



Primeros estudios en la reproducción del mero rojo *Epinephelus morio* bajo condiciones controladas

Claudia Verónica Durruty Lagunes

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



PRIMEROS ESTUDIOS EN LA REPRODUCCION DEL MERO ROJO *Epinephelus morio* BAJO CONDICIONES CONTROLADAS



TESIS DOCTORAL

Claudia Verónica Durruty Lagunes



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

PRIMEROS ESTUDIOS EN LA REPRODUCCION DEL MERO ROJO *Epinephelus morio* BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

CLAUDIA VERONICA DURRUTY LAGUNES

TRABAJO DE TESIS REALIZADO EN:

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACION
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIDAD ACADÉMICA SISAL
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



BECA CONVENIO OTORGADA POR



PRIMEROS ESTUDIOS EN LA REPRODUCCION DEL MERO ROJO *Epinephelus*
morio BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Memoria presentada por:

Claudia Verónica Durruty Lagunes

Para optar por el grado de Doctora en Acuicultura

TRABAJO REALIZADO BAJO LA DIRECCION DE:

Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós

Departament de Fisiología, Facultat de Biología. Universitat de Barcelona.

Dr. Xavier Chiappa Carrara.

Unidad Académica Sisal. Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Araceli Avilés Quevedo.

Centro Regional de Investigación Pesquera La Paz. Instituto Nacional de Pesca, México

Barcelona, 2014

De la mar el mero y de la tierra el cordero.

Refrán popular español



A Manuel,
Rebeca y Verónica

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Carolina y a la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca otorgada para realizar estudios de Doctorado en España.

A la Facultad de Ciencias y a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, por la autorización de las comisiones para realizar estancias en Barcelona.

Al Profesor Emérito Dr. Francesc Castelló i Orvay, por brindarme la posibilidad real de realizar los estudios de Doctorado en España, por las observaciones y dirección de este trabajo así como su disposición y acciones de apoyo en todo este proceso. Por esperar un poco más para concluir su actividad académica.

Al Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós por las observaciones y el apoyo incondicional durante este proceso académico.

A la Dra. Araceli Avilés Quevedo, por ser un ejemplo a seguir y por todo el soporte moral y académico dentro del proyecto.

Al Dr. Xavier Chiappa Carrara, por la confianza en el proyecto y en mi persona, por el soporte financiero y acompañamiento académico.

A la Dra. Gabriela Gaxiola Cortés, por la confianza y el apoyo financiero a través de los proyectos de investigación PAPIIT 220410 y 219713 de la Universidad Nacional Autónoma de México, para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los técnicos Académicos de la UMDI-Sisal:

Al M. en A. Manuel Valenzuela Jiménez por el apoyo técnico para el mantenimiento de los meros en los estanques exteriores, por la donación de camarones para la elaboración del alimento de los peces, por el soporte técnico en los muestreos así como las observaciones al documento final.

A la M. en C. Nancy Herrera Salvatierra por todas las facilidades y apoyo técnico para el procesamiento de las muestras sanguíneas.

A la M. en C. Karla Escalante Herrera por las facilidades y apoyo técnico para el procesamiento de las muestras sanguíneas, por la logística para el transporte y envío del plasma de los meros obtenido durante este trabajo de investigación, así como análisis bacteriológicos de alimento semihúmedo.

A la M. en C. Maribel Badillo Alemán, por la tutoría y apoyo técnico en la histología de las gónadas de los peces, de igual manera por todas las facilidades en la logística de la colecta de gónadas silvestres de mero, así como en el apoyo técnico

para las fotografías de las preparaciones histológicas y participación en los muestreos de los peces.

Al M. en A. Miguel Arévalo López por el apoyo técnico y logístico para el transporte adecuado de las hembras silvestres de mero rojo de alta mar a la Unidad Académica Sisal.

Al Dr. Carlos Maldonado por la elaboración del alimento de mantenimiento utilizado durante este trabajo.

A todos aquellos alumnos y compañeros que participaron de manera activa en los muestreos de los meros realizados para este trabajo: Leonor Espinosa, Annlyn McPhie, Julieta Gamboa, Zzabi Correa, Dalia Cazares, Daniel Olvera, David Zaragoza, Silvia Guzmán, Erick Barrera, Alejandro Schrip, Shirley Pérez, Itzael Cruz, José Luis Conde, Erick Rayo, Abigail Acebedo, Ángel Carrillo, Rebeca Arjona, Eder Mejía, Carlos Mascote, Mariana Uribe, Daniela Santana, Rodrigo González, Karla Sosa, Carlos Castellanos, Aurora Contreras, Arisai Pérez, Emmanuel Colli, Fátima Nuñez, Rebeca Chaay, José Francisco Ramírez y Suemy Lugo.

Al M. en C. Álvaro Hernández Flores, Director del Centro Regional de Investigación Pesquera Yucalpetén, Yucatán del Instituto Nacional de la Pesca y a la Dra. Carmen Monroy, Coordinadora del Proyecto Escama de la misma Institución; por todas las facilidades otorgadas para la colecta de los ejemplares adultos de mero rojo en la embarcación comercial.

A los técnicos del Centro Regional de Investigaciones Pesquera de Yucalpetén; Ing. Kenet Cervera y Edgar Cob por la experiencia compartida y el soporte técnico en la colecta de las hembras silvestres de mero rojo en mar abierto.

A todos y cada uno de los miembros de la tripulación de la embarcación de altura "Anguila" de Progreso, Yucatán. Al Capitán Wilbert Briseño Sánchez, Sr. Víctor Martínez Estrella, Sr. Felipe Ku y Sr. José Puc, por su paciencia e interés en la colecta de las hembras de mero rojo. Además de enseñarme la técnica de captura y la labor que implica la pesquería de esta especie en la Península.

A la Xarxa de Referència de R+D+I en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya, por darme la oportunidad de participar en el Proyecto Mero y aprender con ellos. A Anna Nebot y Pablo Bou por los muestreos, las discusiones y la amistad surgida por un objetivo en común.

Al Dr. Joan Cerdá del laboratorio de Biología Molecular del IRTA-ICM (CSIC) por la oportunidad de aprender formas de trabajo y por el interés y facilidades dentro de su laboratorio para la evaluación de esteroides. Al Dr. François Chauvigne y a la Dra. Cinta Zapater Cardona por la paciencia, asesoría y apoyo técnico en el procesamiento de las muestras de plasma y evaluación de los esteroides.

A la Dra. Mercé Duffort del laboratorio de Biología Celular de la UB por sus valiosas opiniones en las preparaciones histológicas de las gónadas de mero rojo.

A todos los queridos amigos y a toda mi gran familia que siempre estuvieron con nosotros, siempre al pendiente; enviando mensajes de ánimo, apoyándonos incondicionalmente en todo momento, compartiendo la ilusión de este proyecto de vida desde el principio.

A mi familia Catalana. A Marc, Erenia, Ariadna y Bernard, por dejarme compartir todas estas experiencias de los meros, gracias por dejarme ser parte de su historia. De manera especial agradezco a mí querida Carme que con todo su entusiasmo, energía y ese gran corazón y conocimiento, hizo que mi estancia en Barcelona no solo fuera un crecimiento académico, sino también un crecimiento muy humano, feminista, cultural y culinario. Lograron que me sintiera en casa. Moltes gracias.

A mi gran equipo de vida, Manuel, Rebeca y Verónica. Mi punto de partida y mi equilibrio. Porque juntos hemos logrado lo que sola hubiera sido más difícil; porque cada logro de uno de nosotros es un logro de todos; en donde cada uno hizo su parte; algunas veces comprendiendo las ausencias en cumpleaños, graduaciones, clases de manejo y todas esas cosas que importan; otras sonriendo y disfrutando la aventura. Porque nuestras locuras, son de aquellas que no valen la pena curar y porque ahora hemos concluimos una más.

CONTENIDO

AgRADECIMIENTOS	6
Contenido	9
Lista de figuras.....	11
Lista de Tablas	15
Abreviaciones	17
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
INTRODUCCION	20
a) Biología Reproductiva.....	25
b) Pesquería.....	27
OBJETIVOS GENERALES	33
CAPITULO 1.....	34
Determinación del mejor andrógeno (Testosterona y 17 α -Metiltestosterona) en implantes de silicón para la reversión sexual de juveniles de <i>Epinephelus morio</i> de hembra a machos en su periodo reproductivo natural.....	34
INTRODUCCION	35
OBJETIVOS	36
MATERIAL Y METODOS.....	37
a) Captura de Juveniles.....	37
a) Marcaje.....	38
b) Alimentación	38
c) Implantes hormonales.....	39
d) Plasma sanguíneo	41
e) Evaluación de esteroides.....	41
f) Crecimiento y sobrevivencia	42
g) Ecografías	42
h) Histología.....	43
i) Estadística.....	43
RESULTADOS.....	44
DISCUSION.....	51
CONCLUSIONES	61

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
CAPITULO 2.....	70
Evaluación de los cambios de Estradiol, Testosterona y 11-ketotestosterona en sangre de hembras de <i>Epinephelus morio</i> entre dos periodos reproductivos naturales y previamente implantadas con Testosterona y Metilttestosterona.....	70
INTRODUCCION	71
OBJETIVO	73
MATERIAL Y METODOS.....	73
RESULTADOS.....	75
DISCUSION.....	80
CONCLUSION	82
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	83
CAPITULO 3.....	91
Conocer el efecto de dos dosis de MT en la reversión sexual de hembras de <i>Epinephelus morio</i> de hembra a macho en su periodo reproductivo natural.	91
INTRODUCCION	92
OBJETIVOS	93
MATERIAL Y METODO	94
RESULTADOS.....	97
DISCUSION.....	110
CONCLUSIONES	115
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	116
CAPITULO 4.....	119
Estabulación de hembras silvestres de <i>Epinephelus morio</i>	119
INTRODUCCION	120
OBJETIVO	121
MATERIAL Y METODOS.....	122
RESULTADOS.....	123
DISCUSION.....	132
CONCLUSION	136
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	137
CONCLUSIONES GENERALES.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Producción acuícola mundial (en miles de toneladas), de peces marinos en el 2010 (Fuente: FAO, 2012).	21
Figura 2.- Captura de mero (miles de ton) por país a nivel mundial durante el 2000 (Tupper & Sheriff 2002).	21
Figura 3.- Principales países con producción acuícola de meros en el 2000 (FAO, 2002a)	22
Figura 4.- Tendencia de la producción acuícola mundial de meros del año 1991 al 2000 (FAO2002a)	23
Figura 5.- Producción acuícola global de <i>Epinephelus coioides</i> (FAO2012).	24
Figura 6.- Distribución espacial del mero rojo (<i>Epinephelus morio</i> ; Valenciennes, 1828). Tomado de FishBase (2013).	25
Figura 7.- Mero rojo <i>Epinephelus morio</i> mostrando su cambio de coloración	26
Figura 8.- Localización de la península de Yucatán y el banco de Campeche	28
Figura 9.- Producción nacional de mero en peso vivo (toneladas) (CONAPESCA, 2012)	28
Figura 10.- Zona de operación de las flotas pesqueras en el banco de Campeche de febrero 2007 a enero 2008. Tomado de Brulé <i>et al</i> (2009).	29
Figura 11.- Captura de mero (toneladas) en el Estado de Yucatán del año 2002 al 2011 Fuente:(CONAPESCA2011) La flecha indica el año en el que se comenzó a implementar la veda.	31
Figura 12.- Colocación de elastómeros fluorescentes a los meros para su identificación	38
Figura 13.- Incisión ventral para la colocación intraperitoneal del implante de silicona a hembras de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> .	40
Figura 14.- Colocación del implante de silicona a hembras de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> .	40
Figura 15.- Toma de muestra de sangre de arco branquial de mero rojo	41
Figura 16.- Localización de la gónada en meros sometidos a reversión sexual mediante implantes de silicona	43
Figura 17.- Valores de alimento consumido por pez por día (promedio y error estándar) en cada uno de los tratamientos durante los dos periodos en los que se colocaron los implantes.	45
Figura 18.- Índice gonadosomático promedio (IG) y desviación estándar de <i>E. morio</i> antes de colocar el implante (inicial) y después de 60 días de haber colocado el primer implante en enero (MT, T y CT) en cada uno de los tratamientos experimentales. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.	46
Figura 19.- Índice gonadosomático según el peso de los meros. Los colores representan cada tratamiento; verde= MT, azul=CT y rojo=T.	47
Figura 20.- Diámetro (cm) de los lóbulos de la gónada de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> sometidos a tratamientos hormonales e identificados por ultrasonido. Cada tono en las columnas representa el	

diámetro promedio de los dos lóbulos de la gónada de los peces después de 60 días del primer implante.	47
Figura 21.- Gónada de <i>Epinephelus morio</i> después de dos implantes hormonales. A: gónada de los peces antes de colocar los implantes. 40x. B: Tratamiento con Testosterona 10X; C: Tratamiento Control 40X y D: Tratamiento de Metiltestosterona 40 X. POV=ovocitos previtelogénicos; AO = ovocito atrésico; SP=espermatozoides; SPD=espermatozoides.	49
Figura 22.- Niveles promedio y desviación estándar de 11KT (línea azul), E ₂ (línea roja) y T (línea verde) en los meros con implantes de MT, implantes de T e implantes CT. El tiempo indica el número de días transcurridos después de la colocación del primer implante. El eje secundario representa la concentración de T también en pg ml ⁻¹ . Las flechas señalan el momento en el que se colocaron los implantes.	50
Figura 23.- Representación del ciclo reproductivo del mero rojo y su relación con el Índice gonadosomático y los niveles de esteroides en plasma de acuerdo a lo reportado por Brulé <i>et al</i> , (1999) y Johnson <i>et al</i> (1998).	71
Figura 24.- Colocación de PITS Tags (Biomark HPT8 134.2) en el mero rojo <i>E. morio</i>	73
Figura 25.- Valores de oxígeno disuelto, temperatura, salinidad y pH registrados durante la temporada no reproductiva de mero rojo <i>E. morio</i>	76
Figura 26.- Consumo promedio de alimento por día del mero rojo <i>E. morio</i> (barras azules; g promedio alimento pez ⁻¹ ± desviación estándar) y peso promedio de los peces (rombos amarillos; g ± desviación estándar) durante el periodo de mantenimiento. El eje secundario representa el peso vivo de los peces.	77
Figura 27.- Valores promedio (pg ml ⁻¹ ± desviación estándar) de esteroides en meros entre dos periodos reproductivos (2012 y 2013) y tratados previamente con dos implantes CT, T y MT respectivamente. La línea color verde representa a la Testosterona, línea roja Estradiol y línea azul a la 11KT. El eje secundario representa la concentración de T también en pg ml ⁻¹ . Las letras indican diferencias significativas entre las hormonas	79
Figura 28.- Registro de temperatura promedio, máximos y mínimos por mes en el agua de los tanques de experimentales de <i>Epinephelus morio</i> durante la reversión sexual y el mantenimiento. Las líneas punteadas indican la temporada reproductiva de la especie.	97
Figura 30.- Gramos promedio de alimento semihúmedo ingerido por el mero rojo <i>E. morio</i> con tres implantes de MT (barras amarilla) para la reversión sexual y con implantes CT (barras verde).	99
Figura 31.- Consumo promedio de alimento por pez por día de dos meros con implantes con MT y una hembra con implante CT dentro de un mismo tanque.	100
Figura 32.- Ovocitos inmaduros de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> obtenidos por canulación de peces con implantes sin hormonas a los 60 y 90 días después del primer implante. Foto a 10X (A) y 40X (B). OV= ovocito	101
Figura 33.- Muestra en fresco de gónada obtenida por canulación de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> con dos implantes de 17 alfa metiltestosterona (5 mg kg ⁻¹) a los 60 días después de la colocación del primer implante. Foto a 10X (A) y 40X (B y C). ESP= espermatogonias, OV=ovocito,	102

Figura 34.- Muestra en fresco de gónada obtenida por canulación de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> con tres implantes de 17 alfa metiltestosterona (7.5 mg kg^{-1}) a los 90 días después del primer implante. Foto a 10X (A) y 40X (B).	103
Figura 35.- Corte histológico de la gónada de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> revertido con tres implantes de MT a 10 X (A) y 40X (B). SP=cabezas de espermatozoides, ES=espermatoцитos primarios o secundarios, OD=reminiscencias de ovocitos degenerados.	104
Figura 36.- Concentración promedio y error estándar de 11KT (barra color azul), E_2 (barra color naranja) y T (línea verde) en <i>Epinephelus morio</i> con implantes de MT e implantes CT. El eje secundario representa la concentración de Testosterona también en pg ml^{-1}	106
Figura 37.- Esteroides evaluados en un mero de 1300 g de peso y 43.88 cm de LT sometido a tres implantes de MT. El eje secundario representa la concentración de Testosterona (línea verde) también en pg ml^{-1} . Barra naranja representa al estradiol y la barra azul a la 11ketotestosterona. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante. Las flechas indican el momento cuando se colocaron los implantes.	107
Figura 38.- Niveles promedio y error estándar de esteroides que presentó el mero rojo <i>Epinephelus morio</i> durante dos temporadas reproductivas sin implantes de 11 metiltestosterona. El eje secundario (también en pg ml^{-1}) representa la concentración de Testosterona (línea verde). Línea naranja representa al estradiol y la azul a la 11ketotestosterona. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante en enero 2013. Los rectángulos en el eje X indican los meses de colocación de implantes.....	107
Figura 39.- Niveles promedio y error estándar de esteroides que presentaron ejemplares de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> durante dos temporadas reproductivas con implantes de 11 metiltestosterona. El eje secundario (también en pg ml^{-1}) representa la concentración de Testosterona (línea verde). Línea naranja representa al estradiol y la azul a la 11ketotestosterona. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante en enero 2013. Los rectángulos en el eje X indican los meses de colocación de implantes.....	108
Figura 40.- Niveles promedio y error estándar de esteroides que presentaron ejemplares de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> con implantes de 17 α metiltestosterona. Testosterona (línea verde). Estradiol columna naranja y 11ketotestosterona barra azul. A=machos, B=hembra. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante en enero 2013.	109
Figura 41.- Ejemplo de hembra silvestre de <i>Epinephelus morio</i> de 2 900 g y 56.5 cm LF capturada en febrero del 2013 en el Banco de Campeche.	124
Figura 42.- Señales de descompresión que sirvieron para descartar a los meros durante la captura.	124
Figura 43.- Gónada de hembra de 64,6 cm LF y 4000 g de peso capturada durante el mes de febrero de 2013. A.-gónada en fresco, B.- Frotis en fresco a 10x en microscopía óptica, C.-Corte transversal de la gónada con tinción H-E. 40X.....	130
Figura 44.- Macho silvestre de <i>Epinephelus morio</i> . (A) Corte histológico H-E de gónada a 20x de 69 cm de LF y 4700 g de peso. (B) Concentraciones de esteroides que corresponden a ese estadio de	

desarrollo del testículo de ese macho al momento de la captura. SP= espermatocitos primarios;
ES=espermatocitos secundarios; OV ovocitos residuales. 131

Figura 45.- Hembra silvestre de *Epinephelus morio*. (A) Corte histológico de la ovario una hembra
silvestre de *Epinephelus morio* en estadio vitelogénico y las concentraciones de esteroides (B) de ese
estadio de desarrollo. Los valores de E₂ fueron superiores a 5000 pg ml⁻¹. 132

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Composición de la dieta utilizada para <i>Epinephelus morio</i> durante el periodo de mantenimiento y bioensayo 1. Formulación de la Dra. Gabriela Gaxiola.....	39
Tabla 2.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos en tanques de juveniles de <i>E. morio</i> durante la aclimatación y reversión sexual de hembra a macho con implantes de Testosterona y 17alfa-metiltestosterona con silicona.	44
Tabla 3.- Valores de peso (g) y talla (cm) del mero rojo <i>E. morio</i> en cada unidad experimental antes de la colocación de los implantes (enero 2012) y al final del bioensayo (marzo 2012). CT=control, T=Testosterona, MT1=Metiltestosterona tanque 1 y MT2= Metiltestosterona tanque 2.	46
Tabla 4.- Aplicación de hormonas para reversión sexual de distintas especies de mero del género <i>Epinephelus</i>	57
Tabla 5.- Niveles de esteroides registrados para distintas especies de <i>Epinephelus</i> silvestres de acuerdo a su estadio de madurez. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E ₂ y 11KT están expresados en pg ml ⁻¹	58
Tabla 6.- Niveles de esteroides registrados para distintas especies de <i>Epinephelus</i> de acuerdo a su estadio de madurez. Los peces han sido mantenidos en cautividad por lo menos un año. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E ₂ y 11KT están expresados en pg ml ⁻¹	59
Tabla 6.- Continuación. Niveles de esteroides registrados para distintas especies de <i>Epinephelus</i> de acuerdo a su estadio de madurez. Los peces han sido mantenidos en cautividad por lo menos un año. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E ₂ y 11KT están expresados en pg ml ⁻¹	60
Tabla 7.- Condición experimental durante el segundo año de reversión inducida del mero rojo <i>Epinephelus morio</i> . Los pesos y talla de los peces son valores promedio y error estándar.	94
Tabla 8.- Composición de dieta de reproducción empleada para bioensayos de reversión sexual del mero rojo <i>Epinephelus morio</i>	95
Tabla 9.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos evaluados en tanques de <i>E. morio</i> durante la reversión sexual a macho con implantes de silicona.	97
Tabla 10.- Relación de talla y peso promedio y desviación estándar de los meros al inicio (diciembre 2012) y término (febrero o marzo 2013) del bioensayo. Δ=incremento.	98
Tabla 11.- Niveles de esteroides para <i>Epinephelus morio</i> . Los valores en las poblaciones silvestres hacen referencia al pico de reproducción. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E ₂ y 11KT están expresados en pg ml ⁻¹ . El * indica datos de un solo pez de cada sexo.	112
Tabla 12.- Datos morfométricos de <i>Epinephelus morio</i> silvestres aclimatados al laboratorio.....	129

Tabla 13.- Concentración individual de esteroides (pg ml ⁻¹) de <i>E. morio</i> silvestres llevados al laboratorio para la conformación de un stock de reproductores, así como el valor promedio y error estándar de todos los peces para cada esteroide.....	130
Tabla 14.- Datos morfométricos de reproductores silvestres de <i>Epinephelus morio</i> muestreados en el barco (datos proporcionados por el CRIP Yucalpetén) y sus correspondientes valores de esteroides. Los ** indican valor superior a 5000 pg ml ⁻¹	131
Tabla 15.- Valores de esteroides (pg ml ⁻¹) de organismos silvestres de mero rojo <i>Epinephelus morio</i> revertidos sexualmente a macho a partir de implantes de 17 alfa metilttestosterona y organismos adultos silvestres. Observaciones a 40X excepto la de la hembra silvestres que es a 20X. ET= Transición temprana, LT= Transición tardía. H=Hembra, M=Macho.....	135

ABREVIACIONES

11KT	11 keto-testosterona
BSA	Bovin Serum Albumine
CT	Tratamiento control
DMSO	Dimetilsulfóxido
E₂	Estradiol
H	Hembras
LF	Longitud furcal
LHRH	Hormona liberadora de Gonadotropina
LT	Longitud total
M	Machos
MDHT	17- alfa-metildihidrotestosterona
ml	mililitro
MT	17- alfa-metiltestosterona
ng	nanogramos
pg	Picogramos
PV	Peso Vivo
T	Testosterona
UAS	Unidad Académica Sisal
UMDI	Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación
ups	Unidades prácticas de salinidad

RESUMEN

El mero rojo *Epinephelus morio* es una especie hermafrodita protógino en peligro de extinción en el Sureste del Golfo de México y Caribe mexicanos debido a la pesca. La reversión sexual es una práctica común en acuicultura para la obtención de machos de pequeña talla para resolver la reproducción en cautividad. Se utilizaron implantes silásticos de 17 alfa metiltestosterona (MT) (2.5 mg kg^{-1}) y Testosterona (T) (1.0 mg kg^{-1}) para determinar mejor esteroide para la reversión sexual de hembras inmaduras a machos y posteriormente dosis total de 5.0 y 7.5 mg kg^{-1} de MT en un segundo año reproductivo consecutivo. Se evaluó el crecimiento, consumo de alimento, histología de la gónada, concentraciones de T, 11 keto testosterona (11KT) y estradiol (E_2) en plasma sanguíneo en cada condición experimental y durante un año en cautividad. Sólo la MT logró la transición tardía de los meros de 433 g promedio y 31.6 cm LF por primera vez. La dosis de 7.5 logró un mayor avance en la reversión sin embargo en ninguno de los casos se obtuvo esperma por masaje abdominal. Los niveles hormonas de los peces durante la reversión sexual mostraron niveles de T por encima de los de 11KT y E_2 . La T osciló entre 326 a $647.15 \text{ pg ml}^{-1}$, la 11KT 100.36 a 334 mg kg^{-1} y E_2 110 a $401.07 \text{ mg kg}^{-1}$. La relación entre estas concentraciones hormonales cambia según el avance de desarrollo del testículo. La reversión sexual por segundo año consecutivo estimuló a la disminución de las concentraciones de Estradiol en sangre e incrementó los de 11 metiltestosterona. Se logró estabular un grupo de 14 ejemplares de mero rojo de organismos adultos silvestres y revertidos a macho en laboratorio.

ABSTRACT

The red grouper *Epinephelus morio* is a protogynous hermaphrodite species endangered in the southeast of the Gulf of Mexico and Mexican Caribbean due to fishing. Sex reversal is a common practice in aquaculture to produce small-sized males. Silastic implants of 17 alpha methyltestosterone (MT) (2.5 mg kg⁻¹) and Testosterone (T) (1.0 mg kg⁻¹) were used to determine the best steroid for sex reversal of immature males to females and later total dose of 5.0 and 7.5 mg kg⁻¹ of MT in the second reproductive year. Growth, feed intake, gonad histology, concentrations of T, 11 keto testosterone (11KT) and estradiol (E₂) in blood plasma in each experimental condition and for a year in captivity was evaluated. Only the MT achieved late transition from grouper of 433 g and 31.6 cm LF for the first time. The dose of 7.5 achieved further progress in reversing but in neither case was obtained sperm by stripping. T showed levels of above 11KT and E₂ in sexual reversion. The T was from 326 to 647.15 pg ml⁻¹, the 11KT 100.36 to 334 mg kg⁻¹ and the E₂ 110 to 401.07 mg kg⁻¹. The relationship between these hormone levels change according to the progress of development of the testis. Sex reversal for the second year spurred the decline in blood concentrations of estradiol and increased 11-methyltestosterone. A broodstock group of 14 red grouper of wild adult and reversal male in laboratory was formed.

INTRODUCCION

1. Piscicultura Marina

El pescado y los productos pesqueros son una fuente valiosa de nutrientes de gran importancia para una alimentación diversificada y saludable. El pescado normalmente tiene un bajo contenido de grasas saturadas, carbohidratos y colesterol, proporciona proteínas de elevado valor además de una gran variedad de micronutrientes esenciales como vitaminas (D, A y B), minerales (calcio, yodo, zinc, hierro y selenio) y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (el ácido docosahexaenoico y el ácido eicosapentaenoico).

El pescado y los productos pesqueros son los alimentos básicos más comercializados del mundo y para muchos países y regiones costeras estas exportaciones pesqueras son esenciales para su economía (FAO, 2012).

Se sabe que hay una tendencia general a nivel mundial a una ligera disminución de la productividad de pesca de extracción y que la acuicultura ha aumentado de manera significativa (47% de la producción pesquera para consumo humano en 2010) convirtiéndose en una solución para la producción de alimentos (FAO, 2012).

La acuicultura no sólo tiene implicaciones en la producción de alimento humano; también incluye la producción de cebo vivo para la pesca, la alimentación de otros organismos en cultivo (producción de biomasa de plancton, por ejemplo) o la producción de organismos ornamentales; así mismo, puede ser una alternativa para pesquerías afectadas por la sobreexplotación.

La acuicultura incrementa también las fuentes de empleo en algunas zonas; por ejemplo, para América Latina de 2000 a 2010, se incrementó en un 2.6 % anual el número de piscicultores. Aunque no se hace una distinción de sexos, se estima que a nivel mundial en el 2010 el 15% de las mujeres participaron en el sector primario y hasta un 90% en actividades secundarias como la elaboración (FAO, 2012). Además, de la misma manera que la pesca, la acuicultura ha generado puestos de trabajo en actividades auxiliares como envasado, comercialización, fabricación de equipos, suministro de hielo o investigación, entre otros.

Para 2010, según el Informe de la FAO (2012), se incrementó en 541 el número de especies acuáticas cultivadas en todo el mundo, en diversos sistemas e instalaciones de cultivo en agua dulce, salobre y marina, de las cuales el 60.4% fueron peces de escama. Asimismo, este organismo cita que la producción mundial de cultivo de peces marinos aumentó a una tasa media anual del 9.3% de 1990 a 2010 (siete veces más rápido que la de los moluscos), y que actualmente esta

producción mundial de piscicultura marina se compone principalmente de jureles y pámpanos, dentones y lubinas, sciánidos, serránidos y lizas (Figura 1).

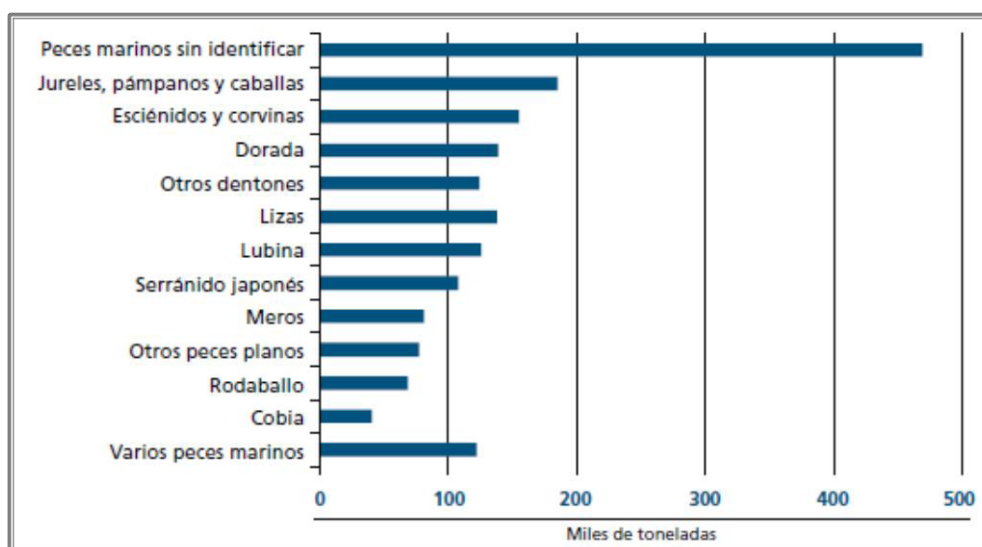


Figura 1.- Producción acuícola mundial (en miles de toneladas), de peces marinos en el 2010 (Fuente: FAO, 2012).

Los meros a nivel mundial tienen gran importancia económica por lo que son capturados en distintas regiones del mundo (Figura 2) donde México encabeza la lista en el Continente Americano.

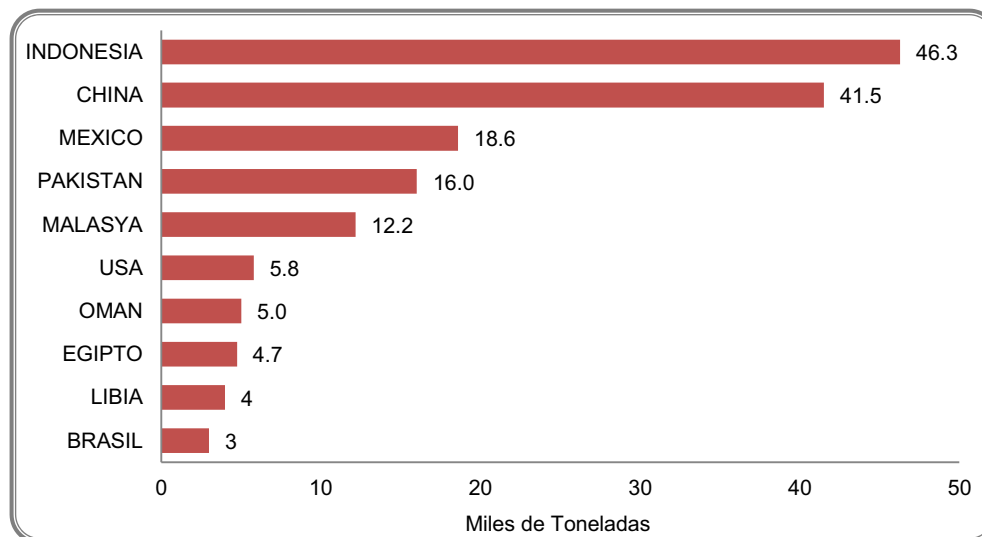


Figura 2.- Captura de mero (miles de ton) por país a nivel mundial durante el 2000 (Tupper and Sheriff, 2002)

Los peces de la familia Serranidae, son altamente apreciados por la calidad de su carne y el alto precio de mercado, lo que ha ocasionado la sobreexplotación pesquera de las especies de mayor valor comercial en muchas áreas, mostrando señales de disminución en los volúmenes de pesca. Una gran proporción de los meros del mundo, son capturados por las pesquerías artesanales, que aunque son

de bajo impacto, afectan adversamente el stock, de la misma manera que la pesca recreacional, por ejemplo en Florida, se captura del 25 al 35% de la captura total del estado (Morris, Roberts y Hawkins, 2000 citado en Ottolenghi *et al.* 2004).

Actualmente, se cultivan dieciséis especies de meros en el este y sureste de Asia: en China, Hong Kong y Provincia China de Taiwán, Malasia, Indonesia, Filipinas, Singapur, Tailandia y Vietnam (Sim *et al.*, 2005). Las toneladas producidas por estos países durante el 2000 (FAO, 2000) se muestra en la Figura 3.

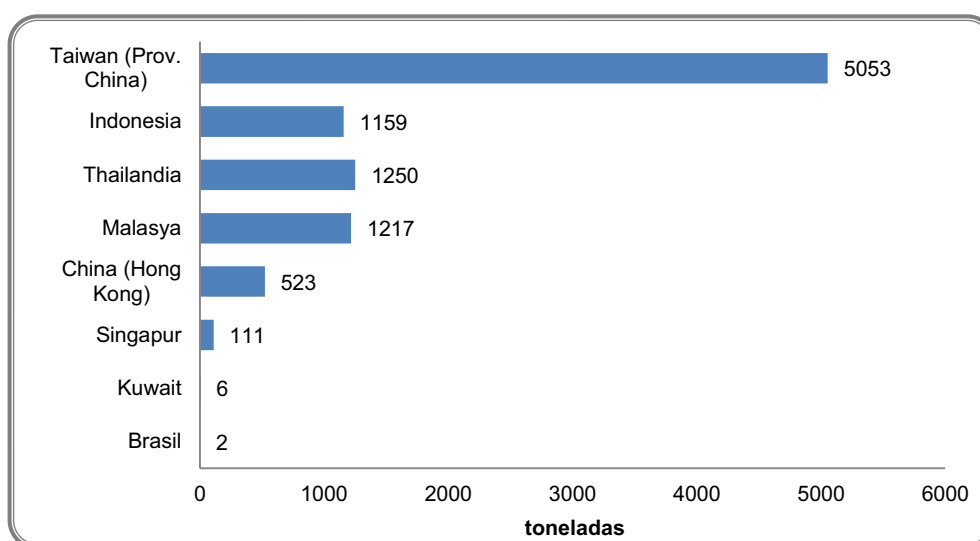


Figura 3.- Principales países con producción acuícola de meros en el 2000 (FAO, 2002a)

En el año 2000, FAO (2002a) reportó una producción acuícola de meros de 9300 toneladas (Figura 4) y en el 2010 (FAO, 2012) menciona una producción acuícola de 82,000 toneladas.

Las principales especies cultivadas son el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*; Hamilton, 1822) y el mero malabar (*E. malabaricus*; Bloch y Schneider, 1801). Otras especies importantes son el mero cola oscura (*E. bleekeri*; Vaillant, 1878), el mero de Hong Kong o pintas rojas (*E. akaara*; Temminck y Schlegel, 1842), el mero amarillo (*E. awoara*; Temminck & Schlegel, 1842), y el mero areolado (*E. areolatus*; Forsskål, 1775). También son cultivados en menor cantidad el mero de banda (*E. amblycephalus*; Bleeker 1857), el mero café jaspeado (*E. fuscoguttatus*; Forsskål, 1775), el mero gigante o de Queensland (*E. lanceolatus*; Bloch, 1790), el mero seis barras (*E. sexfasciatus*; Cuvier and Valenciennes, 1828), el mero tres manchas (*E. trimaculatus*; Valenciennes, 1828), el mero aleta larga “longfin grouper” (*E. quoyanus*; Valenciennes, 1830), el mero diente largo (*E. brunneus*; Bloch, 1793), el mero jorobado (*Cromileptes altivelis*; Valenciennes, 1828), el mero leopardo o “leopard coraltrout” (*Plectropomus leopardus*; Lacepède, 1802) y el mero manchado (*P. maculatus*; Bloch, 1790).

En América, en el sureste de USA, Caribe y Brasil, se encuentran algunas especies de meros con buen potencial para el cultivo como el mero de Nassau o estriado (*E. striatus*; Bloch, 1792), el mero gigante (*E. itajara*; Lichtenstein, 1822), el mero gag (*Mycteroperca microlepis*; Goode and Bean, 1880) y el mero negro (*M. bonaci*; Poey, 1860) (Tucker, 1999).

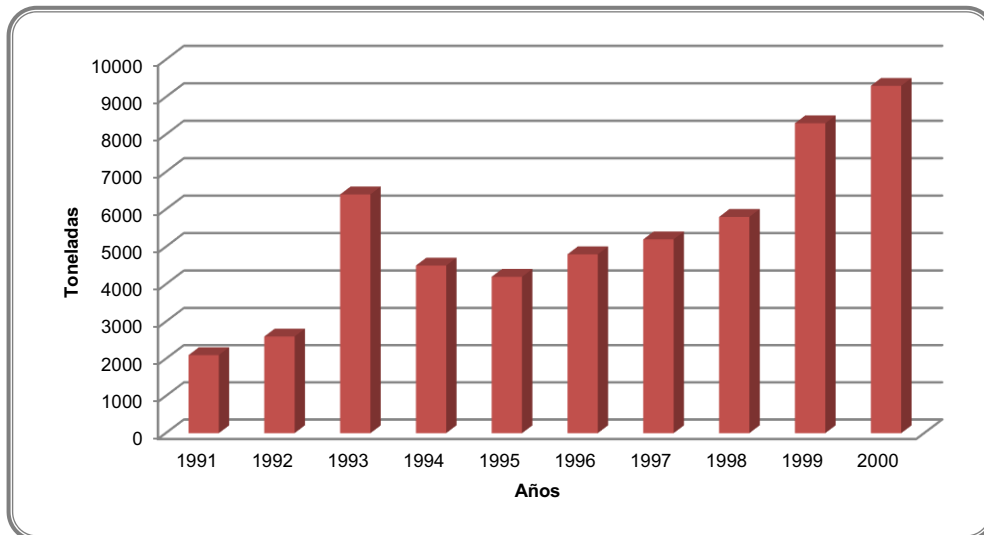


Figura 4.- Tendencia de la producción acuícola mundial de meros del año 1991 al 2000 (FAO2002a)

Actualmente el cultivo de los meros, está clasificado por la FAO dentro de la Acuicultura Basada en la Captura (Ottolenghi et al., 2004), ya que tradicionalmente los cultivos se inician con la engorda de juveniles silvestres, alimentados con restos de pescado (Tupper and Sheriff, 2008) aunado a prácticas de conducta y ordenamiento cuestionables de lo cual se derivan serios problemas ambientales y pesqueros (Ottolenghi et al., 2004). En la actualidad, se está sustituyendo poco a poco la dieta de pescado fresco por piensos secos para reducir la presencia de enfermedades y mejorar la calidad de agua (Sim et al., 2005). Asimismo, hoy día, existen centros de producción de crías (algunas de las cuales han cerrado el ciclo) y el engorde se realiza en jaulas y tanques (Pomeroy et al., 2002; Sadovy, 1996) volviéndose una práctica muy común en los países asiáticos.

De acuerdo a la FAO (Shams, 2010), la producción del *E. coioides* en Asia comienza a registrarse a partir del año 1999 (Figura 5) y aunque hay una tendencia a incrementar, la disminución en los últimos años quizás sea debido a una combinación de factores como falta de alevines, enfermedades, calidad de agua, fenómenos naturales y/o falta de un alimento balanceado (Pomeroy et al., 2002).

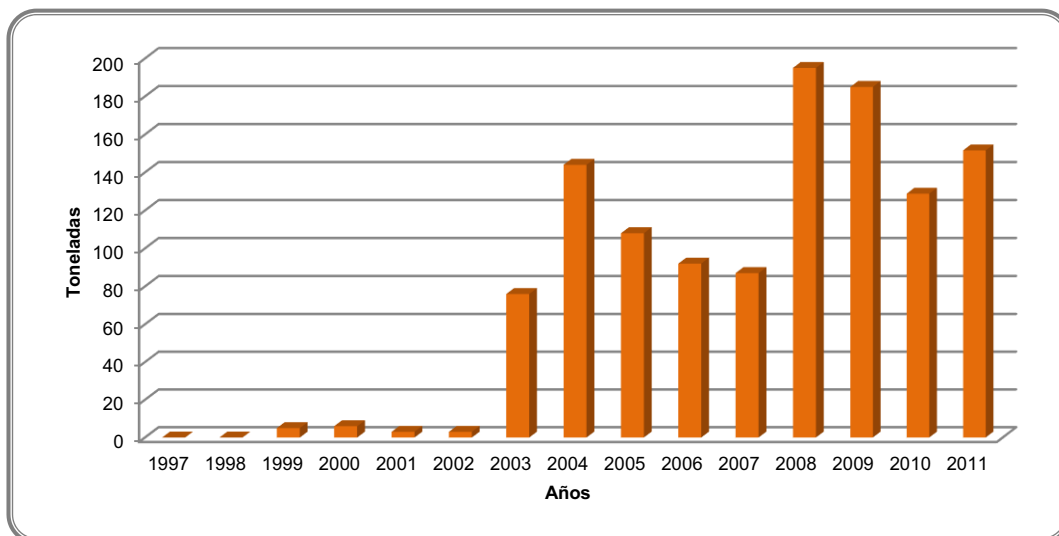


Figura 5.- Producción acuícola global de *Epinephelus coioides* (FAO2012).

Considerando entonces que los meros tienen potencial para el cultivo será importante desarrollar esta actividad en aquellas especies regionales que tengan impacto económico y social, más aún si el esfuerzo pesquero está afectando drásticamente las especies.

2. *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828)

Epinephelus morio pertenece a la Familia *Serranidae*; subfamilia *Epinephelinae*, tribu *Epinephelini* (groupers), género *Epinephelus*; uno de los de mayor importancia en cuanto al número de especies presentes (Brulé et al., 2004; Tucker, 1999). Estos peces son demersales que prefieren arrecifes coralinos y zonas rocosas; o suelos limo arcillosas en el caso de Florida (Johnson et al., 1998). Los adultos se localizan a menos de 100 m de profundidad y no presentan un dimorfismo sexual externo notorio (Brulé et al., 2004).

Son peces carnívoros oportunistas, sedentarios que capturan sus presas mediante emboscadas (Parrish, 1987). Los adultos se alimentan de una dieta variada, pero comúnmente incluyen peces lutjánidos y espáridos, cangrejos xánthidos y portúnidos, langostas espinosas y camarones que capturan desde las zonas de aguas someras hasta fondos ubicados entre 400 y 500m de profundidad, mientras que los juveniles consumen más crustáceos y pueden localizarse en zonas de pastos (Brulé et al., 2004).

Epinephelus morio es un pez tropical comúnmente conocido como mero rojo, cherna yucateca, cherna americana, mero guasa o red grouper. Se distribuye en el Océano Atlántico (Figura 6) desde Massachusetts, Estados Unidos hasta Rio de Janeiro,

Brasil, incluyendo el Golfo de México, el Caribe y Bermuda (Fishbase, 2013; McGovern et al., 2002).



Figura 6.- Distribución espacial del mero rojo (*Epinephelus morio*; Valenciennes, 1828). Tomado de FishBase (2013).

a) Biología Reproductiva

Epinephelus morio (Figura 7) es un pez hermafrodita protógino secuencial, es decir, madura primero como hembra al menos una vez, y después como macho el resto de las veces (Brulé et al., 1999). Son animales muy longevos, presentan un crecimiento lento, bajas tasas de mortalidad natural y madurez tardía (Coleman et al., 1996).



Figura 7.- Mero rojo *Ephinephelus morio* mostrando su cambio de coloración

Según la distribución espacial en el Golfo de México, las poblaciones de *E. morio* pueden presentar periodos de reproducción desfasados. Brulé *et al.* (1999) reportaron que para la región Sur, el mero se reproduce de enero a marzo, mientras que en la región Este, la época es de marzo a mayo (Collins *et al.*, 2002; Moe, 1969).

Las hembras del Sur del Golfo de México comienzan a madurar a los 54.5 cm de LF y los machos a partir de los 75.3 cm de LF (Brulé *et al.*, 1999); mientras que en el Este, Moe (1969) reportó tallas de 48.5 cm LF para las hembras y de 51 a 73 cm LF para los machos.

Las hembras se localizan cerca o lejos de la costa existiendo una diferencia en relación de las tallas donde abundan. En zonas alejadas a la costa (25 a 90 m de profundidad), se encuentran las hembras de mayor talla y por lo tanto aquellas maduras durante la temporada de reproducción (Brulé *et al.*, 1999).

Por otra parte, los machos solo pueden localizarse a grandes profundidades y por lo general, son más grandes que las hembras. La proporción de sexos (M:H) en la población se modifica con la clase de talla, siendo las tallas pequeñas dominadas por las hembras (30 cm LT proporción 1:31.5) y a partir de 72 cm de LF la proporción es 1:1 (Brulé et al., 1999; Giménez et al., 2003).

Durante el periodo de reproducción, los adultos liberan sus gametos en el lugar de residencia habitual o bien en áreas de desove específicas después de haber efectuado una migración. Para *E. morio* no se reporta agregación para la reproducción, como sucede con algunas otras especies de mero (Brulé et al., 1999) y hasta ahora no se ha podido establecer una relación entre la fase lunar y los desoves, sin embargo se han capturado hembras y machos maduros próximos a luna llena y cuarto menguante (Zetina et al., 1996).

Los meros se caracterizan por su capacidad para producir un número elevado de ovocitos (Shapiro, 1987). Para *E. morio* se ha establecido una fecundidad relativa (número de óvulos en gónadas maduras por unidad de masa del cuerpo del pez) de 102.6 y 573.5 huevos g⁻¹ (Giménez et al., 2003).

Los juveniles, individuos que han completado la metamorfosis, viven en hábitat bentónico y son sexualmente inmaduros, viven cerca de la costa en aguas poco profundas en zonas rocosas (Renan et al., 2003) donde se alimentan y protegen de depredadores (Jory e Iversen, 1989 en Renan et al, 2003).

b) Pesquería

Las especies más abundantes en las capturas comerciales realizadas en el Banco de Campeche (Figura 8) son esencialmente: *Epinephelus morio*, *Mycteroperca microlepis*, *M. phenax* y *M. bonaci* siendo el primero el que muestra mayor presión pesquera comercial y recreativa (Brulé and Déniel, 1996; Brulé and Rodriguez-Canché, 1993; Burgos et al., 2008; Caballero-Arango et al., 2010; Giménez et al., 2003; Johnson et al., 1998) lo cual impacta en ámbitos ecológicos, económicos y sociales de la región.



Figura 8.- Localización de la península de Yucatán y el banco de Campeche

Según datos del Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011 (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2012) el Estado de Yucatán es donde se realiza la mayor captura de meros a nivel nacional (76%) (Figura 9). Este recurso se pesca durante todo el año y en el otoño el esfuerzo pesquero se reduce debido a que parte de la flota se dedica a la explotación de pulpo (Burgos, 1999).



Figura 9.- Producción nacional de mero en peso vivo (toneladas) (CONAPESCA, 2012)

Para la pesca de meros en Yucatán, se utilizan tres tipos de flotas: la flota artesanal o flota menor que captura organismos juveniles (de 1 a 3 años de edad) desde la

orilla hasta las 36.58 metros de profundidad. La flota de mediana y la de mayor altura (Incluyendo a la flota cubana) que capturan, organismos reproductores a profundidades de hasta 200 metros, Carta Nacional Pesquera (DOF, 2012). En la Figura 10, puede verse como se distribuyen las embarcaciones para la pesca de meros (Brulé et al., 2009).

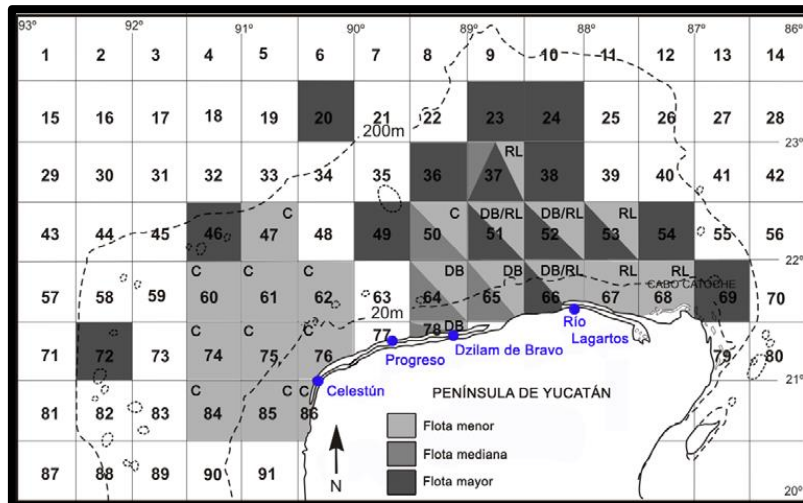


Figura 10.- Zona de operación de las flotas pesqueras en el banco de Campeche de febrero 2007 a enero 2008. Tomado de Brulé et al. (2009).

A nivel nacional aproximadamente el 60% del pescado desembarcado por la flota de mediana altura y el 54% de la flota artesanal es mero rojo Carta Nacional Pesquera (DOF, 2007). Ésta es una pesquería que genera empleos, capta divisas por exportaciones, contribuye al desarrollo regional y al crecimiento de la infraestructura pesquera (Burgos et al., 2008).

Los meros pueden ser particularmente sensibles al impacto producido por la actividad pesquera (Coleman et al., 2000) ya que presentan un crecimiento lento, una madurez sexual tardía y una gran longevidad.

Debido a la presión pesquera en distintas etapas del ciclo de vida de la especie (juveniles y adultos) la producción por pesca se ha visto mermada presentando síntomas de sobreexplotación (Brulé et al., 2009; Burgos and Defeo, 2004; Burgos et al., 2008; Caballero-Arango et al., 2010).

El mayor esfuerzo de pesca ejercido sobre un stock, está dirigido de manera selectiva hacia los individuos más grandes en talla y edad, que generalmente son los organismos adultos aptos para la reproducción (Coleman et al., 2000; Ralston, 1987). Por todo lo anterior, esta pesquería está considerada con el estatus de pesquería en deterioro, por lo que se recomienda disminuir el esfuerzo pesquero actual al nivel que permita recuperar el rendimiento de los años 80 (DOF, 2012).

Los efectos de la presión de pesca de esta especie, se han visto reflejadas en la reducción de la captura (Burgos et al., 2008) cambios en las estrategias de reproducción de la especie (Caballero-Arango et al., 2010) y cambios en la proporción de sexos (Giménez et al., 2003). De hecho Arreguín- Sánchez *et al.* (1996) mencionan que es un recurso que se ha explotado a su máxima capacidad biológica.

En el caso particular de las especies de mero con hermafroditismo protógino (como *E. morio*), la captura selectiva de los individuos más grandes puede también conducir a una reducción paulatina del número de machos presente en el stock explotado y, en caso extremo, provocar un déficit en la cantidad de gametos masculinos necesarios para la fertilización de los ovocitos producidos por las hembras durante el periodo de reproducción (Bannerot et al., 1987). Estos estudios de biología reproductiva han dado la pauta para la gestión del recurso mediante la aplicación de un manejo de tipo convencional (manejo pesquero) o de tipo no-convencional (manejo conservativo) (Brulé et al., 2004).

Actualmente *E. morio* es una especie catalogada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN, por sus siglas en inglés) dentro de la lista roja como una especie próxima a ser amenazada (NT, near threatened), es decir, que sus poblaciones podría estar amenazada en un futuro cercano (García-Moliner and Eklund, 2004).

Dentro del manejo de tipo convencional para esta pesquería se ha implantado una veda desde el año 2003, la cual se aplica anualmente desde el 15 de febrero al 15 de marzo. También se han establecido artes de pesca, talla mínima de captura y permisos finitos para embarcaciones (Brulé et al., 2004; Burgos et al., 2008). Estrategias que no han funcionado del todo después de 9 años. Si se observa la figura 11 puede apreciarse que no se ha incrementado la captura como se esperaba después de la implantación de la veda (flecha dentro del gráfico) y que la vigilancia para el cumplimiento del resto de las medidas no ha sido fácil.

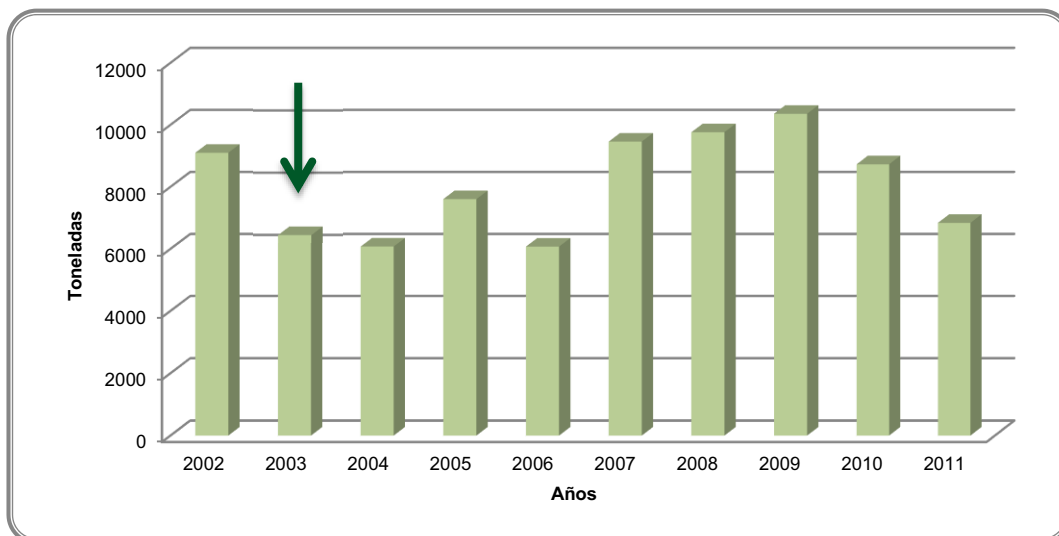


Figura 11.- Captura de mero (toneladas) en el Estado de Yucatán del año 2002 al 2011
Fuente:(CONAPESCA2011) La flecha indica el año en el que se comenzó a implementar la veda.

Otra opción, es la aplicación de medidas no convencionales como la adopción de prácticas de pesca menos dañinas o destructivas, las operaciones de repoblación con crías procedentes de la acuicultura, la restauración de hábitat o su modificación (Bohnsack and Ault, 1996) y el establecimiento de áreas marinas protegidas (Almary et al., 2013). De esta manera la acuicultura bien puede representar una buena opción complementaria para la gestión de los recursos naturales y para lograrlo se deberá resolver la producción de crías en laboratorio.

3. Reversión sexual

Los peces regulan su reproducción a través del sistema neuroendocrino. Los receptores sensoriales perciben los estímulos ambientales y son transportados a la hipófisis mediante neurohormonas, principalmente de origen hipotalámico, que a su vez controlan y modulan la síntesis y liberación de las hormonas gonadotropas o gonadotrofinas.

Las gonadotrofinas (FSH y LH) sintetizadas en la adenohipófisis, son las responsables de que tenga lugar la ovogénesis y la espermatogénesis a través de su acoplamiento a receptores de membrana específicos localizados en las células foliculares del ovario y en las células de Leydig y Sertoli en el testículo. Una vez en la gónada, éstas sintetizarán esteroides (estrógenos y andrógenos respectivamente) y entonces éstos producirán los gametos (Zanuy et al., 2009).

El testículo de los peces teleósteos está constituido por dos compartimentos, el lobular y el intersticial. El primero lo constituyen los espermatoцитos formados por células germinales y células de Sertoli que las engloban y rodean. En el segundo se localizan las células de Leydig responsables de la producción de esteroides

gonadales. En los machos, durante el proceso de espermatogénesis, ambas gonadotrofinas estimulan la producción testicular de 11-cetotestosterona (11KT) *in vitro* (Planas, 1995).

El fenómeno del cambio de sexo se da sólo en peces hermafroditas secuenciales como consecuencia de factores estimulantes o a la desaparición de factores inhibidores (Ross, 1990; Warner, 1988). En cualquier caso, el cerebro integra los estímulos ambientales que dirigen el cambio de sexo en las gónadas (Francis, 1992). El mecanismo por el cual la gónada recibe la información aún no ha sido determinado, pero es muy probable que implique a las gonadotrofinas hipofisarias (FSH y LH) y a sus respectivos receptores en las gónadas (Piferrer, 2009).

En todos los vertebrados, los esteroides sexuales (progestágenos, andrógenos y estrógenos) son los productos de secreción más importantes de las gónadas si se considera la concentración que pueden alcanzar en el plasma (Borg, 1994). Para la diferenciación sexual (proceso mediante el cual una gónada indiferenciada se transforma en un ovario o testículo) andrógenos y estrógenos son los relevantes, ya que los andrógenos masculinizan y los estrógenos feminizan (Piferrer, 2009).

Los esteroides sexuales se sintetizan a partir del colesterol dentro de la mitocondria mediante la acción de enzimas esteroidogénicas. En un principio se consideró que la abundancia entre estrógenos y andrógenos producían la diferenciación, ahora se sabe que esta proporción depende de la enzima citocromo P450 aromatasa (aromatasa, P450arom, cyp19a o cyp19a1) y que ésta es esencial para la diferenciación sexual de hembras (Piferrer *et al.* 1994; Piferrer, 2009).

Para la diferenciación de machos en los peces, los andrógenos importantes son la 11-ketotestosterona (11-KT), 11-hidroxiandrostenediona y 11-hidroxitestosterona (11-hidroxi-T) (Baroiller *et al.*, 1999; Piferrer *et al.*, 1993).

La aromatasa se localiza en el retículo endoplasmático de las células esteroidogénicas, particularmente en la granulosa del folículo ovárico. Esta enzima, tienen importancia en el desarrollo ovárico de los peces (Piferrer, 1994a) y también en el cambio de sexo de los peces hermafroditas (Kumar *et al.*, 2005).

La inhibición de la aromatasa durante la diferenciación del sexo provoca que las hembras genóticas se desarrollen como machos fenotípicos. Se ha observado que a nivel molecular, los niveles del mRNA de la aromatasa incrementan durante el cambio de sexo protándrico (macho a hembra) (Kroon *et al.*, 2005) y disminuyen, con el cambio proterogineo (hembra a macho) (Nakamura *et al.*, 2005).

A nivel histológico los peces hermafroditas protogineos, durante el cambio de sexo, el ovario se degenera partiendo solamente de la pared cuando el tejido testicular puede desarrollarse desde las lamelas ováricas o proliferar desde las paredes

bordeando el lumen radial o linealmente. Los testículos secundarios (transformados desde ovarios) poseen la estructura correspondiente a la pared del ovario y un lumen ovárico (Pandian, 2011; Reinboth, 1988).

De los métodos utilizados para manipular el sexo en peces, los hormonales son los más utilizados, pues como ya se indicó, el sexo depende de los esteroides (andrógenos para machos o estrógenos para hembras) que bien pueden ser aplicados en la gónada sexualmente indiferenciada (Francesc Piferrer, 2001), o bien, en hembras maduras (Chao and Chow, 1990).

El andrógeno MT ha sido utilizado como un inductor que acelera el proceso de reversión de hembras maduras e inmaduras de los meros o peces serránidos en machos funcionales (Mathew et al., 2002) puede ser administrada en el alimento o a través de implantes (Bhandari et al., 2004; Cabrita et al., 2009; Chao and Chow, 1990; Kumar et al., 2003), ya que activa la espermatogénesis del tejido testicular inactivo presente a los largo del epitelio de la gónada (Chao and Chow, 1990).

Como parte de la biología reproductiva, la fisiología da herramientas para entender los procesos que ocurren en los peces y cómo éstos cambian en condiciones de cautiverio. Se sabe también que los niveles de testosterona, estradiol y 11-ketotestosterona varían de acuerdo a la especie, sexo y época del año.

La interacción entre los esteroides regulan el cambio de sexo en peces hermafroditas (Alam et al., 2006; Kumar et al., 2003), así mismo conocer los cambios en la secreción de esteroides durante el ciclo sexual puede dilucidar su posible rol en el control de la gametogénesis y durante la transición sexual (Johnson et al., 1998).

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar el mejor andrógeno (Testosterona y 17 α -Metiltestosterona) en implantes de silicón para la reversión sexual de hembras de *Epinephelus morio* de hembra a machos en su periodo reproductivo natural.
2. Conocer los cambios de Estradiol, Testosterona y 11-ketotestosterona en sangre de hembras de *Epinephelus morio* entre dos periodos reproductivos naturales y previamente implantadas con T y MT.
3. Conocer el efecto de dos dosis de MT en la reversión sexual de hembras de *Epinephelus morio* de hembra a macho en su periodo reproductivo natural.
4. Establación de un stock de reproductores de *Epinephelus morio* en condiciones de laboratorio.

CAPITULO 1

Determinación del mejor andrógeno (Testosterona y 17 α -Metiltestosterona) en implantes de silicón para la reversión sexual de juveniles de *Epinephelus morio* de hembra a machos en su periodo reproductivo natural

INTRODUCCION

Especies como el mero rojo, son animales muy longevos. Por su condición de hermafroditas protoginios, los peces maduran primero como hembras y mucho más tarde cambian a machos. De acuerdo a Brulé *et al* (2003), las hembras de *E. morio* maduras son aquellas que tienen 50 cm de longitud total (LT) mientras que los machos tienen 80 cm y ambos son localizados a partir de 20 m de profundidad (Giménez *et al.*, 2003) lo que de dificulta en principio, la obtención de ejemplares vivos, sobre todo de los machos.

La reproducción inducida, y el desarrollo embrionario y larvario de *E. morio* se ha realizado en laboratorio (Colin *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2002) capturando hembras silvestres y colectando los testículos de machos salvajes. Aunque la producción resultó exitosa, no es posible depender siempre de machos silvestres para la producción de crías en laboratorio.

Considerando entonces que los machos de mero rojo son organismos de gran tamaño, que son localizados a grandes profundidades, que están representados en una baja proporción en la población (1:10 a tallas de 95 cm LT (Giménez *et al.*, 2003), aunado a que es una especie que no presenta agregación para la reproducción, la probabilidad de captura de machos siempre será reducida, a parte del alto costo económico que implica intentar la captura en aguas “offshore”.

Por otro lado, pescar a grandes profundidades, ocasiona una descompresión en los peces, dañando sus órganos debido al inflado de la vejiga natatoria (Brulé *et al.*, 2004) afectando su supervivencia, y por ello es importante establecer estrategias alternas para disponer de machos en cautividad.

Las estrategias usadas actualmente para la producción de meros por acuicultura implican el uso de hormonas sexuales en hembras maduras o inmaduras que son revertidas a machos (Glamuzina *et al.*, 1998; G Li *et al.*, 2006; Marino *et al.*, 2000; Mathew *et al.*, 2002) lo cual permite obtener semen en laboratorio para producir crías mediante fertilizaciones naturales (Mathew *et al.*, 2002) o en su defecto, almacenarlo mediante criopreservación (Cabrita *et al.*, 2009; Peatpisut and Bart, 2010) para ser utilizado en fertilizaciones *in vitro* o bien, para conservar el genoma de la especie. Lograr el cambio de sexo mediante esta técnica, dependerá del tipo y dosis de hormona a utilizar y la manera de administrarla (Mathew, 2011). La 17 alfa-metiltestosterona ha sido la hormona más utilizada en los meros del género *Epinephelus*.

Esta hormona ha sido administrada en el alimento para *E. fario* (Kuo *et al.*, 1988) , *E. tauvina* (Mathew, 2005b, 2011; Mathew *et al.*, 2002) y *E. marginatus* (Glamuzina *et al.*, 1998; Sanches *et al.*, 2009). Se han utilizado en implantes de colesterol,

implantes con tubos silásticos y tubos de silicona para *E. aeneus* (Hassin *et al*, 1997) y *E. marginatus* (Sarter *et al*, 2006; Sarter *et al*, 2006; Cabrita *et al*, , 2011) y en inyecciones para *E. suillus* (Tan-Fermin *et al*, 1994). Para *E. akaara*, además de la MT se ha probado la Metildihidrotestosterona (MDHT) y ésta con un inhibidor de la aromatasa (Guang-li Li *et al.*, 2006). También se ha utilizado la T y una mezcla de andrógenos.

Independientemente de la forma de administración, para los meros del género *Epinephelus* la dosis utilizada para obtener machos en estado inicial o avanzado de reversión y machos espermeables varía entre 2.3 a 10 mg Kg⁻¹ en un periodo de entre 2 a 17 meses.

Para *E. morio* no se han realizado estudios sobre reversión inducida, por lo que es necesario, en un primer momento, establecer la hormona que muestre mejores resultados para obtener machos en condiciones de cautividad con organismos de talla pequeña, por lo que este trabajo pretende cubrir los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Determinar el mejor andrógeno (Testosterona y/o 17 α -Metiltestosterona) en la reversión sexual de hembras de *Epinephelus morio* a machos en su periodo reproductivo natural.

Objetivos específicos:

- ✓ Conocer los niveles de Estradiol, Testosterona y 11-ketotestosterona en sangre de hembras de *Epinephelus morio* implantados con T y MT.
- ✓ Evaluar el efecto de la T y la MT en la gónada de hembras de *Epinephelus morio* implantados para reversión.
- ✓ Evaluar la producción de semen en hembras revertidas a macho después de 60 días de haber colocados los implantes de T y MT.

MATERIAL Y METODOS

Ejemplares Utilizados

a) Captura de Juveniles

Sesenta juveniles de *E. morio* de 206.1 ± 4.9 g de PV fueron capturados con línea de mano tipo escamera frente a la costa de Sisal, Yucatán, México y transportados en contenedores de 300 litros de capacidad con agua marina hasta la Unidad Académica Sisal (UAS) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A su llegada al laboratorio recibieron un baño de agua dulce durante 10 minutos y posteriormente uno de formol (10%) 30 ppm por espacio de 10 minutos como tratamiento profiláctico.

Tres meses después y al término de un bioensayo de nutrición, los peces en buen estado fueron llevados al área de reproducción de peces marinos de la UAS donde estuvieron durante 4 meses para seleccionar a los más grandes y en mejor estado.

De este grupo original de peces, se emplearon un total de 24 juveniles de mero rojo *E. morio* de 433 ± 94 g de PV y de 31.64 ± 2.5 cm de LT para el bioensayo de reversión.

Calidad de agua

Durante todo este trabajo, se vigiló la calidad del agua diariamente registrando el oxígeno disuelto y la temperatura del agua con un Multianalizador HACH Modelo HQ40d y la salinidad con un refractómetro.

Todos los tanques tuvieron aireación mediante un soplador turbo blower, y un recambio del 200% diario de agua marina filtrada. El agua fue tratada con un filtro de arena antes de ingresar al sistema.

Diariamente se eliminaron residuos de comida y sedimentos del tanque con un sifón y una vez por semana se limpiaron los refugios con agua dulce.

Condiciones experimentales

Este trabajo se realizó durante la temporada reproductiva de enero a marzo del 2002 previendo obtener semen de los peces al término de la temporada reproductiva.

Los peces se colocaron en tanques de 1.6 m³ de capacidad, en una densidad de seis peces por tanque equivalente a una biomasa de 1.3 y 2.0 kg m⁻³.

Los tratamientos probados fueron: implantes de silicona con T (1.0 mg kg⁻¹); implantes con MT (2.5 mg kg⁻¹) y un tercero que sirvió de control (CT, sin hormonas). Un tanque con 6 peces fue destinado para el CT y otro para el tratamiento con T para el tratamiento con MT se utilizaron dos tanques (12 peces).

A cada pez se le colocaron dos implantes, con un mes de diferencia; el primero fue en enero del 2012 y el segundo en febrero del mismo año. Treinta días posteriores al segundo implante se inyectó a los peces 20 µg kg⁻¹ de LHRH para incrementar la producción de semen (Cabrita *et al*, 2009). 24 horas después de esta inyección se dio masaje abdominal y se realizó una biopsia a los peces con una cánula de 1 mm de diámetro.

Al final de este bioensayo (60 días después del primer implante), se sacrificaron tres peces por tratamiento. Las gónadas fueron pesadas para obtener el Índice Gonadosomático (IG) y fueron fijadas con formol al 10%; posteriormente se deshidrataron de acuerdo a la metodología de Hernández-Canseco, (2012), para ser teñidas con hematoxilina-eosina y realizar su posterior análisis histológico. Las muestras fueron cortadas a 3 µm de grosor.

a) Marcaje

Los peces fueron identificados individualmente en cada unidad experimental con elastómeros fluorescentes (VIE), que fueron inyectados debajo de la epidermis entre las aletas ventrales (figura 12).



Figura 12.- Colocación de elastómeros fluorescentes a los meros para su identificación

b) Alimentación

Durante este bioensayo los peces fueron alimentados a saciedad diariamente con la dieta semihúmeda formulada por la Dra. Gabriela Gaxiola en el área de nutrición de

la UMDI y utilizada por Gutiérrez (2010) (Tabla 1). Todo el alimento fue elaborado en el área de Nutrición de la UAS.

Tabla 1.- **Composición de la dieta utilizada para *Epinephelus morio* durante el periodo de mantenimiento y bioensayo 1. Formulación de la Dra. Gabriela Gaxiola.**

Ingrediente	%
Harina de pescado	50.0
Pasta de soya	8.0
Calamar	5.0
Concentrado proteico de soya	10.0
Gluten de trigo	12.0
Aceite de hígado de bacalao	3.0
Almidón de trigo	9.0
Premezcla de vitaminas	2.0
CMC	1.0

El alimento se mantuvo en congelación en bolsas individuales para cada tanque. Antes y después de alimentar, se pesó la cantidad de alimento con una balanza OHAUS de 600 g de capacidad y una precisión de 0.1 g. Posteriormente se obtuvo la diferencia entre el peso del alimento final menos el inicial para calcular el consumo de alimento por día en cada condición experimental.

c) Implantes hormonales

Los implantes utilizados fueron elaborados en la UAS con tubos de silicona de acuerdo a la metodología de Cabrita (2009) y aplicados por Ureta (2011) en *Epinephelus marginatus*. Las hormonas utilizadas fueron disueltas en una solución de DMSO con aceite de castor en la proporción 1:3 (Cabrita *et al*, 2009), la 17alfa-metiltestosterona (SIGMA) en una dosis de 2.5 mg kg⁻¹ y la Testosterona (SIGMA) en una dosis de 1.0 mg kg⁻¹.

Para cada hormona, se pesó la cantidad a utilizar en un tubo Eppendorf con doble guante desechable. Se adicionó DMSO al tubo y se pasó por el vortex. Se adicionó el aceite de castor suavemente y el tubo fue sellado con papel parafilm. Se llevó a vortex y posteriormente los tubos fueron mantenidos en un agitador oscilatorio para Eppendorf (Mixmate) por lo menos durante 1.40 horas.

Una vez que se obtuvo la mezcla homogenizada y considerando la cantidad de hormona necesaria para todos los peces del tratamiento, se llenó el tubo silástico (Silascon, Dow Corning, D.I. 0.058" X D.E. 0.077" X Grosor 0.009"). Conociendo la longitud que ese volumen ocupaba, mediante una regla de tres se obtuvo el tamaño que tenía que cortarse del tubo de acuerdo a las dosis de hormona que debería ser colocada a cada pez.

Una vez cortados con una hoja de bisturí, cada uno de los extremos del tubo con hormona fue sellado con pegamento quirúrgico (Silastic Medical Adhesive Silicone Type A) y se dejaron secar a temperatura ambiente por unos 30 minutos. Los implantes fueron colocados en cajas de Petri etiquetadas con las dosis de esos implantes y mantenidos en refrigeración para ser usados al día siguiente.

Para la colocación de los implantes los peces fueron anestesiados con aceite de clavo (50 ppm), después con una hoja de bisturí de punta roma se realizó una incisión lateral en un ángulo de 45° dejando ver la piel del pez. Después de la primera incisión, poco a poco se iba introduciendo la navaja con movimientos a manera de zig zag aproximadamente un centímetro, de tal suerte que la incisión profunda fuera más ancha que la inicial (figura 13).



Figura 13.- **Incisión ventral para la colocación intraperitoneal del implante de silicona a hembras de mero rojo *Epinephelus morio*.**

De acuerdo al peso del mero, se colocó el implante en la parte más profunda de la herida (figura 14), después se colocó en un tanque anexo para su recuperación y posteriormente se regresó a su tanque definitivo.



Figura 14.- **Colocación del implante de silicona a hembras de mero rojo *Epinephelus morio*.**

d) Plasma sanguíneo

Extracción de sangre

Se tomaron entre 800 a 1000 μ l de sangre del arco branquial (entre las lamelas y en la región más recta) de los peces, antes de colocar los implantes y a los 30 y 60 días después del segundo implante. Para extraer la sangre, se utilizaron jeringas de insulina con agujas removibles, previamente heparinizadas (heparina 1000 UI) y mantenidas previamente en frío dentro de una nevera de unicel o poliespán.

Los peces fueron anestesiados con aceite de clavo y una vez que perdieron el equilibrio, se colocaron en una “camilla” de tal manera que quedaran en posición ventral y se pudiera descubrir la branquia con facilidad (figura 15).



Figura 15.- Toma de muestra de sangre de arco branquial de mero rojo

Una vez colectada la sangre, se retiró la aguja y se repartió la sangre en dos tubos Eppendorf de 1 ml previamente etiquetados. La sangre fue vertida suavemente por las paredes del tubo y se mantuvo en frío hasta su procesamiento.

Todas las muestras de sangre se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12000 rpm. El plasma fue separado y mantenido en congelación a -40°C hasta su análisis.

e) Evaluación de esteroides

En el plasma se evaluaron T, 11KT y E₂ mediante las técnicas “enzyme immunassay” (EIA) con los kits Cayman dentro del Laboratorio de Biología Molecular IRTA-ICM (CSIC) en Barcelona. El análisis se inició con la evaporación de las muestras de 100 μ l de plasma que fueron mezcladas con 2 ml de metanol. Las muestras se agitaron en vortex por espacio de dos minutos y posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 2.5 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue separado en tubos de cristal y al precipitado restante se le adicionó 1.7 ml de etanol, se agitó con vórtex y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones anteriores.

Todo el sobrenadante resultante fue evaporado en una placa térmica a 45 grados por más de 24 horas. Las muestras una vez secas se re-suspendieron con buffer-BSA (500 ul) se cubrieron y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su análisis.

El estradiol (Cayman 582251) se midió con una precisión del 50% B/Bo de 125 pg ml⁻¹ y una detección límite de 20 pg ml⁻¹; la Testosterona (Cayman 582701) se midió con una precisión del 50% B/Bo de 32 pg ml⁻¹ y una detección límite de 6 pg ml⁻¹ y la 11 keto-testosterona (Cayman 582751) se midió con una precisión del 50% B/Bo de 5 pg ml⁻¹ y una detección límite 80% B/Bo de 1.3 pg ml⁻¹ de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

f) Crecimiento y sobrevivencia

Una vez que los peces estuvieron anestesiados, y antes de tomar la muestra de sangre, los meros fueron pesados con una balanza OHAUS de 4000 g de capacidad y una precisión de 0.1 g. Posteriormente fueron fotografiados sobre papel milimétrico. Las imágenes fueron analizadas con el programa informático ImageJ para registrar la talla de los peces en los distintos tratamientos.

Se registró el número de peces muertos durante el periodo experimental para calcular la supervivencia al final del bioensayo.

g) Ecografías

En colaboración con el Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Yucatán, se identificaron con el ultrasonido SSD-500 las gónadas de tres peces de cada tratamiento al término del bioensayo.

Después de 60 días de haber colocado el primer implante, los meros fueron anestesiados (50 ppm con aceite de clavo). Una vez que perdieron el equilibrio y estando dentro del agua, se localizó e identificó la gónada con el transductor del ultrasonido SSD-500 y se midió el diámetro de los lóbulos (figura 16). Posteriormente los meros fueron sacrificados para extraer las gónadas, una vez fuera del pez, éstas fueron medidas directamente con el ultrasonido para verificar que la identificación en la imagen de la pantalla correspondiera efectivamente a las gónadas.



Figura 16.- Localización de la gónada en meros sometidos a reversión sexual mediante implantes de silicona

Las gónadas fueron fijadas (formol 10%) para su posterior análisis histológico. Se relacionó el diámetro de la gónada con el tratamiento de reversión sexual.

h) Histología

Las gónadas fueron fijadas y mantenidas en formol al 10% hasta su procesamiento. Estas fueron deshidratadas y teñidas con la técnica hematoxilina-eosina de acuerdo a la metodología establecida por Hernández-Canseco (2012).

i) Estadística

Se obtuvieron los valores promedio y desviación estándar de todos los datos de consumo de alimento, peso y talla de los peces. Se realizó un análisis de varianza seguido de un análisis de rangos múltiples de Duncan para determinar diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de esteroides y el IG de los distintos tratamientos hormonales.

RESULTADOS

Calidad de agua

Los valores de oxígeno disuelto, temperatura y salinidad en el agua de los tanques experimentales para la aclimatación de los meros, durante su aclimatación en el área de reproducción (Septiembre-Diciembre) y durante el bioensayo de reversión sexual (Enero-Marzo) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos en tanques de juveniles de *E. morio* durante la aclimatación y reversión sexual de hembra a macho con implantes de Testosterona y 17alfa-metiltestosterona con silicona.

	Bioensayo	Oxígeno mg l ⁻¹	Temperatura °C	Salinidad ups
sep-11	Aclimatación	5.85±0.20	27.62±0.41	37±0.30
oct-11		6.06±0.25	26.45±0.54	37±0.91
nov-11		6.20±0.41	26.41±0.54	35±0.00
dic-11		6.20±0.41	26.41±0.54	35±0.00
ene-12	Reversión sexual	6.07±0.45	25.05±0.42	38±0.00
feb-12		6.11±1.22	25.81±0.39	38±0.36
mar-12		6.94±0.45	25.97±0.49	37±0.48

Durante los bioensayos pudo observarse que la calidad de agua fue similar durante el periodo de aclimatación y el periodo de reversión sexual. Los valores promedio para el oxígeno disuelto fueron 6.08±0.32 y 6.37±0.71 mg l⁻¹ respectivamente. La salinidad se incrementó en casi 2 ups durante la reversión con promedio de 37.72 ± 0.28 ups, respecto a la salinidad promedio de 35.88 ± 0.3 registrada en la aclimatación, mientras que la temperatura del agua disminuyó en promedio 1°C hacia la temporada reproductiva de enero a marzo con valores promedio de 25.6 ±0.43°C en la reversión y 26.72 ± 0.51°C en la aclimatación.

Consumo de alimento

El consumo del alimento hace referencia a los gramos de alimento semihúmedo ingerido por pez al día. Durante este bioensayo, los meros consumieron entre 7 y 12 gramos promedio diario (Figura 17). El consumo de alimento por los meros en los tratamientos CT, T y MT1 no presentó diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los dos periodos de implantes (ene-feb, primer implante y feb-mar el segundo). Los

meros del tratamiento MT2 si mostraron diferencias significativas entre los dos periodos de implantes ($p \leq 0.05$), consumiendo más alimento durante ene-feb y disminuir hasta en 5 gramos promedio el consumo en feb-mar .

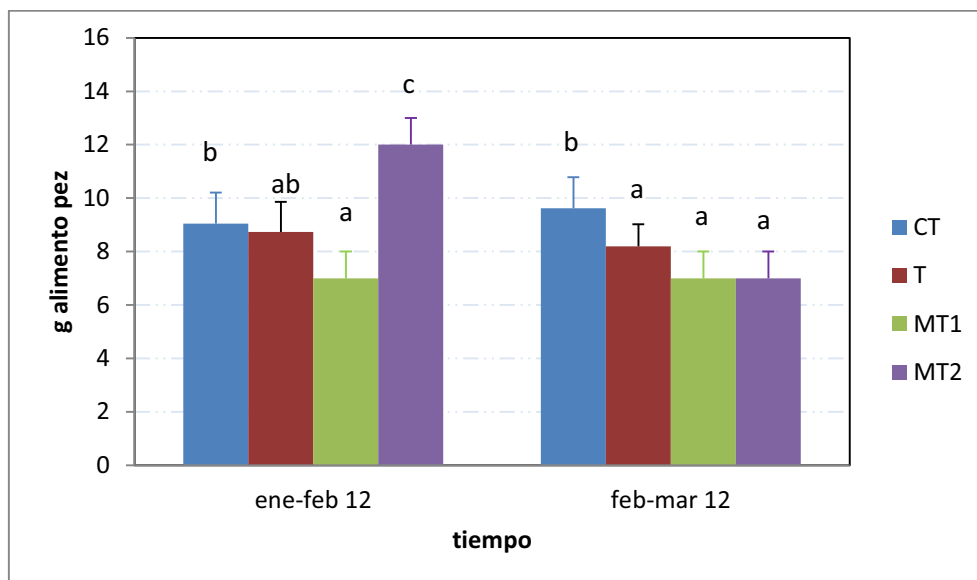


Figura 17.- Valores de alimento consumido por pez por día (promedio y error estándar) en cada uno de los tratamientos durante los dos periodos en los que se colocaron los implantes.

Los meros en los tratamientos CT y T consumieron 0.02 g de alimento por gramo de peso durante todo el bioensayo mientras que los peces del MT1 consumieron 0.1 g durante el tiempo del primer implante y 0.02 g de alimento durante el segundo implante y en el tratamiento MT2 durante ambos implantes consumió 0.01.

Crecimiento y Supervivencia

En la tabla 3 se muestran los pesos y tallas promedio de los peces en cada uno de los tratamientos experimentales. Los incrementos promedio en peso variaron en cada condición experimental, los peces del tratamiento CT incrementaron 14.92 g en 2 meses, mientras que los peces del tratamiento con MT1 (réplica 1 de MT) fue de 41.26 g. Por otro lado, los meros en los tratamientos con T y MT2 (réplica 2 de MT) disminuyeron su peso (-28.96 y -11.78 g respectivamente) en relación al peso que tenían al iniciar este experimento.

Tabla 3.- Valores de peso (g) y talla (cm) del mero rojo *E. morio* en cada unidad experimental antes de la colocación de los implantes (enero 2012) y al final del bioensayo (marzo 2012). CT=control, T=Testosterona, MT1=Metiltestosterona tanque 1 y MT2= Metiltestosterona tanque 2.

Tratamiento	Peso inicial Ene 12	Peso final Mar 12	N	LF inicial	LF final	Número Muertos
CT	510.92 ± 122.74	525.84 ± 3.50	6	31.52 ± 1.73	32.71 ± 2.02	0
T	438.96 ± 101.22	410.72 ± 7.24	6	30.11 ± 2.31	30.78 ± 2.08	0
MT 1	522 ± 74.61	563.93 ± 47.8	6	32.02 ± 2.25	34.13 ± 1.92	2
MT 2	526.42 ± 144.79	514.64 ± 28.98	6	32.98 ± 3.27	32.93 ± 4.13	1

Al final de este bioensayo, los tratamientos CT y T presentaron el 100% de supervivencia. Sólo en las réplicas con MT se encontraron peces muertos (Tabla 3), para terminar con una supervivencia del 66 y 83% para el MT1 y MT2 respectivamente.

Índice Gonadosomático (IG)

Al término del bioensayo, el IG promedio de los meros con los distintos implantes fue entre 0.12 y 0.18 (Figura 18). No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos experimentales; ni entre éstos y la condición inicial de la gónada previo a la colocación del implante.

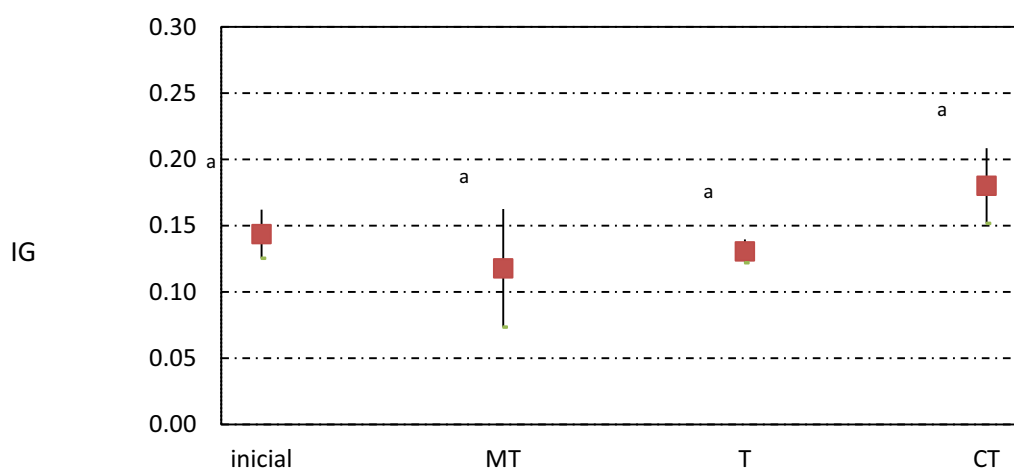


Figura 18.- Índice gonadosomático promedio (IG) y desviación estándar de *E. morio* antes de colocar el implante (inicial) y después de 60 días de haber colocado el primer implante en enero (MT, T y CT) en cada uno de los tratamientos experimentales. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

No se encontró una relación (positiva o negativa) entre el IG y el peso de los peces, aunque independientemente del peso, el IG de los peces con el tratamiento MT fue el más alto (Figura 19), ni entre éste índice y el esteroide utilizado en el implante.

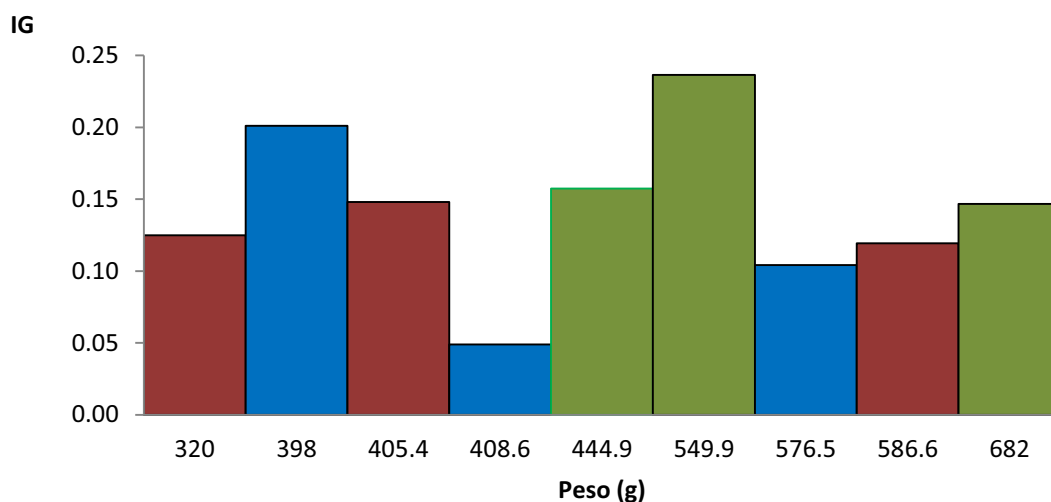


Figura 19.- Índice gonadosomático según el peso de los meros. Los colores representan cada tratamiento; verde= MT, azul=CT y rojo=T.

Ecografías

Mediante ultrasonidos, se identificaron las gónadas de los peces. Los diámetros de los lóbulos gonádicos de los mismos, de acuerdo al tratamiento hormonal para la reversión sexual se muestran en la figura 20, donde puede apreciarse en todos los casos una diferencia en el diámetro de los dos lóbulos de la gónada. Estadísticamente las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

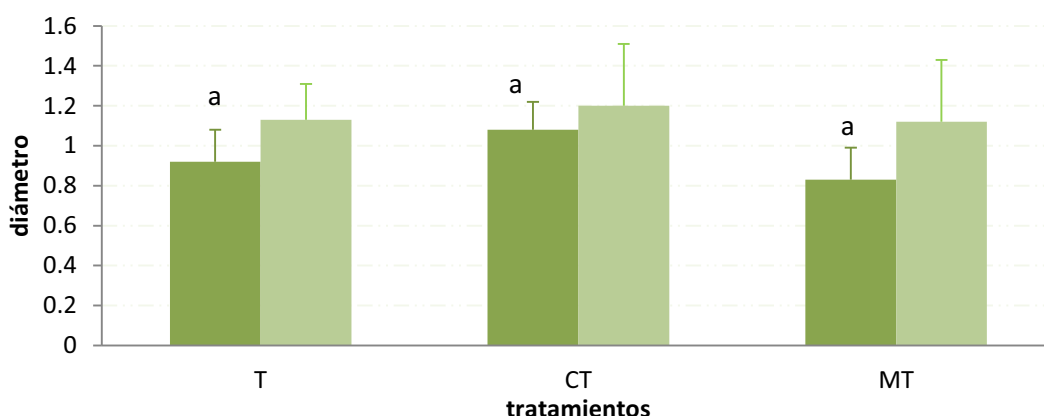


Figura 20.- Diámetro (cm) de los lóbulos de la gónada de mero rojo *Epinephelus morio* sometidos a tratamientos hormonales e identificados por ultrasonido. Cada tono en las columnas representa el diámetro promedio de los dos lóbulos de la gónada de los peces después de 60 días del primer implante.

Al término del bioensayo se intentó obtener una muestra de la gónada mediante canulación, pero los peces de todos los tratamientos presentaron el gonoporo sin dilatar, por lo que no se forzó la entrada de la cánula, resultando que en ninguno de los peces se logró obtener semen al final del bioensayo.

Histología

Los cortes histológicos mostraron que después de dos implantes hormonales, los meros CT y los tratados con T tuvieron gónadas con ovocitos inmaduros (Figura 21-B y C). No se observó ningún cambio celular en relación a la condición de los peces antes de la colocación del implante (Figura 21-A). En estos tratamientos, se mantuvo la configuración de las lamelas y a lo largo de éstas, los ovocitos inmaduros.

En algunas ocasiones se observó en los peces tratados con testosterona que algunos ovocitos presentaron nucléolos en la periferia del núcleo celular (Figura 21-B).

Los meros tratados con implantes de MT después de 60 días mostraron un cambio en la morfología celular. De manera aislada se observaron algunos ovocitos inmaduros ubicados preferentemente hacia las paredes de las lamelas. Se encontró una gran cantidad de células indiferenciadas y grupos de espermatozoides distribuidos a lo largo y ancho de la lamela. Esta conformación celular se observó en todos los peces tratados que se sacrificaron.

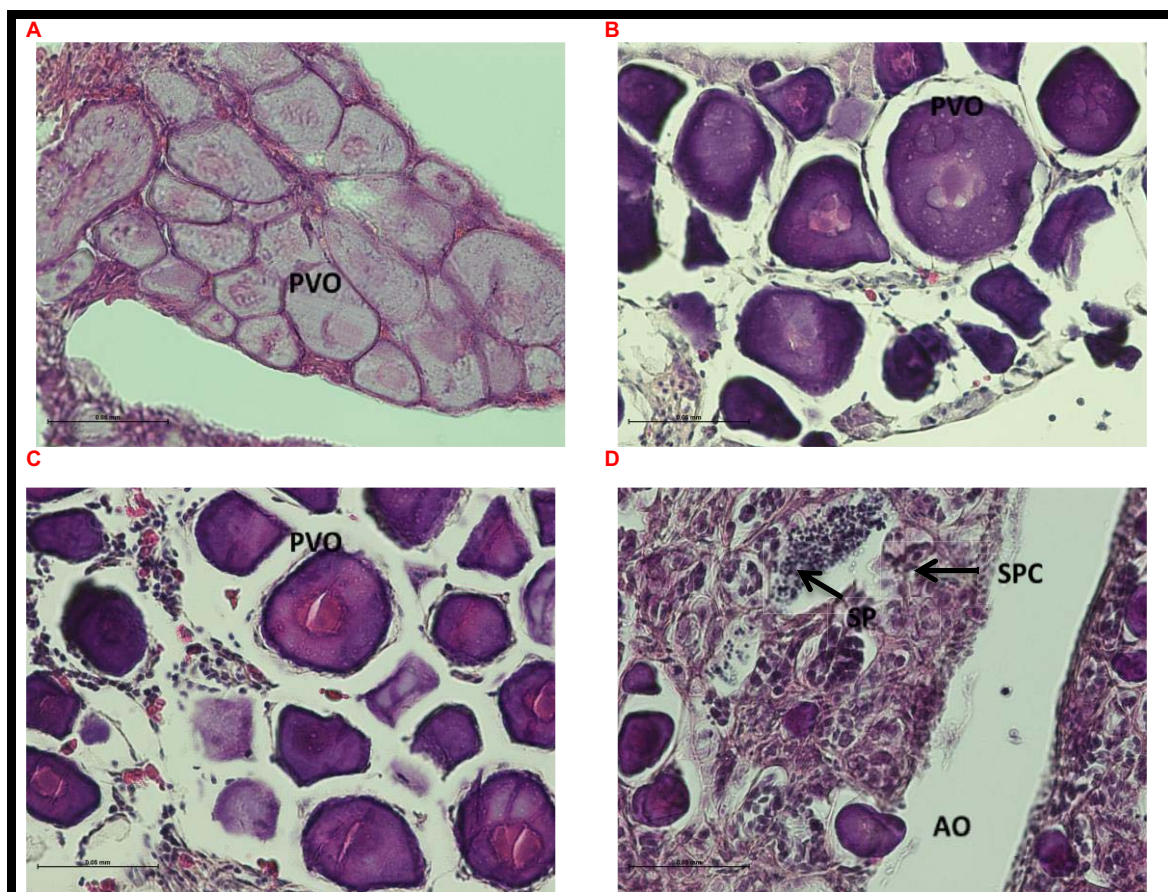


Figura 21.- Gónada de *Epinephelus morio* después de dos implantes hormonales. A: gónada de los peces antes de colocar los implantes. 40x. B: Tratamiento con Testosterona 10X; C: Tratamiento Control 40X y D: Tratamiento de Metiltestosterona 40 X. POV=ovocitos previtelogénicos; AO = ovocito atrésico; SP=espermatozoides; SPD=espermaticitos.

Esteroides

Durante este bioensayo, los niveles de E₂, T y 11KT en el plasma sanguíneo presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cada uno de los tratamientos (Figura 22). En todos los casos, las concentraciones de T fueron más altas que las de E₂ y 11KT y para ésta última hormona, los valores siempre fueron menores a 200 pg ml^{-1} .

Puede observarse que los peces sin tratamiento hormonal (CT) presentaron niveles de E₂ y 11KT constantes después de haber colocado el primer implante (tiempo cero) y el segundo (30 días) presentándose valores de 66 a 137 pg ml^{-1} para 11KT y de 237 a 291 pg ml^{-1} para E₂. La T, aunque presentó los valores más altos (hasta 3500 pg ml^{-1}), disminuyó a los 30 y 60 días hasta valores de 579 pg ml^{-1} .

Por otro lado, en los meros con implantes de T, fue evidente el incremento de la T y el E₂ en sangre después del primer implante y su posterior disminución a los 60 días, alcanzando niveles muy similares a los que presentaron los peces en el tiempo cero

(176 pg ml⁻¹ para E₂ y 350 pg ml⁻¹ para T). Puede observarse que los niveles de 11KT siempre se mantuvieron por debajo de los 200 pg ml⁻¹.

Finalmente, los meros con implantes de MT, mostraron un aumento en el estradiol (151 a 401 pg ml⁻¹) y de 11KT (34 a 100 pg ml⁻¹), al mismo tiempo, los niveles de testosterona aumentaron hasta 736 pg ml⁻¹ a los 30 días, pero después mostraron una tendencia a disminuir.

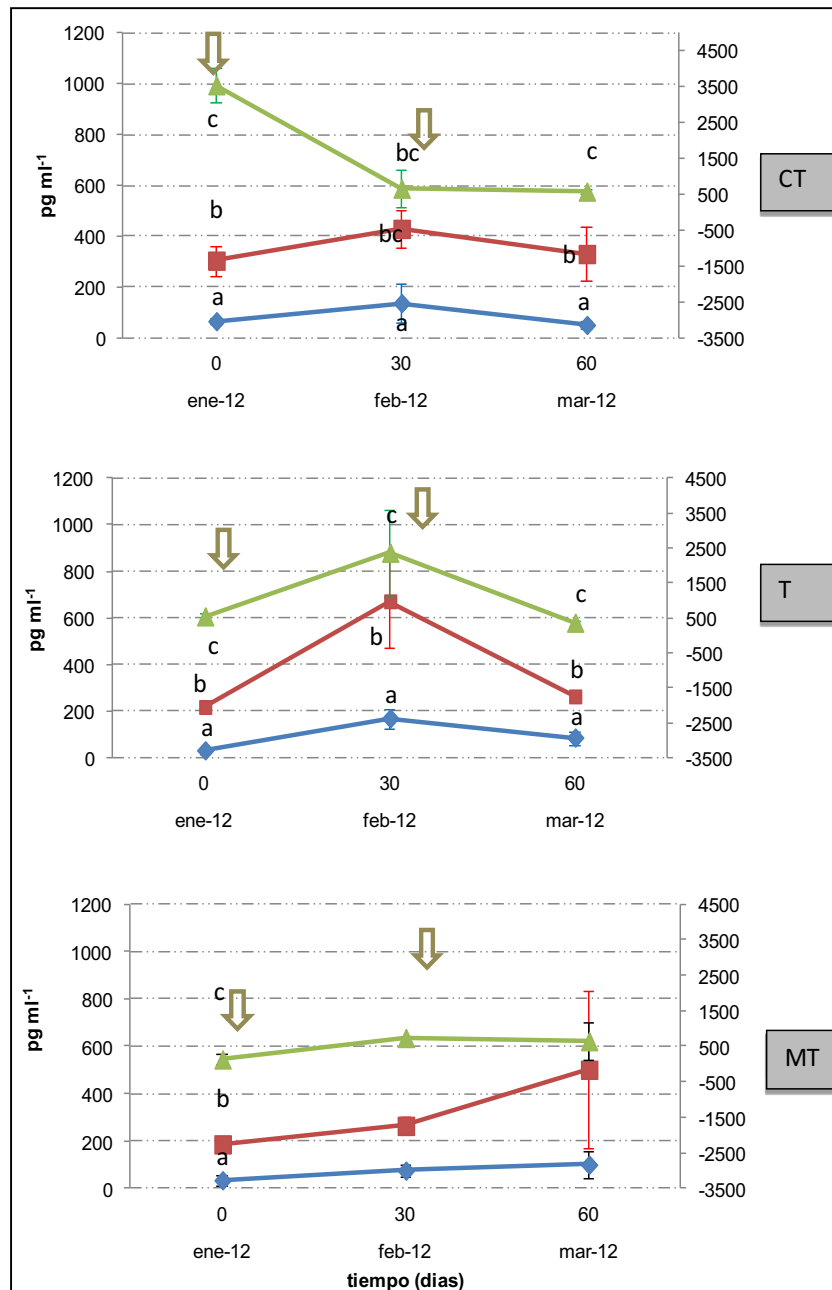


Figura 22.- Niveles promedio y desviación estándar de 11KT (línea azul), E₂ (línea roja) y T (línea verde) en los meros con implantes de MT, implantes de T e implantes CT. El tiempo indica el número de días transcurridos después de la colocación del primer implante. El eje secundario representa la concentración de T también en pg ml⁻¹. Las flechas señalan el momento en el que se colocaron los implantes.

DISCUSION

Los valores de los parámetros fisicoquímicos del agua indicaron que la calidad de ésta fue adecuada de acuerdo a lo reportado para otras especies del género *Epinephelus*.

La salinidad, el pH, amonio, nitritos y nitratos se encontraron dentro del intervalo reportado para reproductores de *E. coioides* (Shams, 2010), *E. tauvina* (Mathew, 2005b; Mathew et al., 2002) y *E. aeneus* (Hassin et al., 1997). La salinidad de 36.7 ups promedio fue más cercana a lo reportado para *E. coioides* (Shams, 2010) y *E. aeneus* (Hassin et al., 1997), 45 y 40 ups respectivamente.

La temperatura registrada en el bioensayo, estuvo 2 a 3 °C por arriba de lo reportado por Johnson *et al.*, (1988) en los sitios de captura de *E. morio* en el este de Florida (18 a 23 °C de marzo a mayo dentro de la temporada reproductiva) y en el agua de fondo en el sureste del Golfo de México, (Giménez et al., 2003), reportaron 22±1°C.

Dado que en los bioensayos no se controló la temperatura del agua, la temperatura mantenida dentro de los tanques de cultivo fue reflejo de las condiciones naturales del agua de mar en la zona durante este trabajo experimental. Independiente de esta situación, la temperatura del agua fue la misma para todas las condiciones experimentales, lo que permite sugerir que la respuesta de los peces estuvo dada, en el caso de la reversión, por las hormonas externas administradas a los peces.

Durante este bioensayo se encontró que el consumo de alimento, el crecimiento y la supervivencia estuvieron directamente relacionados.

Si se considera que la tasa de crecimiento de los peces es lenta en comparación de otros organismos en cultivo como los invertebrados, podría esperarse no encontrar incrementos significativos en un periodo corto de dos meses, sin embargo, se presentó una disminución en peso de manera similar a la reportada para otras especies del género *Epinephelus* bajo condiciones de reversión como *E. akaara* (G Li et al., 2006), *E. aeneus* (Hassin et al., 1997) o *E. coioides* (S Yeh et al., 2003).

Durante el cambio de sexo en los organismos protogínicos la degeneración de los ovocitos y la proliferación de las células espermáticas provocan una disminución en el Índice gonadosomático y por ende una disminución en el peso de los peces revertidos, especialmente porque el testículo suele ser más pequeño que el ovario. En este trabajo, las gónadas de los meros experimentales fueron pequeñas con un avance considerable de reversión en el tratamiento de MT pero no en el de T, por lo que es de suponerse que el consumo de alimento y el comportamiento de los peces en cada uno de los tanques jugaron un papel importante en esta disminución.

Fue notorio encontrar en los tanques peces dominantes, que eran los que comían primero y que a medida que crecían iban teniendo más control del espacio, estresando a los meros más pequeños, los que a su vez disminuían el consumo de alimento y por lo tanto su peso.

La dominancia dentro de los tanques, se registró primero en el tratamiento de MT, y al final del bioensayo en el resto de los tratamientos. Esta circunstancia ocasionó la mortalidad de los peces, pues se pudo verificar mediante observaciones que los peces de mayor tamaño agredían a los pequeños o aquel que presentaba una talla similar al dominante y con el fin de escapar de dicha agresión, el pez nadaba rápidamente hasta que saltaba fuera del tanque, de ahí que los peces muertos hayan sido localizados fuera del tanque.

Al reducirse el número de peces, disminuía la densidad y por lo tanto incrementaba el espacio para crecer; de esta manera, los meros del tanque MT1 al tener mayor mortalidad (Tabla 3) se redujo la densidad de 2.0 a 1.4 kg m³ y al mismo tiempo mantuvo el consumo de alimento, alcanzando el mayor incremento en peso.

No se considera que el consumo de alimento haya estado relacionado directamente con el tratamiento. Ya que el consumo de alimento no cambió con uno o dos implantes en los tratamientos CT, T y MT1, sino más bien en la relación social de los peces en el tanque, la posición de éste dentro del área experimental y la saciedad. Fue muy evidente el incremento de la ingesta el día posterior al fin de semana y el mayor consumo del pez dominante, que generalmente coincidía con el de mayor talla.

De acuerdo a los estudios sobre pesquerías del mero rojo, el IG se modifica de manera importante en las hembras durante la temporada reproductiva (marzo a mayo en la región central de Florida y de enero a marzo en el sureste del Golfo de México), llegando a presentar valores de 1.1 (Johnson et al., 1998) y de 2.1 (Brulé et al., 1999), mientras que para los machos se reportan valores en esta misma temporada de 0.3 y 0.29 respectivamente. Estos IG en los machos de mero rojo se debe a que la especie forman parejas y no agregaciones para reproducirse, por lo tanto presentan testículos reducidos y de bajo peso y por lo tanto IG bajos (Tuz et al., 2003).

En este trabajo, los peces que revirtieron el sexo presentaron valores inferiores a los del medio silvestre, 0.12 para CT y 0.18 para los tratados con MT. La falta de diferencias significativas entre los tratamientos, independientemente del peso, puede explicarse justamente por la pequeña talla de los peces. Los valores de IG obtenidos, fueron menores a los reportados para los machos de esta especie en condiciones silvestres (Brulé et al., 1999; Johnson et al., 1998) y son más parecidos a los de machos salvajes en temporada no reproductiva (0.15 en promedio) (Brulé et

al., 1999) y a hembras silvestres en temporada no reproductiva IG menor a 0.2 (Johnson et al., 1998).

Los peces utilizados en los bioensayos de reversión fueron hembras sexualmente inmaduras, por lo tanto fue normal que presentaran estos valores de IG. Aunque la reversión de los peces con MT provocó un cambio a nivel celular, no provocó una modificación evidente en la morfología macroscópica y tamaño de la gónada.

Esta condición del tamaño de la gónada fue corroborada con el análisis por ultrasonido previo al sacrificio de los animales, al no existir diferencias significativas en el diámetro todas las gónadas, se consideró que todas eran similares.

Si bien la ecografía fue una técnica no invasiva para identificar la gónada, sólo pudo validarse su posición en la cavidad del cuerpo como se hizo con el esturión (Colombo et al., 2004), la tilapia *Oreochromis niloticus* (Nzeh et al., 2012) y la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Evans et al., 2004), pero no fue posible identificar a los peces que se encontraban en reversión sexual.

Es posible que debido a que la identificación de los meros en reversión, fue a nivel microscópico y no macroscópico, no existió un cambio en la morfología. Se sabe que el tamaño y etapa de vida del pez y el crecimiento gonadal de los adultos reproductivamente activos influyen en la capacidad para la identificación del sexo (Novelo and Tiersch, 2012). Bajo estas consideraciones, testículos completamente maduros durante la temporada reproductiva han sido identificados fácilmente por ecografías en el halibut *Hippoglossus hippoglossus* y el fletán *Pleuronectes americanus* y *P. ferruginea* (Rommens, 2001) pero no en juveniles.

Por otro lado, identificar testículos a partir de hembras masculinizadas con hormonas en el alimento fue posible en la trucha arcoíris (Hliwa et al., 2013), a diferencia de este trabajo, los testículos se encontraron produciendo semen, sin embargo no fue fácil identificar machos jóvenes inmaduros, por lo tanto será interesante probar esta técnica en meros machos completamente maduros sin perder de vista que las gónadas de *E. coioides* (Kuo et al., 1988) y las de *E. morio* (Brulé et al., 1999) pueden identificarse con claridad sólo mediante histología, de acuerdo a Yeh et al. (2003), las gónadas no presentan tejido conectivo que diferencie el testículo del ovario, sino que las células espermáticas y ováricas están entremezcladas, sin embargo es posible que la reducción del tamaño de la gónada pueda ser detectado por la ecografía.

Las gónadas de *E. morio* siguieron manteniendo la estructura de lamelas características en los ovarios y pudo apreciarse la conformación de pequeños grupos de espermatozoides repartidos a lo largo y ancho de la lamela, pero sobretodo una mayor abundancia de espermatozoides primarios o secundarios, corroborando lo establecido por Kuo et al. (1988) que cuando los peces

hermafroditas protándicos cambian de sexo, los ovocitos primarios permanecen y las espermatogonias comienzan a aparecer a lo largo del tejido ovárico. La atresia de los ovocitos y la espermatogénesis se da de manera simultánea hasta que comienza a dominar el tejido vascular constituyendo la estructura de la gónada. Bajo estas condiciones se pudiera pensar que la dosis utilizada en estos implantes no fue suficiente para esta especie, pues aunque se logró la reversión, no se pudo obtener semen al término del bioensayo.

Durante la reversión sexual, los cambios en la gónada de *E. morio* aparentemente se realizó del centro hacia la periferia, de manera similar a *E. akaara* (G Li et al., 2006) ya que las reminiscencias de los ovocitos se encontraron en mayor abundancia en el borde de la lamela. Esta estructura histológica sólo pudo apreciarse en los peces tratados con MT. Los meros en tratamiento CT no presentaron ningún cambio en su morfología en relación a su estado inicial en cuanto al desarrollo de los ovocitos.

Los meros del tratamiento con Testosterona, la hormona y la dosis utilizada no logró la reversión a macho, caso contrario a lo obtenido en *E. coioides* con la misma dosis utilizada en este trabajo (S Yeh et al., 2003) donde un 14% de los peces lograron revertirse sexualmente después de 60 días y 25% a los tres meses (Tabla 4). En este trabajo la Testosterona aparentemente comenzó a realizar algún cambio a nivel celular, identificado con los nucléolos, pero no se identificaron células sexuales masculinas.

Los niveles de esteroides en sangre son indicadores fisiológicos del estado de madurez de un pez, considerando los niveles de E, T y 11KT evaluados en este trabajo, los cuales estuvieron por debajo de lo reportado por Johnson *et al* (1998) en machos maduros silvestres de *E. morio* durante la temporada reproductiva, pudiera explicar la ausencia de semen al final del bioensayo en los peces revertidos.

El cambio de sexo, puede darse en dos meses para algunas especies como *E. marginatus* y *E. coioides* (Cabrita et al., 2009; Tsai et al., 2011; Ureta, 2011) o bien, en 5 meses o un año como en *E. aeneus* (Hassin et al., 1997). Independientemente del tiempo, Li *et al*, (2006) establecieron dos fases en este proceso denominado transición: la transición temprana (ET por sus siglas en Inglés) que se caracteriza con la degeneración de los ovocitos y la simultánea proliferación de células espermatogénicas; y la transición tardía (LT, por sus siglas en inglés), en donde se encuentran varias fases de células espermatogénicas, desde espermatocitos hasta espermátidas y solamente unos pocos ovocitos atrésicos remanentes

En *E. akaara*, en la transición temprana hay una degeneración progresiva de los ovocitos, éstos son absorbidos y las células espermatogénicas proliferan incrementando desde la región central hacia la periferia de la lamela del ovario, o bien; de las paredes hacia el centro como en *E. tauvina* (Mathew, 2011). En el caso

de *E. morio*, la transición tardía fue observada en las gónadas con dos implantes de MT después de los 90 días posteriores al primer implante. Las condiciones por las cuales no se produjo semen, pueden ser explicadas por los niveles de esteroides en sangre.

En varias especies de teleósteos se ha visto que la Testosterona, 11KT y 11 β -HT (hidroxitestosterona) se encuentran en distintos niveles en sangre de acuerdo a su estación reproductiva. La T parece estar más relacionada a la espermatogénesis (G Li et al., 2006) y la 11KT con la espermiación (S Yeh et al., 2003), sin embargo la diferenciación de espermatogonias a espermatozoides requiere la presencia de ambas hormonas (Carrillo and Zanuy, 1993).

Para la transición tardía en especies como *E. marginatus* (Glamuzina et al., 1998), *E. tauvina* (Mathew, 2011), *E. akaara* (G Li et al., 2006), *E. merra* (Bhandari et al., 2004), *E. coioides* (S Yeh et al., 2003), los niveles de esteroides pueden ser muy variables (Tabla 5) dependiendo de la especie, de la temporada en la que la reversión fue inducida (pre-reproductiva, reproductiva o pos-reproductiva). También existe variación entre los organismos silvestres que realizan el cambio de manera natural y los inducidos, generalmente en los primeros, los valores son mayores, sin embargo con concentraciones muy bajas de T, E₂ y 11KT, se logra la reversión a macho.

De esta manera, los peces en reversión de mero rojo en condiciones naturales muestran concentraciones de 290 a 1650 pg ml⁻¹ de T, 100 a 600 pg ml⁻¹ de 11KT y de 70 a 370 pg ml⁻¹ de E₂, (Johnson et al., 1998) mientras que con dos implantes de MT, las concentraciones de T estuvieron dentro del intervalo (647 pg ml⁻¹), los valores de 11KT fueron en el límite inferior (100 pg ml⁻¹) y el E₂ por arriba de lo reportado (401 pg ml⁻¹). De manera general, la reversión sucede cuando los niveles de T y 11KT aumentan y los de E₂ disminuyen. Valores superiores de E₂ en los meros estimulados a la reversión indican que parte de la MT exógena fue aromatizada (Shinn-lih Yeh and Kuo, 2003) incrementando los niveles de E₂ en sangre. Por otro lado, los andrógenos en sangre indicaban una proliferación de células espermáticas con los niveles de T pero no una espermiación, debido a las bajas concentraciones de 11KT.

La 17 alfa metiltestosterona actúa como un andro-inductor acelerando la transformación de organismos inmaduros, pero también puede estimular al desarrollo de hembras maduras (Mathew et al., 2002). El tejido testicular presente a lo largo del epitelio germinal, con la MT se activa y comienza la espermatogénesis (Chao and Chow, 1990).

Las gónadas femeninas de los groupers son aparentemente bipotenciales y pueden ser manipuladas con la implantación de andrógenos (S Yeh et al., 2003). La manipulación del sexo realizada durante la temporada reproductiva podría suponer

un aumento en los niveles de andrógenos y por lo tanto una seguridad para la reversión sexual a macho, sin embargo, es probable que las hembras utilizadas en este bioensayo aun estando inmaduras, pudieran estar produciendo cantidades endógenas de hormonas, por lo menos los niveles de T fueron los valores altos (500 a 1000 pg ml⁻¹) y los niveles de ésta depende del estado de la gónada (S Yeh et al., 2003).

Lee *et al.* (1995) sugieren que la inversión sexual de *Epinephelus tauvina* inducida por MT tiene un efecto directo en el ovario y una retroalimentación positiva en el eje hipotálamo-pituitaria resultando un incremento en la producción de gonadotropina. Si hay una inhibición de la actividad de la aromatasa y del gen de expresión en la gónada, entonces disminuyen los estrógenos secretados por ésta, hay degeneración de los folículos ováricos y una proliferación de células espermatogénicas después del aumento de 11KT (G Li et al., 2006).

Los meros rojos, tratados con MT presentaron la transición tardía a macho (espermatoцитos y espermatozoides con algunos ovocitos) en 90 días, con niveles de 11KT insuficientes para la espermiación, de manera similar que para *E. marginatus* donde después de 4 meses sólo se encontraron distintos estadios de la espermatogénesis (Glamuzina et al., 1998) o completamente distintos para la misma especie donde se obtuvieron machos espermeables en dos meses (Ureta, 2011). Estos resultados pueden deberse a las diferencias entre especies, a la elección del tiempo de implantación y a la talla inicial de los peces (S Yeh et al., 2003).

Tabla 4.- Aplicación de hormonas para reversión sexual de distintas especies de mero del género *Epinephelus*.

Autor	Especie	Esteroide	Dosis (mg kg ⁻¹)	Vehículo de la hormona	Estadio de desarrollo	Organismos experimentales		Resultados
						Talla (mm)	Peso (g)	
Kuo, 1988	<i>E. fario</i>	MT	69.7 a 159.4 (0.5 a 1.0 mg día ⁻¹)	oral	♀ dos años	469 LS	1690	Reversión en un mes. Espermátidas y espermatozoides en 5 meses.
Hassin, 1997	<i>E. aeneus</i>	MT	2.3	Tubos silásticos			2200 a 3600	solo el 20% fueron espermeables después de 5 meses
Glamuzina, 1988	<i>E. marginatus</i>	MT	5	en alimento	juveniles y ♀	24 a 52	150 a 2950	Después de 4 meses testículos en distintos estadios de espermatogénesis.
Ureta, 2011	<i>E. marginatus</i>	MT	2.5	Implante silicona	juveniles			Machos espermeables en dos meses
Mathew, 2002	<i>E. tauvina</i>	MT	3	Implante de colesterol y goma de acacia	♀	54	3.2	macho espermeable en dos meses
Mathew, 2011	<i>E. tauvina</i>	MT	3 en promedio 50 a 55 acumulada	Pelet de colesterol y celulosa dentro del alimento	♀ vitelogénicas	380 a 600 LF		9 a 12 semanas u total de 50 a 55 mg kg Transición tardía después de 80 días (2.6 meses) machos funcionales
Guang-Li, 2006	<i>E. akaara</i>	MT	10	Implantes mezclados con elastómeros	♀ de tres años	25.5 a 31 LS	460 a 710	Transición temprana (ovocitos atrésicos y proliferación de células germinales espermatogénicas)
		MDHT	10					Transición tardía (presencia de espermatoцитos a espermátidas, muy pocos ovocitos remanentes)
		MT+AI	10 + 1					
Alam et al, 2006	<i>E. merra</i>	AI (Fadrozole)	10	Mezclada con manteca de cacao	♀ en maduración	175 a 202 LT	80 a 106	60% de los meros con espermatozoides en tubos seminales
Bhandari et al, 2004	<i>E. merra</i>	AI	0.1, 0.5 y 1.0	implantes de manteca de cacao	♀ inmaduras			Después de 90 días, peces con 0.1 mg kg ⁻¹ presentan transición temprana: Transición tardía se presentó con 1.0 mg kg ⁻¹ .
Yeh et al, 2003a	<i>E. tukula</i>	MT +TP	1.0 +1.0	Pelet de manteca de cacao y celulosa	♀ de 6 años	840 a 1180	13000 a18000	66.7% fueron machos después de 70 días. Solo 28% presentaron buena motilidad espermática.
Yeh et al, 2003b	<i>E. coioides</i>	11 KT + TP	1.0	Pelet de manteca de cacao y celulosa	♀ de 6 años	893±14 LT	1320±1710	38.9 y 66.7% de los peces fueron machos a los 30 y 70 días respectivamente
Yeh et al. 2003c	<i>E. coioides</i>	T	1.0	Pelet de manteca de cacao y celulosa	♀ de 2 años	416±7 LT	1034±45	14.28% de los peces se encontraron en cambio de sexo a los 60 días y 28.5% a los 90 días
		11 KT	1.0					no reversión
		TP	1.0					no reversión
		MT	1.0					87.5% de los peces fueron machos. Todos con espermatoцитos y espermatogonias
		T+MT+PT	1.0+1.0+1.0					87.5% de los peces fueron machos. 43.7% presentaron espermatoцитos y espermatogonias y 43.7% machos con espe
Yeh et al, 2003	<i>E. coioides</i>	T+MT+PT	1 a 20	Pelet de manteca de cacao y celulosa	♀ de 2 años	482±13 LT	1715.7±32.6	Después de 90 días, la dosis de 1 mg kg ⁻¹ produjo el 85.7% de machos de los cuales la mitad fueron espermeables. El 100% de los machos se consiguió con dosis de 10 y 20 mg kg ⁻¹ , en ambos casos sólo 14.28% fueron machos espermeables
Presente trabajo	<i>E. morio</i>	MT	5	Implantes de silicona	♀ inmaduras	316±25	433±94	Después de 90 días, transición temprana a macho, ovocitos atrésicos, espermatogonias, espermatoцитos y algunos espermatozoides
		T	2					No reversión

MT= 17α METILTESTOSTERONA. TP= PROPIONATO DE TESTOSTERONA. AI= INHIBIDOR DE AROMATASA. MDHT=METILDIHIDROTESTOSTERONA.11KT= 11 KETOTESTOSTERONA

Tabla 5.- Niveles de esteroides registrados para distintas especies de *Epinephelus* silvestres de acuerdo a su estadio de madurez. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E₂ y 11KT están expresados en pg ml⁻¹.

	Condición	Especie	Hormona utilizada	Esteroides	H	Transición		M
						ET	LT	
Utilizando organismos silvestres	Cambio de sexo natural. Colecta de ejemplares en distintos estadios de maduración	<i>E. merra</i> (Alam et al., 2006)		T		250	300	
				11KT		400	700	
				E ₂		1000	200	
		<i>E. merra</i> (Bhandari et al., 2003)		T	250	200	400	350
				11KT	200	200	750	600
				E ₂	200	150	150	150
		<i>E. morio</i> (Johnson et al., 1988)		T	2000	290 a 1650		600
				11KT	ND	100 a 600		4000
				E ₂	3000	70 a 370		≤500
	Inducción con de esteroides	<i>E. merra</i> (Bhandari et al., 2004)	Fradozole	T			150	
				11KT			500	
				E ₂			90	
		<i>E. morio</i> (presente trabajo)	Dos Implantes con MT	T			647	
				11KT			100	
				E ₂			401	
		<i>E. akaara</i> (Guang-li Li et al., 2006)	Implantes de MT	T		180		
				11KT		50		
				E ₂		20		
Implantes de MT+AI	T			600				
	11KT			120				
	E ₂			17				
Implantes MDHT	T			200				
	11KT			150				
	E ₂			17				

ND=NO DETERMINADO, AM= MEZCLA DE ANDROGENOS. MT= 17 α METILTESTOSTERONA.T=TESTOSTERONA.TP=PROPIONATO DE TESTOSTERONA. AI=INHIBIDOR DE AROMATASA, MDHT=METILHIDROXITESTOSTERONA

Tabla 6.- Niveles de esteroides registrados para distintas especies de *Epinephelus* de acuerdo a su estadio de madurez. Los peces han sido mantenidos en cautividad por lo menos un año. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E₂ y 11KT están expresados en pg ml⁻¹.

	Condición	Especie	Hormona utilizada	Esteroides	H	Transición		M		
						ET	T			
Peces mantenidos en cautividad por un año	Cambio de sexo natural	<i>E. microdon</i> (Debas et al., 1989)		T	80	60		500-700		
				11KT	100	100		800-900		
				E ₂	100	110		100-200		
		<i>E. akaara</i> (G.-L. Li et al., 2007)		T	920	1630		1640		
				11KT	320	5920		6230		
				E ₂	51.68			27.69		
	Inducción con de esteroides	<i>E. fario</i> (Kuo et al., 1988)		MT oral	T	140 a 633	124		1100 a 1632	
					11KT	ND	ND		ND	
					E ₂	48.7 a 79.9	57.3 a 34.8		32.8 a 73.7	
		<i>E. akaara</i> (Guang-li Li et al., 2006)		Inhibidor de Aromatasa con elastómeros	T	350			1500	
					11KT	250			1500	
					E ₂	10			5	
		<i>E. coioides</i> (S Yeh et al., 2003)	T + MT + TP		T	29.12	32.71±5.19		1312.21±176.9	
					11KT	17.41±1.84	11.83±0.54		14.33±3.25	
					E ₂	31.36±4.55	20.98±0.44		21.34±1.29	
			<i>E. coioides</i> (S Yeh et al., 2003)	T		T		77.1±14.5		
						11KT		45.9±13.8		
						E ₂		25.2±2.5		
Implantes con AM (T+MT+TP)	T					169±29.6		119.2±3.2		
	11KT					29.9±7.3		21.6±2.6		
	E ₂					28.4±1.7		22.2±1.7		
Implantes de MT	T		77±13.6		286.2±12.7					
	11KT		28.3±1.7		33.9±3.9					
	E ₂		28.2±1		29.7±1.1					

ND=NO DETERMINADO, AM= MEZCLA DE ANDROGENOS. MT= 17 α METILTESTOSTERONA.T=TESTOSTERONA.TP=PROPIONATO DE TESTOSTERONA

Tabla 6.- Continuación. Niveles de esteroides registrados para distintas especies de *Epinephelus* de acuerdo a su estadio de madurez. Los peces han sido mantenidos en cautividad por lo menos un año. H=hembra, ET= transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E₂ y 11KT están expresados en pg ml⁻¹.

	Condición	Especie	Hormona utilizada	Esteroides	H	Transición		M
						ET	T	
Peces mantenidos en cautividad por un año	Inducción con de esteroides	<i>E. marginatus</i> <i>Ureta, 2011</i>	Dos Implantes de MT	T				160
				11KT				ND
				E ₂				70
		<i>E. marginatus</i> <i>Sarter, 2006</i>	Implante MT EVAC	T				1500
				11KT				250
				E ₂				ND

ND=NO

DETERMINADO

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos

1. Sólo la 17 alfa metilttestosterona logró la reversión sexual de hembras inmaduras a macho de *E. morio*.
2. Los niveles de esteroides en macho de *E. morio* revertidos sexualmente con 17 alfa metilttestosterona fueron 647.15 pg ml⁻¹ para Testosterona, 100.36 pg ml⁻¹ para 11Ketotestosterona y 401.07 pg ml⁻¹ para Estradiol.
3. La 17 alfa metilttestosterona transformó los ovocitos a espermátidas y espermatozoides en la gónada de hembras inmaduras de *E. morio*.
4. La reversión se observó a nivel histológico en la gónada y no en la producción de esperma fluido mediante masaje abdominal o canulación.
5. Se logró por primera vez en cautividad la reversión sexual de *Epinephelus morio*. Además se redujo la talla de cambio de sexo a 27.9 cm de longitud total en el sureste del Golfo de México.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmad, T. A. 2000. Growth and survival of the grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton) at different loading rates in tanks, (1993), 603–608.
- Alam, M. A. Bhandari, R. K. Nakamura, Y. S. Soyano, K. and Nakamura, M. 2006. Changes in Androgen-Producing Cell Size and Circulating 11-Ketotestosterone Level During Female–Male Sex Change of Honeycomb Grouper *Epinephelus merra*. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 206–214.
- Almary, G. Hamilton, R. Bode, M. Matawai, M. Potuku, T. Saenz-Agudelo, P. ... Jones, G. 2013. Dispersal of Grouper Larvae Drives Local Resource Sharing in a Coral Reef Fishery. *Current Biology*, 23, 626–630. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.006>
- Bannerot, S. Fox, W. and Powers, J. 1987. Reproductive strategies and the management of snappers and groupers in the Gulf on Mexico and Caribbean. In J. J. P. & S. Ralston (Ed.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* . (pp. 561–603). Boulder, CO.: Westview Press.
- Baroiller, J. Guiguen, Y. and Fostier, A. 1999. Endocrine and enviromental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 910–931.
- Bhandari, R. K. Komuro, H. Higa, M. and Nakamura, M. 2004. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zoological Science*, 21(3), 305–310.
- Bhandari, R. K. Komuro, H. Nakamura, S. Higa, M. and Nakamura, M. 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. *Zool. Sci.*, 20, 1399–1404.
- Bohnsack, J. A. and Ault, J. S. 1996. Management Strategies to Conserve Marine Biodiversity. *Oceanography*, 9(1), 73–82.
- Borg, B. 1994. Androgens in telost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, C109, 219–245.
- Brulé, T. Colás-Marrufo, T. Pérez-Díaz, E. and Déniel, C. 2004. Epinepheline (Epinephelini) y Pargos (Lutjanidae, Lutjaninae, Lutjanus) del Golfo de México. In M. Caso, I. Pisanti, & E. Escurra (Eds.), *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México* (Vol. Primera, pp. 245–300). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Instituto de Ecología A.C. Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies.
- Brulé, T. and Déniel, C. 1996. Biological research on the red grouper (*Epinephelus morio*) from the southern Gulf of Mexico. . In F. Arreguín- Sánchez, J. Munro, & M. and P. Balgos D. (Eds.), *Biology, fisheries and culture of tropical groupers and snappers* (pp. 28–42). Manila: Conference International Center for Living Aquatic Resources Management Proceedings 48.

- Brulé, T. Déniel, C. Colás-Marrufo, T. and Sánchez-Crespo, M. 1999. Grouper Reproduction in the Southern Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128:3, 385–402. doi:10.1577/1548-8659(1999)1282.0.CO;2
- Brulé, T. Nónh-Quiñones, V. Sánchez-Crespo, M. Colás-Marrufo, T. and Paredes-Díaz, E. 2009. Composición de las Capturas Comerciales del Complejo Mero-pargo en el Sureste del Golfo de México e Implicaciones para el Manejo de su Pesquería . *Proceedings of the 61st Gulf and Caribbean Fisheries Institute, November 1*.
- Brulé, T. and Rodríguez-Canché, L. 1993. Foods habits of juvenile red groupers, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828), from Campeche Bank, Yucatan, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 52, 772– 779.
- Burgos, R. 1999. *Modelo bioeconómico captura-mortalidad para la pesquería de mero Epinephelus morio del Banco de Campeche: un marco de manejo precautorio. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV-IPN Unidad Mérida,.*
- Burgos, R. and Defeo, O. 2004. Long-term population structure, mortality and modeling of a tropical multi-fleet fishery: the red grouper *Epinephelus morio* of the Campeche Bank, Gulf of Mexico. *Fish. Res.*, 66, 325–335.
- Burgos, R. Pérez, M. Mena, J. Cervera, K. Espinoza, J. Mena, R. ... Cob, E. 2008. *Veda de la pesquería de mero (Epinephelus morio) en el Banco de Campeche para el 2008*. Instituto Nacional de Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Vol. 106).
- Caballero-Arango, D. Brulé, T. Montero-Muñoz, J. and Colás-Marrufo, T. 2010. Temporal variation in the Red Grouper, *Epinephelus morio*, Demographic Structure from Southern Gulf of Mexico . *Rev. Mar. Cost. ISSN 1659-455X.*, 2, 39–52.
- Cabrita, E. Engrola, S. Conceição, L. E. C. Pousão-Ferreira, P. and Dinis, M. T. 2009. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, 287(1), 152–157.
- Carrillo, M. and Zanuy, S. 1993. Fisiología de la Reproducción. In F. Castelló (Ed.), *Acuicultura Marina: Fundamentos biología y tecnología de la Reproducción*. (Vol. 4, p. 125). Universidad de Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
- Chao, T. M. and Chow, M. 1990. Effect of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsskål). *Singapore J. Pri. Ind.*, 18, 1–14.
- Coleman, F. Koenig, C. and Collins, L. 1996. Reproductive styles of shallow-water groupers (Pisces: Serranidae) in the eastern Gulf of Mexico and the consequences of fishing spawning aggregations. . *Environmental Biology of Fishes*, 47, 129–141.
- Coleman, F. Koenig, C. Huntsman, G. Musick, J. Eklund, A. McGovern, J. ... Grimes, C. 2000. Long-lived reef fishes: the grouper-snapper complex. *Fisheries*, 25(3), 14–21.
- Colin, P. L. Koenig, C. C. and Laroche, W. A. 1996. Development from egg to juvenile of the red grouper (*Epinephelus morio*)(Pisces: Serranidae) in the laboratory. In *Biology*,

fisheries and culture of tropical groupers and snappers. *ICLARM Conf. Proc* (Vol. 48, pp. 399–414).

- Collins, L. Fitzhugh, G. Lombardi-Carlson, L. Lyon, H. Walling, W. and Oliver, D. 2002. *Characterization of red grouper (Serranidae: Epinephelus morio) reproduction from the eastern Gulf of Mexico. National Marine Fisheries Service Southeast Fisheries Science Center* (Vol. Contributi, pp. 1–21).
- Colombo, R. E. Wills, P. S. and Garvey, J. E. 2004. Use of Ultrasound Imaging to Determine Sex of Shovelnose Sturgeon. *North American Journal of Fisheries Management*, 24(1), 322–326. doi:10.1577/M03-016
- Debas, L. Fostier, A. Fuchs, J. Weppe, M. Nedelec, G. Beneti, A. ... Jalabert. 1989. The sexuality of cultured hermaphroditic fish species: analysis of morphological and endocrinological features in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon*, as a basis for further research to control reproduction in the grouper. . *Advances in Tropical Aquaculture*, 20(4), 543–557.
- DOF. 2007. *Norma Oficial Mexicana NOM-065-PESC-2007*. México.
- DOF. 2012. Carta Nacional Pesquera . *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación, (Segunda S.*
- Evans, A. F. Fitzpatrick, M. S. and Siddens, L. K. 2004. Use of ultrasound imaging and steroid concentrations to identify maturational status in adult steelhead. *North American Journal of Fisheries Management*, 24, 967–978.
- FAO. 2000. *Fishery Statistics: aquaculture production 2000*. (Vol. Fisheries). Roma: FAO.
- FAO. 2012. *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. (D. de P. y Acuicultura, Ed.). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Fisbase. 2013. <http://www.fishbase.org>.
- Francis, R. 1992. Sexual hability in teleost. *Quart. Rev. Biol.*, 67, 1–18.
- García-Moliner, G. and Eklund, G. 2004. *Epinephelus morio*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. .
- Giménez, E. Moreno, V. Burgos, R. and Alfonso, S. 2003. Reproducción y Fecundidad de la Cherna Americana (*Epinephelus morio*) en el Banco de Campeche, México. *Oceanides*, 18(1), 13–21.
- Glamuzina, B. Glavić, N. Skaramuca, B. and Kožul, V. 1998. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe). *Aquaculture Research*, 29(8), 563–567.
- Gutiérrez, D. 2010. *Bioenergética de juveniles Epinephelus morio (VALENCIENNES, 1828. Tesis de Maestría*. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.

- Hassin, S. De Monbrison, D. Hanin, Y. Elizur, A. Zohar, Y. and Popper, D. M. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156(3), 305–316.
- Hliwa, P. Bah, M. Kuźmiński, H. Dobosz, S. and Ciereszko, A. 2013. Ultrasound evaluation of the gonadal structure in sex-reversed rainbow trout females. *Aquaculture International*, 22(1), 89–96. doi:10.1007/s10499-013-9646-5
- Johnson, A. Thomas, P. and Wilson, R. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico . *Journal of Fish Biology*, 52, 502–518.
- Kroon, F. J. Munday, P. L. Westcott, D. a Hobbs, J.-P. a and Liley, N. R. 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 272(1570), 1399–405. doi:10.1098/rspb.2005.3097
- Kumar, R. B. Alam, M. A. Higa, M. Soyano, K. and Nakamura, M. 2005. Evidence That Estrogen Regulates the Sex Change of Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*), a Protogynous Hermaphrodite Fish . *Journal of Experimental Zoology*, 303A, 497–503.
- Kumar, R. B. Komuro, H. Nakamura, S. Higa, M. and Nakamura, M. 2003. Gonadal Restructuring and Correlative Steroid Hormone Profiles during Natural Sex Change in Protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*) . *Zoological Science*, 20, 1399–1404.
- Kuo, C.-M. Ting, Y.-Y. and Yeh, S.-L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74(1-2), 113–126. doi:10.1016/0044-8486(88)90091-9
- Li, G. Ā, X. L. Zhang, Y. and Lin, H. 2006. Gonadal development , aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor , fadrozole. *Aquaculture Research*, 37, 484–491. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01453.x
- Li, G. Liu, X. and Lin, H. 2006. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(1), 25–33.
- Li, G.-L. Liu, X.-C. and Lin, H.-R. 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Animal Reproduction Science*, 99(1), 156–166.
- Marino, G. Azzurro, E. Finoia, M. G. Messina, M. T. Massari, A. and Mandich, A. 2000. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). In *Recent Advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Proceedings of the Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM), jointly organized by CIHEAM and FAO* (Vol. 24, pp. 215–225).

- Mathew, G. 2005a. Broodstock development of groupers. In *Proceedings of Ocean Life Food & Medicine Expo* (pp. 311–317).
- Mathew, G. 2005b. Broodstock Development of Groupers . In *Proceedings of Ocean Life Food & Medicine Expo* (Vol. Chennai, I, pp. 311–317).
- Mathew, G. 2011. Gonadal restructuring during sex transformation in the protogynous greasy grouper *Epinephelus tauvina* (Forsskal) (Perciformes: Serranidae). *Indian Journal of Fisheries*, 58(1), 39–43.
- Mathew, G. Sanila, N. Sreedhar, N. Bhai, K. S. Kambadkar, L. R. and Palaniswamy, N. 2002. Experiments on broodstock development and spawning of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Indian Journal of Fisheries*, 49(2), 135–139.
- McGovern, J. Burgos, J. Harris, P. Sedberry, G. Loefer, J. Pashuk, O. and Russ, D. 2002. *Aspects of the Life History of Red Grouper, Epinephelus morio, Along the Southeastern United States* . South Carolina Department of Natural Resources MARMAP program (Vol. NA97FF0347, p. 59 p).
- Moe, M. A. 1969. *Tagging fishes in Florida offshore waters*. Florida Department of Natural Resources, Marine Research Laboratory. (Vol. Profession).
- Nakamura, M. Kobayashi, S. Miura, M. Alam, M. A. and Bhandari, R. K. 2005. Sex change in coral reef fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31, 117–122.
- Novelo, N. and Tiersch, T. 2012. A Review of the Use of Ultrasonography in Fish Reproduction. *North American Journal of Aquaculture*, 74(2), 169–181.
- Nzeh, G. C. Makinde, K. Jimoh, K. and Obaro, I. O. 2012. Role of Ultrasound in Evaluation of the Presence of Ovaries in *Oreochromis niloticus* (L). *Agriculture*, 4(5), 436–438. doi:10.5829/idosi.wjfm.2012.04.05.6361
- Ottolenghi, F. C. Silvestri, P. Giordano, A. and Lovatelli, M. B. 2004. *Capture based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails*. Roma: FAO.
- Pandian, T. J. 2011. *Sexuality in Fishes* (p. 189). USA: CRC Press.
- Parrish, J. D. 1987. The trophic biology of snappers and groupers. In J. Polovina & S. Ralston (Eds.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (pp. 405–464). Colorado. USA: Westview Press.
- Peatpisut, T. and Bart, A. 2010. Cryopreservation of sperm from natural and sex- reversed orange- spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Research*, 42(1), 22–30.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 229–281. doi:10.1016/S0044-8486(01)00589-0

- Piferrer, F. 2009. Determinación y Diferenciación Sexual en los Peces. In M. Carrillo (Ed.), *La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (pp. 249–336). Madrid, España: Fundación OESA.
- Piferrer, F. Baker, J. and Donaldson, E. M. 1993. Effects of natural, syntethic aromatizable and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 91, 59–65.
- Piferrer, F. Carrillo, M. Zanuy, S. Solar, I. and Donaldson, E. M. 1994. Induction of sterility in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by androgen immersion before first feeding. *Aquaculture*, 119, 409–423.
- Planas P., J. and S. 1995. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins, GTH I and GTH II, in vitro. *Biol. Reprod*, 52, 697–704.
- Pomeroy, R. Agbayani, R. J., T. Sugama B., K. S. and Tridjoko. 2002. *The status of grouper culture in Southeast Asia*. SPC (Vol. 10, pp. 22–26).
- Ralston, S. 1987. Mortality rates of snappers and groupers. In J. Polovina & S. Ralston (Eds.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (pp. 375–404). Boulder, CO.: Westview Press.
- Reinboth, R. 1988. *Physiological problems of teleost ambisexuality*. *Environmental Biology of Fishes* (Vol. 22(4), pp. 249–259). CRC Press. Science publishers.
- Renan, X. Cervera-Cervera, K. and Brulé, T. 2003. Probable Nursery Areas for Juvenile Groupers Along the Northern Coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *54th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 496.
- Rommens, M. 2001. Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of sh using ultrasonography. *Aquaculture*.
- Ross, R. 1990. The evolution of sex-change mechanisms in fishes. *Env. Biol. Fishes*, 29, 81–93.
- Sadovy, Y. 1996. Reproduction of reef fishery species. Pages 15–59 in . In editors. N. V. C. Polunin and C. M. Roberts (Ed.), *Reef fisheries*. (pp. 15–59). London: Chapman and Hall.
- Sanches, E. Oliveira, I. and Serralheiro, C. 2009. Sex inversion of dusky grouper “*Epinephelus marginatus*” INTRODUÇÃO Os serranídeos (família Serranidae , subfamília Epinephelinae) compreendem 159 espécies distribuídas em 15 gêneros . Denominados genericamente por meros , chernes , garoupas e badejos, 198–209.
- Sarter, K. Papadaki, M. Zanuy, S. and Mylonas, C. 2006. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256(1–4), 443–456. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.034>

- Shams, A. J. 2010. Cultured Aquatic Species Information Programme *Epinephelus coioides*. Cultured Aquatic Species Information Programme. *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]*. Rome. Updated 2010. [Cited 30 June 2013]. . Roma: FAO. Retrieved from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Epinephelus_coioides/en
- Shapiro, D. Y. 1987. Reproduction in groupers. In J. Polovina & S. Ralston (Eds.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (pp. 295–327). Boulder, Colorado.: Westview Press,.
- Shapiro, D. Y. Sadovy, Y. and McGehee, M. A. 1993. Periodicity of sex change and reproduction in the red hind *Epinephelus guattatus*, a protogynous grouper. *Bulletin of Marine Science*, 53 (3), 1151–1162.
- Sim, S. T. Rimmer, M. A. Toledo, J. D. Sugama, K. Rumengan, I. Williams, K. C. and Philops, M. J. 2005. *A Practical Guide to Feeds and Feed Management for Cultured Groupers*. (NACA, Ed.). Thailand.
- Tsai, Y.-J. Lee, M.-F. Chen, C.-Y. and Chang, C.-F. 2011. Development of gonadal tissue and aromatase function in the protogynous orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Zool Stud*, 50, 693–704.
- Tucker, J. 1999. *Species Profile Grouper Aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication (Vol. Publicatio).
- Tupper, M. and Sheriff, N. 2002. Capture-based aquaculture of groupers. In A. Lovatelli & P. Holthus (Eds.), *Capture-based aquaculture. Global overview* (pp. 217–253). Roma: FAO Fisheries Technical Paper. No. 508.
- Tupper, M. and Sheriff, N. 2008. *Capture-based aquaculture of groupers. Global overview*. FAO Fisheries Technical Paper. (Vol. No. 508. R, pp. 217–253.). Rome, FAO.
- Ureta, M. 2011. *Avances en la reproducción en cautiverio de la especie Epinephelus marginatus*. Universidad de Barcelona. Universitat de Barcelona.
- Warner, R. 1988. Sex change ins fishes: hypothesis, evidence and objectives. *Env. Biol. Fishes*, 22, 81–90.
- Xia, W. Zhou, L. Yao, B. Li, C. J. and Gui, J. F. 2007. Differential and spermatogenic cell-specific expression of DMRT1 during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 263(1-2), 156–172. doi:10.1016/j.mce.2006.09.014
- Yamaguchi, S. Kagawa, H. Gen, K. Okuzawa, K. and Matsuyama, M. 2004. Silicone implants for delivery of estradiol-17 β and 11-ketotestosterone to red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 239(1-4), 485–496. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.05.031
- Yeh, S. Dai, Q. Chu, Y. Ching-Ming, K. Ting, Y.-Y. and Chang, C. 2003. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228(1-4), 371–381. doi:10.1016/S0044-8486(03)00316-8

Yeh, S. and Kuo, C. 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper , *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218, 729–739.

Zanuy, S. Carrillo, M. Rocha, A. and Molés, G. 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleosteos. In *La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (pp. 99–172). Madrid, España.

Zetina, C. Rios, G. and Contreras, M. 1996. Notas sobre la Reproducción del mero (*Epinephelus morio*) en el Banco de Campeche, Golfo de México. *Ciencia Pesquera*, 13, 27–29.

Zuñiga, S. 2011a. Método de cuantificación de amonio. Técnica para la evaluación en microplaca. *En Prensa*.

Zuñiga, S. 2011b. Método de cuantificación de nitrito. Técnica para la evaluación en microplaca. *En Prensa*.

CAPITULO 2

Evaluación de los cambios de Estradiol, Testosterona y 11-ketotestosterona en sangre de hembras de *Epinephelus morio* entre dos periodos reproductivos naturales y previamente implantadas con Testosterona y Metiltestosterona.

INTRODUCCION

En términos generales, el ciclo de maduración de un pez involucra el desarrollo de la gónada para la formación de los gametos que serán liberados hasta la regeneración de la misma para posteriormente reiniciar el siguiente ciclo. En general se habla de cuatro momentos dentro del ciclo, la recrudescencia, maduración, desove y postdesove, en donde ocurren eventos muy particulares tanto en los ovarios como en los testículos. Este proceso se puede presentar una o varias veces al año, dependiendo de la especie y de la combinación de los factores bióticos y abióticos del medio en donde se desarrolla el pez.

Para estandarizar los términos utilizados en la reproducción de los peces, Brown *et al* (2011) establecen cuatro fases para el ciclo de reproducción y las características generales en cada uno de estos. A) Regeneración, donde los peces son sexualmente maduros pero reproductivamente inactivos; B) Desarrollo, cuando comienza el desarrollo de la gónada pero aún no se encuentran listos para el desove; C) Desovador capaz, cuando ya están listos para el desove; y D) Regresión, cuando cesa el desove.

Los cambios ocasionados en las gónadas están relacionados con las hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) (Johnson, 1998; Ching-Min, 1988). Durante el ciclo reproductivo, estas hormonas se encuentran en distintas concentraciones según la etapa del ciclo, afectando el desarrollo de la gónada y por lo tanto el IG. Si esto se representa de manera gráfica (figura 23), encontramos que los máximos valores del Índice gonadosomático y de los niveles de esteroides (estradiol en las hembras; y 11-ketotestosterona y Testosterona en los machos) se presentan en la etapa de desovador capaz y en el caso del mero rojo esta condición se presenta en los meses de enero a marzo.

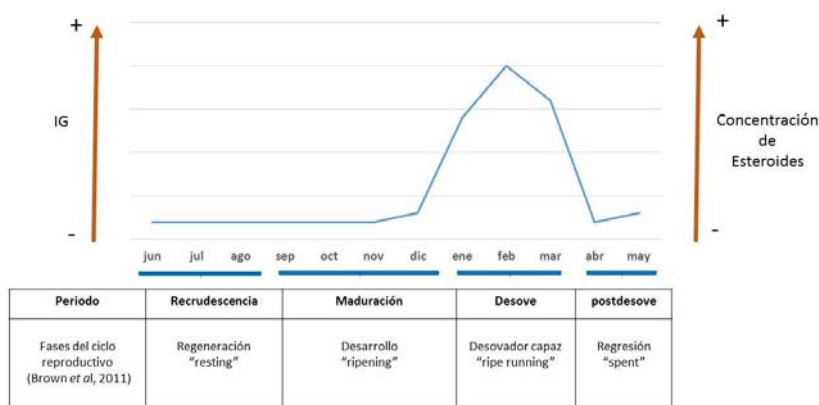


Figura 23.- Representación del ciclo reproductivo del mero rojo y su relación con el Índice gonadosomático y los niveles de esteroides en plasma de acuerdo a lo reportado por Brulé *et al*, (1999) y Johnson *et al* (1998).

Para los peces del género *Epinephelus* se ha reportado que la reversión o cambio de sexo sucede previamente a la temporada de desove, o bien, en cualquier momento del

ciclo reproductivo (Shapiro, 1993). En las poblaciones naturales de *E. morio*, los peces en reversión se han encontrado durante la temporada de regeneración (junio, agosto) y en la temporada de maduración y desove (diciembre, enero y febrero) (Brulé et al., 1999). Los niveles hormonales varían según el estadio de maduración de los meros, así cuando los machos están espermeables, los niveles de T y 11KT son más elevados que cuando están maduros inactivos o en proceso de maduración (Johnson et al., 1998).

Cuando se estimula la reversión sexual de manera artificial en organismos hermafroditas, es importante considerar que los andrógenos externos tendrán efecto en el pez durante el tiempo que se encuentren en sangre, ya que los esteroides no se almacenan (F Piferrer, 2009); por tal motivo, los peces pueden volver a su estado natural de hembra, con sus niveles hormonales propios de condición de hembra y es muy probable que se mantengan así hasta que alcancen la talla natural de macho.

La determinación del tiempo que puede perdurar el efecto de los andrógenos después de la reversión sexual artificial dará la pauta para estimar el tiempo en el que los peces serán viables para fertilizar. Por otra parte, las reversiones definitivas han ocurrido cuando se alcanza una dosis acumulada de 50 a 55 mg para *E. tauvina* (Mathew, 2011) y cuando se utilizan hembras en fase de desarrollo (Alam, 2006; Matherw, 2011).

Los trabajos de reversión sexual de hembras a machos en los meros, concluyen entre los 60 o 90 días que es cuando se obtiene la producción de semen (Cabrita, 2009; Mathew, 2011; Alam, 2006; Bhandari, 2006). Durante este tiempo se ha logrado medir los niveles esteroides en sangre (Yeh, 2003) y poco se sabe de los cambios que ocurren en estas hormonas tiempo después de la reversión a macho. Al respecto solo existen reportes de estos niveles durante el ciclo reproductivo cuando el cambio se da de manera natural en cautividad en el mero de Hong Kong, *E. akaara* (Li, 2007).

Para *E. morio* no existen reportes de la obtención de machos a partir de la reversión inducida y por ende se desconoce el efecto que pudiera tener la hormona una vez concluida la reversión. Es posible que las hembras revertidas a macho regresen a su condición de hembra como lo observado para el mero grasoso *E. tauvina* (Mathew, 2011) o que se mantengan como machos definitivos como el mero del mediterráneo *E. marginatus* (Engrola, com. per.)

Al mismo tiempo se desconoce el comportamiento hormonal de los peces al término de la temporada reproductiva en condiciones de cautividad. Conocer esta información nos permitirá establecer la respuesta reproductiva de los peces en condiciones de cautiverio después de la reversión sexual y antes del próximo periodo reproductivo.

OBJETIVO

Determinar los cambios de Estradiol, Testosterona y 11-ketotestosterona en sangre de hembras de *Epinephelus morio* entre dos periodos reproductivos naturales.

Y paralelamente:

- ✓ Evaluar el crecimiento en talla y peso de hembras de mero rojo *E. morio* previamente implantadas con T y MT.
- ✓ Estimar la sobrevivencia de hembras de mero rojo *E. morio* implantadas previamente con T y MT.

MATERIAL Y METODOS

De marzo a noviembre del 2012 los peces previamente sometidos a reversión sexual inducida con MT y T se mantuvieron en tanques (1.6 m³), en una densidad de tres meros por tanque equivalente a 1.7 kg m³.

Ejemplares utilizados

Esta fase se inició con peces de 581.37 ± 135.39 g de PV y 33.35 ± 2.48 cm de LF. De marzo a abril se mantuvieron en tres tanques (1.6 m³), a partir de junio los peces sometidos al tratamiento de MT fueron llevados a un tanque de 12 m³, debido a la respuesta agresiva de los peces.

Los meros fueron identificados con marcadores electrónicos (PITS tags) colocados intramuscularmente en la región latero-dorsal izquierda del pez (figura 24).



Figura 24.- Colocación de PITS Tags (Biomark HPT8 134.2) en el mero rojo *E. morio*.

Calidad de agua

Durante ocho meses, se registró la calidad de agua evaluando diariamente los parámetros fisicoquímicos oxígeno disuelto, la temperatura del agua y el pH con un Multianalizador HACH Modelo HQ40d y la salinidad con un refractómetro. Esporádicamente se analizó amonio, nitrito y nitrato con la técnica colorimétrica de (Zuñiga, 2011a, 2011b).

Todos los tanques dispusieron de aireación mediante un soplador eléctrico y un recambio diario de agua marina en un 200% en promedio. El agua fue filtrada con un filtro de arena antes de ingresar al sistema.

Diariamente se eliminaron residuos de comida y sedimentos del tanque con un sifón. Una vez por semana se limpiaron con agua dulce los refugios de los peces (tubos de PVC).

Alimentación

Los peces fueron alimentados por la mañana, tres veces por semana (Lunes, Miércoles y Viernes), con una dieta semihúmeda (Tabla 1) elaborada con una semana de anticipación y conservada en congelación hasta momentos antes de alimentar.

Antes y después de proporcionar la dieta, se pesó la cantidad de alimento con una balanza OHAUS de 600 g de capacidad y una precisión de 0.1 g, para calcular el consumo de alimento diario en relación al número de peces por tanque.

Crecimiento y sobrevivencia

Bimestralmente se realizaron muestreos para estimar el crecimiento en talla y peso.

Antes de realizar la biometría, los peces fueron anestesiados uno por uno con aceite de clavo dispuesto en una concentración de 1ml por cada 20L en una caja de plástico de 50 litros. Una vez anestesiados, los peces se pesaron con una balanza OHAUS de 4000 g de capacidad y una precisión de 0.1 g. Para obtener las tallas, los meros fueron fotografiados sobre papel milimétrico. Las imágenes fueron analizadas con el programa informático ImageJ.

Se registró el número de peces muertos durante el periodo de mantenimiento para calcular la supervivencia final en relación al número de meros iniciales.

Plasma sanguíneo

Aprovechando que los peces fueron sedados cada dos meses, se obtuvieron muestras de plasma de cada uno de los peces. La cantidad muestreada fue de 800 a 1000 μ l de sangre del arco branquial (entre las lamelas y en la región más recta). Para extraer la sangre, se utilizaron jeringas de insulina con agujas removibles, previamente

heparinizadas (heparina 1000 UI) y mantenidas previamente en frío dentro de una nevera de unicel o poliespán.

Una vez que los peces perdieron el equilibrio dentro del tanque con anestesia, se colocaron en una “camilla” de tal manera que quedaran en posición ventral y se pudiera descubrir la branquia con facilidad (Figura 15).

Una vez colectada la sangre, se retiró la aguja y se repartió la sangre en dos tubos Eppendorf de 1 ml previamente etiquetados. La sangre fue vertida suavemente por las paredes del tubo y se mantuvo en frío hasta su procesamiento.

Todas las muestras de sangre se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12000 rpm. Las muestras de plasma fueron congeladas a -40°C para posteriormente evaluar los niveles de esteroides (E₂, T y 11KT) y estimar el cambio en los perfiles hormonales de los peces después del tratamiento de reversión sexual.

Esteroides

Se evaluó T, 11KT y E₂ en plasma sanguíneo mediante las técnicas “enzyme immunoassay” (EIA) con los kits Cayman dentro del Laboratorio de Biología Molecular IRTA-ICM (CSIC) en Barcelona.

La metodología utilizada ha sido descrita en el capítulo 1 de este trabajo.

RESULTADOS

Calidad de agua

En la figura 25, se muestran los valores de los parámetros de la calidad de agua, de los tanques experimentales que contuvieron los reproductores de mero rojo (*Epinephelus morio*) bajo condiciones de tratamiento hormonal. Los valores de oxígeno disuelto presentaron concentraciones en un rango de 5.15 a 6.94 mg l⁻¹, la temperatura fue de 25.9 a 27.19 °C, la salinidad entre 36 y 38 ups y el pH con valores de 7.28 a 7.81.

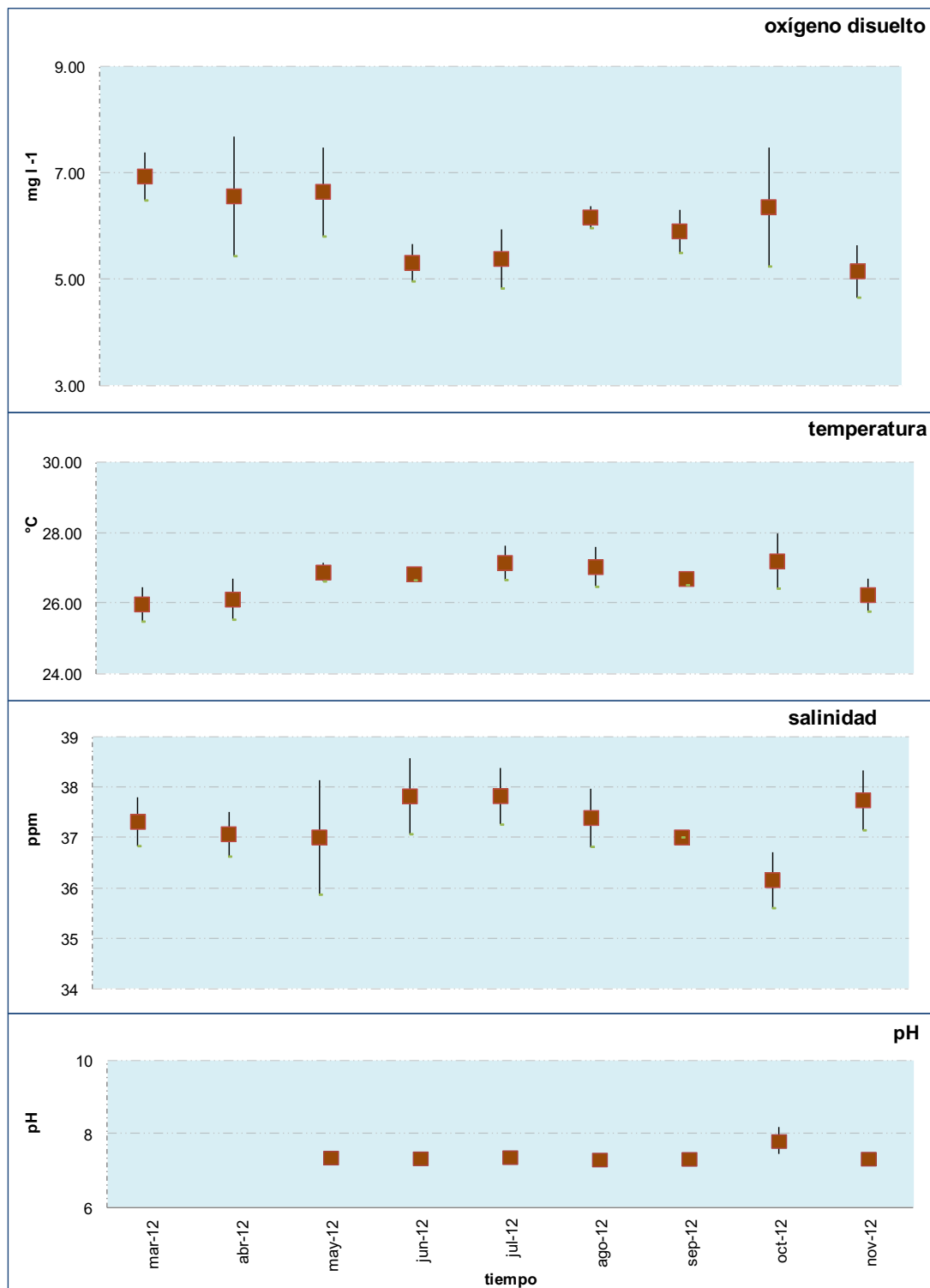


Figura 25.- Valores de oxígeno disuelto, temperatura, salinidad y pH registrados durante el periodo no reproductiva de mero rojo (*Epinephelus morio*) en el Caribe mexicano.

Crecimiento y sobrevivencia

El periodo de mantenimiento se inició con un total de 12 meros, de los cuales tres murieron durante los meses de abril, septiembre y octubre concluyendo esta etapa con un

75% de sobrevivencia. En todos los casos, la muerte de los peces se debió a que saltaron fuera del tanque.

El crecimiento de los peces fue evidente (figura 26) pues duplicaron su peso, aumentando en promedio 548 gramos durante esta periodo (2.6 g día^{-1}). La longitud total incrementó 6.16 cm de abril a noviembre, $0.031 \text{ cm día}^{-1}$.

Consumo de alimento

El consumo de alimento de los peces durante el periodo de mantenimiento se presenta en la figura 26. Los peces gradualmente aumentaron su consumo a medida que incrementaban de peso. Meros con peso de 600 gramos ingirieron 14 gramos promedio por día de alimentación y hasta 37 gramos promedio cuando pesaban más de 1100 gramos.

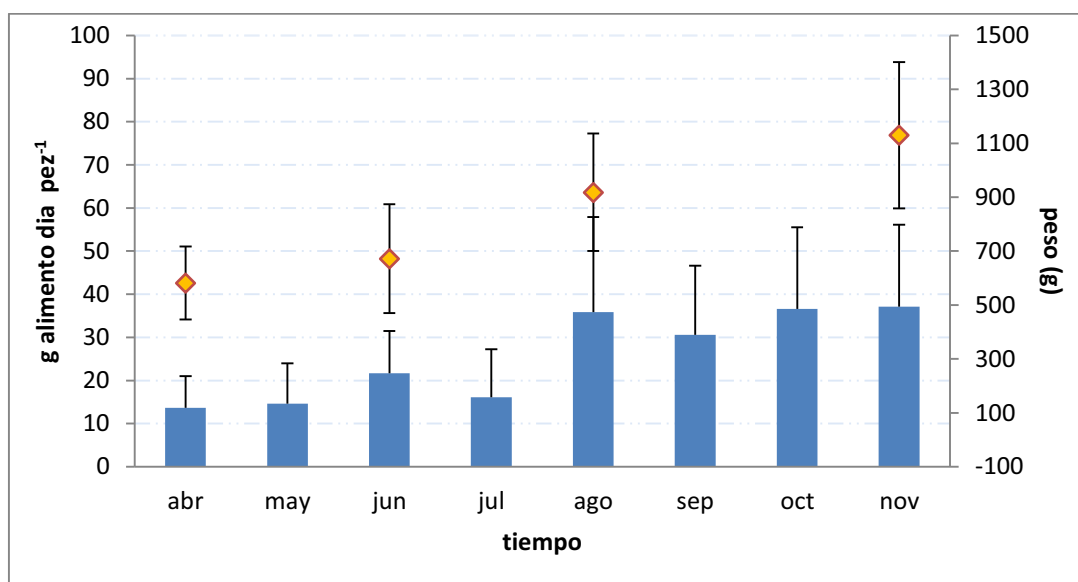


Figura 26.- Consumo promedio de alimento por día del mero rojo *E. morio* (barras azules); alimento consumido por pez en gramos (promedio \pm desviación estándar) y peso promedio de los peces (rombos amarillos) gramos \pm desviación estándar) durante el periodo de mantenimiento. El eje secundario representa el peso vivo de los peces.

Esteroides sexuales

Los valores de esteroides en los meros después de haber sido implantados con MT y T se muestran en la figura 27. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las tres hormonas en todos los tratamientos.

Se encontró que en los peces tratados sin hormonas (CT), la T y el E_2 tienden a mantenerse dentro de un intervalo, mientras que la 11KT tiende a disminuir. El E_2 en los peces control fluctuó entre 141 y 287 pg ml^{-1} , la 11KT presentó concentraciones de 31 a 160.94 pg ml^{-1} mientras que la T presentó concentraciones entre 401 a 1047 pg ml^{-1} .

Para el tratamiento con T, los valores correspondieron a solo un pez. Los niveles de E₂ y T mostraron una tendencia a incrementar con el tiempo, caso contrario, los niveles de 11KT que disminuyó, de manera similar que los peces control. El pez tratado con dos implantes de T mostró niveles de E₂ entre 86 a 319 pg ml⁻¹, de 120 a 241 pg ml⁻¹ de 11KT y de 705 a 804 pg ml⁻¹ de T en el plasma sanguíneo. Como puede apreciarse los niveles hormonales de los tres esteroides en sangre de los peces control y con implantes de Testosterona fueron similares.

Finalmente, en los peces donde se logró la reversión sexual con la colocación de implantes de MT, se observó que los niveles de E₂ se mantuvieron entre 97 a 211 pg ml⁻¹. La T fue constante hasta agosto y para noviembre incrementó de 300 a 1400 pg ml⁻¹ (Tabla 7).

Para los niveles de 11KT fue sorprendente encontrar un pico en el mes de agosto (420 pg ml⁻¹) superior a lo encontrado durante la temporada reproductiva cuando los peces fueron implantados con MT.

Tabla 7.- Concentración de Testosterona, Estradiol (E₂) y 11 ketosterona (11KT) en pg ml⁻¹ en plasma de hembras de *Epinephelus morio* tratadas con implantes silásticos con Testosterona (T), 17 alfa Metiltestosterona (MT) y un grupo control (CT).

Esteroides en plasma (pg ml ⁻¹)	TRATAMIENTOS		
	CT	T	MT
T	401 - 1047	705 a 804	300 - 1400
E ₂	141 - 287	86 - 319	97 - 211
11KT	31 - 160.94	120 - 241	420

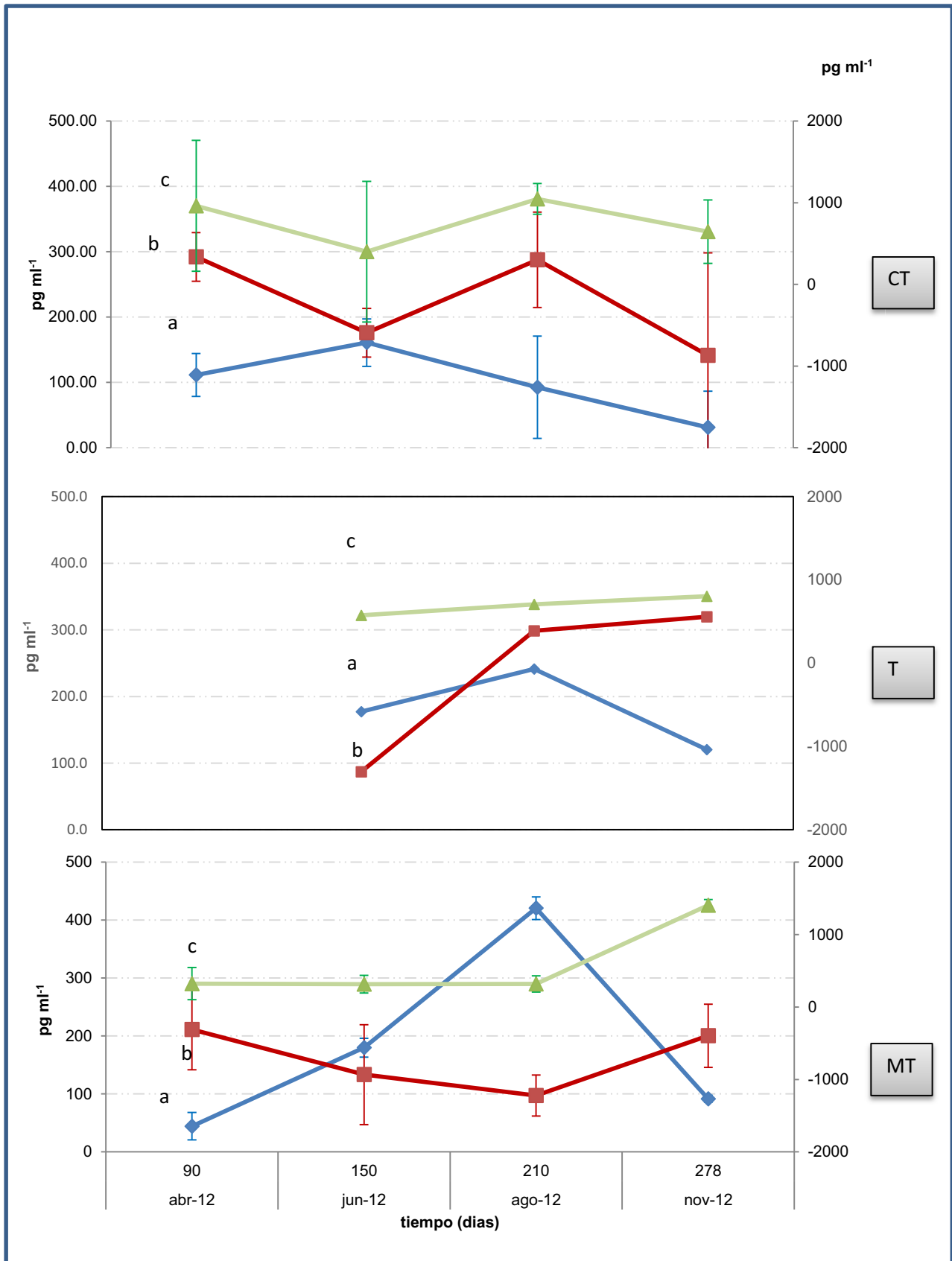


Figura 27.- Valores promedio ($\text{pg ml}^{-1} \pm$ desviación estándar) de esteroides en meros entre dos periodos reproductivos (2012 y 2013) y tratados previamente con dos implantes CT, T y MT respectivamente. La línea color verde representa a la Testosterona, línea roja Estradiol y línea azul a la 11KT. El eje secundario representa la concentración de T también en pg ml^{-1} . Las letras indican diferencias significativas entre las hormonas

DISCUSION

Las condiciones de los parámetros de la calidad de agua fueron muy estables durante este periodo. La temperatura mostró muy poca variación incluso dentro del verano incrementando en no más de 1°C.

Todos los valores registrados se encontraron dentro de lo reportado para otras especies del género *Epinephelus* (Mathew, 2005a; Mathew et al., 2002; Shams, 2010) y lo reportado para crecimiento de *E. coioides* en tanques de 1 m³ (Ahmad, 2000) y para estudios de bioenergética en juveniles de *E. morio* (Gutiérrez, 2010).

Considerando que la temperatura durante este periodo se mantuvo entre 26 y 28°C, ésta tuvo un efecto significativo en la energía destinada para el crecimiento, pues el mero rojo requiere más energía cuando la temperatura del agua aumenta. Aspecto que fue demostrado por Gutiérrez (2010) para juveniles de distintas tallas de *E. morio* en dos condiciones climáticas.

El consumo de alimento obtenido (2.6 gr día⁻¹) fue similar a lo reportado por Gutiérrez (2010), de 2.3 gr día⁻¹; de acuerdo al balance energético obtenido por este autor, la energía de la dieta destinada a la generación de biomasa representa el menor porcentaje de la energía ingerida (18 a 33% según la talla de los peces); a pesar de esto, los meros durante estos siete meses de mantenimiento además de que aumentaron el consumo del alimento duplicaron su talla, lo que de alguna manera pudiera indicar que la composición de la dieta utilizada se acerca a los requerimientos de la especie.

El uso de esteroides externos para la reversión sexual ha sido una práctica común en los peces de la familia Serranidae. La respuesta última esperada de las hembras o juveniles sometidos a reversión sexual es la producción de esperma; sin embargo, la reversión puede darse sin este producto final, por lo que para demostrar la efectividad del esteroide utilizado, así como el vehículo del mismo (inyección, alimento o implante) se realizaron una serie de evaluaciones que ayudaron a demostrar y a entender el proceso de inversión sexual.

Para conocer el estado de reversión de los “groupers”, se realizan análisis histológicos de la gónada (Mathew, 2011), evaluaciones de la actividad de la aromatasa (Li et al., 2006; Li et al., 2007), evaluación de LH en pituitaria (Sarter et al., 2006), obtención del índice gonadosomático (Shapiro et al., 1993) y análisis de los niveles de T, 11 KT y E₂ en sangre (Kuo et al., 1988; Ureta, 2011; Xia et al., 2007). Generalmente, este tipo de indicadores se miden durante el tiempo de reversión, periodo que puede abarcar de 4 a 12 semanas en promedio. No existen reportes de estas evaluaciones después de la reversión inducida.

Hasta ahora los niveles hormonales en *Epinephelus morio* y *E. microdon* durante todo el ciclo reproductivo han sido evaluados en organismos capturados del medio natural (Johnson et al. 1998) y en ejemplares silvestres de *E. akaara* y *E. microdon* mantenidos en laboratorio por un año (Debas et al., 1989; G.-L. Li et al., 2007). En estas especies, las

concentraciones de T, 11KT y E₂ disminuyen durante la fase de regresión, regeneración y desarrollo en relación a los valores encontrados en la fase de desove. Durante la regresión y reposo, las hembras, machos e intersexo presentan valores inferiores a 1000 pg ml⁻¹ para 11KT y E₂, y menores a 250 pg ml⁻¹ en T, mientras que durante la fase de desove los valores son mayores a 900 pg ml⁻¹ en T (G.-L. Li et al., 2007).

Por otro lado, hembras silvestres de *E. morio* de la población de Florida fuera de la temporada reproductiva, mostraron valores inferiores a 1000 pg ml⁻¹ de T y E₂, mientras que en los machos los valores reportados fueron menores de 2000 pg ml⁻¹ para T y 11KT y menos de 500 pg ml⁻¹ de E₂. Estos valores fueron similares a los encontrados en los ejemplares de *E. morio* después de los implantes de CT, MT y T (figura 27), sin embargo un incremento de 11 KT hasta alcanzar un pico de 420 pg ml⁻¹ a los 210 días se presentó en los meros tratados con MT, lo que podría indicar que aun los implantes continuaban liberando la hormona.

Para los implantes silásticos se requieren dosis muy altas de hormonas en relación a otros tipos de implantes (Sarter et al., 2006). La técnica utilizada por Yamaguchi et al (2004) con DMSO y aceite castor (utilizada en este trabajo) requiere de menor dosis; sin embargo, para *Pagrus aurata*, se encontró que en 30 días solo se había liberado el 10% de la hormona (Yamaguchi et al., 2004), por ello es posible, que en el caso del mero rojo, la liberación de MT haya continuado rebasando por mucho los 100 pg ml⁻¹ encontrados en los meros con reversión tardía (figura 22); por lo que es posible que hasta los 210 días (agosto) después del primer implante se hubiera podido colectar semen. Lamentablemente los peces no fueron canulados durante este tiempo, pues al estar durante la temporada no reproductiva se podrían dañar los conductos genitales al introducir la cánula.

De manera contraria, los peces tratados con testosterona y sin hormona, presentaron niveles hormonales similares entre ellos, lo cual podría indicar que los meros continuaron, en ambos casos, en su condición de hembras inmaduras.

Una vez lograda la reversión sexual a macho por inducción externa, pueden pasar dos cosas; a) que el pez regrese a su condición de hembra una vez pasado el efecto del andrógeno (Marino et al., 2000), o bien, se logre la reversión definitiva (Sarter et al., 2006). La diferencia de la respuesta está dada por el momento de la aplicación de la hormona dentro del ciclo reproductivo, la forma de aplicación (inyección, implante, alimento), la hormona utilizada y dosis, es decir, la eficiencia de la administración (Sarter et al., 2006). En este caso, no se puede asegurar que la reversión sea definitiva pues se requiere esperar hasta la próxima temporada reproductiva.

La reversión sexual en el mero rojo *E. morio* puede darse no solo durante la temporada reproductiva. Brulé (1999) reportó organismos intersexo en los meses de junio y agosto, es decir, pueden presentar el cambio de sexo en la temporada reproductiva y fuera de ésta. Por otro lado, se ha reportado que la talla de reversión ha disminuido de 60.5 cm LT del año 1989 al 1992 hasta 48.5 cm en el año 2003 al 2004 a causa del esfuerzo pesquero (Caballero-Arango et al., 2010); por lo que pudiera ser posible que los meros

con 38.58 cm de LT (talla de los meros tratados con MT) también estuvieran en posibilidad de revertir a machos en “condiciones naturales”, más aun si recibieron el andrógeno que estimula la reversión sexual.

Dentro de los sistemas de producción, es de esperarse que una vez que se logra la reversión sexual, esos ejemplares conformen el banco de reproductores. Si la reversión sólo fue temporal, podría volver a repetirse durante el siguiente ciclo reproductivo con organismos de mayor tamaño y con gónadas más grandes. Si la reversión fuera definitiva, se tendrían ya los machos que asegurarían la fertilización natural o artificial de los huevos. De esta manera, los peces continuarán en cautiverio hasta la próxima temporada reproductiva.

CONCLUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye:

1. Los niveles de esteroides en hembras control (sin hormonas) entre dos periodos reproductivos fueron entre 141 y 287 pg ml⁻¹ para Estradiol, de 31 a 160.94 pg ml⁻¹ para 11Ketotestosterona y entre 401 a 1047 pg ml⁻¹ para Testosterona.
2. Los niveles de esteroides para el único pez sobreviviente con implantes de testosterona fueron de 86 a 319 pg ml⁻¹ para Estradiol, de 120 a 241 pg ml⁻¹ de 11Ketotestosterona y de 705 a 804 pg ml⁻¹ de Testosterona en el plasma sanguíneo.
3. Los niveles de esteroides del mero rojo con implantes de 17 alfa metiltestosterona entre dos periodos reproductivos se mantuvo entre 97 a 211 pg ml⁻¹ para Estradiol. La Testosterona incrementó de 300 a 1400 pg ml⁻¹, mientras que la 11 ketotestosterona fluctuó entre 44 a 420 pg ml⁻¹, registrando un pico en el mes de agosto, a los 210 días después del primer implante.
4. Durante el tiempo de mantenimiento utilizando dieta semihúmeda, los peces crecieron 2.6 g día⁻¹ y 0.031 cm día⁻¹.
5. Se logró una sobrevivencia del 75%. La mortalidad se debió al salto de los peces fuera del tanque.
6. Previo al inicio del siguiente ciclo reproductivo, se dispone de cinco meros tratados con 17 alfa metiltestosterona, un mero previamente implantado con Testosterona y tres meros sin tratamiento hormonal.
7. Los implantes silásticos con 17 alfa Metiltestosterona (MT) en las dosis probadas en hembras de *Epinephelus morio* promovieron la reversión sexual en el periodo de estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmad, T. A. 2000. Growth and survival of the grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton) at different loading rates in tanks, (1993), 603–608.
- Alam, M. A. Bhandari, R. K. Nakamura, Y. S. Soyano, K. and Nakamura, M. 2006. Changes in Androgen-Producing Cell Size and Circulating 11-Ketotestosterone Level During Female–Male Sex Change of Honeycomb Grouper *Epinephelus merra*. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 206–214.
- Almary, G. Hamilton, R. Bode, M. Matawai, M. Potuku, T. Saenz-Agudelo, P. ... Jones, G. 2013. Dispersal of Grouper Larvae Drives Local Resource Sharing in a Coral Reef Fishery. *Current Biology*, 23, 626–630. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.006>
- Bannerot, S. Fox, W. and Powers, J. 1987. Reproductive strategies and the management of snappers and groupers in the Gulf on Mexico and Caribbean. In J. J. P. & S. Ralston (Ed.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* . (pp. 561–603). Boulder, CO.: Westview Press.
- Baroiller, J. Guiguen, Y. and Fostier, A. 1999. Endocrine and enviromental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 910–931.
- Bhandari, R. K. Komuro, H. Higa, M. and Nakamura, M. 2004. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zoological Science*, 21(3), 305–310.
- Bhandari, R. K. Komuro, H. Nakamura, S. Higa, M. and Nakamura, M. 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. *Zool. Sci.*, 20, 1399–1404.
- Bohnsack, J. A. and Ault, J. S. 1996. Management Strategies to Conserve Marine Biodiversity. *Oceanography*, 9(1), 73–82.
- Borg, B. 1994. Androgens in telost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, C109, 219–245.
- Brulé, T. Colás-Marrufo, T. Pérez-Díaz, E. and Déniel, C. 2004. Epinepheline (Epinephelini) y Pargos (Lutjanidae, Lutjaninae, Lutjanus) del Golfo de México. In M. Caso, I. Pisanti, & E. Escurra (Eds.), *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México* (Vol. Primera, pp. 245–300). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Instituto de Ecología A.C. Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies.
- Brulé, T. and Déniel, C. 1996. Biological research on the red grouper (*Epinephelus morio*) from the southern Gulf of Mexico. . In F. Arreguín- Sánchez, J. Munro, & M. and P. Balgos D. (Eds.), *Biology, fisheries and culture of tropical groupers and snappers* (pp. 28–42). Manila: Conference International Center for Living Aquatic Resources Management Proceedings 48.

- Brulé, T. Déniel, C. Colás-Marrufo, T. and Sánchez-Crespo, M. 1999. Grouper Reproduction in the Southern Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128:3, 385–402. doi:10.1577/1548-8659(1999)1282.0.CO;2
- Brulé, T. Nónh-Quñones, V. Sánchez-Crespo, M. Colás-Marrufo, T. and Paredes-Díaz, E. 2009. Composición de las Capturas Comerciales del Complejo Mero-pargo en el Sureste del Golfo de México e Implicaciones para el Manejo de su Pesquería . *Proceedings of the 61st Gulf and Caribbean Fisheries Institute, November 1*.
- Brulé, T. and Rodríguez-Canché, L. 1993. Foods habits of juvenile red groupers, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828), from Campeche Bank, Yucatan, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 52, 772– 779.
- Burgos, R. 1999. *Modelo bioeconómico captura-mortalidad para la pesquería de mero Epinephelus morio del Banco de Campeche: un marco de manejo precautorio. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV-IPN Unidad Mérida,.*
- Burgos, R. and Defeo, O. 2004. Long-term population structure, mortality and modeling of a tropical multi-fleet fishery: the red grouper *Epinephelus morio* of the Campeche Bank, Gulf of Mexico. *Fish. Res.*, 66, 325–335.
- Burgos, R. Pérez, M. Mena, J. Cervera, K. Espinoza, J. Mena, R. ... Cob, E. 2008. *Veda de la pesquería de mero (Epinephelus morio) en el Banco de Campeche para el 2008.* . Instituto Nacional de Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Vol. 106).
- Caballero-Arango, D. Brulé, T. Montero-Muñoz, J. and Colás-Marrufo, T. 2010. Temporal variation in the Red Grouper, *Epinephelus morio*, Demographic Structure from Southern Gulf of Mexico . *Rev. Mar. Cost. ISSN 1659-455X.*, 2, 39–52.
- Cabrita, E. Engrola, S. Conceição, L. E. C. Pousão-Ferreira, P. and Dinis, M. T. 2009. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, 287(1), 152–157.
- Carrillo, M. and Zanuy, S. 1993. Fisiología de la Reproducción. In F. Castelló (Ed.), *Acuicultura Marina: Fundamentos biología y tecnología de la Reproducción.* (Vol. 4, p. 125). Universidad de Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
- Chao, T. M. and Chow, M. 1990. Effect of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsskål). *Singapore J. Pri. Ind.*, 18, 1–14.
- Coleman, F. Koenig, C. and Collins, L. 1996. Reproductive styles of shallow-water groupers (Pisces: Serranidae) in the eastern Gulf of Mexico and the consequences of fishing spawning aggregations. . *Environmental Biology of Fishes*, 47, 129–141.
- Coleman, F. Koenig, C. Huntsman, G. Musick, J. Eklund, A. McGovern, J. ... Grimes, C. 2000. Long-lived reef fishes: the grouper-snapper complex. *Fisheries*, 25(3), 14–21.
- Colin, P. L. Koenig, C. C. and Laroche, W. A. 1996. Development from egg to juvenile of the red grouper (*Epinephelus morio*)(Pisces: Serranidae) in the laboratory. In *Biology*,

fisheries and culture of tropical groupers and snappers. ICLARM Conf. Proc (Vol. 48, pp. 399–414).

- Collins, L. Fitzhugh, G. Lombardi-Carlson, L. Lyon, H. Walling, W. and Oliver, D. 2002. *Characterization of red grouper (Serranidae: Epinephelus morio) reproduction from the eastern Gulf of Mexico. National Marine Fisheries Service Southeast Fisheries Science Center* (Vol. Contributi, pp. 1–21).
- Colombo, R. E. Wills, P. S. and Garvey, J. E. 2004. Use of Ultrasound Imaging to Determine Sex of Shovelnose Sturgeon. *North American Journal of Fisheries Management*, 24(1), 322–326. doi:10.1577/M03-016
- Debas, L. Fostier, A. Fuchs, J. Weppe, M. Nedelec, G. Beneti, A. ... Jalabert. 1989. The sexuality of cultured hermaphroditic fish species: analysis of morphological and endocrinological features in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon*, as a basis for further research to control reproduction in the grouper. . *Advances in Tropical Aquaculture*, 20(4), 543–557.
- DOF. 2007. *Norma Oficial Mexicana NOM-065-PESC-2007*. México.
- DOF. 2012. Carta Nacional Pesquera . *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación, (Segunda S.*
- Evans, A. F. Fitzpatrick, M. S. and Siddens, L. K. 2004. Use of ultrasound imaging and steroid concentrations to identify maturational status in adult steelhead. *North American Journal of Fisheries Management*, 24, 967–978.
- FAO. 2000. *Fishery Statistics: aquaculture production 2000*. (Vol. Fisheries). Roma: FAO.
- FAO. 2012. *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. (D. de P. y Acuicultura, Ed.). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Fisbase. 2013. <http://www.fishbase.org>.
- Francis, R. 1992. Sexual hability in teleost. *Quart. Rev. Biol.*, 67, 1–18.
- García-Moliner, G. and Eklund, G. 2004. *Epinephelus morio*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. .
- Giménez, E. Moreno, V. Burgos, R. and Alfonso, S. 2003. Reproducción y Fecundidad de la Cherna Americana (*Epinephelus morio*) en el Banco de Campeche, México. *Oceanides*, 18(1), 13–21.
- Glamuzina, B. Glavić, N. Skaramuca, B. and Kožul, V. 1998. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe). *Aquaculture Research*, 29(8), 563–567.
- Gutiérrez, D. 2010. *Bioenergética de juveniles Epinephelus morio (VALENCIENNES, 1828. Tesis de Maestría*. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.

- Hassin, S. De Monbrison, D. Hanin, Y. Elizur, A. Zohar, Y. and Popper, D. M. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156(3), 305–316.
- Hliwa, P. Bah, M. Kuźmiński, H. Dobosz, S. and Ciereszko, A. 2013. Ultrasound evaluation of the gonadal structure in sex-reversed rainbow trout females. *Aquaculture International*, 22(1), 89–96. doi:10.1007/s10499-013-9646-5
- Johnson, A. Thomas, P. and Wilson, R. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 52, 502–518.
- Kroon, F. J. Munday, P. L. Westcott, D. a Hobbs, J.-P. a and Liley, N. R. 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 272(1570), 1399–405. doi:10.1098/rspb.2005.3097
- Kumar, R. B. Alam, M. A. Higa, M. Soyano, K. and Nakamura, M. 2005. Evidence That Estrogen Regulates the Sex Change of Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*), a Protogynous Hermaphrodite Fish. *Journal of Experimental Zoology*, 303A, 497–503.
- Kumar, R. B. Komuro, H. Nakamura, S. Higa, M. and Nakamura, M. 2003. Gonadal Restructuring and Correlative Steroid Hormone Profiles during Natural Sex Change in Protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*). *Zoological Science*, 20, 1399–1404.
- Kuo, C.-M. Ting, Y.-Y. and Yeh, S.-L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74(1-2), 113–126. doi:10.1016/0044-8486(88)90091-9
- Li, G. Ā, X. L. Zhang, Y. and Lin, H. 2006. Gonadal development, aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole. *Aquaculture Research*, 37, 484–491. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01453.x
- Li, G. Liu, X. and Lin, H. 2006. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(1), 25–33.
- Li, G.-L. Liu, X.-C. and Lin, H.-R. 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Animal Reproduction Science*, 99(1), 156–166.
- Marino, G. Azzurro, E. Finoia, M. G. Messina, M. T. Massari, A. and Mandich, A. 2000. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). In *Recent Advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Proceedings of the Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM), jointly organized by CIHEAM and FAO* (Vol. 24, pp. 215–225).

- Mathew, G. 2005a. Broodstock development of groupers. In *Proceedings of Ocean Life Food & Medicine Expo* (pp. 311–317).
- Mathew, G. 2005b. Broodstock Development of Groupers . In *Proceedings of Ocean Life Food & Medicine Expo* (Vol. Chennai, I, pp. 311–317).
- Mathew, G. 2011. Gonadal restructuring during sex transformation in the protogynous greasy grouper *Epinephelus tauvina* (Forsskal) (Perciformes: Serranidae). *Indian Journal of Fisheries*, 58(1), 39–43.
- Mathew, G. Sanila, N. Sreedhar, N. Bhai, K. S. Kambadkar, L. R. and Palaniswamy, N. 2002. Experiments on broodstock development and spawning of *Epinephelus tauvina* (Forsk.) . *Indian Journal of Fisheries*, 49(2), 135–139.
- McGovern, J. Burgos, J. Harris, P. Sedberry, G. Loefer, J. Pashuk, O. and Russ, D. 2002. *Aspects of the Life History of Red Grouper, Epinephelus morio, Along the Southeastern United States* . South Carolina Department of Natural Resources MARMAP program (Vol. NA97FF0347, p. 59 p).
- Moe, M. A. 1969. *Tagging fishes in Florida offshore waters*. Florida Department of Natural Resources, Marine Research Laboratory. (Vol. Profession).
- Nakamura, M. Kobayashi, S. Miura, M. Alam, M. A. and Bhandari, R. K. 2005. Sex change in coral reef fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31, 117–122.
- Novelo, N. and Tiersch, T. 2012. A Review of the Use of Ultrasonography in Fish Reproduction. *North American Journal of Aquaculture*, 74(2), 169–181.
- Nzeh, G. C. Makinde, K. Jimoh, K. and Obaro, I. O. 2012. Role of Ultrasound in Evaluation of the Presence of Ovaries in *Oreochromis niloticus* (L). *Agriculture*, 4(5), 436–438. doi:10.5829/idosi.wjfm.2012.04.05.6361
- Ottolenghi, F. C. Silvestri, P. Giordano, A. and Lovatelli, M. B. 2004. *Capture based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails*. Roma: FAO.
- Pandian, T. J. 2011. *Sexuality in Fishes* (p. 189). USA: CRC Press.
- Parrish, J. D. 1987. The trophic biology of snappers and groupers. In J. Polovina & S. Ralston (Eds.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (pp. 405–464). Colorado. USA: Westview Press.
- Peatpisut, T. and Bart, A. 2010. Cryopreservation of sperm from natural and sex-reversed orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Research*, 42(1), 22–30.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 229–281. doi:10.1016/S0044-8486(01)00589-0
- Piferrer, F. 2009. Determinación y Diferenciación Sexual en los Peces. In M. Carrillo (Ed.), *La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (pp. 249–336). Madrid, España: Fundación OESA.

- Piferrer, F. Baker, J. and Donaldson, E. M. 1993. Effects of natural, syntethic aromatizable and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 91, 59–65.
- Piferrer, F. Carrillo, M. Zanuy, S. Solar, I. and Donaldson, E. M. 1994. Induction of sterility in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by androgen immersion before first feeding. *Aquaculture*, 119, 409–423.
- Planas P., J. and S. 1995. Maturation-associated changes in the respose of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins, GTH I and GTH II, in vitro. *Biol. Reprod*, 52, 697–704.
- Pomeroy, R. Agbayani, R. J., T. Sugama B., K. S. and Tridjoko. 2002. *The status of grouper culture in Southeast Asia*. SPC (Vol. 10, pp. 22–26).
- Ralston, S. 1987. Mortality rates of snappers and groupers. In J. Polovina & S. Ralston (Eds.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (pp. 375–404). Boulder, CO.: Westview Press.
- Reinboth, R. 1988. *Physiological problems of teleost ambisexuality*. *Environmental Biology of Fishes* (Vol. 22(4), pp. 249–259). CRC Press. Science publishers.
- Renan, X. Cervera-Cervera, K. and Brulé, T. 2003. Probable Nursery Areas for Juvenile Groupers Along the Northern Coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *54th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 496.
- Rommens, M. 2001. Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of ® sh using ultrasonography. *Aquaculture*.
- Ross, R. 1990. The evolution of sex-change mechanisms in fishes. *Env. Biol. Fishes*, 29, 81–93.
- Sadovy, Y. 1996. Reproduction of reef fishery species. Pages 15–59 in . In editors. N. V. C. Polunin and C. M. Roberts (Ed.), *Reef fisheries*. (pp. 15–59). London: Chapman and Hall.
- Sanches, E. Oliveira, I. and Serralheiro, C. 2009. Sex inversion of dusky grouper “*Epinephelus marginatus*” INTRODUÇÃO Os serranídeos (família Serranidae , subfamília Epinephelinae) compreendem 159 espécies distribuídas em 15 gêneros . Denominados genericamente por meros , chernes , garoupas e badejos, 198–209.
- Sarter, K. Papadaki, M. Zanuy, S. and Mylonas, C. 2006. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256(1–4), 443–456. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.034>
- Shams, A. J. 2010. Cultured Aquatic Species Information Programme *Epinephelus coioides*. Cultured Aquatic Species Information Programme. *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]*. Rome. Updated 2010. [Cited 30 June 2013]. .

Roma: FAO. Retrieved from
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Epinephelus_coioides/en

- Shapiro, D. Y. 1987. Reproduction in groupers. In J. Polovina & S. Ralston (Eds.), *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (pp. 295–327). Boulder, Colorado.: Westview Press,.
- Shapiro, D. Y. Sadovy, Y. and McGehee, M. A. 1993. Periodicity of sex change and reproduction in the red hind *Epinephelus guattatus*, a protogynous grouper. *Bulletin of Marine Science*, 53 (3), 1151–1162.
- Sim, S. T. Rimmer, M. A. Toledo, J. D. Sugama, K. Rumengan, I. Williams, K. C. and Philops, M. J. 2005. *A Practical Guide to Feeds and Feed Management for Cultured Groupers*. (NACA, Ed.). Thailand.
- Tsai, Y.-J. Lee, M.-F. Chen, C.-Y. and Chang, C.-F. 2011. Development of gonadal tissue and aromatase function in the protogynous orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Zool Stud*, 50, 693–704.
- Tucker, J. 1999. *Species Profile Grouper Aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication (Vol. Publicatio).
- Tupper, M. and Sheriff, N. 2002. Capture-based aquaculture of groupers. In A. Lovatelli & P. Holthus (Eds.), *Capture-based aquaculture. Global overview* (pp. 217–253). Roma: FAO Fisheries Technical Paper. No. 508.
- Tupper, M. and Sheriff, N. 2008. *Capture-based aquaculture of groupers. Global overview*. FAO Fisheries Technical Paper. (Vol. No. 508. R, pp. 217–253.). Rome, FAO.
- Ureta, M. 2011. *Avances en la reproducción en cautiverio de la especie Epinephelus marginatus*. Universidad de Barcelona. Universitat de Barcelona.
- Warner, R. 1988. Sex change ins fishes: hypothesis, evidence and objectives. *Env. Biol. Fishes*, 22, 81–90.
- Xia, W. Zhou, L. Yao, B. Li, C. J. and Gui, J. F. 2007. Differential and spermatogenic cell-specific expression of DMRT1 during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 263(1-2), 156–172.
doi:10.1016/j.mce.2006.09.014
- Yamaguchi, S. Kagawa, H. Gen, K. Okuzawa, K. and Matsuyama, M. 2004. Silicone implants for delivery of estradiol-17 β and 11-ketotestosterone to red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 239(1-4), 485–496. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.05.031
- Yeh, S. Dai, Q. Chu, Y. Ching-Ming, K. Ting, Y.-Y. and Chang, C. 2003. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228(1-4), 371–381. doi:10.1016/S0044-8486(03)00316-8

Yeh, S. and Kuo, C. 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper , *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218, 729–739.

Zanuy, S. Carrillo, M. Rocha, A. and Molés, G. 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleosteos. In *La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (pp. 99–172). Madrid, España.

Zetina, C. Rios, G. and Contreras, M. 1996. Notas sobre la Reproducción del mero (*Epinephelus morio*) en el Banco de Campeche, Golfo de México. *Ciencia Pesquera*, 13, 27–29.

Zuñiga, S. 2011a. Método de cuantificación de amonio. Técnica para la evaluación en microplaca. *En Prensa*.

Zuñiga, S. 2011b. Método de cuantificación de nitrito. Técnica para la evaluación en microplaca. *En Prensa*.

CAPITULO 3

Conocer el efecto de dos dosis de MT en la reversión sexual de hembras de *Epinephelus morio* de hembra a macho en su periodo reproductivo natural.

INTRODUCCION

Para la inducción con esteroides a la masculinización en organismos gonocóricos es frecuente realizar los tratamientos durante el periodo crítico de la diferenciación del sexo. Durante este tiempo las gónadas comienzan el desarrollo y las células germinales son bipotenciales y tienen la capacidad de desarrollar ovogonias o espermatogonias (Sarter et al., 2006).

En el caso de los organismos hermafroditas, exitosas reversiones han sido reportadas en organismos reproductivamente maduros (Bhandari et al., 2006; Mathew, 2011) o bien, en juveniles (Glamuzina et al., 1998; Marino et al., 2000; Sarter et al., 2006).

La reversión sexual es una práctica común en la acuicultura (Hassin et al., 1997) y la metiltestosterona es el andrógeno más utilizado para los meros del género *Epinephelus* utilizado dosis desde los 2.3 mg Kg⁻¹ para *E. aeneus* (Hassin et al., 1997) hasta los 11 mg Kg⁻¹ para *E. marginatus* (Sarter et al., 2006). La aplicación de ésta sola (Glamuzina et al., 1998; Hassin et al., 1997; G Li et al., 2006; Mathew et al., 2002; Yeh, Dai, et al., 2003), combinada con Propionato de Testosterona (Yeh, Kuo, et al., 2003) o con Gonadotropina Coriónica Humana (Sarter et al., 2006) han conseguido la transición a macho, incluyendo desde la observación de espermátidas a espermatoцитos hasta la reversión definitiva a machos.

En especies como *E. marginatus* donde la reversión sexual ocurre en peces de entre 9 y 16 años (Chauvet 1998, Marino 2001 en: Sarter, 2006) o como *E. morio*, donde sucede a partir de los 7 años en la población del este del Golfo de México (McGovern et al., 2002) o 13 años de vida en la población del sureste (Collins et al., 2002) será importante asegurar que la reversión sexual inducida en juveniles o hembras sea efectiva durante la temporada reproductiva y que entonces forme parte de la estrategia de reproducción en cautividad, o de lo contrario, ser una reversión definitiva que permita disponer de un stock de machos de pequeña talla.

A la fecha sólo se ha reportado la reversión definitiva a macho en *E. marginatus* (Conceição et al., 2008; Sarter et al., 2006). Sarter et al (2006) utilizaron una mezcla de MT (11 mg kg⁻¹) con 6000 UI kg⁻¹ de GCH colocados en implantes elaborados con el copolímero Etileno-Vinil acetato (EVAc por sus siglas en inglés) logrando un cambio de sexo a los tres meses del tratamiento y manteniéndose en esta condición de macho al año siguiente.

De manera similar Conceição *et al* (2008) utilizaron 2.5 mg kg⁻¹ de MT y después de dos meses de tratamiento hembras cambian a macho y los organismos inmaduros se mantienen en la misma condición. Al año siguiente un mero continuaba siendo macho antes del tratamiento con MT y después del tratamiento hormonal tanto hembras como meros inmaduros fueron machos funcionales.

Considerando que es relativamente fácil tener más acceso a peces inmaduros de mero rojo, no así los machos, debido a la distribución espacial que tienen los sexos de esta especie en el Golfo de México, es necesario encontrar la estrategia de la reproducción en cautividad para asegurar su producción comercial. De manera general hay dos aspectos principales a resolver de manera inmediata; primero, el mantenimiento adecuado de los peces al cautiverio y segundo la inducción a la pubertad en organismos precoces para asegurar la producción de semen.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos hasta este momento dentro de este trabajo de investigación con el mero rojo donde se ha logrado una transición tardía de la reversión sexual a macho, además por llevar un año en cautividad los peces han alcanzado una mayor talla, es necesario saber si una dosis mayor de MT puede ayudar a la producción de semen, por lo que se pretende cubrir los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

1. Conocer el efecto de dos dosis de 17 alfa metiltestosterona (5 y 7.5 mg kg⁻¹) en la reversión de hembras inmaduras de mero rojo *Epinephelus morio* a machos dentro de su periodo reproductivo natural
 - ✓ Conocer los niveles de esteroides de los peces tratados con dos dosis de hormonas mediante el análisis de plasma sanguíneo.
 - ✓ Conocer el cambio ocurrido en la gónada del mero rojo sometida a distintas dosis de 17 alfa metiltestosterona mediante biopsias gonádicas y análisis histológico.
2. Comparar el efecto de la 17 alfa metiltestosterona en la reversión sexual de hembra a macho colocando los implantes previo a la temporada reproductiva.
 - ✓ Evaluar los niveles de esteroides sexuales en sangre en los meros durante el proceso de reversión
3. Conocer el efecto de la dosis de 2.5 mg kg⁻¹ en el mero rojo durante una segunda temporada reproductiva en peces previamente revertidos
 - ✓ Evaluar los niveles de esteroides sexuales en sangre en el mero rojo durante el proceso de reversión

MATERIAL Y METODO

Condiciones experimentales

Se realizaron tres bioensayos de reversión sexual con hembras de *Epinephelus morio* los cuales consistieron en: A) dos implantes de MT (dic 12 y ene 13) en meros previamente revertidos en el periodo reproductivo anterior; B) dos implantes en peces implantados por primera vez (ene 13 y feb 13) y; C) tres implantes de MT (dic 12, ene 13 y feb 13) en meros revertidos previamente en la temporada reproductiva anterior.

La distribución de tallas y pesos de los meros utilizados en cada condición experimental se muestra en la tabla 8.

Tabla 8.- **Condición experimental durante el segundo año de reversión inducida del mero rojo *Epinephelus morio*. Los pesos y talla de los peces son valores promedio y error estándar.**

Condición Experimental	Número de peces	Peso vivo (g)	Talla promedio (cm LF)	Dosis total de hormona (mg kg ⁻¹)
A Dos implantes de MT (dic 12 y ene 13)	2	1410.5±82.7	42.2±2.54	5
B Dos implantes de MT (ene 13 y feb 13)	2	391± 62	27.85±0.24	5
C Tres implantes de MT (dic 12, ene 13, feb 13)	2	1282.5±6.4	42.2±2.54	7.5

En todas las condiciones experimentales se mantuvieron meros con implantes de silicón sin hormona (CT). Para los bioensayos A y C se utilizaron dos hembras CT, las cuales estuvieron individualmente en tanques de 1.6 m³ (0.09 y 0.11 kg m⁻³ respectivamente), mientras que los peces a revertir se colocaron todos juntos en un tanque de 12 m³ de capacidad (0.48 kg m⁻³). Para la condición experimental B, los meros a revertir fueron puestos junto con una hembra de 1106 g de PV y 39.6 cm de LF en un tanque de 1.6 m³ (densidad de 1.18 kg m⁻³).

Para la reversión sexual, se colocó a los peces un implante de MT (2.5 mg kg⁻¹) cada 30 días. Un total de dos implantes fueron colocados para alcanzar una dosis de 5 mg kg⁻¹ y tres implantes para la dosis de 7.5 mg kg⁻¹. A los peces CT se les colocaron sus respectivos implantes al mismo tiempo que fueron colocados a los peces con MT. Los implantes hormonales fueron colocados intraperitonealmente de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 1.

Treinta días después del último implante, se inyectó LHRH (20 µg kg⁻¹) a los peces implantados con MT. 24 horas después de la inyección los peces fueron masajeados ventralmente (stripping) y canulados. Las muestras fueron observadas en el microscopio óptico.

Los meros fueron identificados con marcadores electrónicos (PITS tags) intramuscularmente en la región latero-dorsal izquierda del pez.

Alimentación

Los meros fueron alimentados con una dieta semihúmeda de pescado, calamar, camarón y alimento INVE (Fish Breed-M) para reproducción (tabla 9).

Tabla 9.- **Composición de dieta de reproducción empleada para bioensayos de reversión sexual del mero rojo *Epinephelus morio*.**

Ingrediente	%
Calamar	12.5
Camarón	12.5
Sardina	25.0
INVE	50.0

Los peces fueron alimentados a saciedad por las mañana tres veces por semana (Lunes, Miércoles y Viernes).

Crecimiento y sobrevivencia

Los meros fueron anestesiados con aceite de clavo (1 ml por cada 20 litros de agua de mar). Una vez que perdieron el equilibrio, fueron pesados con una balanza OHAUS de 4000 g de capacidad y una precisión de 0.1 g. Posteriormente fueron fotografiados sobre papel milimétrico. Las imágenes fueron analizadas con el programa informático ImageJ para registrar la talla de los peces en los distintos tratamientos.

Se registró el número de peces muertos durante el periodo experimental para calcular la supervivencia al final del bioensayo.

Plasma sanguíneo

Muestras de sangre entre 800 a 1000 µl fueron colectadas de los peces del arco branquial. La metodología para la extracción y procesamiento de la sangre se indica en el Capítulo 1.

Las muestras fueron tomadas antes de colocar cada uno de los implantes y al final de este bioensayo. Todas las muestras de plasma fueron procesadas para evaluar la concentración de E₂, T y 11KT con la técnica EIA indicada en el capítulo 1.

Biopsias

A los 60 días después de haber colocado el primer implante (para los peces con dos implantes de MT), y a los 90 días (para los meros con tres implantes de MT) se tomaron biopsias gonádicas de los meros previamente anestesiados. Las condiciones del muestreo fueron las mismas a las utilizadas en el capítulo 1 de este trabajo. Las muestras fueron observadas en fresco bajo el microscopio óptico.

Histología

Para el tratamiento con tres implantes de MT, un pez fue sacrificado al final del bioensayo para procesar la gónada por histología de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 1.

Estadística

Se obtuvieron los valores promedio y desviación estándar de todos los datos de consumo de alimento y peso y talla de los peces. Se realizó un análisis de varianza seguido de un análisis de rangos múltiples de Duncan para determinar diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de esteroides de los distintos tratamientos hormonales para los bioensayos de reversión.

RESULTADOS

Calidad de agua

Los parámetros de calidad de agua registrados durante este periodo experimental se muestran en la tabla 10. El oxígeno disuelto, la temperatura, la salinidad y el pH se mantuvieron muy estables. Los valores de amoniaco fueron de $0.005 \pm 0.002 \text{ mg l}^{-1}$ y el nitrito fue de $0.04 \pm 0.07 \text{ mg l}^{-1}$, los cuales estuvieron por debajo de lo establecido para el cultivo de meros (APEC/SEAFDEC, 2001).

Tabla 10.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos evaluados en tanques de *E. morio* durante la reversión sexual a macho con implantes de silicona.

	Oxígeno (mg l^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Salinidad (ups)	pH
dic-12	6.11 ± 0.31	25.99 ± 0.56	37 ± 0.0	7.31 ± 0.05
ene-13	6.08 ± 0.34	25.65 ± 0.73	38 ± 0.51	7.40 ± 0.1
feb-13	5.79 ± 0.63	25.67 ± 0.80	35 ± 0.0	7.37 ± 0.06
mar-13	5.98 ± 0.25	25.13 ± 0.69	36 ± 0.71	7.33 ± 0.07

En la figura 28 se muestra el cambio de la temperatura incluyendo las dos temporadas reproductivas y el periodo de mantenimiento en el agua de los tanques experimentales durante el año. La temperatura no presentó cambios bruscos, llegándose a presentar una diferencia de 2.6°C , entre los meses más cálidos y más fríos. Las temperaturas más bajas (25°C) se presentaron durante la temporada reproductiva de la especie (enero a marzo).

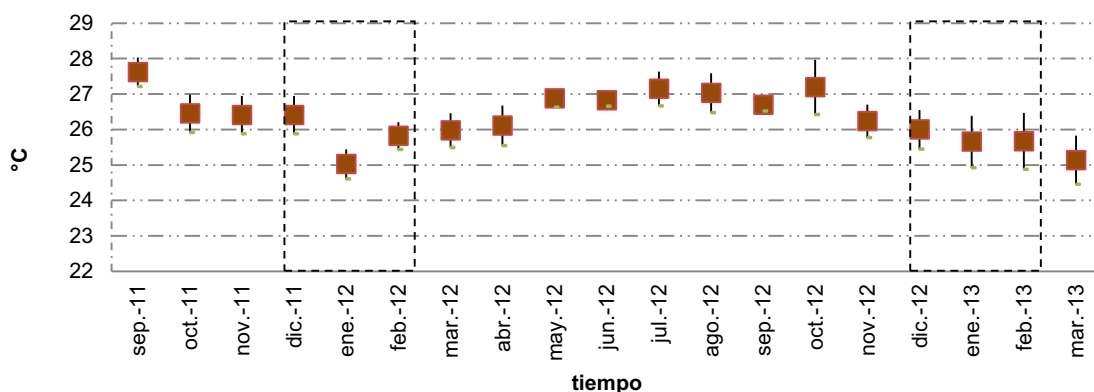


Figura 28.- Registro de temperatura promedio, máximos y mínimos por mes en el agua de los tanques de experimentales de *Epinephelus morio* durante la reversión sexual y el mantenimiento. Las líneas punteadas indican la temporada reproductiva de la especie.

Crecimiento y sobrevivencia

Los datos de talla y peso de los peces con implantes CT y de MT se muestran en la tabla 11. Los peces tratados con dos implantes de MT (tratamiento A) no incrementaron en peso. Para el resto de los peces, los gramos ganados por día fueron entre de 0.6 g día⁻¹ en los meros del tratamiento B y 4.8 g día⁻¹ para los meros del tratamiento C.

Referente a la talla, los peces control crecieron más que los tratados con MT, excepto los meros con MT del tratamiento B (dos meros a revertir junto con una hembra), quienes presentaron los mayores incrementos 0.08 cm día⁻¹ de todos los peces.

Dentro de este periodo de reversión, solo hubo un pez muerto en el tratamiento CT con tres implantes, el cual saltó del tanque a finales del mes marzo.

Tabla 11.- Relación de talla y peso promedio y desviación estándar de los meros al inicio (diciembre 2012) y término (febrero o marzo 2013) del bioensayo. Δ =incremento.

TRAT	Número implantes	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Δ Peso g día ⁻¹	LT inicial (cm)	LF final (cm)	Δ Talla cm día ⁻¹	No. muertos	
A	MT	3	1478.3±131.2	1479±226	0.01	42.8±3.46	44.6±1.83	0.03	0
	CT	2	1063.5±241.1	1246±216.37	2.9	39.1±0.5	42.6±0.3	0.06	0
B	MT	2	391± 62	467±117.4	0.6	27.8±0.24	31.8±2.1	0.08	0
	CT	1	1106	1350	4	39.61	43.4	0.06	0
C	MT	2	1282.5±6.4	1493.5±195.9	2.3	42.2±0.41	44.5±0.7	0.03	0
	CT	2	1063.3±241.1	1503.13±751.1	4.8	39.1±0.5	43.21±7.7	0.05	1

Alimento

La cantidad de alimento semihúmedo consumido por los peces tratados 5 mg kg⁻¹ de MT (Tratamiento A) se muestra en la figura 29. Los peces comieron entre 24 y 37 gramos por día durante este periodo y hubo una tendencia a disminuir ligeramente el consumo al final del bioensayo.

Los peces con implantes control que se encontraron en tanques individuales, consumieron más alimento al inicio del bioensayo en relación a los implantados con MT que se encontraban en grupo. Durante todo el bioensayo los gramos de alimento consumido por gramo de pez fueron de 0.03 g día⁻¹ para el tratamiento CT, mientras que para los peces tratados con MT fue de 0.02 g día⁻¹.

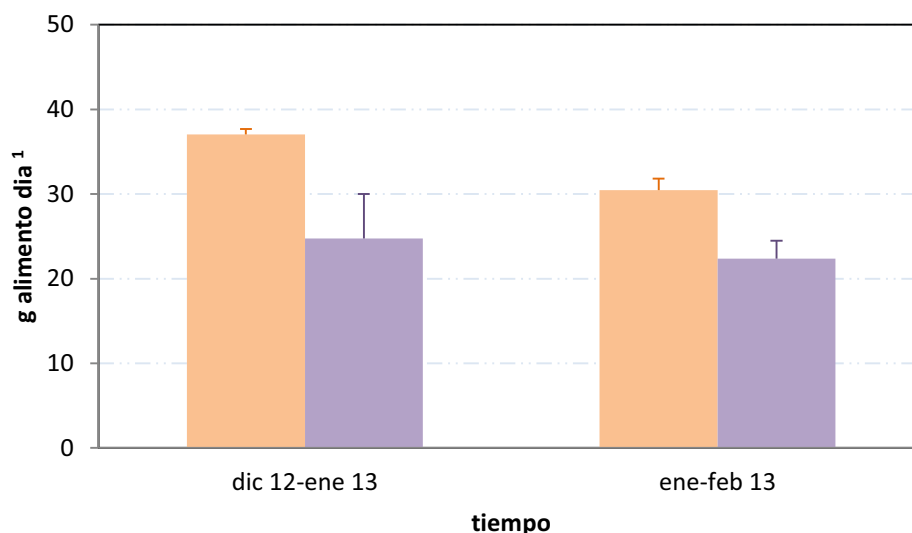


Figura 29.- Consumo promedio por día por pez y error estándar en los meros con dos implantes. Cuatro peces con implantes de MT (barra amarilla) y dos hembras individuales con implante CT (barra verde).

El consumo de alimento de los meros durante el periodo de los implantes (Tratamiento C) se presenta en la figura 30. Se encontró una tendencia general a que los peces con MT consumieran menos alimento semihúmedo que los meros del tratamiento CT, salvo una réplica de MT durante el último mes de experimentación.

En promedio los peces consumieron entre 18 y 30 g por pez durante todo el periodo experimental.

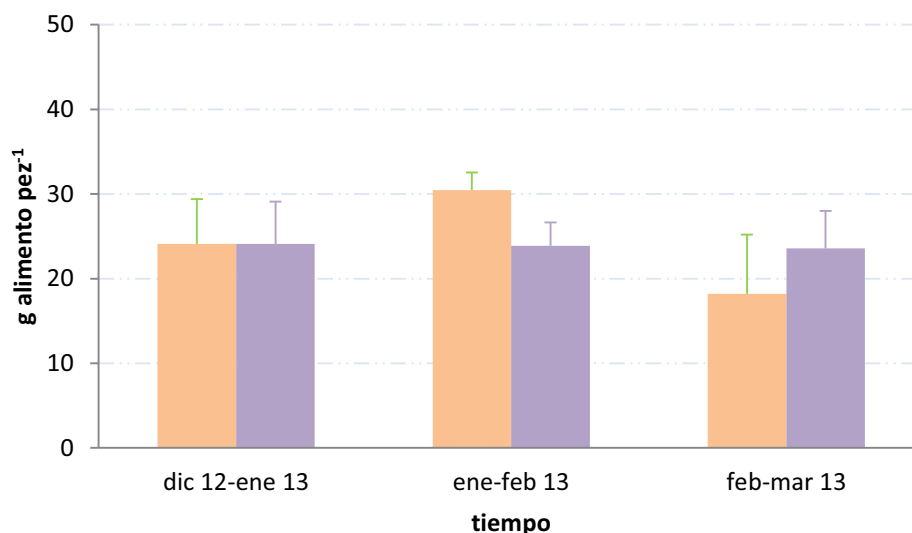


Figura 30.- Gramos promedio de alimento semihúmedo ingerido por el mero rojo *E. morio* con tres implantes de MT (barras amarilla) para la reversión sexual y con implantes CT (barras verde).

Los meros implantados en enero y colocados con la hembra dentro del mismo tanque (Tratamiento B) consumieron en promedio por día entre 26 y 33 gr por pez (figura 31). El

mayor consumo fue al inicio del bioensayo con una tendencia a reducir hacia el final del experimento.

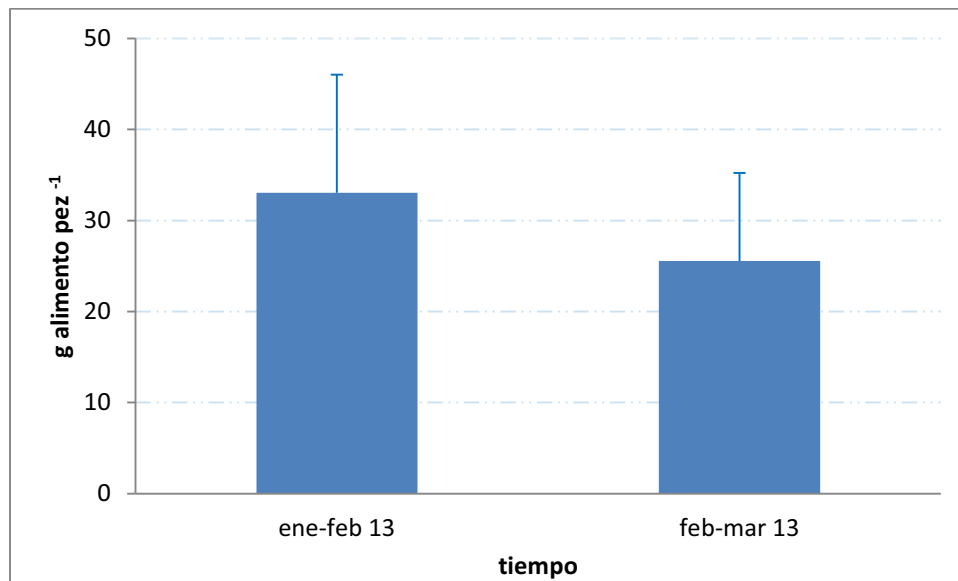


Figura 31.- Consumo promedio de alimento por pez por día de dos meros con implantes con MT y una hembra con implante CT dentro de un mismo tanque.

Biopsias

De todos los peces experimentales, sólo los peces del tratamiento B no pudieron ser canulados. Las muestras obtenidas por canulación y observadas en fresco de los peces control se muestran en la figura 32, en donde puede observarse el tejido conformado solo ovocitos previtelogénicos.

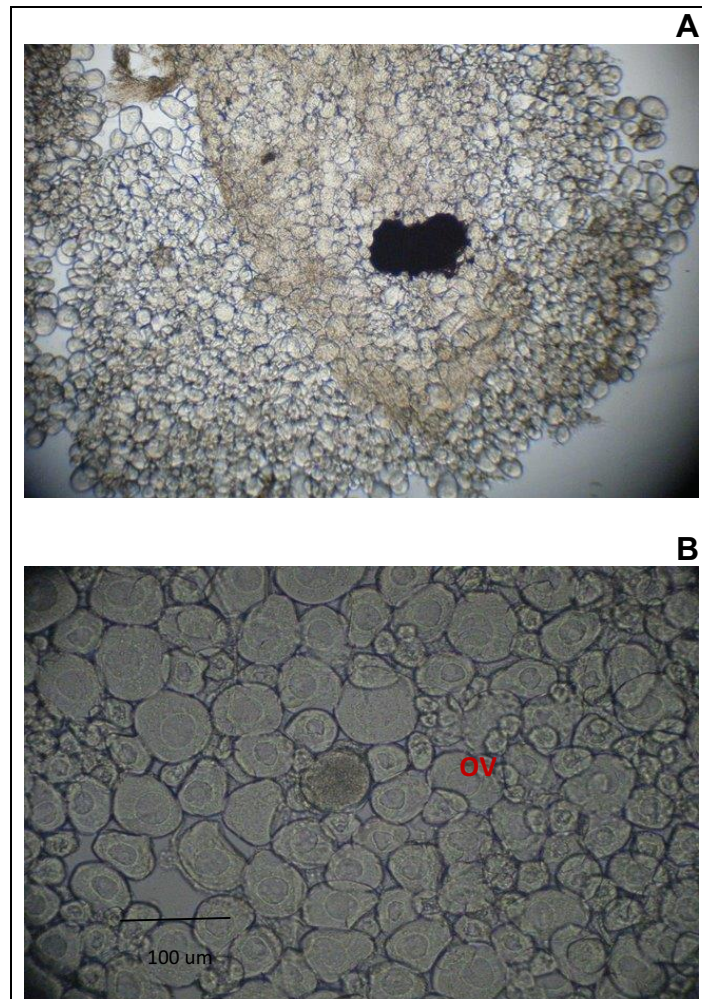


Figura 32.- Ovocitos inmaduros de mero rojo *Epinephelus morio* obtenidos por canulación de peces con implantes sin hormonas a los 60 y 90 días después del primer implante. Foto a 10X (A) y 40X (B). OV= ovocito

En los peces tratados con MT (5 mg kg^{-1}) se observaron en las muestras en fresco tanto ovocitos como tejido no característico de un ovario entremezclado (Figura 33A). Dentro del tejido no ovárico (Figura 33B), se observaron células con gran cantidad de organelos en la periferia de la membrana celular, células que bien pudieran ser identificadas como ovocitos en transformación a espermátidas. En los ovocitos inmaduros se encontraron células mucho más pequeñas intercaladas, las membranas nucleares mostraron gran cantidad de nucléolos denotando actividad celular (Figura 33C).

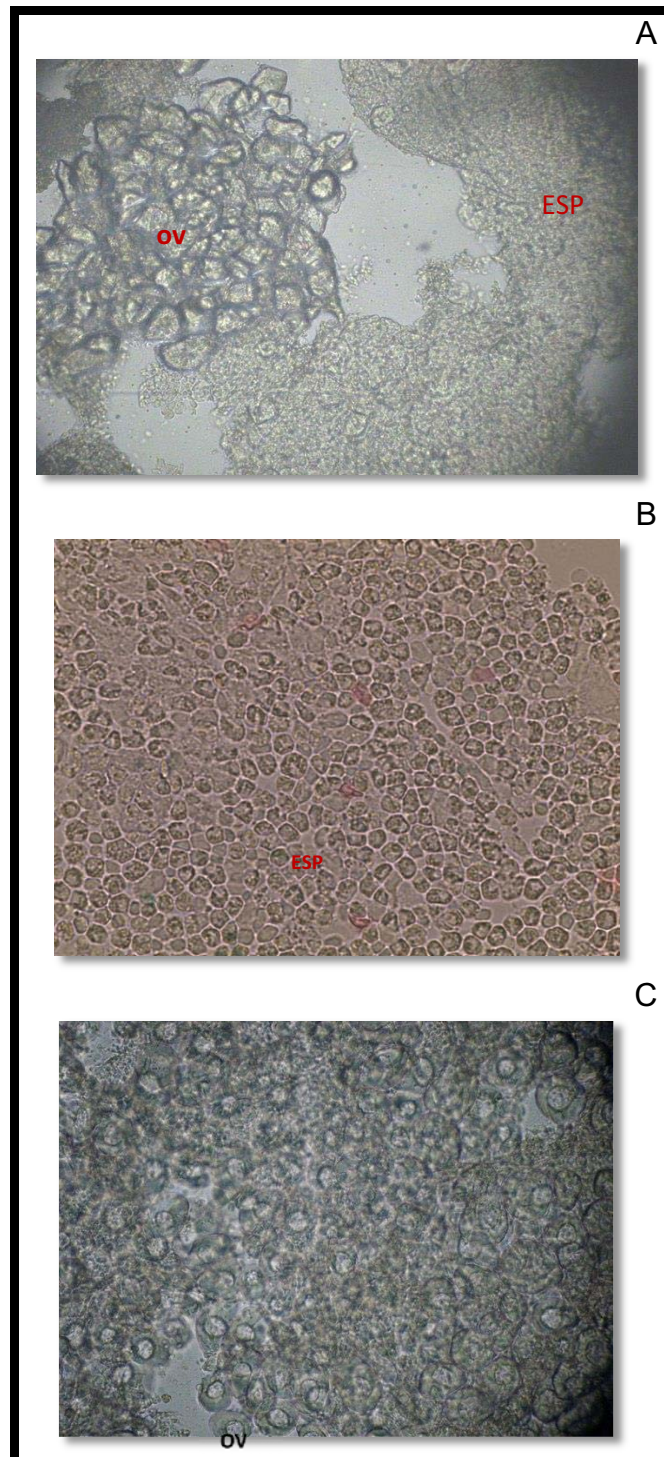


Figura 33.- Muestra en fresco de gónada obtenida por canulación de mero rojo *Epinephelus morio* con dos implantes de 17 alfa metilttestosterona (5 mg kg^{-1}) a los 60 días después de la colocación del primer implante. Foto a 10X (A) y 40X (B y C). ESP= espermatogonias, OV=ovocito,

Para los peces tratados con tres implantes de MT (Tratamiento C), la muestra obtenida por canulación mostró una conformación celular totalmente diferente a la obtenida con dos implantes (Figura 34). Se observaron células que pueden ser identificadas como espermátidas o espermatoцитos. No se observaron ovocitos evidentes en la muestra.

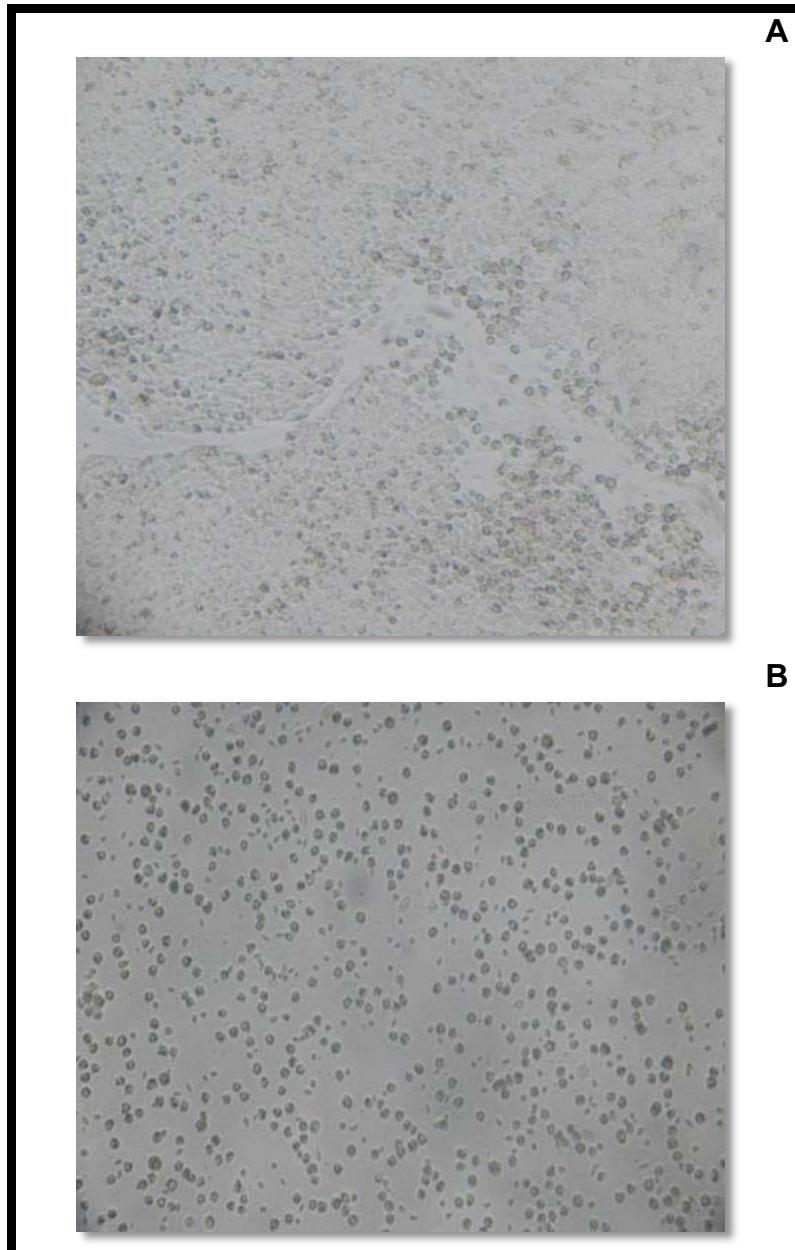


Figura 34.- Muestra en fresco de gónada obtenida por canulación de mero rojo *Epinephelus morio* con tres implantes de 17 alfa metilttestosterona (7.5 mg kg^{-1}) a los 90 días después del primer implante. Foto a 10X (A) y 40X (B).

Histología

Solo un pez con tres implantes de MT fue sacrificado al final del tratamiento para el análisis histológico. La gónada mostró un avanzado estado de reversión (Figura 35) encontrándose una gran cantidad de espermatozoides a lo largo y ancho del tejido, así como también espermatoцитos primarios o secundarios. Se observó el mantenimiento de la estructura lamelar de la gónada (Figura 35A) con reminiscencias de ovocitos degenerados en la periferia de estas lamelas.

Fueron evidentes cistos de espermatoцитos primarios o secundarios y una gran cantidad de espermatozoides hacia el centro del tejido (Figura 35B).

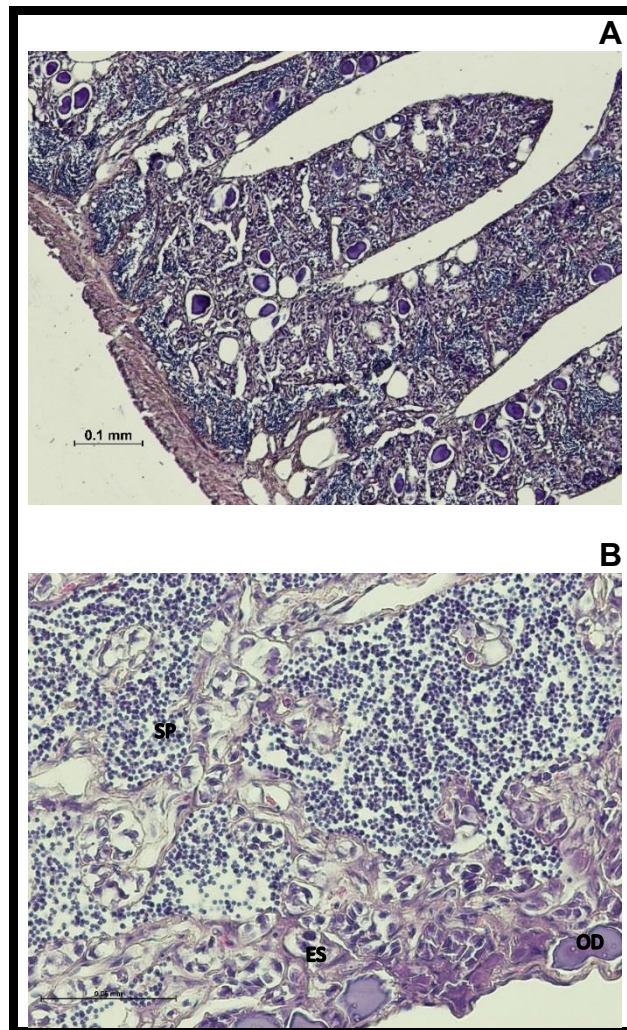


Figura 35.- Corte histológico de la gónada de mero rojo *Epinephelus morio* revertido con tres implantes de MT a 10 X (A) y 40X (B). SP=cabezas de espermatozoides, ES=espermatoцитos primarios o secundarios, OD=reminiscencias de ovocitos degenerados.

Esteroides

Todos los peces (CT y MT con dos o tres implantes) mostraron en promedio, niveles de T superiores a los de E₂ y 11KT (Figura 36), presentando el pico máximo a los 30 días después de la colocación del primer implante con valores de 1174, 640 y 737 pg ml⁻¹ respectivamente.

Los peces CT mostraron un incremento gradual de E₂ en plasma a medida que pasaba el tiempo, alcanzando un pico máximo de 508 pg ml⁻¹ y 559 pg ml⁻¹ a los 60 y 90 días después del primer implante respectivamente. Por otro lado, los niveles de 11KT mostraron una tendencia a incrementar hasta alcanzar el pico de 214 pg ml⁻¹ a los 60 días después del primer implante (marzo) y posteriormente disminuir hasta 91 pg ml⁻¹, valor similar previa la colocación del implante.

En los meros tratados con dos o tres implantes de 17 alfa metiltestosterona se encontró los niveles de T fueron no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las dos condiciones. Los niveles de esta hormona oscilaron entre 376 y 737 pg ml^{-1} .

Los peces mostraron una tendencia a incrementar los niveles de estradiol en sangre. La concentración máxima se alcanzó con dos y tres implantes a los 60 días después del primer implante, cuando los peces tenían 5 mg kg^{-1} de MT. Posteriormente cuando los peces tuvieron 7.5 mg kg^{-1} (con la colocación del tercer implante) los niveles bajaron de 534 a 171 pg ml^{-1} (Figura 36).

Finalmente, la concentración de 11KT en los peces con dos implantes de MT mostraron valores que oscilaron entre 44 y 83 pg ml^{-1} (Figura 36), mientras que aquellos en donde fueron colocados tres implantes de MT, la 11KT mostró una tendencia a incrementar en el tiempo, encontrándose el pico a los 90 días con valores de 196 pg ml^{-1} .

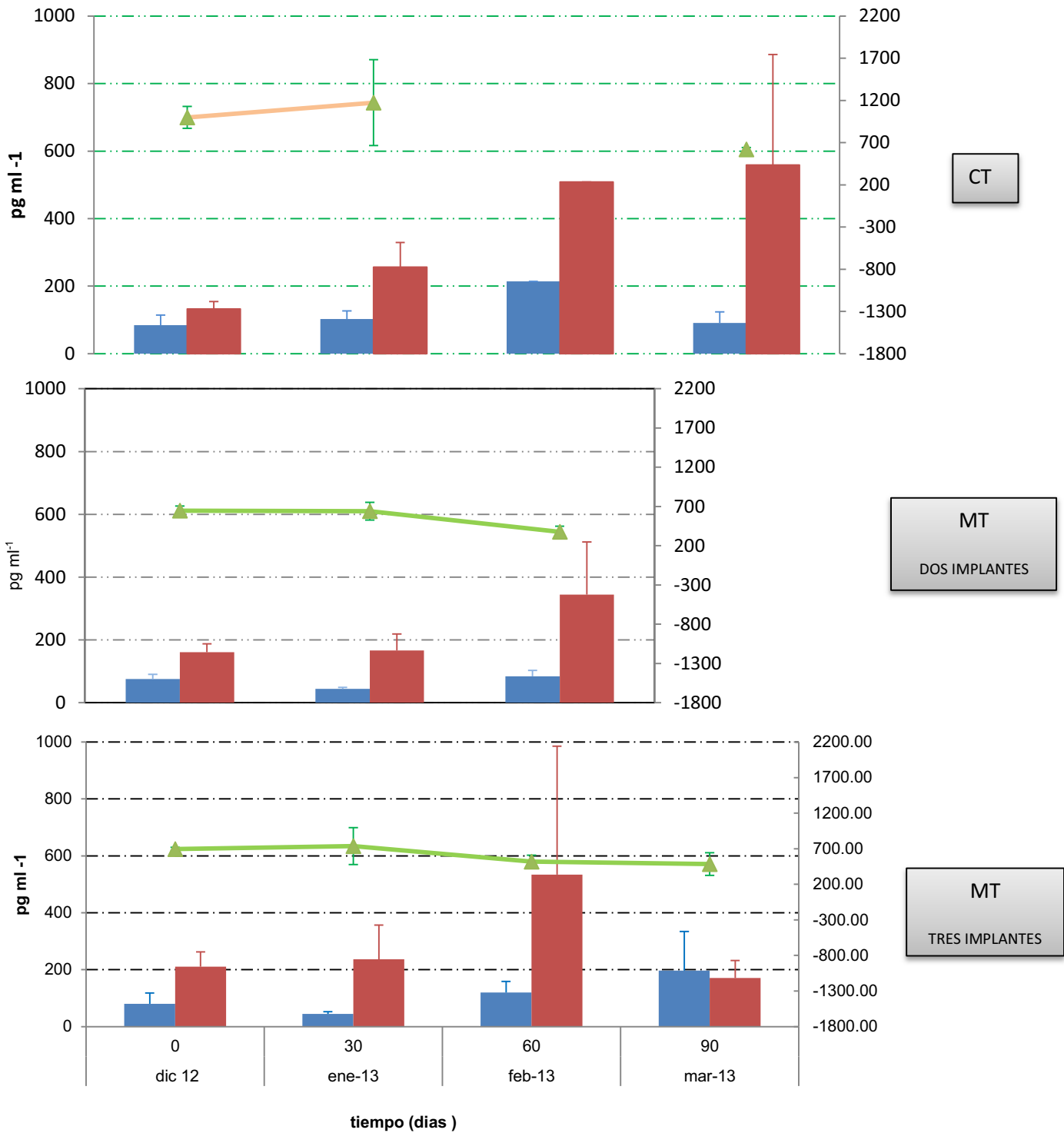


Figura 36.- Concentración promedio y error estándar de 11KT (barra color azul), E₂ (barra color naranja) y T (línea verde) en *Epinephelus morio* con implantes de MT e implantes CT. El eje secundario representa la concentración de Testosterona también en pg ml⁻¹

Los niveles de esteroides del mero del cual se obtuvieron los cortes histológicos de la gónada y en donde se observó un avanzado estado de desarrollo del testículo, se presentan en la figura 37. Puede verse que al término del experimento (90 días) los

niveles de estradiol fueron los más bajos (110 pg ml^{-1}) mientras que los niveles de testosterona y 11 ketotestosterona fueron similares (326 y 334 respectivamente).

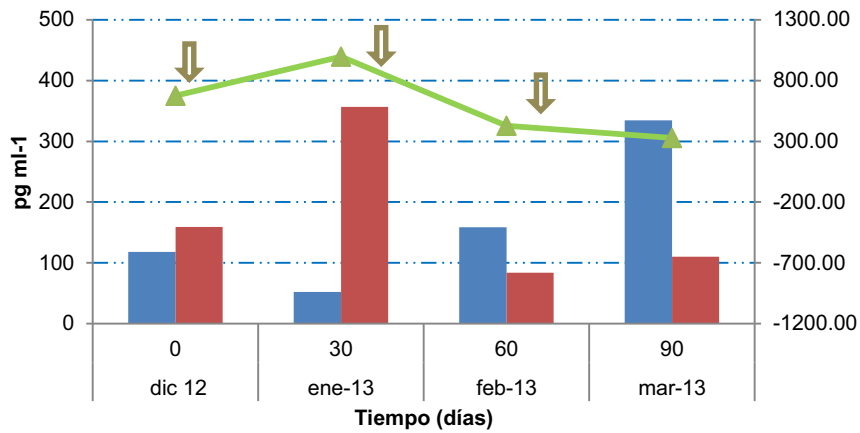


Figura 37.- Esteroides evaluados en un mero de 1300 g de peso y 43.88 cm de LT sometido a tres implantes de MT. El eje secundario representa la concentración de Testosterona (línea verde) también en pg ml^{-1} . Barra naranja representa al estradiol y la barra azul a la 11ketotestosterona. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante. Las flechas indican el momento cuando se colocaron los implantes.

Considerando que los peces se mantuvieron durante dos temporadas reproductivas, los cambios hormonales que sufrieron los meros control durante este tiempo se muestran en la figura 38. Durante los 14 meses experimentales, los niveles de 11 Ketotestosterona se mantuvieron en concentraciones inferiores a 200 pg ml^{-1} , mientras que la Testosterona osciló entre 330 y 1600 pg ml^{-1} . El estradiol a partir de la segunda temporada reproductiva (ene-marzo 2013) comenzó a incrementar hasta alcanzar los 886 pg ml^{-1} en sangre.

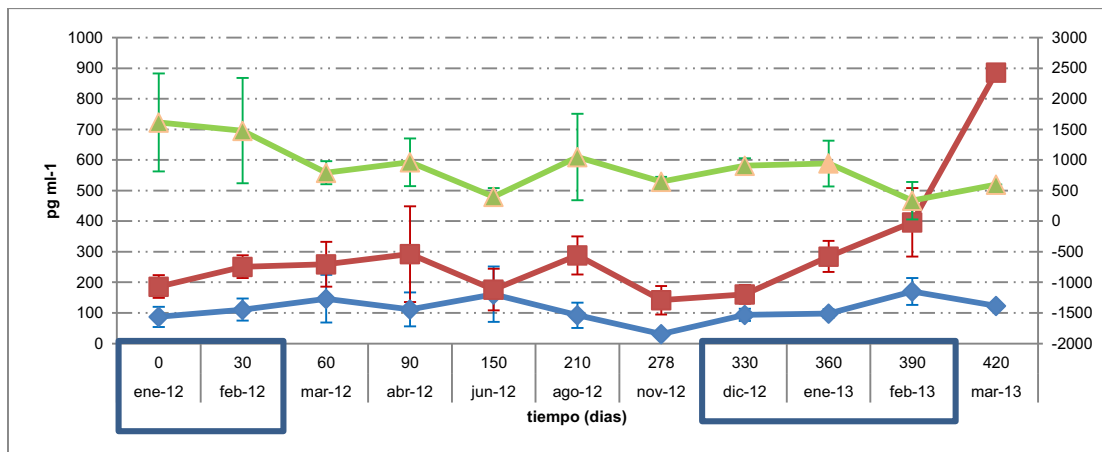


Figura 38.- Niveles promedio y error estándar de esteroides que presentó el mero rojo *Epinephelus morio* durante dos temporadas reproductivas sin implantes de 11 metiltestosterona. El eje secundario (también en pg ml^{-1}) representa la concentración de Testosterona (línea verde). Línea naranja representa al estradiol y la azul a la 11ketotestosterona. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante en enero 2013. Los rectángulos en el eje X indican los meses de colocación de implantes.

Los meros tratados durante dos años con 17 alfa metiltestosterona presentaron cambios en los niveles hormonales (Figura 39). No existieron diferencias significativas con los niveles de E₂, 11KT y T entre los dos periodos reproductivos con el tratamiento de dos implantes.

Para los meros tratados con tres implantes en la segunda temporada reproductiva, sólo se encontraron diferencias ($p \geq 0.05$) en las concentraciones de 11 ketotestosterona al final del bioensayo (marzo 2013).

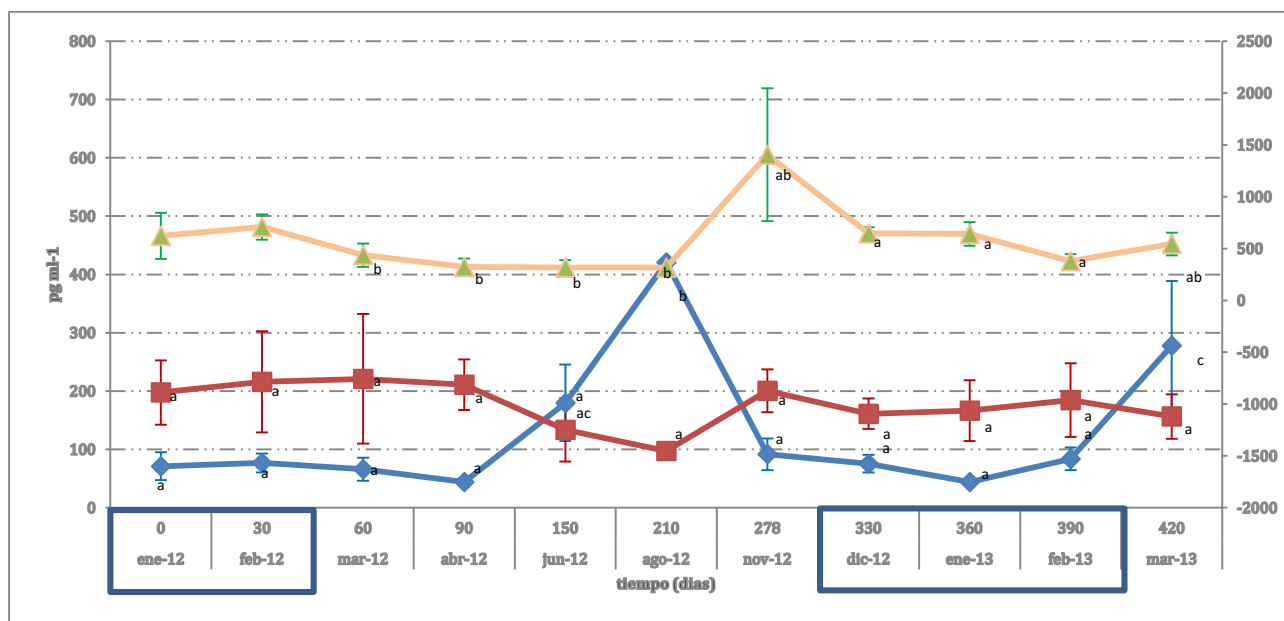


Figura 39.- Niveles promedio y error estándar de esteroides que presentaron ejemplares de mero rojo *Epinephelus morio* durante dos temporadas reproductivas con implantes de 11 metiltestosterona. El eje secundario (también en pg ml^{-1}) representa la concentración de Testosterona (línea verde). Línea naranja representa al estradiol y la azul a la 11ketotestosterona. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante en enero 2013. Los rectángulos en el eje X indican los meses de colocación de implantes.

Para los peces revertidos por primera vez y colocados con una hembra dentro de un mismo tanque, tenemos que las principales diferencias fueron con los niveles de Estradiol, en donde la hembra incrementó sus niveles hasta 886 pg ml^{-1} al final del bioensayo, mientras que en los machos los niveles no superaron los 250 pg ml^{-1} promedio (figura 40). Las concentraciones de 1KT tanto en la hembra como en los macho no se alcanzaron más de 215 pg ml^{-1} .

Respecto a los niveles de T, los machos tendieron a disminuir esta hormona en sangre, mientras que la hembra mostró tener concentraciones próximas a 600 pg ml^{-1} al inicio y final del bioensayo.

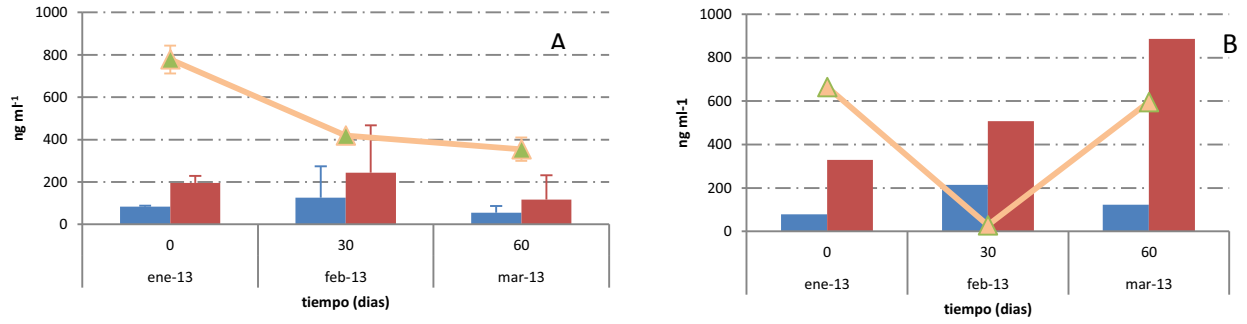


Figura 40.- Niveles promedio y error estándar de esteroides que presentaron ejemplares de mero rojo *Epinephelus morio* con implantes de 17 α metiltestosterona. Testosterona (línea verde). Estradiol columna naranja y 11ketotestosterona barra azul. A=machos, B=hembra. El tiempo indica los días transcurridos desde el primer implante en enero 2013.

DISCUSION

Las condiciones de los parámetros de la calidad de agua fueron muy estables. Todos los valores registrados se encontraron dentro de lo reportado para otras especies del género *Epinephelus* (Mathew, 2005; Mathew et al., 2002; Shams, 2010) y lo reportado para crecimiento de *E. coioides* en tanques de 1 m³ (Ahmad, 2000) y para juveniles de *E. morio* (Gutiérrez, 2010).

Las diferencias encontradas en el incremento en peso y talla de los peces pudieron ser más una respuesta de los peces a la cautividad que al efecto de las hormonas en los implantes. Los peces más grandes crecieron menos, posiblemente porque a tallas grandes, los animales no crecen tan rápido como en las primeras etapas de vida.

Gutiérrez (2010) reportó que los meros aislados no comían, en este trabajo, las hembras control se encontraron de manera individual en los tanques y no tuvimos ese problema, posiblemente porque las hembras habían estado previamente en compañía de otros peces por varios meses dentro del mismo tanque donde posteriormente estuvieron solas.

Cuando los peces hermafroditas protándicos cambian de sexo, los ovocitos primarios permanecen y las espermatogonias comienzan a aparecer a lo largo del tejido ovárico. La atresia de los ovocitos y la espermatogénesis se da de manera simultánea hasta que comienza a dominar el tejido vascular constituyendo la estructura de la gónada (Kuo et al., 1988).

Si la reversión es tardía, en la gónada se encuentran varias fases de células espermatogénicas, desde espermatocitos hasta espermátidas y solamente unos pocos ovocitos atrésicos remanentes y la degeneración progresiva de éstos que son absorbidos (Guang-li Li et al., 2006), aspecto que se apega más a los peces tratados con 7.5 mg kg⁻¹.

Para *E. morio* la descripción de las gónadas en reversión de los organismos silvestres incluye la presencia de ovocitos degenerados o no, con algunos cistos de espermatocitos, espermátidas o espermatozoides entremezclados con los ovocitos de la lamela ovárica (Brulé et al., 1999) condición que fue más evidente en los meros con 7.5 mg kg⁻¹. De acuerdo al mismo autor, si los cistos contienen todos los estadios de espermatogénesis invadiendo toda la lamela ovárica, entonces también son considerados como un macho.

Las descripciones de estos cambios celulares han sido realizadas mediante técnicas histológicas, obteniendo información valiosa sobre los cambios sufridos por el pez durante el proceso de reversión ya sea de manera natural o inducida una vez que el organismo ha sido sacrificado (G Li et al., 2007; Sarter et al., 2006). Si el cambio de sexo es avanzado pero no existe una gran cantidad de espermatozoides no habrá liberación de los mismos con el masaje abdominal y si se tienen pocos ejemplares o si es necesario mantenerlos por más tiempo en cautividad, una manera de poder identificar los cambios en la gónada sin sacrificar al pez, es la canulación.

Aunque la canulación tradicionalmente es utilizada para la identificación del estado de madurez de las hembras de los peces para la inducción a la maduración final (Alvarez-lajonchère et al., 2013), no es una técnica utilizada frecuentemente en los machos, pues éstos deben ser espermeables para la fecundación; sin embargo, para los machos obtenidos durante este trabajo experimental, la canulación funcionó muy bien para identificar; primero, el cambio de sexo de los peces hormonados y segundo, el avance de la transición entre las dos dosis de 17 alfa metiltestosterona utilizadas.

En este trabajo, no se logró obtener semen de los peces mediante masaje pero si se pudieron canular en el segundo periodo reproductivo, situación que no se dio en los peces cuando se indujeron por primera vez. Es posible que la talla sea un factor limitante para la canulación, ya que entre más pequeño, el conducto genital será más reducido dificultando la entrada de la cánula. Entre más pequeño sea el pez revertido, menor tamaño de la gónada y por lo tanto menor cantidad de semen a producir (Cabrita et al., 2009).

Por otro lado, la canulación ovárica es una técnica utilizada durante la época reproductiva y cuando los peces tienen la talla mínima para ser reproductores, por lo que poder ser canulados, en principio, es un indicador indirecto del estado de madurez de los peces.

De esta manera, en los meros con 5 mg kg^{-1} se encontró tejido con ovocitos inmaduros y tejido compacto de células espermáticas, mientras que en la dosis de 7.5 mg kg^{-1} existió una diversidad de células espermáticas, principalmente espermatoцитos, las cuales se encontraron individualizadas. Esta evidente diferencia en las células observadas, fue comprobada posteriormente con el análisis histológico, donde todos los estadios de la espermatoogénesis fueron observados lo que indicó un mayor avance en el desarrollo de la gónada, aun así, la estructura de la lamela se mantenía.

Es importante hacer notar que de los trabajos publicados con peces del género *Epinephelus* en donde se consigue la reversión tardía a macho mediante el uso de andrógenos externos, los niveles de T y 11KT varían muchísimo, desde 60 pg ml^{-1} para *E. microdon* (Debas et al., 1989) hasta 1650 pg ml^{-1} en *E. akaara* (G Li et al., 2007) para niveles de Testosterona en sangre. Para los niveles de 11 KT, los niveles se pueden encontrar entre 28 pg ml^{-1} para *E. coioides* (Yeh, Dai, et al., 2003) hasta 750 pg ml^{-1} 5920 pg ml^{-1} en *E. akaara* (G Li et al., 2007).

Por otro lado, los niveles hormonales reportados para machos de *E. morio* silvestres distan mucho a los obtenidos en este trabajo, pero son muy similares a los meros en transición (Tabla 12).

Tabla 12.- Niveles de esteroides para *Epinephelus morio*. Los valores en las poblaciones silvestres hacen referencia al pico de reproducción. H=hembra, ET=transición temprana, LT=transición tardía, M=macho. Los valores de T, E₂ y 11KT están expresados en pg ml⁻¹. El * indica datos de un solo pez de cada sexo.

condición	Especie	Hormona utilizada	Esteroides	H	Transición		M
					ET	LT	
Silvestres	<i>E. morio</i> (Johnson et al, 1988)		T	2000	290 a 1650	600	
			11KT	ND	100 a 600	4000	
			E ₂	3000	70 a 370	≤500	
	<i>E. morio</i> * (presente trabajo) Ver capítulo 4		T	110		833	
			11KT	40		7554	
			E ₂	5000		159	
Inducción con esteroides	<i>E. morio</i> (presente trabajo)	Dos implantes 2.5 mg kg ⁻¹ de MT primer año	T		647		
			11KT		100		
			E ₂		401		
		Dos Implantes 2.5 mg kg ⁻¹ MT segundo año consecutivo	T		485		
			11KT		196		
			E ₂		171		
		Tres implantes 2.5 mg kg ⁻¹ MT	T		326		
			11KT		334		
			E ₂		110		

La aplicación de MT por segundo año consecutivo produjo buenos resultados, aunque los niveles hormonales de un año a otro no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$), durante este último periodo, fue posible canular a todos los peces revertidos, lo que quizás esté relacionado con un aumento, casi del doble de la 11KT durante el segundo año de reversión con dos implantes.

Los esteroides sexuales progestágenos, andrógenos y estrógenos son principalmente producidos por las gónadas. Los niveles de esteroides en plasma muestran importantes variaciones durante la maduración de las gónadas (Schulz et al., 2010). En varias especies de teleósteos se ha visto que la Testosterona, 11KT y 11 β -HT (hidroxitestosterona) se encuentran en distintos niveles en sangre de acuerdo a su estación reproductiva, donde la T parece estar más relacionada a la espermatogénesis y la 11KT con la espermiación. La diferenciación de espermatogonias a espermatozoides requiere la presencia de ambas hormonas (Carrillo and Zanuy, 1993).

Según el sexo del pez durante la transición, los perfiles hormonales cambian. Para *E. akaara*, Li et al (2007), encontraron en la temporada reproductiva que la relación entre los niveles de esteroides según sus concentraciones el $E_2 \geq T \geq 11KT$ en las hembras, para los machos $E_2 \geq T \geq 11KT$ (con concentraciones de E₂ mucho menores que las hembras) y en los peces en transición sexual $E_2 \geq 11KT \geq T$.

Para *E. morio*, Johnson et al (1998) encontraron en peces silvestres que las hembras durante la estación reproductiva, tenían concentraciones de $E_2 \approx T$, los machos $11KT \geq T \geq E_2$ y para los peces en transición $T \geq 11KT \geq E_2$. Durante la reversión inducida, los meros con 5 mg kg⁻¹ tuvieron esta última relación entre las hormonas; y para la dosis de

7.5 mg kg⁻¹ la relación fue 11KT≈T≥E₂. Esta relación entre las hormonas pudiera explicar el avanzado desarrollo de la gónada, pues en cultivo de órganos de anguila, la 11KT induce a la espermatogénesis desde la proliferación de espermatogonias (Schulz et al., 2010).

La espermatogénesis está regulada por hormonas. La hormona folículo estimulante (FSH) regula las primeras etapas de la espermatogénesis, mientras que la LH está involucrada principalmente en los estadios finales de maduración.

La FSH durante la proliferación espermatogonial, estimula la producción de esteroides que inducen a la espermatogénesis, como la 11KT, el mayor andrógeno de los peces teleósteos. La 11KT en la espermatogénesis, induce a la proliferación de espermatogonias a espermiogénesis (meiosis de espermatogonias). Su acción es mediada por otros factores producidos por las células de Sertoli, las cuales tienen receptores de andrógenos, como los factores de crecimiento IGF1 y el activin B (Miura et al., 1995^a en Schulz, et al (2010).

Seguido de la proliferación mitótica, las espermatogonias tipo B entran en profase meiótica y se diferencian a espermatocitos primarios, donde la hormona 17α,20β dihidroxy-4-pregnen-3-one (DHP) (la mayor progestina de peces teleósteos) inicia la meiosis en la espermatogénesis.

En el caso de la reversión, la dosis más alta de MT en los implantes, ocasionó que los niveles de 11KT en sangre fueran similares a los de T, indicando que la espermatogénesis estaba progresando, al afectar la diferenciación de las células espermáticas, propiciando la transición de espermatogonias (del tipo A al B) e iniciando el proceso de meiosis para la formación de espermatozoides (Schulz et al., 2010).

Por otro lado, el E₂ tiene un efecto directo o indirecto en la expresión de los genes para la regulación de la esteroidogénesis, como las aromatasas y los genes para la espermatogénesis, como el ácido retinoico, el cual es necesario para la proliferación y diferenciación de espermatogonias indiferenciadas; sin embargo dosis muy altas de E₂ puede reducir el fluido seminal (Lahnsteiner et al., 2006).

Esas dosis altas fueron posiblemente las responsables de que no existiera una espermiación en el sentido de que en el cambio natural o inducido de sexo, parece existir una relación entre los niveles de Estradiol y la 1KT, en donde el E₂ debe ser por lo menos la mitad o menos, de la concentración de la 11KT. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, esta proporción casi se logra en la dosis de 7.5 mg kg⁻¹ lo que bien pudiera indicar que la MT estaba siendo aromatizada para convertir MT a E₂ como se ha reportado para *E. akaara* (Li et al, 2006b).

La 17 alfa-metiltestosterona es considerada uno de los andrógenos más recomendada o idóneo para la reversión sexual de los teleósteos (Guang-li Li et al., 2006). Es un andrógeno aromatizable, que acelera el proceso de reversión sexual en hembras maduras e inmaduras (Debas et al, 1989; Mathew2011). Esa respuesta podría deberse a un efecto

directo en el ovario y/o un “feedback” en el eje hipotálamo-pituitaria resultando en un incremento en la producción de gonadotropina (Lee et al., 1995).

Distintos estudios muestran que los genes de la aromatasa se encuentran en el cerebro (p450 aromatasa B) y en la gónada (p450 aromatasa A) y al parecer la MT suprime la actividad de expresión del gen de la P450aromA en las gónadas disminuyendo la cantidad de estrógeno secretado por la gónada, degenerando los folículos ováricos y posteriormente proliferando las células espermatogénicas después de elevar los niveles de 11 KT (G Li et al., 2006).

Dosis altas de MT (90 mg de MT por kg de alimento) provocan que los niveles de E₂ disminuyan en *E. fario* (Kuo et al., 1988), esto podría sugerir que la dosis de 5.0 mg kg⁻¹ fue baja en el primer año de implantación, sin embargo esa misma dosis para el segundo año disminuye los niveles de E₂ lo cual podría indicar que los peces pueden ser revertidos a machos de manera definitiva como lo conseguido con *E. marginatus* (Conceição et al., 2008) y muy probablemente la dosis de 7.5 mg kg⁻¹ debe darse en dos implantes y no en tres.

Contrariamente a lo obtenido en *E. marginatus* (Cabrita et al, 2009; Ureta2011) la dosis de 2.5 mg kg PV⁻¹ no fue suficiente para *E. morio* por lo que será necesario incrementar la dosis utilizando dos implantes; así como utilizar un inhibidor de aromatasa para obtener el semen del mero rojo.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos durante este trabajo experimental

1. El avance de desarrollo del testículo está relacionado con la dosis administrada de 17 alfa metiltestosterona.
2. La dosis de 7.5 mg kg⁻¹ de 17 alfa metiltestosterona provoca un mayor cambio que 5.0 mg kg⁻¹ en la gónada de hembra a macho en el mero rojo *E. morio*. Mostrando todos los estadios de la espermatogénesis con niveles de Testosterona de 326 mg kg⁻¹ y 11Ketotestosterona y Estradiol de 334 y 110 mg kg⁻¹ respectivamente.
3. No existe un cambio en la reversión de macho de hembras de *E. morio* colocando los implantes de 17 alfa metiltestosterona previo a la temporada reproductiva (diciembre) o iniciando la temporada (enero).
4. Los implantes de 17 alfa metiltestosterona colocados en dos años consecutivos a una dosis de 2.5 mg kg⁻¹ reducen los niveles de estradiol en sangre, y mantienen la condición de transición tardía.
5. La canulación fue un método eficiente, bajo las condiciones experimentales propuestas, para identificar el cambio de sexo de hembra a macho de mero rojo, así como el avance de transición de éstas, sin tener que sacrificar al pez.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmad, T. A. 2000. Growth and survival of the grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton) at different loading rates in tanks, (1993), 603–608.
- Alvarez-lajonchère, L. Ibarra-Zatarain, Z. and Ibarra-Castro, L. 2013. Validación y estandarización de una técnica para biopsia ovárica en el pargo flamenco, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Revista Investigaciones Marinas*, 33(1), 1–8.
- APEC/SEAFDEC. 2001. Husbandry and health management of grouper. *Asia-Pacific Economic Cooperation, Singapore (APEC Publication No. 201-FS-03.1) and SEAFDEC Aquaculture Dept, Tigbauan, Iloilo - See More at: <http://www.seafdec.org.ph/?s=APEC+Publication+No.+201-FS-03.1#sthash.xT9oYdx9.dpuf>*, 194 P.
- Bhandari, R. K. Alam, M. A. Soyano, K. and Nakamura, M. 2006. Induction of female-to-male sex change in the honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by 11-ketotestosterone treatments. *Zoological Science*, 23(1), 65–69.
- Cabrita, E. Engrola, S. Conceição, L. E. C. Pousão-Ferreira, P. and Dinis, M. T. 2009. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, 287(1), 152–157.
- Carrillo, M. and Zanuy, S. 1993. Fisiología de la Reproducción. In F. Castelló (Ed.), *Acuicultura Marina: Fundamentos biología y tecnología de la Reproducción*. (Vol. 4, p. 125). Universidad de Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
- Collins, L. Fitzhugh, G. Lombardi-Carlson, L. Lyon, H. Walling, W. and Oliver, D. 2002. *Characterization of red grouper (Serranidae: Epinephelus morio) reproduction from the eastern Gulf of Mexico. National Marine Fisheries Service Southeast Fisheries Science Center* (Vol. Contributi, pp. 1–21).
- Conceição, L. Cabrita, E. Engrola, S. Lacuisse, M. Pousão-Ferreira, P. and Dinis, M. 2008. Hormonal induction of Atlantic dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) broodstock. *Cybium*, 32(2 suppl), 324–325.
- Debas, L. Fostier, A. Fuchs, J. Weppe, M. Nedelec, G. Beneti, A. ... Jalabert. 1989. The sexuality of cultured hermaphroditic fish species: analysis of morphological and endocrinological features in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon*, as a basis for further research to control reproduction in the grouper. *Advances in Tropical Aquaculture*, 20(4), 543–557.
- Glamuzina, B. Glavić, N. Skaramuca, B. and Kožul, V. 1998. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe). *Aquaculture Research*, 29(8), 563–567.

- Gutiérrez, D. 2010. *Bioenergética de juveniles Epinephelus morio* (VALENCIENNES, 1828. Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.
- Hassin, S. De Monbrison, D. Hanin, Y. Elizur, A. Zohar, Y. and Popper, D. M. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156(3), 305–316.
- Kuo, C.-M. Ting, Y.-Y. and Yeh, S.-L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74(1-2), 113–126. doi:10.1016/0044-8486(88)90091-9
- Lahnsteiner, F. Berger, B. Kletzl, M. and Weismann, T. 2006. Effect of 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquat. Toxicol*, 79, 124–131.
- Lee, S. T. L. Kime, D. E. Chao, T. M. Lim, H. S. Chou, R. Lam, T. J. and Tan, C. H. 1995. In Vitro Metabolism of Testosterone by Gonads of the Grouper (*Epinephelus tauvina*) before and after Sex Inversion with 17 α -Methyltestosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 99(1), 41–49. doi:10.1006/gcen.1995.1083
- Li, G. Ā, X. L. Zhang, Y. and Lin, H. 2006. Gonadal development , aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor , fadrozole. *Aquaculture Research*, 37, 484–491. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01453.x
- Li, G. Liu, X. and Lin, H. 2006. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(1), 25–33.
- Li, G. Liu, X. and Lin, H. 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Animal Reproduction Science*, 99(1), 156–166.
- Marino, G. Azzurro, E. Finoia, M. G. Messina, M. T. Massari, A. and Mandich, A. 2000. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). In *Recent Advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Proceedings of the Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM), jointly organized by CIHEAM and FAO* (Vol. 24, pp. 215–225).
- Mathew, G. 2005. Boodstock development of groupers. In *Proceedings of Ocean Life Food & Medicine Expo* (pp. 311–317).

- Mathew, G. 2011. Gonadal restructuring during sex transformation in the protogynous greasy grouper *Epinephelus tauvina* (Forsskal) (Perciformes: Serranidae). *Indian Journal of Fisheries*, 58(1), 39–43.
- Mathew, G. Sanila, N. Sreedhar, N. Bhai, K. S. Kambadkar, L. R. and Palaniswamy, N. 2002. Experiments on broodstock development and spawning of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Indian Journal of Fisheries*, 49(2), 135–139.
- McGovern, J. Burgos, J. Harris, P. Sedberry, G. Loefer, J. Pashuk, O. and Russ, D. 2002. *Aspects of the Life History of Red Grouper, Epinephelus morio, Along the Southeastern United States*. South Carolina Department of Natural Resources MARMAP program (Vol. NA97FF0347, p. 59 p).
- Sarter, K. Papadaki, M. Zanuy, S. and Mylonas, C. 2006. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256(1–4), 443–456. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.034>
- Schulz, R. W. de França, L. R. Lareyre, J.-J. Le Gac, F. LeGac, F. Chiarini-Garcia, H. ... Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Shams, A. J. 2010. Cultured Aquatic Species Information Programme *Epinephelus coioides*. Cultured Aquatic Species Information Programme. *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]*. Rome. Updated 2010. [Cited 30 June 2013]. . Roma: FAO. Retrieved from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Epinephelus_coioides/en
- Yeh, S. Dai, Q. Chu, Y. Ching-Ming, K. Ting, Y.-Y. and Chang, C. 2003. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228(1-4), 371–381. doi:10.1016/S0044-8486(03)00316-8
- Yeh, S. Kuo, C. Ting, Y. and Chang, C. 2003. Androgens stimulate sex change in protogynous grouper, *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. *Comparative Biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 135(3), 375–382.

CAPITULO 4

Estabulación de hembras silvestres de *Epinephelus morio*.

INTRODUCCION

La acuicultura debe asegurar un suministro confiable y suficiente de huevos de alta calidad en un tiempo y a un precio razonable para que la especies puedan ser cultivadas (Alvarez-Lajonchère, 2006) y estos solo pueden ser obtenidos por un banco de reproductores mantenido en condiciones ambientales adecuadas (Navas et al., 2007).

Tradicionalmente los cultivos se han iniciado con la colecta de ejemplares silvestres como en los meros del género *Epinephelus* (Pomeroy et al., 2002) o las corvinas (Pastor et al., 2005) o bien, juveniles o adultos de lubina o recientemente de atún rojo *Thunnus thynnus* (Gándara et al., 2011) por citar algunos ejemplos, los cuales son llevados a los laboratorios o centros de producción para su reproducción en condiciones controladas.

La decisión de coleccionar ya sea juvenil o adulto, dependerá de la tasa de crecimiento de los peces, pero sobre todo de la talla mínima de reproducción de la especie. Especies donde los juveniles sean relativamente fácil de coleccionar y donde la maduración sexual se alcance en tallas pequeñas, coleccionar juveniles puede ser una buena opción; contrariamente, especies que requieren alcanzar gran tamaño para comenzar a madurar, quizás no lo sea tanto.

Para especies que ya se cultivan comercialmente, la colecta de juveniles de los sistemas de engorda puede hacerse para sustituir o reemplazar el banco de reproductores ya existente.

La gran ventaja de la colecta de los juveniles, es que en lo general se aclimatan más rápidamente a la cautividad, además, si se consiguen en un buen número, pueden elegirse los mejores ejemplares como reproductores.

Por otro lado, cuando las especies son longevas o de gran tamaño, coleccionar organismos juveniles implica inversión de tiempo y dinero para su mantenimiento en laboratorio hasta que alcancen la talla mínima de reproducción. Cuando existe la relativa facilidad de coleccionar organismos en talla reproductiva, la colecta de adultos será la mejor opción, pues incluso podrá identificarse el sexo y el estado de madurez de los peces.

Sea de una manera o de otra, es claro que la decisión de iniciar un banco de reproductores dependerá de la biología de la especie, de la técnica de captura que asegure, dentro de lo posible, el menor daño de los peces, de la factibilidad de los sitios de colecta y de la logística para el transporte de los organismos al laboratorio.

Para el grupo de los meros ambas estrategias han sido utilizadas (Tucker, 1999) ya que estos peces presentan un amplio intervalo de tallas máximas, desde los 12 cm para *Paranthias colonus* o por encima de 3 m como el mero

gigante *Epinephelus lanceolatus*. Por otro lado, la mayoría de los meros que se han estudiado son sexualmente maduros entre los 2 y 6 años de vida y los de mayor talla como *Epinephelus fuscoguttatus*, madura a los 9 años de vida (Tupper and Sheriff, 2008).

Una vez hecha la selección de juveniles o adultos, el siguiente paso a cubrir será la cuarentena. Esta es considerada como las medidas de la gestión del riesgo que debe ser aplicada, sola o en combinación, para reducir el riesgo que presentan los patógenos de animales acuáticos (Arthur et al., 2012).

Comúnmente, la cuarentena de rutina se realiza en instalaciones de producción, por ejemplo, reproductores nuevos, domésticamente producidos o localmente capturados o juveniles (Arthur et al., 2012). Es esencial realizarla además de evitar contaminaciones en los centros de producción, descartar aquellos ejemplares que debido al estrés de la captura, transporte y encierro expresen algún problema sanitario.

Los tratamientos de cuarentena van desde el aislamiento hasta la aplicación de tratamientos de desinfección con formol, agua dulce, antibióticos, entre otros. El uso de cualquiera de ellos, dependerá de la especie, la edad del organismo y la sensibilidad de los productos utilizados.

Tomando en cuenta que los juveniles y hembras inmaduras sexualmente de *E. morio* pueden colectarse cerca de la costa y que aquellas en avanzado estado de desarrollo gonadal han sido capturadas mar adentro (Brulé et al., 1999)(Brulé et al., 1999)(Brulé et al., 1999)(Brulé et al. 1999)(Brulé et al. 1999)(Brulé et al., 1999)(Brulé et al., 1999) y que la talla promedio de primera maduración es a los 54.5 cm de LF (Brulé et al., 1999) la colecta de organismos adultos, pudiera ser una opción para acortar el tiempo de reproducción en cautividad.

Como continuación del trabajo de investigación sobre reversión sexual a macho mediante implantes hormonales que se realizó en meses anteriores y considerando que para la reproducción en cautividad del mero rojo es indispensable contar con hembras maduras (entre 39 a 72 cm LF), se realizó la colecta de hembras durante la temporada veda en la Costa de Yucatán.

OBJETIVO

Colectar hembras silvestres de mero rojo *Epinephelus morio* en un avanzado estado de madurez sexual mediante el arte de captura tradicional durante la temporada reproductiva para incrementar el banco de reproductores en laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Captura de Adultos

Durante febrero del 2013, se capturaron ocho hembras de *E. morio* con palangre en una embarcación comercial de mediana altura denominada “Anguila” en la Sonda de Campeche.

El palangre fue dejado en el mar por espacio de 7 a 9 horas después de haber sido lanzado. Los peces capturados con tallas mayores a 50 cm de LT fueron colocados en un contenedor de 60 litros de agua de mar con suministro continuo de agua. De manera inmediata con una aguja calibre 16 G se hizo una punción lateral a unos 3 cm de distancia por detrás de la base de la aleta pectoral para desinflar la vejiga natatoria.

Una vez que comenzó a salir el aire, con la mano se presionó suavemente el abdomen en dirección ventrodorsal y anteroposterior para eliminar la mayor cantidad de aire contenido en el pez. Lograda la estabilidad del mero, se le retiró el anzuelo, que en la mayoría de las veces quedó enganchado lateralmente en la boca.

Ya sin anzuelo, los peces fueron colocados en un tanque de 1.5 m³ de capacidad, adaptado al espacio del barco y con circulación de agua continua durante el día y con un sistema de aireación mediante bombas de acuario durante la noche.

Después de tres días de captura, los peces fueron cambiados a otra embarcación pequeña y repartidos en dos tanques de 0.5 m³ de capacidad con agua de mar a un 30% de su capacidad y con aireación de bombas de acuario. De esta manera fueron transportados a las Instalaciones de la UAS. Ya en el área de reproducción de peces marinos, los meros se colocaron en un tanque de 1.0 m³ y se dejaron por espacio de 19 horas con flujo continuo de agua marina y aireación.

Posteriormente los meros fueron sometidos de manera individual a tratamiento profiláctico de agua dulce durante 10 minutos y un baño con formol 125 ppm. Los meros fueron colocados en un tanque de reproducción de 12 m³, el cual contenía recipientes plásticos a manera de refugios.

Los peces fueron identificados con marcadores electrónicos (PITS tags) colocados intramuscularmente en la región latero-dorsal izquierda.

Plasma Sanguíneo

De algunos meros mayores a 50 cm de LT que fueron sacrificados en el barco, previamente se tomaron muestras entre 800 a 1000 μ l de sangre de arco branquial. Las muestras fueron mantenidas en hielo y posteriormente fueron centrifugadas en el barco durante 10 minutos a su máxima potencia con una mini centrífuga para Eppendorff mantenida en frío dentro de una nevera.

El plasma obtenido se mantuvo en hielo hasta llegar a las Instalaciones de la UAS, ahí fueron colocadas a -40°C hasta la evaluación de E₂, T y 11KT mediante la técnica EIA con kits Cayman (ver esteroides en el capítulo 1).

Para las hembras llevadas al laboratorio y que formaron parte del stock, las muestras de sangre fueron tomadas 24 horas después de la llegada de los peces a las instalaciones de la UAS.

Histología

Durante la captura se seleccionaron algunas gónadas de mero de peces que fueron eviscerados en campo para realizar un análisis histológico.

Las gónadas fueron mantenidas en formol al 10% hasta su llegada al laboratorio, posteriormente fueron deshidratadas y teñidas (Hernández-Canseco, 2012).

RESULTADOS

Colecta de los ejemplares

Con un intento de asegurar ejemplares silvestres maduros en el laboratorio, se gestionó y programó en colaboración del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) de Yucalpetén, Yucatán una salida a mar abierto durante la temporada de veda (15 de febrero al 15 de marzo) de mero en el Golfo de México y mar Caribe. Se realizó la colecta con la metodología de la captura comercial de mero en la región en una embarcación de mediana altura durante los primeros días de viaje. Los peces fueron capturados del 23 al 25 de febrero del 2013, días previos a la luna llena.

Los meros fueron capturados en el Banco de Campeche (22° N y 90° W), a 26 brazas (46.8 m) de profundidad.

Durante tres días se capturaron ocho peces de 66.39 ± 6.18 cm de LF (Figura 41) y 4400 ± 1051 g de peso, de promedio respectivamente.



Figura 41.- Ejemplo de hembra silvestre de *Epinephelus morio* de 2 900 g y 56.5 cm LF capturada en febrero del 2013 en el Banco de Campeche.

No fue posible saber con precisión el tiempo que los peces pasaron enganchados al anzuelo, pero ninguno de ellos presentó señales graves de descompresión como los ojos fuera de sus órbitas o bien los estómagos expuestos por la boca (figura 42).



Figura 42.- Señales de descompresión que sirvieron para descartar a los meros durante la captura.

La captura se inició con la preparación de los anzuelos con la carnada, utilizando principalmente el bonito (*Sarda* sp.). Se hicieron dos lances por día comenzando a tirar los anzuelos entre 10:00 y 11:00 h para recogerlos alrededor de las 16:00 h y lanzados nuevamente entre las 19:00 y 20:00 h para recoger cerca de las 06:00 h. El tiempo transcurrido entre el lance y la recogida de los anzuelos duró alrededor de 4 a 5 h.

Debido a que el barco realizaría una captura comercial y ésta tiene una duración media de 17 días, una vez capturados los peces se cambiaron de embarcación para ser llevados al laboratorio. A continuación se muestra la secuencia desde la captura de los meros hasta su instalación al área de reproducción de la UAS.



Preparación de carnada y anzuelos.

A) Corte del pescado en trozos de bonito (*Sarda* sp.)

B) cordeles con anzuelos de unos 2 m de longitud



Lanzamiento al agua por popa de los anzuelos ensartados en la línea principal a una distancia aproximada de unos 4 m entre uno y otro



Subiendo el palangre por estribor con un cabrestante



Identificación del tamaño y observación del estado de descompresión del pez



Colocación en tanque con renovación de agua. Revisión de que el pez no se hubiera tragado el anzuelo, de lo contrario sería eliminado



Pinchazo en la vejiga natatoria para extraer el aire



Estabilización del pez. Se mantuvo en este tanque hasta comprobar que el pez se mantenía por si solo en posición vertical



Una vez estabilizado, se retiró el anzuelo (A). El anzuelo generalmente quedó insertado lateralmente (B)



Los peces se colocaron en el tanque de 1000 litros para su recuperación. Se observaron continuamente para verificar su comportamiento



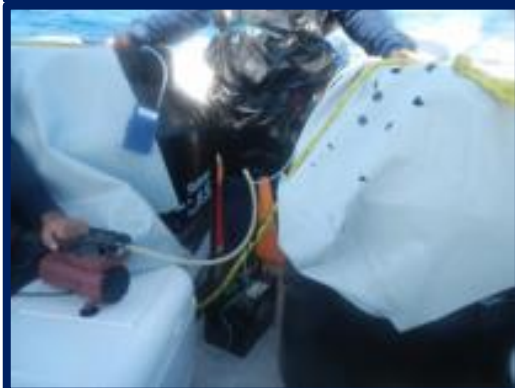
Pez recién colectado, se esperaba comenzara a irse al fondo, como un indicador de su recuperación



Cinco de los ocho ejemplares capturados



Cambio de embarcación. Paso de los peces de uno en uno para ser transportados al laboratorio



Transporte en dos tanques de 500 litros con aireación y renovación parcial de agua cada dos horas



Desembarque de los peces en el puerto de Sisal y transporte hacia el laboratorio de la UNAM



Colocación de los peces en el tanque de cuarentena dentro de las Instalaciones de la UNAM



Hembras de *Epinephelus morio* instaladas en el área de reproducción de peces marinos de la UAS

Después de las 24 horas de la llegada de los peces y al finalizar del tratamiento profiláctico, solo una hembra murió. Este pez presentó una fuerte infección bacteriana a lo largo del cuerpo, debido a que durante el cambio de una embarcación a otra, el pez cayó dentro de la lancha, lo cual le ocasionó laceraciones en la piel que se complicaron con el estrés del transporte.

Durante el tratamiento profiláctico se observó la presencia de isópodos en las narinas de tres de los peces, de manera similar a lo reportado por SEAFDEC (2010) para los meros asiáticos. No se identificaron visualmente digeneos en branquias ni cualquier otro parásito externo.

Los datos morfométricos de los meros que llegaron al laboratorio pueden verse en la tabla 13.

Tabla 13.- Datos morfométricos de *Epinephelus morio* silvestres aclimatados al laboratorio.

CLAVE	LF (cm)	LT (cm)	PESO (kg)
O23	56.57	58.17	2.900
O52	58.65	59.91	3.200
O15	64.68	66.59	4.000
O12	67.38	68.44	4.100
OO3	67.99	70.76	4.600
994	72.7	75.2	5.000
O22	69.14	71.3	5.600
O39	73.97	75.42	5.800

Los peces se mantuvieron a una densidad de 2.13 kg m⁻³.

Por otro lado, los peces mostraron una rápida recuperación y adecuación al nuevo tanque. Tres días después de su llegada a la UAS se proporcionaron a los peces dos camarones vivos, lo cual estimuló a los peces a comer y a acercarse al personal en el momento de la alimentación. Después de ocho días, todos los peces comenzaron a comer el alimento semihúmedo.

Con las biopsias gonádicas, se identificó que todos los peces colectados fueron hembras y todas mostraron ovocitos en estadio previtelogénico. La hembra que murió después del tratamiento profiláctico presentó un IG de 0.1 y un estado de madurez I o II de acuerdo a Brulé *et al.* (1999) (figura 43).

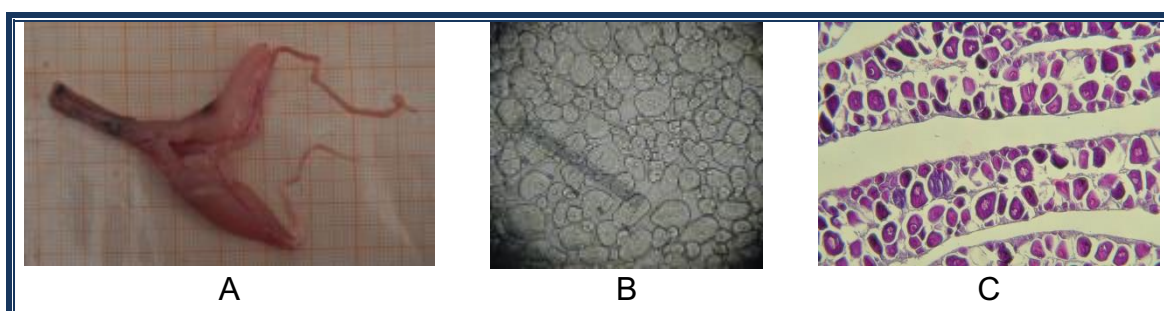


Figura 43.- Gónada de hembra de 64,6 cm LF y 4000 g de peso capturada durante el mes de febrero de 2013. A.-gónada en fresco, B.- Frotis en fresco a 10x en microscopía óptica, C.-Corte transversal de la gónada con tinción H-E. 40X.

Esteroides

Los niveles de esteroides de los meros llevados al laboratorio se muestran en la Tabla 14. Puede apreciarse que los valores para E₂ estuvieron entre 23.14 y 78.37 pg ml⁻¹ mientras que para T y 11KT estuvieron entre 70.85 a 170.22 y 14.12 a 77.74 pg ml⁻¹ respectivamente.

Tabla 14.- **Concentración individual de esteroides (pg ml⁻¹) de *E. morio* silvestres llevados al laboratorio para la conformación de un stock de reproductores, así como el valor promedio y error estándar de todos los peces para cada esteroide.**

CLAVE	E ₂	T	11KT
O12	23.14	142.98	48.41
O22	78.37	134.34	54.07
O23	37.77	238.10	40.64
O39	45.48	92.62	77.74
O52	44.44	70.85	14.12
OO3	50.40	170.22	48.41
<i>promedio</i>	46.60 ± 6.28	141.52 ± 20.46	47.23 ± 7.1

Por otro lado, los niveles de esteroides de los meros silvestres a los cuales se les pudieron coleccionar muestra de sangre en el barco, presentaron niveles de E₂, T y 1KT superiores a los meros del stock llevados al laboratorio. Estos peces tuvieron como talla mínima 52 cm de LF y un peso promedio de 2.10 kg (tabla 15) y ninguno de ellos sobrevivió para ser llevado al laboratorio.

Tabla 15.- Datos morfométricos de reproductores silvestres de *Epinephelus morio* muestreados en el barco (datos proporcionados por el CRIP Yucalpetén) y sus correspondientes valores de esteroides. Los ** indican valor superior a 5000 pg ml⁻¹.

CLAVE	LF (cm)	LT (cm)	PESO ENTERO (kg)	PESO EVISCERADO (kg)	E ₂ (pg ml ⁻¹)	T (pg ml ⁻¹)	11KT (pg ml ⁻¹)
C3	57	60	3.10	2.90	211.78	204.42	511.40
C4	52	54	2.20	2.10	194.25	1053.73	5445.03
C11	52	55	2.10	2.00	129.25	656.64	1558.77
C14	60	64	3.22	2.97	106.19	250.35	1139.44
C20	64	67	3.50	3.30	159.06	833.07	7554.8
C21	69	73	4.90	4.700	**	110.98	40.63
Promedio	59±6.16	62.17±6.67	3.17±0.93	3.0 ± 0.89			

De este grupo de peces, se encontró que aunque las gónadas de manera macroscópica fueron identificadas como hembras, los niveles hormonales y la histología indicaron que uno de ellos era macho maduro (figura 42).

En este macho, se observó una gónada con algunos ovocitos residuales (OV) y donde las lamelas tradicionales de hembras no son visibles (figura 42A). Existe una gran cantidad de grupos de espermatozoides repartidos en todo el tejido y agrupaciones de espermatidas, espermatocitos primarios o secundarios en sitios donde antes se encontraban los ovocitos.

De acuerdo a este estadio de desarrollo, el pez mostró niveles de E₂ muy bajos (159 pg ml⁻¹). La concentración de T fue muy inferior a la de 11KT (833 y 7554 pg ml⁻¹ respectivamente) (figura 42B).

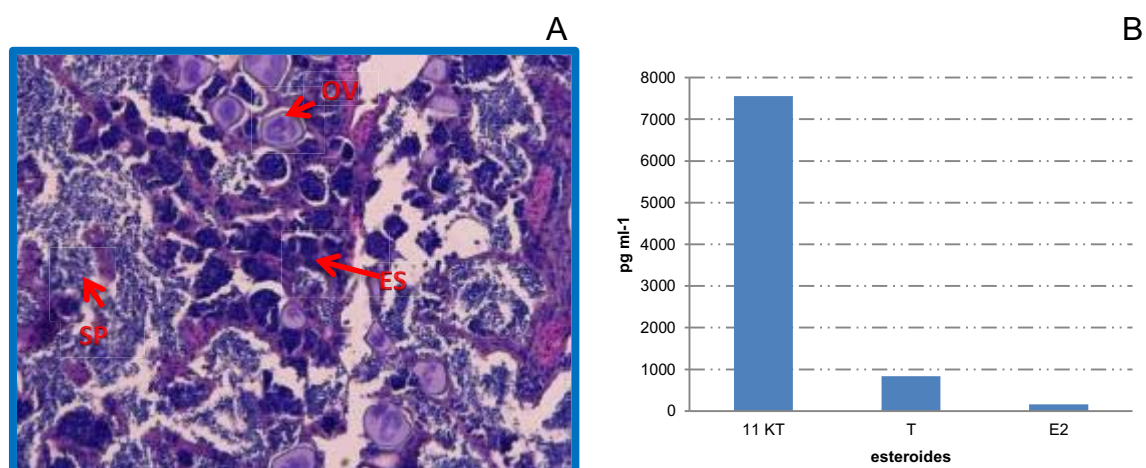


Figura 44.- Macho silvestre de *Epinephelus morio*. (A) Corte histológico H-E de gónada a 20x de 69 cm de LF y 4700 g de peso. (B) Concentraciones de esteroides que corresponden a ese estadio de desarrollo del testículo de ese macho al momento de la captura. SP= espermatozoides primarios; ES=espermatozoides secundarios; OV ovocitos residuales.

Por otro lado, dentro de este mismo lote de peces, se identificó una gónada de mayor tamaño que correspondió a una hembra en estado de maduración (figura 43). Se observaron ovocitos inmaduros de pequeño tamaño (Figura 43A) y otros de mayor tamaño con vitelo en su interior, sin embargo algunos de estos ovocitos comenzaron a mostrar signos de atresia, como la reabsorción del citoplasma.

Referente a los niveles hormonales, esta hembra presentó concentraciones inferiores a 150 pg ml^{-1} de 11KT y T (40 y 110 pg ml^{-1} respectivamente), mientras que la concentración de E_2 quedó fuera de la curva estándar y no pudo ser valorada por el Kit EIA, por lo que el nivel debió ser mayor a 5 ng ml^{-1} .

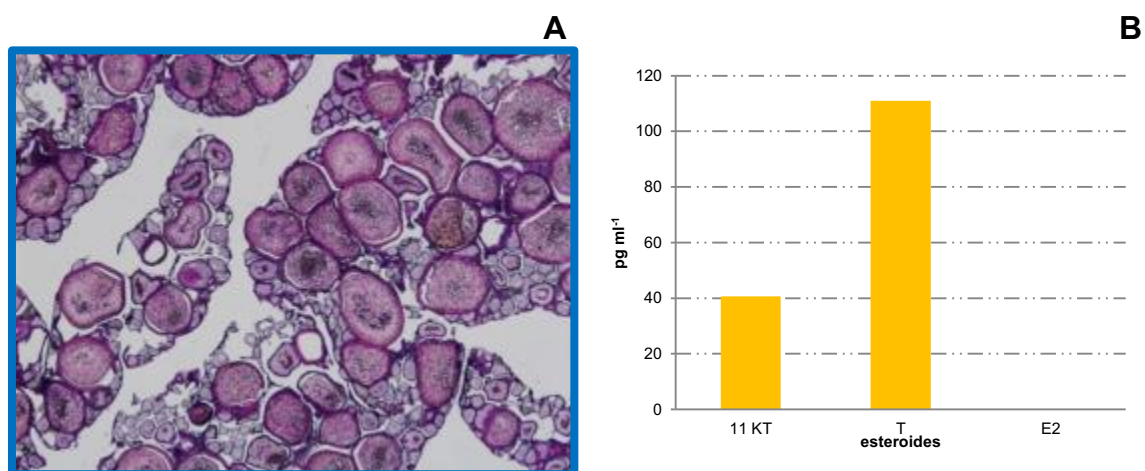


Figura 45.- Hembra silvestre de *Epinephelus morio*. (A) Corte histológico de la ovario una hembra silvestre de *Epinephelus morio* en estadio vitelogénico y las concentraciones de esteroides (B) de ese estadio de desarrollo. Los valores de E_2 fueron superiores a 5000 pg ml^{-1} .

DISCUSION

En las dos últimas décadas la acuicultura se ha desarrollado como una alternativa a la pesca extractiva.

Comenzar un banco de reproductores de peces marinos, implica la selección de los peces con ciertas características, la más básica es el sexo. Identificar el sexo del pez permite elegir aquel que buscamos y si además podemos seleccionar a los reproductores con un avanzado estado de madurez, podríamos tener una ventaja extra.

Durante este trabajo de investigación, partimos del hecho de que los machos de mero rojo serían obtenidos del proceso de reversión sexual en laboratorio, por lo tanto sería necesaria la colecta de hembras maduras silvestres.

Para este cometido, la captura de ejemplares adultos de mero rojo, fue un gran reto, en primera instancia por el arte de pesca en donde los peces pueden estar varias horas ensartados en el anzuelo; y por la dinámica de la captura comercial en donde los anzuelos son recogidos a tal velocidad, que combinado con la profundidad de la colecta ocasiona la descompresión de los peces.

El aspecto más importante y quizás determinante que permitió la sobrevivencia de los reproductores capturados fue el desinflado de la vejiga natatoria de los meros recién salidos del agua. La dificultad de mantener con vida a los meros de gran tamaño que son colectados a grandes profundidades ya había sido observada (Colin et al., 1996) de ahí que solo se colectaron los testículos para fertilizar los huevos de las hembras en laboratorio.

Originalmente se pretendía tomar muestras de sangre de los peces al momento de salir del agua, pero se perdía tiempo valioso para recuperar al pez, de tal manera que las veces en las que fue posible extraer la sangre, los peces no sobrevivieron, de ahí que se haya decidido asegurar la sobrevivencia de los peces y posteriormente extraer la sangre.

Los peces capturados superaron la talla mínima reportada (Brulé et al., 1999; Giménez et al., 2003) para la maduración de las hembras, por lo que se esperaba que estuvieran maduras sexualmente, sin embargo los niveles hormonales evaluados no confirmaron el resultado, debido en gran medida a la toma tardía de las muestras (24 horas o más de la captura) y al efecto del estrés propio de la captura en los peces.

Se sabe que el estrés, ataca al sistema nervioso y endocrino, induciendo la caída de los esteroides en el plasma de los niveles plasmáticos por lo que si alguna de las hembras llevadas al laboratorio se encontraba madura, es posible que el estrés de todo el proceso de la captura hayan disminuido los niveles de esteroides propiciando una reabsorción de la gónada.

La canulación o biopsia ovárica es un método para evaluar el desarrollo de la gónada durante el periodo de reproducción (Alvarez-lajonchère et al., 2013) para tomar la muestra generalmente los peces se encuentran anestesiados o inmovilizados. Intentar identificar el sexo y estado de madurez de los meros al momento de la captura a través de biopsias no fue posible debido una combinación de aspectos anatómicos del pez y a las condiciones de la pesca. Se encontró que cuando la vejiga natatoria tenía aire, ésta empujaba la gónada (de pequeño tamaño) alejándola del gonoporo impidiendo alcanzarla con la cánula, condición que fue detectada cuando los peces fueron sacrificados.

Contrariamente intentar canular al mero una vez que la vejiga había sido desinflada no siempre dio buen resultado, pues los peces en su gran mayoría presentaron gónadas de pequeño tamaño, indicando gónadas inmaduras por ello la canulación se realizó durante la temporada reproductiva cuando los

peces presentan gónadas desarrolladas y donde los oviductos están dilatados de tal manera que permitan la entrada de la cánula sin dañar el tejido.

No encontrar a hembras maduras durante la temporada de veda fue un aspecto relevante, según comentarios de los mismos pescadores, la captura de hembras grávidas había sido un mes anterior, indicando un posible cambio en la actividad reproductiva de la especie, aspecto que deberá corroborarse con estudios de pesquerías.

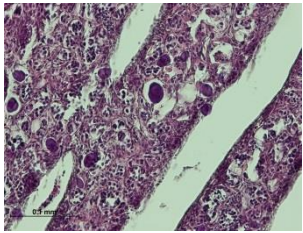
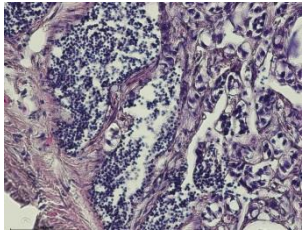
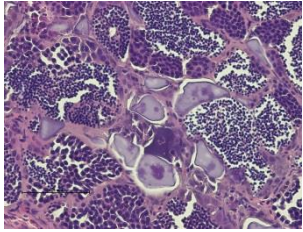
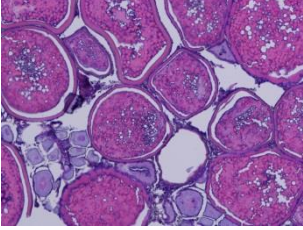
Las diferencias encontradas entre la morfología de la gónada y el estado de madurez identificado en campo, en comparación con los niveles hormonales en sangre y la histología de la gónada; corroboran que no es posible identificar el sexo de los mero rojo sólo con la observación macroscópica de la gónada (Brulé *et al*, 1999). La canulación bajo las condiciones de colecta de los meros en campo realizada por primera vez, tampoco resultó ser un método completamente fiable de identificación y aunque la talla pudiera ser un indicador, tampoco resulta ser una garantía para la selección de hembras y machos, ya que se ha encontrado una disminución de las tallas de madurez en el tiempo (Giménez *et al.*, 2003).

Tomando con cautela que los datos de las hormonas corresponden a un solo ejemplar; en la hembra madura las concentraciones fueron $E_2 \geq T \geq 11KT$ de manera similar a *E. coioides* (Yeh *et al.*, 2003) y a *E. morio* del este del Golfo de México (Johnson *et al.*, 1998). Para la misma especie, se encontraron diferencias (≥ 5000 y 3000 pg ml⁻¹ respectivamente).

Referente al macho la relación de las concentraciones de los esteroides fue $11KT \geq T \geq E_2$ de manera similar a *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998) y *E. merra* (Kumar *et al.*, 2003). Las concentraciones del presente trabajo fueron superiores a las reportadas para la misma especie.

Comparando los resultados obtenidos tenemos que los organismos silvestres maduros mostraron niveles de esteroides muy por encima de los peces que fueron revertidos sexualmente, incluso donde el avance fue mayor (tres implantes) (Tabla 16).

Tabla 16.- Valores de esteroides (pg ml-1) de organismos silvestres de mero rojo *Epinephelus morio* revertidos sexualmente a macho a partir de implantes de 17 alfa metiltestosterona y organismos adultos silvestres. Observaciones a 40X excepto la de la hembra silvestres que es a 20X. ET= Transición temprana, LT= Transición tardía. H=Hembra, M=Macho.

Histología	Condición experimental	Esteroide	H	Transición		M
				ET	LT	
	Dos Implantes con MT	T			647	
		11KT			100	
		E ₂			401	
	Tres implantes con MT	T			484	
		11KT			196	
		E ₂			171	
	silvestre	T				833
		11KT				7554
		E ₂				159
	silvestre	T	110			
		11KT	40			
		E ₂	≥ 5000			

CONCLUSION

1. Se lograron conformar un grupo de 7 meros adultos de *E. morio* de 4457 g promedio y 66.6 cm LF dentro de las Instalaciones de la Unidad Académica Sisal
2. De acuerdo a la técnica de captura y transporte, se logró un 87.5 % de sobrevivencia de los peces colectados.
3. Los niveles de esteroides evaluados 2 a 3 días después de la captura de los ejemplares estabulados no dieron información del estado de madurez y sexo de los peces colectados.
4. Los niveles de esteroides en una hembra silvestre madura de 69 cm de LF y 4.90 Kg de peso capturada fueron de 40.6 pg ml⁻¹ de 11 Ketotestosterona, 110.9 pg ml⁻¹ de Testosterona y más de 5000 pg ml⁻¹ de Estradiol.
5. Los niveles de esteroides en un macho silvestre de 64 cm de LT y 3.5 Kg de peso fueron 7554.8 pg ml⁻¹ de 11 Ketotestosterona, 833.08 pg ml⁻¹ de Testosterona y de 159 pg ml⁻¹ de Estradiol.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alvarez-Lajonchère, L. 2006. Nutrición de Reproductores de Peces Marinos. *Simposium Internacional de Nutrición*.
- Alvarez-lajonchère, L. Ibarra-Zatarain, Z. and Ibarra-Castro, L. 2013. Validación y estandarización de una técnica para biopsia ovárica en el pargo flamenco, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Revista Investigaciones Marinas*, 33(1), 1–8.
- Arthur, R. Bondad-Reantaso, M. and Subasinghe, R. 2012. *Procedimientos para la cuarentena de animales acuáticos vivos* (p. 91 p).
- Brulé, T. Déniel, C. Colás-Marrufo, T. and Sánchez-Crespo, M. 1999. Grouper Reproduction in the Southern Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128:3, 385–402. doi:10.1577/1548-8659(1999)1282.0.CO;2
- Colin, P. L. Koenig, C. C. and Laroche, W. A. 1996. Development from egg to juvenile of the red grouper (*Epinephelus morio*)(Pisces: Serranidae) in the laboratory. In *Biology, fisheries and culture of tropical groupers and snappers*. ICLARM Conf. Proc (Vol. 48, pp. 399–414).
- Gándara, F. De Ortega, A. Belmonte, A. Mylonas, C. C. and Viguri, J. R. P. F. J. 2011. Obtención de puestas masivas de huevos de atún rojo (*Thunnus thynnus*) en cautividad, durante 3 años consecutivos. In *XII Congreso Nacional de Acuicultura*. (pp. 2010–2011).
- Giménez, E. Moreno, V. Burgos, R. and Alfonso, S. 2003. Reproducción y Fecundidad de la Cherna Americana (*Epinephelus morio*) en el Banco de Campeche, México. *Oceanides*, 18(1), 13–21.
- Hernández-Canseco, J. 2012. *Ecología de la reproducción del bolín yucateco *Floridichthys polyommus* (Hubbs 1936) en el sistema lagunar La Carbonera, Yucatán*. . UMAR, Oaxaca, México.
- Johnson, A. Thomas, P. and Wilson, R. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 52, 502–518.
- Kumar, R. B. Komuro, H. Nakamura, S. Higa, M. and Nakamura, M. 2003. Gonadal Restructuring and Correlative Steroid Hormone Profiles during Natural Sex Change in Protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*). *Zoological Science*, 20, 1399–1404.
- Navas, J. Bruce, M. Thrush, M. Farndale, M. Bromage, N. Zanuy, S. ... Ramos, J. 2007. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 51(4), 760*773.

- Pastor, E. Grau, A. and Alconchel, J. I. 2005. Revisión del cultivo de esciéndidos en el mundo , con especial atención a la corvina *Argyrosomus regius*. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21, 169–175.
- Pomeroy, R. Agbayani, R. J., T. Sugama B., K. S. and Tridjoko. 2002. *The status of grouper culture in Southeast Asia*. SPC (Vol. 10, pp. 22–26).
- Tucker, J. 1999. *Species Profile Grouper Aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication (Vol. Publicatio).
- Tupper, M. and Sheriff, N. 2008. *Capture-based aquaculture of groupers. Global overview*. *FAO Fisheries Technical Paper*. (Vol. No. 508. R, pp. 217–253.). Rome, FAO.
- Yeh, S. Kuo, C. Ting, Y. and Chang, C. 2003. Androgens stimulate sex change in protogynous grouper, *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. *Comparative Biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 135(3), 375–382.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados obtenidos, los objetivos planteados en este trabajo fueron cumplidos, así:

1. La 17 alfa metiltestosterona en implantes silásticos a una dosis de 2.5 mg kg⁻¹ induce a la reversión sexual a macho a partir de hembras inmaduras de 433 gramos y 31.6 cm de longitud furcal promedio.
2. Se logró por primera vez en cautividad la reversión sexual de *Epinephelus morio*. Además se redujo la talla de cambio de sexo a 27.9 cm de LF en el sureste del Golfo de México.
3. La T en dosis de 1.0 mg kg⁻¹ no provocó degeneración de los ovocitos para dar paso a las células espermáticas en juveniles de mero rojo de 31.6 cm promedio de longitud furcal.
4. La dosis total de 7.5 mg kg⁻¹ fue más efectiva que la de 5 mg kg⁻¹. Estimuló al desarrollo de las células desde espermatogonia hasta espermatozoide durante en la reversión sexual de juveniles a macho de *Epinephelus morio*.
5. Los niveles de T en meros con implantes de 17 alfa-metiltestosterona y testosterona fueron superiores a los niveles de E₂ y 11KT.
6. La reversión sexual a macho mediante el uso de implantes de 17 alfa-metiltestosterona por segundo año consecutivo estimuló a la disminución de las concentraciones de Estradiol en sangre e incrementó los de 11 metiltestosterona.

7. La biopsia ovárica permitió identificar a las hembras en reversión y su avance de desarrollo en hembras inmaduras de *Epinephelus morio*
8. Se logró la conformación de un lote de reproductores de 14 peces, de los cuales siete hembras adultas fueron capturadas en el medio silvestre, con pesos desde 2.9 a 5.8 kg y de 58 y 75.5 cm de LT.
9. Con este grupo de ejemplares y con el conocimiento que se dispone de los niveles de esteroides circulantes y de la técnica de reversión a machos podemos abordar con mayor garantía la reproducción de esta especie en cautividad.