



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIA BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS

Evaluación de los mecanismos moleculares inducidos por hormonas esteroides durante el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Alumno:

M. en C. A. Ricardo Chávez García

COMITÉ TUTORAL

Tutor(a):

Doctora: Marcela Vergara Onofre

Miembro del SNI- Nivel 1

Co- Tutor(a):

Doctora: Clara Ortega Camarillo

Miembro del SNI- Nivel 1

Asesor(a):

Doctora: Guadalupe Prado Flores



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00014

Matrícula: 2161800499

Evaluación de los mecanismos moleculares inducidos por hormonas esteroides durante el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).



En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 27 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS
- DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ
- DRA. RENATA PATRICIA SAUCEDO GARCIA
- DRA. GUADALUPE DIAZ ROSAS
- DR. GERARDO FIGUEROA LUCERO



Chavez G.R.

RICARDO CHAVEZ GARCIA
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

DE: RICARDO CHAVEZ GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]

MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS

PRESIDENTA

[Signature]

DRA. ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS

VOCAL

[Signature]

DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

VOCAL

[Signature]

DRA. RENATA PATRICIA SAUCEDO GARCIA

VOCAL

[Signature]

DRA. GUADALUPE DIAZ ROSAS

SECRETARIO

[Signature]

DR. GERARDO FIGUEROA LUCERO

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE

Profesor (a) Investigador (a) del Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

CDMX, México.

DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO

Investigador (a) de Tiempo Completo. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica,

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI

Instituto Mexicano del Seguro Social

CDMX, México.

DRA. GUADALUPE PRADO FLORES

Profesor Investigador del Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

CDMX, México.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE DEL JURADO

DRA. ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS

Investigador (a) de Tiempo Completo. Hospital Infantil de México- Federico Gómez
(HIMFG) Laboratorio de Biología Molecular de Cardiopatías Congénitas y Teratogénesis
Experimental. CDMX, México.

SECRETARIO DEL JURADO

DR. GERARDO FIGUEROA LUCERO

Profesor Titular C, Planta Experimental de Producción Acuícola Departamento de
Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
CDMX, México.

VOCAL DEL JURADO

DRA. RENATA PATRICIA SAUCEDO GARCÍA

Investigador Asociado D en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades
Endocrinas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
CDMX, México.

AGRADECIMIENTOS A LOS ASESORES

Agradezco a la Dra. Marcela Vergara Onofre por brindarme la oportunidad para la realización de este proyecto, por su confianza y su apoyo para poder ir cumpliendo mis metas a nivel académico y personal.

Para la Dra. Clara Ortega Camarillo quien me guio a un camino por el cual pude enriquecer los conocimientos, técnicas de laboratorio para realizar este proyecto además por su sabios consejos y valiosas aportaciones para los trabajos derivados de este proceso de aprendizaje.

A la Dra. Guadalupe Prado Flores que aportó muchos consejos para la realización de este documento, además de que aportó sus conocimientos críticos y cabales para la mejor difusión de ideas y análisis de la redacción de la tesis, comprensión de datos y quien me ayudó a aterrizar las ideas para poder hacer el análisis de los resultados.

Dra. Guadalupe Díaz Rosas con quien el solo decir gracias no basta, ya que fue una pieza fundamental con sus conocimientos en biología molecular para poder realizar la mayor parte de este proyecto, ya que me ayudó desde la estandarización de las técnicas de extracción de RNA hasta consolidar la base de datos de los resultados de qPCR.

Dr. Gerardo Figueroa Lucero quien me abrió las puertas de su laboratorio hacia el camino de la acuicultura y me enseñó lo básico para poder mantener a los organismos de este estudio, además de que me brindó sus conocimientos, consejos y aportaciones para la realización de este proceso de producción de peces.

A la Dra. Alejandra Contreras Ramos con quien estoy en deuda eterna y muy agradecido ya que me mostró otro camino por el cual no tenía ni la más remota idea del cual podía llegar a recorrer en el ámbito científico, me enseñó todo lo correspondiente a las técnicas de biología molecular, microscopia confocal, inmunofluorescencia, histología, estadística. Gracias por seguir siendo partícipe hasta el final de este proyecto y los que se van a seguir desprendiendo de esta etapa doctoral.

Al Dr. Germán Mendoza quien me apoyó en la parte estadística de este proyecto que fue fundamental para la publicación de estos resultados en revistas JRC, además de sus valiosas aportaciones en los seminarios de evaluación.

Financiamiento / Instituciones

El Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco pertenece al padrón de posgrados de excelencia del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El autor de este texto fue becario del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el número de registro 250693.

Los miembros del Centro de Acuicultura (CONAPESCA) de Zacatepec Morelos nos proporcionaron los organismos reproductivos, nos brindaron la capacitación en el manejo y la reproducción de los mismos, en especial a la colaboración al Biólogo Arturo Castañeda.

Personal del Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) quienes nos apoyaron y nos brindaron las facilidades para la realización de este proyecto.

En la Planta Experimental de Producción Acuícola- Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa nos brindaron el espacio y la infraestructura para poder realizar la crianza y el muestreo de los organismos acuáticos.

A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica por el apoyo y facilidades para la realización de este proyecto.

Agradecimientos Personales

A mis Padres por el gran apoyo que me han dado a lo largo de mi vida para poder cumplir mis metas académicas, profesionales y personales de manera incondicional, siempre alentándome y enseñándome con el mejor ejemplo.

A mis Hermanos quienes han sido un ejemplo a seguir en todo momento para poder superar mis metas día a día, con quienes mis espacios de esparcimiento han servido para poder reflexionar sobre este proceso doctoral.

A mi Sobrina Paloma quien con su ternura y felicidad me motiva a ser su ejemplo a seguir en todo momento.

A la familia Osornio-Quintero quienes han estado al pendiente todo momento de este proceso académico y también en el ámbito laboral y personal para poder superarme ante cualquier en esta etapa.

A la familia García-Santibáñez quienes me han apoyado con sabios consejos desde mi etapa de licenciatura y maestría. Los hago partícipes con sus sabias palabras y vivencias que han compartido conmigo.

A mis compañeros de laboratorio Lucia Lima, Damián Camacho, Edgar González, Marianita, Keyla Díaz, Adda Jeannette, Diana Esparza, Diana Arellano, Fernanda, Mayra, los chicos de estancia de verano con quien nos hicimos compañía durante nuestra fase de aprendizaje, además de que compartimos conocimiento y experiencias muy valiosas.

A mis amigos Sixer's con quienes he crecido desde mi infancia y me han acompañado en las buenas y en las malas, gracias a todos ustedes Mauricio Mendoza, Hugo Pimental, Mario Torres X., Marco Juárez, Cesar Serrano, Gustavo Rojas, etc.

A mis amigos de la Universidad Ezequiel García, Moyocoyani Guerrero, Alejandro Clark, Isaac Vásquez, Aldo Sánchez, etc., con quienes nos hemos acompañado y hemos estado al pendiente de nuestro desarrollo académico, profesional y personal.

A mis grandes amigos que conocí en esta etapa Karina Garduño, Erick Pavón, Rod Torres, Fernando Salmerón y Tania Hernández, quienes me han dado su apoyo y palabras de aliento en los momentos de estrés, en los momentos difíciles, así como en los momentos divertidos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I.- Introducción.....	11
II.- Planteamiento del Problema	13
1.-Oreochromis niloticus (Tilapia del Nilo).....	14
2.- Diferenciación Sexual	16
2.1.- Diferenciación sexual a nivel Cromosomal	16
2.2.- Diferenciación sexual a nivel gonadal	17
Cuadro 1. Funciones de genes implicados en la diferenciación sexual del sistema reproductivo.	20
2.3.- Diferenciación sexual a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC).....	22
2.4.- Diferenciación sexual en Oreochromis niloticus	22
2.5.- Periodo Crítico de la Diferenciación Sexual	25
3.- Reversión sexual en tilapia	25
Cuadro 2. Hormonas esteroides, hormonas análogas y componentes no esteroides usados para producir monosexos de tilapia.	26
Cuadro 3. Producción de tilapia del Nilo macho con distintos componentes hormonales.....	28
Cuadro 4. Producción de tilapia del Nilo hembra con distintos componentes hormonales.....	29
3.1.- Tilapia Genéticamente Macho.....	31
3.2.-Regulación Endocrina	31
4.- Receptores Celulares a Esteroides.....	32
5.- Hormonas sintéticas como Disruptores Endocrinos.....	34
6.- Apoptosis	36
IV.- Hipótesis.....	43
V.- Objetivo General.....	44
VII.- Material y Métodos	45
Animales	45
Tratamientos	45
Mediciones Morfométricas	45
Toma de Muestra	45

Procedimiento Histológico	46
Inmunofluorescencia.....	47
Cuadro 5 Anticuerpos Primarios.	48
Extracción ARN.....	48
Gel de Agarosa.....	48
Preparación de ADN complementario.....	49
Cuadro 6. Preparación de Master Mix para preparar ADN Complementario	49
PCR- Transcriptasa reversa en Tiempo Real	49
Cuadro 7. Preparación de RT-PCR Tiempo Real	50
Diseño de Primers	50
Cuadro 8. Primers a estudiar.....	50
Análisis Estadístico.....	51
VIII.-Resultados	52
1.- Impacto del tratamiento hormonal sobre talla y crecimiento	52
Tabla 1. Efecto del Tratamiento sobre la longitud Total en <i>Oreochromis niloticus</i>	52
Tabla 2. Efecto del Tratamiento sobre en la longitud patrón en <i>Oreochromis niloticus</i>	53
Tabla 3. Efecto del Tratamiento sobre la altura en <i>Oreochromis niloticus</i>	54
Tabla 4. Efecto sobre el peso y el crecimiento en <i>Oreochromis niloticus</i>	54
Expresión de receptores α y β estrogénicos en cerebro de Tilapia.....	55
Determinación de los marcadores de muerte celular en cerebro de Tilapia	59

RESUMEN

El tejido cerebral presenta una alta sensibilidad a la presencia de hormonas esteroides durante los periodos críticos del dimorfismo sexual mediante los receptores estrogénicos cuya presencia o ausencia dirige vías la sobrevivencia o muerte por apoptosis en las células neuronales. El propósito de este estudio fue evaluar la participación de los receptores estrogénicos α y β como reguladores de los genes Bax, Bcl-2, p53 y FAS moduladores de la apoptosis en tejido cerebral durante la reversión sexual mediada por 17- β etinil-estradiol y 17- α metil-testosterona en *Oreochromis niloticus*. La tilapia del Nilo se crió en condiciones controladas y se dividió en tres grupos: FEM: tratadas con 17 α -etinil estradiol, MAS: tratadas con 17 α -metiltestosterona y el grupo CTRL sin tratamiento hormonal. Se comparó el efecto de la administración hormonal sobre los cambios morfométricos a los 5, 10, 15, 25, 35, 40, 50, 60 y 70 días después de la fertilización con la técnica morfométrica "protocolo de Truss". Los datos se analizaron utilizando un modelo lineal general de mediciones repetidas y análisis de varianza de comparación de medias. La curva de crecimiento se realizó utilizando el modelo logístico de Gompertz. Los resultados mostraron que la larva masculinizada presentaba una tasa de crecimiento más alta y aumentaba la ganancia diaria de peso 2.05-2 mg en comparación con los controles y las feminizadas 1.67-3 mg y 7.57-4 mg, respectivamente. La reversión sexual de la tilapia del Nilo con 17 α -metiltestosterona aumentó la curva de crecimiento del organismo masculinizado y ofreció uniformidad en el tamaño final. A través de microscopia confocal y qPCR en tiempo real se determinó que la actividad de los genes reguladores de la apoptosis se presentó a los 7, 10 y 15 días de edad para los organismos sometidos a tratamiento hormonal en comparación al grupo control y se asume que el periodo crítico de la participación de estos receptores ocurre entre los días 7 y 10. Se observó que la relación entre Bax y Bcl-2 dirige la señalización de sobrevivencia celular mediante la presencia del α -RE tanto para organismos masculinizados como feminizados, mientras que la activación de β -ER muestra un aumento de FAS sobre p53 relacionado con la muerte por apoptosis en las etapas más adultas en el fenotipo femenino. El tratamiento hormonal induce cambios en factores de transcripción génica relacionados con la diferenciación sexual mediante la activación de los procesos de muerte por apoptosis a edades tempranas del desarrollo neuronal.

ABSTRACT

Brain tissue has a high sensitivity to the presence of steroid hormones during critical periods of sexual dimorphism through estrogenic receptors whose presence or absence directs pathways to survival or death by apoptosis in neuronal cells. The purpose of this study was to evaluate the participation of estrogen receptors α and β as regulators of the Bax, Bcl-2, p53 and FAS genes modulating apoptosis in brain tissue during sexual reversal mediated by the 17- β ethinyl hormones -estradiol and 17- α methyl-testosterone in *Oreochromis niloticus*. Nile tilapia was raised under controlled conditions and divided into three groups: FEM: treated with 17 α -ethinyl estradiol, MAS: treated with 17 α -methyltestosterone and the CTRL group without hormonal treatment. The effect of hormonal administration on morphometric changes at 5, 10, 15, 25, 35, 40, 50, 60 and 70 days after fertilization was compared with the morphometric technique "Truss protocol". Data were analyzed using a general linear model of repeated measurements and analysis of variance of comparison of means. The growth curve was performed using the Gompertz logistic model. The results showed that the masculinized larva had a higher growth rate and increased daily weight gain 2.05-2 mg compared to controls and feminized 1.67-3 mg and 7.57-4 mg, respectively. The sexual reversal of Nile tilapia with 17 α -methyltestosterone increased the growth curve of the masculinized organism and offered uniformity in the final size. Through real-time confocal microscopy and qPCR it was determined that the activity of apoptosis regulatory genes occurs at 7, 10 and 15 days of age for organisms undergoing hormonal treatment compared to the control group and assumes that the critical period of participation of these receptors occurs between days 7 and 10. It was observed that the relationship between Bax and Bcl-2 directs the signaling of cell survival through the presence of α -RE for both masculinized and feminized organisms, while that the activation of β -ER shows an increase in FAS on p53 related to death by apoptosis in the more adult stages in the female phenotype. Hormonal treatment induces changes in gene transcription factors related to sexual differentiation by activating apoptosis death processes at early ages of neuronal development.

Evaluación de los mecanismos moleculares inducidos por hormonas esteroides durante el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

I.- Introducción

La diferenciación sexual y el subsecuente desarrollo para determinar el fenotipo masculino o femenino en los organismos ocurren por el efecto de las hormonas esteroides. Los factores reguladores de la determinación sexual no están presentes en todas las especies del reino animal; por tanto, la diferenciación sexual puede presentar bastante plasticidad entre la diversidad de especies (Cutting *et al.*, 2013). Por ejemplo, los peces teleósteos como el caso de los *Oreochromis sp.*, presentan hermafroditismo de manera natural y exhiben cambios sexuales debido a una extensa variedad de factores externos (Godwin, 2010). La determinación sexual en los peces teleósteos frecuentemente cambia en distintas etapas del desarrollo e incluso varía entre las especies de teleósteos (Mank *et al.*, 2006).

La diferenciación sexual se ha estudiado en varios modelos de peces incluyendo al pez Cebra (Anderson *et al.*, 2012) y en los poecílidos como el pez Guppy (Tripathi *et al.*, 2009) con el propósito de comprender y caracterizar el control genético del establecimiento del sexo. Otro campo de investigación que ha recibido mucha atención es el cambio de sexo en los peces, y particularmente con la identificación de hormonas y compuestos químicos que presentan influencias en este ámbito (Scholz & Klüver, 2009).

Dentro del proceso de diferenciación sexual se distinguen diferencias estructurales y funcionales a nivel cerebral y en tracto reproductivo, dichas diferencias se dan a nivel morfológico, anatómico, fisiológico, bioquímico y genético (Roberts *et al.*, 2009). Además, se sabe que, durante dicho proceso, las células neuronales y germinales son susceptibles a la presencia de hormonas esteroides, las cuales después del nacimiento, pueden activar el programa de muerte por apoptosis. El efecto de los esteroides parece estar involucrado en la regulación de la cinética de las células neuronales y en la apoptosis de las mismas (Cooke *et al.*, 1998). Por lo tanto, durante el desarrollo cerebral existe una exquisita sensibilidad a los esteroides, por lo cual se manifiesta una vulnerabilidad a la exposición de xenoestrógenos. En la acuicultura es frecuente la utilización de hormonas sintéticas para revertir el sexo de los individuos; sin embargo, estos métodos no poseen restricción en su aplicación, a pesar de que hay información sobre el carácter genotóxico de algunas de ellas (Kimelberg *et al.*, 2000).

El objetivo de esta investigación es comparar los efectos neuronales, gonadales y genéticos por bioacumulación de disruptores endocrinos en *Oreochromis niloticus* en distintos ambientes hormonales y alterados cromosómicamente.

II.- Planteamiento del Problema

La acuicultura también constituye un factor básico de progreso para países con bajo nivel de desarrollo, ya que genera empleo e innovación tecnológica (FAO, 2014). De acuerdo a la FAO (2006), la producción mundial de acuicultura en 2004 fue de aproximadamente 59.4 millones de toneladas, con un valor de \$70.3 billones de dólares (US) y desde 1950 la actividad ha crecido a una tasa promedio de 8.8% por año, comparada con el 1.2% en pesquerías y 2.8% en la producción de animales terrestres.

México aporta aproximadamente el 1.1% de la producción pesquera y acuícola mundial. Sin embargo y a pesar del crecimiento que reportó CONAPESCA en el 2006, indicaban que el 66% de la captura de México se realiza en el Pacífico nororiental y el 71% de los sitios de pesca estaban explotados en máximo rendimiento o explotación plena, el 15% en deterioro por sobreexplotación. Lo anterior indica que el estado de los recursos pesqueros de la Zona Económica Exclusiva de México está en condiciones aún más delicadas que las reportadas a nivel mundial. Debido a lo anterior secretarías como la SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería y desarrollo Rural Pesca y Alimentación) en conjunto con la FAO plantearon en el 2006 un análisis prospectivo de política para la acuicultura y la pesca, implementaron estrategias de recuperación de la Zona Económica Exclusiva de México, que señaló como estrategia de recuperación que los alimentos de origen acuático tendrían que venir de la acuicultura marina y continental. Es por esto que plantea a la acuicultura como una de las actividades productivas más importantes a nivel mundial coincidiendo con este punto organizaciones internacionales como la FAO, el Centro Mundial de Peces, el Banco Mundial y la OCDE. La FAO en el 2006 consideró la tendencia de crecimiento de la acuicultura mundial y estimando la población mundial para el 2030 propuso que la acuicultura tiene el potencial factible para aportar la producción necesaria (40 millones de toneladas extras) para consumo humano.

III.- Marco Teórico

1.-*Oreochromis niloticus* (Tilapia del Nilo)

La tilapia es la variedad más representativa entre los cultivos acuícolas de agua dulce. Pertenece a la familia *cichlidae*, la cual abarca más de 100 especies distribuidas ampliamente en zonas tropicales de África, América y Asia (Shirak *et al.*, 2002; Wilbert, 2007).

La tilapia está clasificada taxonómicamente de la siguiente manera:

Phylum: Chordata

Suphylum: Vertebrata

Superciase: Gnathostomato

Serie: Piscis

Clase: actinoptergil

Orden: perciforme

Familia: cichidae

Género: Oreochromis

Especie: Oreochromis sp.

Morfológicamente presentan las siguientes características:

Área de pigmentación:

Cuerpo: Verde metálico ligeramente gris (macho)

Cabeza: Verde metálico

Color de Ojos: Café

Región Ventral: Gris plateado

Papila Genital: Blanca

Borde de aleta dorsal: Negra a oscuro

Porción terminal de aleta caudal: Roja, bandas negras bien definidas, borde circular

Perfil dorsal: Convexo

Labios: Negros

1.1.- Generalidades de la Tilapia del Nilo

La tilapia es un pez endémico de África y Oriente, ubicando a esta especie mayormente en zonas tropicales donde su reproducción es favorable y presentando una mayor tasa de crecimiento. Entre las variedades de tilapia se destacan: 1) tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), 2) tilapia Azul (*Oreochromis aureus*) y 3) tilapia Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) (Wilber, 2007).

La tilapia es la variedad más representativa para los cultivos acuícolas de agua dulce, manteniéndose a temperaturas entre 25° y 30° C. La mayoría de las especies de tilapia pueden vivir en agua salada, sin embargo, no todas las especies de tilapia soportan los cambios bruscos de salinidad (Morales, 2003).

En cuanto a la biología reproductiva de la tilapia estos organismos presentan hermafroditismo de manera natural, alcanzando la madurez sexual a partir de los 2 o 3 meses de edad a una longitud total de 8 a 16 centímetros de largo para los machos mientras que para las hembras se presenta la madurez sexual entre los 3 y 5 meses de edad, presentando entre 5 y 8 desoves al año a temperaturas entre 25 ° y 31 ° C. Cada desove puede presentar en promedio de 1,500 huevecillos fertilizados con un tiempo de incubación de 25 a 30 días, dicha incubación de manera natural la realiza el macho manteniéndolos en la boca durante este periodo de tiempo hasta su eclosión (Morales, 2003; Wilber, 2007).

2.- Diferenciación Sexual

El término de dimorfismo o diferenciación sexual describe las diferencias morfológicas entre los sexos. Este concepto se puede extender a los procesos que fundamentan estas diferencias. En este contexto, la diferenciación sexual involucra modificaciones a la expresión genética que define los fenotipos masculinos y/o femeninos (Morelli & Cohen, 2005). La diferenciación sexual tiene como propósito la caracterización en el desarrollo físico y en el comportamiento entre el fenotipo masculino y femenino relacionados con la anatomía y fisiología de la reproducción sexual (Wilhelm *et al.*, 2007). Los avances en la biología molecular han ampliado la visión sobre la participación en la regulación y complejidad de los cromosomas.

La diferenciación sexual se divide en tres etapas, las cuales inician a partir de la fertilización seguida de la diferenciación gonadal y culmina con la diferenciación del sistema nervioso central (SNC). Cada una de estas etapas está influenciada por la otra, dando como resultado diferencias de sexo, no solo en el sistema reproductivo sino también a nivel cerebral (Wilson & Davies, 2007). Las diferencias sexuales se hacen manifiestas no solo en la morfología y funcionalidad del fenotipo como base de la identidad de género, orientación y comportamiento sexual, así como en las funciones cognitivas. A continuación, se describe cada una de las etapas del dimorfismo o diferenciación sexual.

2.1.- Diferenciación sexual a nivel Cromosomal

La determinación sexual a nivel cromosomal se da al momento de la fecundación mediante la carga cromosomal que presente el espermatozoide que fertilizó al ovocito. Fleming & Valain (2004) reportaron que la diferenciación sexual en los mamíferos se da fundamentalmente como resultado de las diferencias cromosomales que son definidas por la presencia del cromosoma XY, el cual está presente en los genitales embrionarios que intervienen en el desarrollo testicular y la espermatogénesis (Marshall Graves, 2000). Los pares cromosomales del fenotipo masculino son XY y el de las hembras XX; por lo que se acepta que el fenotipo masculino se expresa y diferencia a partir del fenotipo femenino (Cline & Meyer, 1996; Casper & Van Doren, 2006). Algunos hallazgos reportan que la diferenciación sexual a este nivel en los mamíferos inicia al segundo día post fertilización (Marshall Graves, 2000; Mittwoch, 2000). En esta etapa se observa que los embriones con fenotipo masculino presentan una actividad metabólica elevada, en comparación con el embrión femenino. Además, se observaron diferencias de tamaño (machos > hembras)

en las estructuras anatómicas como resultado de la acelerada actividad del cromosoma XY en comparación al cromosoma XX (Mittwoch, 2000). Posteriormente a estos eventos desencadenados a partir de la actividad cromosomal, se da lugar la expresión de los factores de transcripción genética relacionados con la formación de las gónadas correspondientes a cada sexo.

2.2.- Diferenciación sexual a nivel gonadal

El siguiente peldaño de la diferenciación sexual implica una serie de alteraciones en los genes, dentro de los que se encuentra el gen de la determinación sexual presente en el cromosoma Y (SRY). El gen SRY participa en la determinación de células germinales de los órganos genitales masculinos en el embrión cuando comienza la formación de los testículos. El gen SRY puede ser detectado en la cresta genital poco después de la formación del testículo, además incrementa su expresión en el marco del control de los genes GATA-4, LHX9, L1M1, WNT1, SF1, entre otros (Fleming & Valain, 2004). Una vez que ocurre la diferenciación sexual de la cresta genital, los niveles de SRY decaen (Koopman, 2001; Park & Jameson, 2005). Al principio se pensó que SRY se expresaba solamente en las crestas genitales, posteriormente se demostró en células cerebrales (Mayer *et al.*, 2000).

El desarrollo del tracto reproductivo femenino ha recibido menor atención que el masculino, quizá esto sea debido a que el proceso se da de forma automática. La funcionalidad de los genes de diferenciación sexual SRY y SOX9 no se ha demostrado totalmente en el proceso de diferenciación de la hembra; sin embargo, se ha reportado que la expresión de algunos genes masculinos se suprime durante la diferenciación femenina, por ejemplo, la diferenciación sexual masculina puede ser interrumpida por la expresión del gen DAX1 que funciona como un antagonista de los genes masculinos ya que la función de este último es la de incrementar la actividad de los genes que son involucrados con el desarrollo y crecimiento ovárico como lo son el SF1 y SOX9 (Wilson & Davies, 2007). Otro gen involucrado es el correspondiente a la sensibilidad reversible al sexo en la región crítica de la hipoplasia adrenal en el cromosoma X-1(DAX1); este gen está presente en ambos sexos hasta la mitad de la gestación (en el ratón hasta el día 12 de vida). Posteriormente DAX1 y WNT4 sólo se expresan en la hembra y al parecer son importantes para el desarrollo ovárico al proteger o inhibir la formación testicular (Vilain & McCabe, 1998).

Rey *et al.*, (2003) propusieron que DAX1 inhibe la expresión de genes que intervienen en la masculinización del tracto reproductor, como SRY, WT1 y SF1; además DAX1 actúa

directamente sobre WNT4 y regula la expresión de WNT7 que controlan el desarrollo del tracto mulleriano hacia oviducto, útero, cérvix y vagina. Otros genes importantes son FOXL2 y FIGX, encargados de controlar la formación y desarrollo de células de la granulosa y ovocitos (Loffler & Koopman, 2002; Fleming & Vilain, 2004). Otros genes involucrados en el proceso de diferenciación gonadal se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Funciones de genes implicados en la diferenciación sexual del sistema reproductivo.

Siglas	Gen	Función
DMRT-1	Factor de transcripción- 1 relacionado con Mab 3 en ambos sexos.	Importante para la proliferación de las células germinales.
GATA-4	Factores de Transcripción de proteínas GATA con capacidad de unión al DNA (G: Guanina, A: Adenina y T: Timina), implicadas en la embriogénesis.	Activa al complejo de la hormona anti-mulerina y regula la función de SF1. En combinación DMRT-1 y SF1, regulan las gónadas de ambos sexos al inicio del desarrollo. En machos al inicio de la diferenciación gonadal y la formación testicular, en las hembras se expresa durante la gestación donde regula la formación ovárica.
KIMI, LHX9, EMX2 y M33	Familia de genes homeobox (HOX).	Contienen factores de transcripción y se requieren en las células germinales y gónadas. LHX9 es requerido para la expresión completa de los mediadores o como un factor cooperativo para la expresión de SOX9.
POD-1	POD-1.	Es necesario para la vascularización normal del desarrollo gonadal en ambos sexos, los ratones con hipoplasia gonadal.
Fog-2	Producto de GATA que se expresa en líneas celulares para determinar la feminización.	Al igual que GATA-4 son esenciales para la expresión de SF1. En ratones knock-out, disminuye la expresión de SF1 y es requerido para activar la expresión de SF1 o W.

FGF-9	Factor de crecimiento fibroblástico 9.	FGF-9 se expresa en células de Sertoli y promueve la formación testicular. Es esencial para la formación testicular. Los ratos con un fenotipo femenino al nacimiento.
SOX-9	Factores de transcripción en DNA relacionados con SRY	Expresa a la proteína similar a SRY que incorpora la actividad de transcripción para el desarrollo de células de Sertoli.
SRY	Gen de determinación sexual presente en el brazo corto del cromosoma Y.	Expresa los factores de transcripción que controlan la actividad de transcripción de la movilidad (HMG) lo cual aloja, busca e induce la actividad de transcripción.
DAX-1	Gen de la sensibilidad reversible del sexo, en la región crítica de la hipoplasia adrenal, en el cromosoma X-1.	Está situado en el cromosoma X y es regulado por el desarrollo testicular en una vía sensible al tiempo. Es esencial para la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli.

(Koopman, 2001; Chan & Rennert, 2002; Fleming & Vilain, 2004; Sharpe, 2004; Park & J. Davies, 2007).

2.3.- Diferenciación sexual a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC)

La última fase del proceso de diferenciación sexual es el dimorfismo del sistema nervioso central (SNC) que se refiere principalmente a las diferencias involucradas en el número de neuronas, morfología e interconexiones, asociadas con cambios en la fisiología cerebral, incluyendo tamaño de los núcleos y los circuitos cerebrales. Se denomina área o núcleo del sistema nervioso central a un grupo de neuronas interconectadas entre sí, con características de tamaño y funciones similares. Las diferencias sexuales en el SNC son resultado de la secreción de hormonas por parte de las gónadas en periodos críticos del desarrollo que ocurre en la etapa prenatal y perinatal. Muchas especies muestran diferencias sexuales en estructuras del SNC que participan en el control de las funciones endocrinas y conductuales, las cuales son parte de los procesos reproductivos que incluyen patrones de conducta esenciales durante el apareamiento (Herrera *et al.*, 2005).

Una de las estructuras con mayor importancia dentro de la diferenciación del SNC es el hipotálamo, conocido como el centro ejecutivo de las funciones homeostáticas del cuerpo, además representa una función reguladora en la interfase anatómica y funcional entre el sistema nervioso y el sistema endocrino, mediante la cual se regula la ingesta de alimentos, el peso corporal, el tipo de comportamiento o conducta, marcaje de territorio, postura de micción, conducta social de juego, aprendizaje y ejecución, lateralización de las funciones cerebrales. Principalmente el humano ofrece el comportamiento durante la cópula y la reacción a varios estímulos sensoriales (Cabeza, 2006). La estructura del hipotálamo es muy compleja, en términos tanto neuroanatómicos como neuroquímicos. Se divide en cuatro regiones anatómicas, que a su vez puede subdividirse en más de 25 núcleos dimórficos de acuerdo con criterios anatómicos y funcionales. Estas estructuras pueden relacionarse directamente con la fisiología y conducta reproductiva. Entre los núcleos dimórficos más estudiados se encuentran el área preóptica, el núcleo ventromedial, el núcleo supraquiasmático, la amígdala y la estría terminal; estas áreas se encuentran en íntima relación con el hipotálamo, (Goy & McEwen, 1980; Robinson *et al.*, 1986; Döler *et al.*, 1986).

2.4.- Diferenciación sexual en *Oreochromis niloticus*

Las especies teleósteas como el caso de la tilapia del Nilo son un interesante modelo para las investigaciones de la determinación sexual, ya que presentan una variedad de sistemas de determinación sexual con la capacidad de producir híbridos viables entre

especies estrechamente relacionadas que presentan diferentes sistemas de determinación sexual (Mank *et al.*, 2006). Se han explorado diferentes aspectos de la determinación sexual de la tilapia debido a que su producción comercial se basa principalmente en cultivos monosexados de machos, lo cual ha provocado dificultades para mantener una producción a escala (Cnaani & Levavi-Sivan, 2009). Para un mejor entendimiento de la base genómica de la determinación sexual en la tilapia es necesario para superar estas dificultades.

La determinación sexual a nivel cromosomal en estos organismos puede ser establecida por 1 o más factores genéticos ambientales o sus interacciones. Los cromosomas sexuales son caracterizados morfológicamente por sus diferencias homólogas o indiferenciadas, en simples y múltiples sistemas con machos o hembras heterogaméticos. Los estudios en organismos con diferentes cromosomas sexuales, machos heterogaméticos (mamíferos y moscas) y hembras heterogaméticas (aves y reptiles) han mostrado interesantes similitudes entre dos sistemas XY/XX y ZW/ZZ en la determinación sexual (Ellegren, 2011). Bellot *et al.*, (2010) compararon el genoma del pez Cebra, tetraodon, pez Globo y el medaka con los cromosomas X de los mamíferos y el Z de las aves, reportando algunos ortólogos que los genes Z y X ocupan porciones separadas de cada genoma del pez.

Las diferencias en los mecanismos de la determinación sexual, están estrechamente relacionados entre las especies de tilapia y la influencia del medio ambiente (Baroiller *et al.*, 2009) sugieren que la determinación sexual puede ser canalizada como rasgos cuantitativos usando marcadores basados en el locus de un carácter cuantitativo (QTL). Varios marcadores ligados al sexo han sido identificados en el género *Oreochromis* (Lee *et al.*, 2004; Shirak *et al.*, 2006; Eshel *et al.*, 2010). En las razas puras de *Oreochromis niloticus* y en híbridos de *Oreochromis niloticus* con cruce de *Oreochromis aureus* se detectó el QTL en las localizaciones LG1, LG23 (Lee *et al.*, 2004; Eshel *et al.*, 2010) y LG3 respectivamente (Lee *et al.*, 2003).

La determinación sexual por QTL en LG23 fue mapeada con un intervalo de confianza de 16-21CM (Eshel *et al.*, 2010), dichos puertos de los genes Amh y Dmrt2 que son involucrados en la determinación sexual de los vertebrados (Shirak *et al.*, 2006).

Estudios realizados por Schartl (2004) revelan la mayoría de los genes involucrados en la determinación sexual en los mamíferos están presentes en el proceso de diferenciación sexual de los peces. Además, los genes que encabezan la cascada de la determinación sexual puede variar entre los organismos acuáticos. Para el estudio de la cascada de la

determinación sexual en etapas tempranas del desarrollo embrionario se eligieron 8 genes: Lhx9, Amh, FoxL2, Cyp19a, Dmrt1, DAX1, SOX9a y SOX9b, los cuales presentan un rol conocido en la vida de la determinación sexual de mamíferos. Birk *et al.*, (2000); Shirak *et al.*, (2006); Ijiri *et al.*, (2008) examinaron la expresión a partir de la gástrula a las etapas finales del estadio larvario de la tilapia del Nilo de monosexos machos XY y hembras XX. Adicionalmente, fueron analizados dos genes previamente mapeados para la determinación sexual en la región: ELAVL1 (Shirak *et al.*, 2006) y SOX14 (Cnaani *et al.*, 2007) en los cuales se encontró similitud vinculada con la vía de la determinación sexual de la tilapia.

En algunos estudios se determinó la especificidad y el tiempo preciso de la expresión de 17 genes asociados a la diferenciación sexual de la gónada en vertebrados con cromosomas XX y XY (Ijiri *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2012). En gónadas XX, la transcripción de la aromatasa Cyp19a1a que es responsable de la síntesis de 17- β estradiol, fue específicamente expresada durante los primeros 5 días post-eclosión, coincidiendo con una sobreexpresión de FoxL2, un factor de transcripción de la misma enzima (Wang *et al.*, 2007).

2.5.- Periodo Crítico de la Diferenciación Sexual

El periodo crítico de la diferenciación sexual en la tilapia del Nilo ocurre a partir de la fertilización del ovocito hasta los 18 días de edad. Durante este periodo, los embriones son sensibles a los andrógenos y a los precursores de esteroides administrados por medio de la inmersión de los huevecillos o mediante la adición de estos compuestos en la dieta (Devlin & Naghama, 2002).

Los estudios realizados por Ijiri *et al.* (2008) demostraron que la expresión de los genes XX y XY en las gónadas de *Oreochromis niloticus* durante el periodo de 9-10 días post fertilización es crítico para la diferenciación de las células germinales primordiales ya sea dentro del ovario o en el testículo. La primera señal morfológica de la diferenciación sexual de la gónada aparece en el alevín de la tilapia entre los días 23-26 post-eclosión con la formación de la cavidad ovárica en la gónada XX (Nakamura *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2000).

3.- Reversión sexual en tilapia

La reversión sexual se usa extensivamente para controlar el sexo de los cultivos de tilapia con el propósito de producir peces de un solo sexo principalmente mediante el uso de hormonas, cambios de temperatura, etcétera. Las hormonas esteroides u hormonas análogas como también algunos compuestos químicos no esteroides (Cuadro 2) son comúnmente usados para producir tilapia monosexada. Las hormonas son generalmente incorporadas en el alimento de las larvas cuando aún presentan el sexo indiferenciado en etapas muy tempranas del desarrollo larvario (Penman & McAndrew, 2000).

Cuadro 2. Hormonas esteroides, hormonas análogas y componentes no esteroides usados para producir monosexos de tilapia.

Hormona	Abreviatura
17 α -metildihidrotestosterona	MDHT
17 α -metiltestosterona	MT
17 α -etiniltestosterona	ET
Metildrostanolona	
Androstenediona	AN
17 α -etinilestradiol	EE
17 β -estradiol	E2
Fadrozol	F
Acetato de Trembolona	TBA
11 β -hidroxi androstenediona	11 β -OHA4
Inhibidor de la aromatasa	AI
Dietilestilbestrol	DES
Tamoxifen	TAM
Acraflavina	
Mibolerona	MI

(Tomado de Abdel & El-Sayed, 2006).

Para obtener un cultivo de organismos monosexuales con un 100% de eficiencia en cuanto a la proporción de machos es importante tener en consideración el compuesto químico a utilizar, asimismo la dosis y el tiempo de administración del tratamiento, por otra parte, también se debe tener en cuenta la estirpe acuática a producir, el tamaño, la edad de la larva como se presenta en el Cuadro 3. Los resultados de las investigaciones indican que la hormona 17 α -metiltestosterona (MT) es la que se usa comúnmente debido a su éxito para revertir el sexo en la tilapia (Guerrero & Guerrero, 1988; Ridha & Lone, 1990; Beardmore *et al.*, 2001). Las dosis de hormonas esteroides probadas para realizar la reversión sexual de la Tilapia a partir de < 30 a 100 mg/ kg de alimento proporcionado a los peces durante 15 a 60 días de edad. Sin embargo, el mejor resultado ha sido reportado con dosis entre 30 a 60 mg/kg administrado durante 25 a 30 días (Green *et al.*, 1997). La MT produce una efectividad de la reversión sexual con un promedio de éxito del 85 a 98% de machos a dosis entre 30 a 60 mg/Kg, sin embargo, se ha reportado que el uso de dosis excesivas de estas hormonas se reduce el porcentaje de éxito de los peces revertidos sexualmente acompañado de un incremento en la tasa de mortalidad, baja tasa

reproductiva y paradójicamente en algunos casos reversiones sexuales indeseables posteriores (Green *et al.*, 1997; Bearmore *et al.*, 2001).

En los estudios realizados por Afonso *et al.* (2001) quienes evaluaron el uso del Fradazole que es un inhibidor de la aromatasa a diferentes concentraciones (0/50 /75 y 100 mg/kg) suministrados en la dieta en tilapia del Nilo en la etapa de larva con una edad aproximada de 9 días con un periodo de consumo de 15 a 30 días, obtuvieron una proporción del 100% de organismos masculinizados con las dosis de 75 y 100 mg/kg con 30 días de exposición.

La administración por vía oral de los tratamientos hormonales para efectuar la reversión sexual de la tilapia es generalmente segura y exitosa; de tal manera, los residuos hormonales provenientes del ayuno y del metabolismo son a menudo una mayor preocupación para el ambiente. Como una medida alternativa para superar este obstáculo se han empleado las técnicas de inmersión hormonal de los peces en etapa de alevines por cortos periodos de tiempo, lo cual además de reducir el periodo de tratamiento, reduce un posible efecto de las hormonas a los consumidores de la carne de tilapia revertida (Gale *et al.*, 1999). Con esta técnica el porcentaje de machos revertidos promedia por arriba del 60 al 100% de eficiencia dependiendo de la especie del pez, tipo, dosis y el tiempo del empleo de la hormona. En el Cuadro 3, se pueden observar algunos de los porcentajes de eficiencia con los distintos componentes hormonales bajo la técnica de inmersión.

Cuadro 3. Producción de tilapia del Nilo macho con distintos componentes hormonales.

Hormona	Vía	Dosis	Edad	Duración	% Machos	Referencia
F	Oral	200-500 mg	7 días	30 días	92 – 96	Kwon <i>et al.</i> , 2000
F	Oral	75-100 mg	Alevín	30 días	100	Afonso <i>et al.</i> , 2001
ET	Oral	60 mg	Alevín	25-28 días	91 – 99	Vera-Cruz & Mair, 1994
MT	Oral	30 mg	Alevín	21 días	99	Guerrero & Guerrero, 1988
MT	Oral	60 mg	2 días	14-28 días	82-92	Smith & Phelps, 1997
TBA	Inmersión	250 µg/l	10 días	2 horas	98-100	Bart, 2002
AN	Inmersión	100-250 µg/l	10 días	2 horas	92	Bart, 2002
MT	Inmersión	50 µg/l	10 días	2 horas	98	Bart, 2002
MDHT	Inmersión	250 µg/l	10 días	2 horas	98-100	Bart, 2002
MT	Oral	60 mg	10 días	10-30 días	92	Gale <i>et al.</i> , 1999
MT	Inmersión	500 µg/l	10-13 días	3 horas	87	Gale <i>et al.</i> , 1999
MDTH	Inmersión	500 µg/l	10-13 días	3 horas	83-100	Gale <i>et al.</i> , 1999
MDTH	Inmersión	1800 µg/l	14 días	4 horas	100	Wassermann & Afonso, 2003
MT	Inmersión	1800 µg/l	10-14 días	4 horas	98	Wassermann & Afonso, 2003
ET	Inmersión	1800 µg/l	14 días	4 horas	86	Wassermann & Afonso, 2003

En el Cuadro 2 se muestra la abreviatura de cada hormona. El % Machos se refiere a la eficiencia de reversión sexual de cada tratamiento reportado en la literatura revisada. (Tomado de Abdel & El-Sayed, 2006).

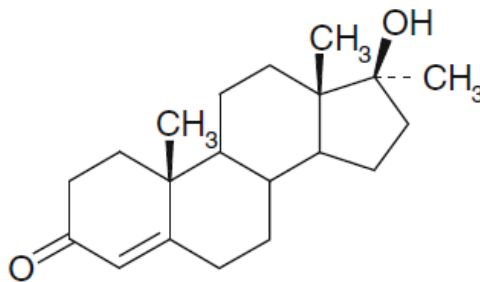
En algunas especies de peces las hembras alcanzan altas tasas de crecimiento, presentando una mayor talla en comparación a los machos. La producción de cultivos de tilapia de monosexos hembra no es una práctica común ya que no es efectiva para que las tallas comerciales de los individuos sean más homogéneas. Sin embargo, se han utilizado para fines de estudio de la reversión sexual del fenotipo femenino, además del uso de la feminización de machos para la producción de los super machos o tilapia genéticamente mejorada. Los químicos para feminizar a la tilapia mediante esteroides naturales y sintéticos como es el caso de la 17- α etinilestradiol (EE) y el dietilelbestrol (DES) son los más efectivos. En el Cuadro 4, se muestran la efectividad y la duración de algunos componentes esteroides para la feminización de la tilapia del Nilo. La efectividad relativa de los esteroides en la feminización de la Tilapia depende del tipo de hormona, especie del pez, estadio larvario, dosis, tiempo y duración del tratamiento. Por ejemplo, Rosenstein & Hulata (1994) fundamentaron que DES fue más efectivo que EE en la feminización de *Oreochromis aureus*, mientras que ocurría lo contrario en el caso de la *Oreochromis niloticus* (Gilling *et al.*, 1996).

Cuadro 4. Producción de tilapia del Nilo hembra con distintos componentes hormonales.

Hormona	Vía	Dosis	Edad	Duración	% Hembras	Referencia
EE	Inmersión	170-200 $\mu\text{g/l}$	Alevín	18 días	100	Gilling <i>et al.</i> , 1996
DES	Oral	400 mg	Larva	28 días	80	Potts & Phelps 1995
EE	Oral	100 mg	Larva	40 días	91	Mohamed <i>et al.</i> , 2004

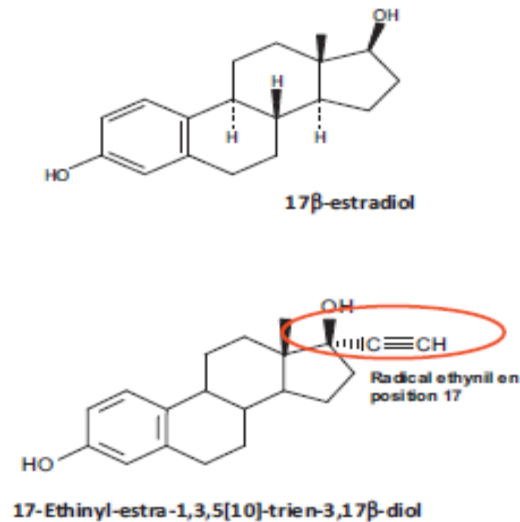
El % hembras se refiere a la eficiencia de reversión sexual de cada tratamiento reportado en la literatura revisada. (Tomado de Abdel & El-Sayed, 2006).

La hormona 17- α metil Testosterona es un andrógeno esteroide derivado de la testosterona proveniente del ciclopentanoperhidrofenantreno, que posee 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C17. Su fórmula es $C_{19}H_{28}O_2$. Esta estructura es necesaria para el mantenimiento de la actividad androgénica. La testosterona puede ser aromatizada en varios tejidos para formar estradiol mediante la acción de la enzima aromatasa (Thevis & Schänder, 2009).



Esquema 1. Estructura Química del 17 α - Metil Testosterona

La hormona 17 β Etinilestradiol es un derivado del estradiol caracterizado por la sustitución de un átomo de hidrógeno por un radical etinilo en la posición 17- beta. Se absorbe rápidamente en el intestino delgado con un nivel plasmático a un tiempo máximo de 2 horas después de tomarlo por vía oral. En la sangre plasmática, se une casi completamente con las albúminas, lo que explica su alta biodisponibilidad que varía de 55% a más de un 80%. A nivel hepático, la presencia del radical etinilo interfiere con los procesos de hidroxilación y oxidación de núcleo aromático (sin impacto del 17b-hidroxiesteroide deshidrogenasa) (Tremollieres, 2012).



Esquema 2. Estructura Química de 17 β Etinilestradiol

3.1.- Tilapia Genéticamente Macho

El uso primordial de la tilapia genéticamente macho (TGM) se deriva de la aplicación de manipulaciones genéticas relativamente simples; los investigadores han propuesto metodologías de cruzamientos en donde se involucran machos de tilapia feminizados con carga cromosomal XY con machos sin tratamiento hormonal, en donde casi toda la progenie sea exclusivamente de machos (Mair *et al.*, 1997) que se conoce como tecnología YY. Estos YY son conocidos como super machos y poseen la propiedad de engendrar descendencia genéticamente masculina. La tecnología YY proporciona una robusta solución fiable para los problemas relacionados con la reversión sexual de machos a hembras, por medio de esto se controla la reproducción no deseada y mejora las tasas de crecimiento (Abucay *et al.*, 1999). Los machos YY son capaces de producir un 100% de machos al cruzarlos con hembras XX.

3.2.-Regulación Endocrina

El eje hipotálmico en los peces como en los anfibios y los mamíferos participa en la homeostasis endocrina y en la reproducción sexual (Yan *et al.*, 2012). Las hormonas gonadotrofinas son glicoproteínas secretadas a partir de la glándula pituitaria y se encargan de regular la gametogénesis. Entre las gonadotrofinas se incluyen a la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), las cuales consisten de una

subunidad proteica α (CGA) y una subunidad β (Que'rat, 1994). Funcionalmente FSH controla la vitelogénesis y la espermatogénesis, mientras que LH facilita la maduración de gametos y el desove durante el ciclo reproductivo del pez. En machos regula la secreción de testosterona actuando sobre las células de Leydig en las gónadas masculinas y en hembras controla la maduración de los folículos ováricos y la ovulación. Se ha reportado que las gonadotrofinas se expresan antes o durante el proceso de diferenciación sexual en la glándula pituitaria del pez y de los anfibios, además de que se involucran en las etapas iniciales de la diferenciación gonadal mediante la activación de sus receptores α y β (Wu *et al.*, 2009; Urbatzka *et al.*, 2010). Ambos receptores son membranales, los cuales en conjunto con el receptor de la hormona liberadora de la tiroides (TSHR), pertenecen a la familia de las proteínas G acoplada a los receptores de membrana, los cuales contienen un gran dominio extracelular que contribuye a la especificidad en la búsqueda de ligandos (Simoni *et al.*, 1997; Kumar & Trant, 2001).

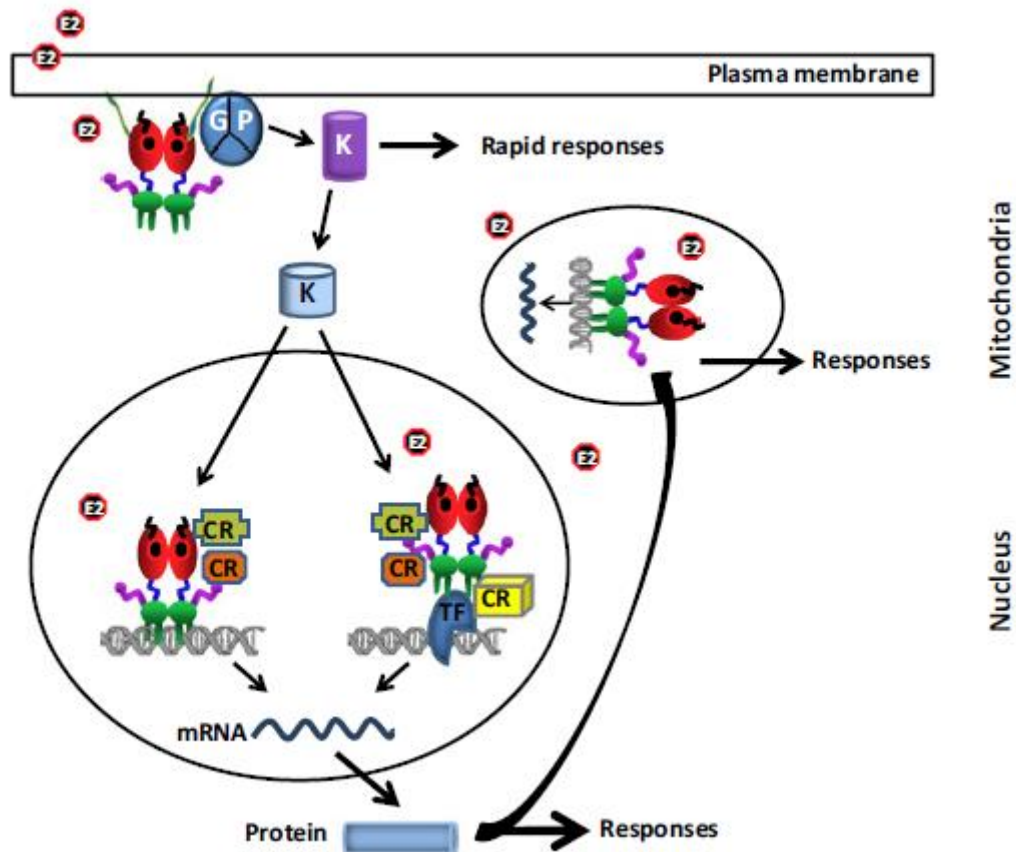
4.- Receptores Celulares a Esteroides

Los estrógenos, así como los disruptores endocrinos funcionan a través de dos receptores de estrógeno (ER): α -ER y β -ER además de que en algunos peces se ha reportado un tercer receptor de estrógeno γ -ER (Lee *et al.*, 2006; Orlando *et al.*, 2006). El estrógeno promueve una sobre-regulación de su propio receptor y una vez activados actúan como reguladores de la expresión génica (Menuet *et al.*, 2002). Los ER activados pueden funcionar directamente a través de elementos de respuesta al estrógeno presentes en regiones promotoras de genes o pueden actuar indirectamente para promover cambios en la expresión génica a través de varias vías (Marchand *et al.*, 2000; Von Hofsten *et al.*, 2002; Matthews & Gustafsson, 2003; Kitano *et al.*, 2007).

En los vertebrados los estrógenos se sintetizan a partir de los andrógenos mediante la acción de la enzima aromatasa, la cual es codificada por el gen Cyp19 (Simpson *et al.*, 1994). En los peces, existen dos isoformas, Cyp19a1a que actúa a nivel gonadal y Cyp19a1b que actúa a nivel cerebral (Kwon *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007). Cyp19a1a funciona primordialmente en el desarrollo de los ovarios en varias especies de teleósteos, mientras que Cyp19a1b participa en el desarrollo del tejido neuronal (Pellegrini *et al.*, 2005) y pueden desempeñar un papel importante en la diferenciación sexual de pez cebra y en algunas otras especies de teleósteos (Chang *et al.*, 1997, Guiguen *et al.*, 1999; Kitano *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2001; Trant *et al.*, 2001; Sawyer *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007).

La diferenciación sexual de los peces es particularmente sensible a la proporción entre andrógenos y estrógenos; por lo tanto, esta relación es crítica y dependiente de la disponibilidad de la enzima Cyp19. Los receptores estrogénicos han sido identificados en la activación de ambas isoformas de Cyp19 (Cyp19a1b y Cyp19a1a) en los peces medaka (*Oryzias latipes*), pez dorado (*auratus de Carassius*), pez cebra, trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Callard *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2001; Tchoudakova *et al.*, 2001; Tong & Chung, 2003).

Cuando se une la hormona a su receptor estrogénico ya sea el α o el β a nivel celular, la señalización se inicia en la (figura en verde, Esquema 3) interactuando con una proteína G (GP) dando como resultado la activación de las quinasas, que a su vez fosforilan los sustratos, incluidos los canales iónicos a nivel de membrana; los mensajeros secundarios conducen a respuestas celulares rápidas. La activación de las quinasas también fosforila a los componentes proteicos de la señalización nuclear por medio de la presencia de E2, incluidos los ER, las proteínas co-reguladoras, los factores de transcripción (TF), y la proteína de la cromatina, en su conjunto alteran la expresión de diversos genes. A nivel mitocondrial, la unión de la hormona con el receptor estrogénico (E2-ER) modifica la expresión génica mediante la interacción con el ADN mitocondrial que a su vez son moduladas por la activación del ER ya que los productos resultantes de la unión del ER a su ligando modulan las funciones mitocondriales (Yasar *et al.*, 2016).



Esquema 3. Señalización mediada por la unión de 17β-estradiol (E2) a los receptores estrogénicos (ER).

5.- Hormonas sintéticas como Disruptores Endocrinos

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en la incidencia y el destino de los contaminantes orgánicos en el medio ambiente acuático y de los subsecuentes efectos en los organismos acuáticos. Una preocupación particular acerca de esto es la presencia de los disruptores endocrinos, los cuales tienen un potencial para modificar la homeostasis interna y la regulación hormonal en los procesos fisiológicos tales como el desarrollo y la reproducción de los organismos (Farmer & Orlando, 2012). Se sabe que estos peces expuestos a disruptores endocrinos exhiben anomalías en el desarrollo sexual y sus efectos son variables dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición de estas sustancias (Schafers *et al.*, 2007); de tal manera, se han dirigido pocos estudios relacionados con la exposición de dichas sustancias en los estadios tempranos del desarrollo de los peces, particularmente con componentes estrogénicos que pueden ser permanentes a largo plazo en la función reproductiva del pez (Coe *et al.*, 2010).

Además, los esteroides sexuales afectan la diferenciación sexual en los peces y el equilibrio en la proporción de estrógenos (17- α estradiol) y andrógenos (testosterona y 11-cetotestosterona). Acorde a esto, Rougeot *et al.* (2007) reportaron que varios organismos teleósteos a los que se le sometió a un cambio en el equilibrio hormonal con la 17-estradiol dio lugar a la feminización, mientras que un cambio de ambiente hormonal con la 11-cetotestosterona resultó en masculinización. En el pez cebrá, la exposición a EE2 puede afectar el desarrollo gonadal, viabilidad, producción de huevos, tasa de fertilización y diferenciación sexual (Nash *et al.*, 2004).

Aravindakshan *et al.* (2004) mencionan que la exposición a los disruptores endocrinos en las etapas prenatal y postnatal ejercen diversas acciones junto a la combinación con contaminantes ambientales como el bisfenol A (BPA) descrito como un disruptor endocrino y el diclorodifeniltricloroetano (DDT), que pueden afectar de manera negativa a las poblaciones de la vida silvestre. Además, en algunos estudios han demostrado que la vida silvestre endémica de los Grandes Lagos presentó un impacto negativo en su capacidad reproductiva. Estos estudios fueron capaces de asociar el consumo materno de pescado contaminado con efectos adversos para la salud en los niños que fueron expuestos a policlorobifenilos (PCB) en la lactancia. Los contaminantes como el bisfenol A y los alquil fenoles presentes en las corrientes de aguas residuales tratadas pueden actuar como estrógenos, imitando e induciendo una amplia gama de efectos en los peces. Estos efectos incluyen la feminización y hermafroditismo en los machos (Jobling & Tyler, 2003). De hecho, los peces pueden servir como un barómetro de los efectos de los xenoestrógenos en los ecosistemas acuáticos y se considera un indicador de la contaminación a la presencia de la vitelogenina (VTG) que es una proteína generada en los organismos femeninos. Normalmente, las hembras sintetizan VTG en el hígado en respuesta al estradiol. Varios informes han demostrado un incremento de la VTG en los peces machos e inmaduros recogidos cerca de los efluentes de aguas residuales y otros efluentes industriales (Aravindakshan *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la exposición a estas aguas induce elevados niveles de VTG, lo cual provoca un retraso en la espermatogénesis, disminuye la producción de espermatozoides, movilidad espermática disminuida y una elevada incidencia de intersexualidad.

Por otra parte, Kosatsky *et al.*, (1999) registraron disruptores endocrinos en los lagos del área de Montreal Canadá y vincularon su presencia con la actividad de pesca deportiva que se intensificaba en periodos de 3 veces por semana llegando a promediar un consumo anual por persona alrededor de 18 kg. Los grandes consumidores de este

pescado presentaban elevados niveles de mercurio en el cabello y elevados niveles circulatorios de PCB y DDE en comparación a consumidores poco frecuentes. Estos consumidores (mamíferos) de dichos peces pueden estar expuestos a efectos perturbadores del sistema endocrino.

6.- Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es el mecanismo de control celular importante por el cual las células mueren (Landowski *et al.*, 2001). La apoptosis en el desarrollo normal es importante para controlar el número de células y la proliferación celular.

Existen dos mecanismos principales dentro de la célula para que se presente la muerte celular, uno de ellos es la muerte por necrosis y la otra es la apoptosis. Cuando la célula es dañada por una lesión externa sufre una muerte por necrosis, mientras que otras células pueden inducir suicidio de manera interna o externa mediante programas de muerte celular provocados por diversos estímulos.

Estos estímulos activan una serie de proteínas complejas que actúan como disparadores de señales que se dan por medio de dos rutas o vías distintas a partir del medio extracelular o del intracelular, dichas vías son conocidas como la extrínseca y la intrínseca, respectivamente.

- a) La vía extrínseca o citoplasmática se acciona mediante la activación de Fas y la unión a su ligando (L/Fas) como el receptor de muerte que forma parte de la super familia de los dominios del factor de necrosis tumoral (Zapata *et al.*, 2005).
- b) Mientras que la vía intrínseca o mitocondrial se inicia desde la misma mitocondria cuando se estimula la liberación del citocromo c que promueve la activación de las proteínas señalizadoras de muerte (Ghobrial *et al.*, 2005). Ambas vías de señalización convergen en una vía común que implica la activación de una cascada de proteasas denominadas caspasas que son las encargadas de concluir el proceso de muerte.

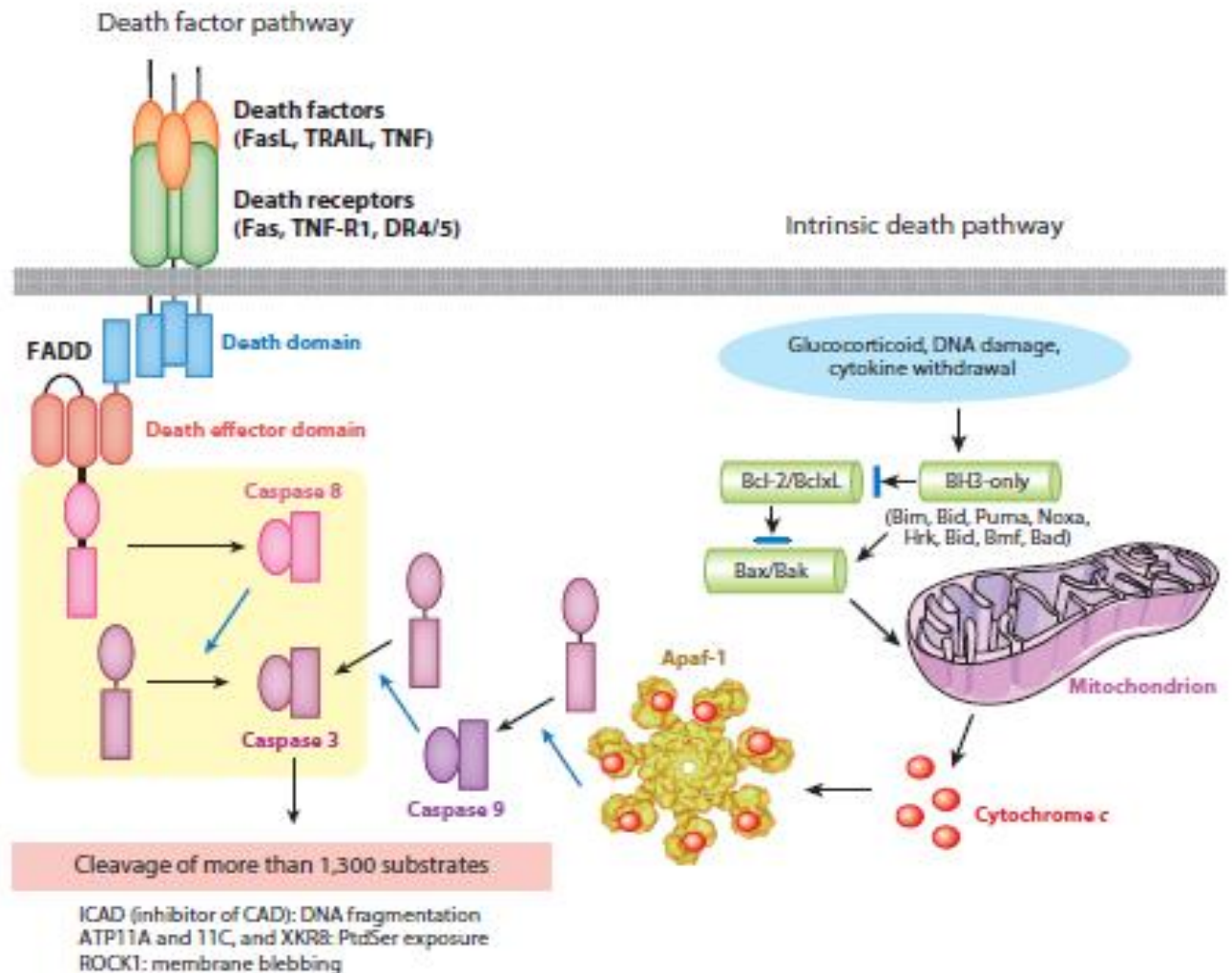
En la vía extrínseca principalmente actúan los miembros de las proteínas Fas, su ligando (L/Fas) unido a la membrana y sus efectores de muerte como es el caso de las caspasas 8 y 10 que son las encargadas de activar a otras caspasas que son las inductoras del proceso de muerte. La activación de la vía extrínseca inicia en la superficie de la membrana celular en donde se activan los receptores de muerte. Fas es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral también denominada Apo-1 o CD95. Otros receptores de TNF incluyen TNF R1, receptor de muerte 3 (Apo 2), receptor de muerte 4 (TRAIL R1), receptor de muerte 5 (TRAIL R2) y receptor de muerte 6 (Zapata *et al.*, 2005).

El L/Fas es principalmente reconocido por sus funciones relacionadas con la muerte celular, pero también participa en varios procesos proliferativos e inflamatorios y en algunas vías de señalización que no están bien definidas (Krammer, 2000). Cuando un estímulo de muerte desencadena la vía extrínseca, el L/Fas unido a la membrana interactúa con los efectores y las formas inactivas del complejo FAS. Este complejo de señalización posee un inductor de muerte mediante una proteína asociada con Fas, caspasa 8 y 10 que conducen a la activación del resto de las caspasas efectoras de muerte; en algunas células, la activación de la caspasa 8 es el único requisito para la ejecución de la muerte por apoptosis, mientras que en otras líneas celulares la caspasa 8 interactúa con la vía intrínseca de la apoptosis escindiendo de la actividad de Bid que es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, quien después es el responsable de la liberación del citocromo c (Wajant, 2002).

Entre los reguladores más importantes de la vía intrínseca están las proteínas de la familia Bcl-2 ya que son los reguladores clave de la apoptosis (Irie *et al.*, 2001). Dentro de la familia Bcl-2 se incluyen a los miembros pro-apoptóticos como lo son Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk y por otra parte a los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1 (Reed, 1994). Los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 actúan como represores de la apoptosis al momento de bloquear la liberación del citocromo-c, mientras que los miembros pro-apoptóticos actúan como promotores de la muerte. Estos efectos son más dependientes del equilibrio entre Bcl-2 y Bax que de la cantidad de Bcl-2 presente (Reed, 1997).

Después de una señal de muerte, las proteínas pro apoptóticas modifican las señales de traducción que provocan desfosforilación, ruptura y translocación de la membrana mitocondrial conduciendo a la apoptosis (Scorrano *et al.*, 2003). Por lo tanto, en respuesta a los estímulos apoptóticos, la membrana mitocondrial externa se vuelve permeable, conduciendo a la liberación de citocromo c en el citosol, que ahí interactúa con Apaf-1, lo que lleva a la activación de la caspasa 9 que sucesivamente activa a la caspasa 3 culminando con el proceso de muerte por apoptosis. No todas las caspasas son involucradas en la apoptosis. Las caspasas que se han descrito en la apoptosis son las caspasas 3, 6, 7, 8 en la vía intrínseca, mientras que la extrínseca en la 3 y la 8 (Yu *et al.*, 2003). Las caspasas son capaces de inducir la escisión de las proteínas quinasas, afectando la estructura del citoesqueleto, inhibir subunidades de endonucleasas (familia CIDE), y finalmente presentan manifestaciones morfológicas como la condensación del

núcleo, fragmentación del ADN y daño irreversible en la membrana mitocondrial (Thornberry & Lazebnik, 1998; Mancini *et al.*, 1998).



(Imagen tomada de Nagata, 2018).

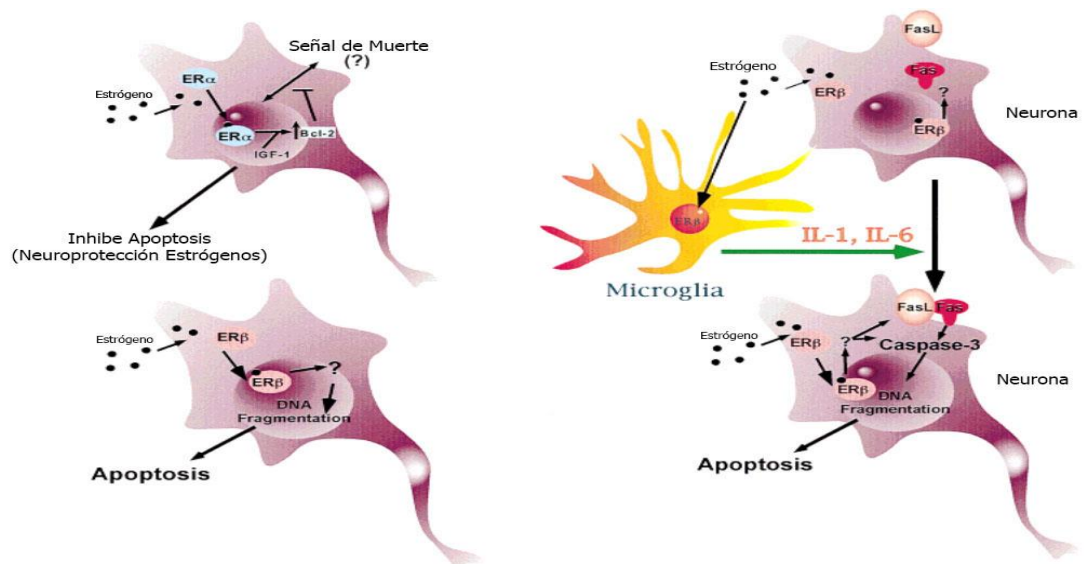
Esquema 4. La transducción de señales de la apoptosis. Las dos vías de señalización apoptóticas convergen. La vía extrínseca se activa por factores de muerte como L/Fas, TNF- α y TRAIL. La unión de un factor de muerte a su receptor específico genera DISC (complejo de señalización inductor de muerte) y provoca la activación de la caspasa 8. El DISC se forma a través de asociaciones homólogas entre dominios de muerte de Fas y FADD y entre dominios efectores de muerte (DED) de FADD y procaspasa 8. La procaspasa 8 lleva dos DED que están asociados. En la vía intrínseca que es

desencadenada por agentes genotóxicos, la citocina y las proteínas BH3 (Bim, Bid, Bad, Bmf, Hrk, Puma y Noxa) se activan por transcripción o postranscripcionalmente, ya sea de forma directa o indirectamente, antagonizando Bcl-2, inducen la oligomerización de Bax / Bak; estos últimos actúan sobre las mitocondrias para liberar al citocromo c. El citocromo c se une a APAF-1 para formar un complejo heptamérico que actúa como un andamio para mediar la conversión de procaspasa 9 en caspasa activa 9. La caspasa 8 se activó en la vía extrínseca y la caspasa 9 en la vía intrínseca escinde la procaspasa 3 a la caspasa 3 madura, para ejecutar la apoptosis, Por ejemplo, ICAD (inhibidor de la DNasa activada por caspasa) se escinde para liberar CAD (DNasa activada por caspasa) para fragmentar el ADN. En el Esquema 4 las flechas negras indican conversión directa, mientras que las flechas azules indican acciones catalíticas.

Existen algunas proteínas que regulan la apoptosis y actúan en ambas vías tanto extrínseca e intrínseca como es el caso de p53, NFkB, la ubiquitina y PI3K. En nuestro estudio es de interés la participación de p53, la cual funciona como un factor de transcripción que regula genes importantes que participan en el ciclo celular, en la reparación de ADN y la apoptosis. El factor de transcripción p53 es un supresor de tumores que se ha denominado “el guardián celular”, ya que es un regulador esencial de las respuestas de estrés celular. Bajo condiciones fisiológicas normales, la proteína p53 se mantiene a niveles intracelulares bajos mediante el mecanismo de retroalimentación negativa trans-activación N-terminal (TAD) donde p53 es reconocido y adicionado con moléculas de ubiquitina por MDM2 que la dirigen hacia el proteosoma para su degradación. En respuesta a una variedad de situaciones de estrés celular como el daño al ADN, la interacción p53-Mdm2 se interrumpe y p53 actúa inmediatamente (Horn & Vousden, 2007). La proteína p53 se localiza en el núcleo donde puede activar o reprimir la transcripción de muchos genes implicados en la regulación de las principales respuestas celulares al estrés, la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, senescencia y apoptosis (Vouden & Prives, 2009; Li *et al.*, 2012). Por lo tanto, se ha propuesto que p53 suprime la tumorigénesis mediante la prevención de la replicación del ADN dañado y mutaciones potencialmente perjudiciales (Vouden & Prives, 2009). P53 se une a promotores de genes diana a través de un elemento de respuesta (p53RE). La actividad de p53 sobre los promotores de genes diana específicos también son regulados a través de la interacción con cofactores transcripcionales específicos durante la respuesta de daño del ADN. Estas proteínas participantes cooperan con p53 para inducir la activación

transcripcional de los objetivos implicados en la determinación del destino celular. En general, tales proteínas aumentan la afinidad de la unión de p53 a un subconjunto del receptor de p53. A su vez, esta interacción inclina el equilibrio a favor de la vida o muerte. Por ejemplo, la familia de proteínas ASPP, compuesta por ASPP1, ASPP2 y iASPP, interactúa directamente con el dominio central de p53 y regula la respuesta apoptótica. Mientras que ASPP1 y ASPP2 señalizan hacia la apoptosis regulada por la vía dependiente de p53 aumentando la expresión de genes pro-apoptóticos (Samuels *et al.*, 2001; Bergamaschi *et al.*, 2006).

En el proceso de diferenciación sexual cerebral en mamíferos se ha reportado que cuando se presentan ambientes hormonales modificados mediante la presencia de compuestos químicos de carácter estrogénico o androgénico, las células neuronales tienden a presentar la activación de los α y β ER. Nielsen *et al.* (2000) reportaron que con la presencia de estrógenos sintéticos las neuronas presentaban la activación del α -ER, el cual de alguna manera promueve la activación de las proteínas de la familia Bcl-2 que protegen a las neuronas de la muerte por apoptosis, promoviendo la proliferación celular a este nivel, por otra parte, también afirman que cuando se activan ambos receptores ya sea α o β también ocurre el mismo efecto sobre la sobrevivencia neuronal. En contraste a esto, Mor *et al.*, (2000) demostraron que si solamente se activa el β -ER como resultado de la presencia de hormonas esteroides sintéticas, de alguna manera se activa la señalización de la vía extrínseca de la apoptosis activando la señalización del complejo Fas.L/Fas desencadenando la liberación de las caspasas culminando con el proceso de muerte por apoptosis como se ejemplifica en el Esquema 5.



(Tomado de Nielsen et al., 2000).

Esquema 5. La presencia de las hormonas esteroides a nivel neuronal provoca que el α -ER señalice la activación de las proteínas de la familia anti apoptótica Bcl-2 llevándola así a la vía de sobrevivencia y proliferación celular. Mientras que en el caso de la activación del β -ER se da lugar a una fragmentación del ADN provocada por la activación de las caspasas 9 y 3 mediante la vía extrínseca de la apoptosis por la activación del complejo Fas con la unión de L/Fas.

7.- Proliferación Celular (PCNA)

Durante la proliferación celular, el genoma está constantemente amenazado por diversos factores celulares y externos. Cuando el ADN está dañado, o cuando su duplicación se retrasa por el estancamiento de la ADN polimerasa, las células inducen una respuesta coordinada denominada respuesta al daño del ADN (DDR) o punto de control. La proliferación celular es dependiente de la capacidad de replicar el genoma. Esto requiere una gran cantidad de proteínas como las de remodelación de cromatina, la activación de las enzimas replicadoras helicasas y polimerasas, las de reparación de ADN y ligasas. La regulación de este proceso es altamente compleja y su ejecución es precisa (Horsfall *et al.*, 2019).

El antígeno nuclear de las células en proliferación (PCNA) es uno de los principales efectores para llevarse a cabo la proliferación celular. En la actualidad se conocen alrededor de 200 proteínas identificadas que se unen a PCNA que interactúan dinámicamente durante los procesos de regulación, replicación y reparación del ADN

durante el ciclo celular. PCNA actúa como un soporte interactivo que involucra al ADN y que de manera progresiva proporciona sitios de unión de manera unidireccional, con lo que facilita el anclaje y afinidad de las proteínas necesaria para llevar a cabo la replicación del ADN (Horsfall *et al.*, 2019). Además, se sabe que PCNA está regulado por el incremento en líneas celulares con muerte celular. PCNA sufre varios tipos de modificaciones, incluyendo ubiquitinación y acetilación (Billon *et al.*, 2017; Gazy & Kupiec 2012; Li *et al.*, 2018). Se ha intentado descifrar la importancia de estas modificaciones, ya que afectan la vía para la reparación del ADN.

La función mejor entendida de PCNA, hasta la fecha, es su papel en la replicación del ADN. PCNA juega un papel esencial en la replicación del ADN por medio de la proteína auxiliar (factor de procesabilidad) de Pol δ que es la enzima encargada de la replicación del ADN cromosómico. PCNA es también el factor de procesividad de Pol δ . PCNA participa en la replicación y reparación del ADN. Un estudio de diferentes formas de PCNA modificado revelaron que algunas de estas afectan la reparación del ADN, pero no la replicación (Ayyagari *et al.*, 1995). Varios estudios han indicado que Pol ϵ juega un papel importante en la reparación del ADN mientras que Pol δ interactúa con la replicación (Kelman, 1997).

IV.- Hipótesis

Las hormonas sintéticas regulan los mecanismos apoptóticos involucrados en el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

V.- Objetivo General

Evaluar los mecanismos moleculares que inducen las hormonas esteroides durante el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

VI.- Objetivos Particulares

- a) Evaluar el efecto del tratamiento de las hormonas esteroides sobre la morfometría de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- b) Identificar la expresión de los Receptores Estrogénicos α y β en cerebro de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- c) Analizar la expresión de las proteínas reguladoras de la apoptosis Bcl-2, Bax, Fas, p53 en tejido cerebral tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- d) Determinar el Periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

VII.- Material y Métodos

Animales

Se obtuvieron 5 parejas de reproductores de *Oreochromis niloticus* del Centro Acuícola (CONAPESCA) de Zacatepec Morelos, los cuales fueron alojados en estanques de 250 litros (separados machos y hembras) mantenidos a una temperatura de 28 a 30° C, manteniendo un pH de 7.0 en el agua y una concentración de oxígeno de 3.5 a 5 mg/L, con un fotoperiodo de 14:10 horas de luz/oscuridad. Los peces fueron alimentados con dieta comercial para peces (PURINA®). Las parejas de peces fueron elegidas al azar para realizar el desove manual a modo de obtener los gametos tanto femeninos como masculinos para realizar la inseminación artificial. Al momento de obtener los huevecillos fecundados, se depositaron en una cámara McDonald con un volumen de 10 litros de agua para ser incubados de manera artificial a una temperatura de 28° C (CENDEPESCA, 2008).

Tratamientos

Una vez realizada la fertilización artificial, los huevecillos obtenidos se distribuyeron para realizar los tratamientos experimentales bajo las siguientes condiciones: Grupo 1 o control (CTRL), los huevos fertilizados en este grupo solo se mantuvieron en una pecera de 80 litros de agua y se obtuvieron hembras y machos para realizar los pruebas control; Grupo 2 o Feminizados (FEM) los huevecillos fueron puestos en una pecera de 80 litros de agua preparada con 200 µg/L de 17 α-etinil estradiol durante 18 días para obtener el 100% de hembras (Wassermann & Afonso, 2003); Grupo 3 o masculinizados (MAS) los huevecillos fueron alojados en una pecera de 80 litros de agua preparada con 1.8 mg/L de 17 α-metiltestosterona durante 4 horas con el objeto de obtener el 100% de machos (Gillin *et al.*, 1996).

Mediciones Morfométricas

Se registró la biometría de los organismos: a) longitud total (LT) tomada desde la cabeza hasta la aleta caudal, b) longitud patrón (LP) que se midió de la cabeza a la furca mediante un ictiómetro, c) altura (A) de los individuos y d) peso total (PT) con una balanza electrónica.

Toma de Muestra

El muestreo del tejido cerebral se realizó a los 5, 6, 7, 10, 15, 25, 35, y 70 días después de la fertilización. Para el muestreo en la etapa larvaria de 5 a 15 días post fertilización se utilizaron de 30-50 organismos; para los 25 días post fertilización se emplearon 15

alevines; para los organismos con 35 y 70 días de edad se colectaron 10 organismos por tiempo de medición. Una vez que se registraron los datos sobre el peso y la longitud de los individuos, los organismos fueron sacrificados por choque térmico con sedación previa con benzocaína al 2% (INECC, 2009). Se extrajo el cerebro de los peces mediante un microscopio estereoscópico; posteriormente se separaron 5 tejidos para los estudios histológicos y 10 organismos para formar *pools* en la extracción de RNA y así realizar el estudio de expresión de genes, los cuales se almacenaron a -80° C hasta su utilización para la extracción de RNAm. Para el sacrificio se respetaron las consideraciones éticas en el manejo de organismos acuáticos (UAM, 2010, USPHS, 1996).

Procedimiento Histológico

Se realizó la disección de tejido cerebral a 5 organismos de *Oreochromis niloticus* para cada grupo de estudio. Una vez realizada la disección de los tejidos, se fijaron en formaldehído al 10% durante 72 horas, posteriormente se hicieron 2 lavados con PBS 1X con un pH de 7.42 en lapsos de 30 minutos. Ya que se realizaron los lavados, los tejidos se deshidrataron en diferentes concentraciones de etanol a partir de 30, 40, 50 y 60% durante 30 minutos; a partir de las concentraciones de 70, 80 y 90% de etanol se realizaron 2 veces durante 1 hora por cada grado de alcohol y al término de esto se sumergieron en alcohol absoluto durante 1 hora. Los tejidos se colocaron en una mezcla de alcohol absoluto/xilol en una proporción de 1:1 durante 24 horas; seguido de esto se colocaron en xilol absoluto durante 72 horas.

Transcurridas las 72 horas, los tejidos fueron retirados del xilol y se colocaron en una mezcla de xilol/cloroformo (1:1) durante 1 hora para posteriormente dejarlos en cloroformo durante 24 horas, al término de esto los tejidos se colocaron en una mezcla de cloroformo/parafina (1:1) durante 1 hora a una temperatura de 50° C, al término de esto se dejaron los tejidos en parafina durante 24 horas, una vez realizado esto, se hizo un cambio de parafina y se dejó a una temperatura de 50° C durante 1 hora, posteriormente se pasaron a moldes histológicos colocando los tejidos de manera transversal y dejando solidificar el tejido en parafina durante 72 horas. Los tejidos fijados en parafina fueron cortados a 8 mm con un microtomo LKB; una vez obtenidos los cortes se montaron en porta objetos, agregándoles alcohol al 70% para sumergirse en baño María durante 3 a 5 minutos, fijándolos en porta objetos con gelatina al 1%. Posteriormente, estos cortes fueron sometidos a la tinción de Mazzón.

Inmunofluorescencia

Una vez que se obtuvieron los cortes histológicos se separaron los tejidos para realizar la prueba inmunohistoquímica. Dichos cortes fueron fijados en porta objetos con Poli-L-Lisina. Posterior a la desparafinada de los tejidos, se sometieron los cortes a rehidratación a partir de Xilol absoluto llevándolo después a alcoholes desde el 96% hasta el 30% durante 5 minutos en cada concentración de etanol y dejándolo hidratar en agua destilada a 4° C durante toda la noche. Una vez que se hidrataron los tejidos se recuperó el antígeno mediante una inmersión de los tejidos en un coplín con una solución de *Antigen Retrieval CitraPlus* (10x) manteniéndolo en baño María durante 30 minutos, un vez que se alcanzó este tiempo, se dejó enfriar la muestra durante 20 minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBS-Tween; al momento de secar la muestra se seccionó con un marcador de cera por cada corte presente en la laminilla, seguido de esto se agregó un bloqueador de proteínas *Power Block Universal Blocking Reagent* (10x) a modo de permitir el bloqueo de los epítomos no deseables y se dejó reposar durante 20 minutos en una cámara húmeda, al culminar este tiempo se adicionó el anticuerpo primario en una dilución de 1:50 a cada tejido durante 12 horas en incubación a 4° C. Una vez que transcurrieron las 12 horas, los tejidos se lavaron en PBS-Tween y se aplicaron 25 µl del anticuerpo secundario dejándolo incubar durante 4 horas (anticuerpo secundario para ratón fue FITC y para conejo fue 595), seguido de esto se realizaron 3 lavados en PBS-Tween en lapsos de 5 minutos, posteriormente se adicionó DRAQ-7 durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados más en PBS-Tween, una vez realizado esto se aplicó el medio de montaje a las laminillas que consistía de una mezcla de 1:1 de PBS: Glicerol, una vez hecho esto se cubrió la laminilla y se selló con esmalte para posteriormente ser revisados en un microscopio confocal ZEISS Axiovert 100M con el software LSM- Browser-ZEN2009 a una longitud de onda de excitación de 488 nm y la emisión a 543 nm. Las secciones se examinaron y fueron fotografiadas digitalmente con un microscopio de fluorescencia. Se compararon los patrones de distribución de las proteínas de interés (Fas, p53, Bcl-2, Bax, α -ER y β -ER, Santa Cruz Biotechnology) de las células inmunorreactivas de las diferentes poblaciones (Erskine *et al.*, 1988, Hines *et al.*, 1999).

Cuadro 5 Anticuerpos Primarios.

Marcador	Identificación	Localización	Dilución
Bcl-2	Sc-65392	Mitocondria	1:50
Bax	Sc-526	Mitocondria	1:50
Fas	Sc-1024	Membrana	1:50
p53	Sc-100	Núcleo	1:50
α -ER	Sc-71064	Membrana	1:50
β -ER	Sc-53494	Membrana	1:50
L-Fas	Sc-19681	Membrana	1:50
Caspasa 3	Sc-56048	Citosol	1:50
PCNA	M-0879	Núcleo	1:50
Caspasa 9	Sc-56076	Citosol	1:50

Extracción ARN

El procedimiento de extracción de ARN se llevó a cabo bajo las consideraciones del equipo QIA Symphony® de QIAGEN®. Para ello se realizó la disección del tejido cerebral el cual se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a una temperatura de -80° C. Una vez descongeladas las muestras se llevó a cabo el lisado del tejido con un triturador manual durante un minuto en presencia del Buffer RTL propuesto por la metodología del protocolo de purificación de RNA_CT_400_V7. Enseguida las muestras se incubaron durante 15 minutos a 50° C; al término de la incubación éstas se introdujeron al QIA Symphony® de QIAGEN® para la extracción de ARN. El sistema opera mediante la acción de perlas magnéticas cuya carga puede cambiar basándose en el pH. Con un pH bajo las moléculas de ARN presentan carga negativa lo cual permite su separación de las proteínas y otros contaminantes que se eliminan en el lavado durante la purificación del ARN y con el cual cuenta el Kit de extracción y separación del ARN. Se realizó la cuantificación de ARN en un espectrofotómetro de micro platina Epoch® mediante el Software Gen5-2.09 que corrobora la relación de la absorbancia a 260/280nm.

Gel de Agarosa

Se realizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE (1x) para revisar la integridad de las bandas en el 18S y 28S. Se utilizó como agente intercalante 1 μ l de SYBR Green por cada 10 ml de solución TAE. Como buffer de carga se empleó el 6X Orange DNA Loading

Dye. Se mantuvieron en una cámara de electroforesis durante 30 minutos a 80 Volts. Se analizaron los geles bajo una cámara UV.

Preparación de ADN complementario

El ADN complementario se sintetizó a partir de la enzima *M- Mult-RT* como se muestra en el Cuadro 6. Una vez que a las muestras se les adicionó el ARN, los dNTP's y los hexámeros aleatorios, cuyos fragmentos de 6 pares de bases y una sola hebra de ADN se pueden unir a cualquier región de ARN, éstas se llevaron a un termociclador para iniciar con un ciclo de 5 minutos a una temperatura de 70° C, posteriormente se mantuvo en hielo durante 3 minutos y se agregó la Master Mix con la enzima RT, el buffer y la RNasa. Seguido de esto se llevaron a un ciclo de 60 minutos a 42° C, seguido de otro ciclo de 10 minutos a 90° C y al final a un ciclo de 4° C hasta retirarlo del termociclador. Una vez que finalizó la síntesis de ADNc, se alojó en congelación a -80° C hasta su uso para la PCR.

Cuadro 6. Preparación de Master Mix para preparar ADN Complementario

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen por Reacción
M-Mult-RT	20 U / μ l	0.5 μ l
Buffer	10 x	2 μ l
dNTP's	10 mM	2 μ l
Inhibidor RNasa	40 U / μ l	0.5 μ l
Hexámeros	40 mM	2 μ l
RNAm	1 μ l	

PCR- Transcriptasa reversa en Tiempo Real

La RT-PCR en tiempo real se realizó mediante las especificaciones del *Syber Green* como se muestra en el Cuadro 7. Las condiciones para el termociclador fueron de la siguiente manera: fase de desnaturalización 1 ciclo de 10 minutos a 95° C, seguido de 1 ciclo de 15 segundos a 95° C para la alineación, para la elongación de 40 ciclos de 1 minuto a 54° C, seguido de 1 ciclo de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 55° C y finalizando con 1 ciclo de 30 segundos a 95° C.

Cuadro 7. Preparación de RT-PCR Tiempo Real

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen por Reacción
Syber Green	2 x	10 μ l
Primer Forward	10 μ M	0.8 μ l
Primer Reverse	10 μ M	0.8 μ l
H ₂ O cbp		Para ajustar el volumen
cDNA		2 μ l

Diseño de Primers

Los primers se diseñaron a partir de la búsqueda de la secuencia del genoma de *Oreochromis niloticus* bajo los reportes encontrados en el *GeneBank*, posteriormente se revisó la secuencia del ADNc reportado en línea por medio de *Ensemble*, una vez realizado esto se utilizó la herramienta Primer Quest en línea de IDT (*Integrated DNA Technologies*) para revisar las opciones sugeridas de este programa de las cuales se revisaron los primers sugeridos que tenían el 100% de afinidad con las secuencias de los genes a estudiar por medio de un FASTA. Las secuencias de los primers de los genes problemas son presentados en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Primers a estudiar

Gen	Forward	Reverse	Amplicon
Bax	CTCTTCCATCTGGCCTGTAAAC	GCTGTAGACCTGCTCTCTGATA	114
p53	CCCTCAGCCAGGATTCATTT	CATCTGACCTCCAGGTTTCTTC	84
Fas	GAGGCCTATCGCTTGTCTTTAG	CCTGCTCCTTTCTCATCTGTTC	103
Bcl-2	CTCTTCCATCTGGCCTGTAAAC	CTGTAGACCTGCTCTCTGATA	114
β -ER	GCTCATGCTGCTTTACATATC	CATCTCCAGCAACAGGTCATAG	109
α -ER	ACGCGTCTGGATACCACTA	TTGTCGCTGGGCACATATAG	103
B-Actin	TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG	CTGTTGGCTTTGGGGTTCA	217
GAPDH	GTCTGGAGAAACCAGCCAAATA	GTGCTCTGTGTATCCCAGAATG	95

Análisis Estadístico

La base de datos se analizó con el programa SPSS versión 6.1 (IBM, NY, USA). Para las variables morfométricas, los resultados se analizaron mediante modelo general lineal de medidas repetidas de *Kruskal Wallis*. Para determinar la normalidad y la homogeneidad de la varianza se utilizó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. Se realizó un análisis de comparación de medias de *Tukey* ($p < 0.05$) mediante el programa JMP versión 9 (Base SAS®, SAS instituto, Carolina de Norte, USA). La diferencia entre las expresiones de proteínas y RNA mensajero se estableció por ANOVA paramétrica, mientras que la correlación entre las variables se analizó por modelo de Pearson o Spearman.

VIII.-Resultados

1.- Impacto del tratamiento hormonal sobre talla y crecimiento

En este estudio se observaron valores morfométricos más altos en todas las medidas estudiadas en los organismos MAS con 17α -metil testosterona, con respecto a los organismos FEM con 17α -etinil estradiol y CTRL, cabe señalar que, para determinar los cambios morfométricos con mayor precisión, se ampliaron los tiempos de estudio (40, 50 y 60 días de edad).

La longitud total de los peces MAS fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en todos los tiempos de medición en comparación con CTRL. Por el contrario, los organismos FEM mostraron una disminución en la longitud total con respecto a CTRL (23%) (Tabla 1). Estos resultados revelaron que los tratamientos hormonales, a partir de los 15 días, aceleran el crecimiento en los organismos MAS e inducen un retraso en el desarrollo de los organismos FEM.

Tabla 1. Efecto del Tratamiento sobre la longitud Total en *Oreochromis niloticus*

Tiempo (días)	FEM (cm)	MAS (cm)	CTRL (cm)	Error Estándar	Valor de P
5	0.81 ± 0.13 ^b	1.08 ± 0.13 ^a	0.81 ± 0.19 ^b	0.03	<0.001
10	0.82 ± 0.12 ^c	1.17 ± 0.17 ^a	1.02 ± 0.08 ^b	0.03	<0.001
15	0.72 ± 0.09 ^c	1.30 ± 0.15 ^a	0.92 ± 0.16 ^b	0.04	<0.001
25	0.9 ± 0.11 ^b	3.48 ± 0.44 ^a	1.24 ± 0.12 ^b	0.16	<0.001
35	1.04 ± 0.12 ^b	3.85 ± 0.19 ^a	1.37 ± 0.20 ^b	0.16	<0.001
40	1.10 ± 0.09 ^c	4.36 ± 0.19 ^a	1.3 ± 0.207 ^b	0.44	<0.001
50	1.21 ± 0.09 ^b	4.52 ± 0.19 ^a	1.60 ± 0.2 ^b	0.19	<0.001
60	1.31 ± 0.09 ^b	4.90 ± 0.19 ^a	1.7 ± 0.2 ^b	0.20	<0.001
70	1.41 ± 0.09 ^b	5.40 ± 0.2 ^a	1.84 ± 0.2 ^b	0.2	<0.001

N = 15 individuos por tiempo; a = literal que expresa mayor crecimiento en comparación con las letras b y c; * Diferencias significativas cuando $P < 0.001$. Diferentes literales expresan diferencias entre grupos.

Los resultados obtenidos con respecto a la longitud patrón se muestran en la Tabla 2, en donde los organismos MAS presentaron un aumento significativo con respecto CTRL. En contraste la longitud patrón de los organismos FEM se redujo en relación con el CTRL. En

ambos casos el efecto se observó a los 25 días de edad ($P < 0,001$). Estos resultados coinciden con los datos de la longitud total anteriormente explicados.

Tabla 2. Efecto del Tratamiento sobre en la longitud patrón en *Oreochromis niloticus*

Tiempo (días)	FEM (cm)	MAS (cm)	CTRL (cm)	Error Estándar	Valor de P
5	0.52±0.12 ^b	0.82±0.12 ^a	0.56 ±0.09 ^b	0.03	<0.001
10	0.59±0.12 ^b	0.92±0.15 ^a	0.58± 0.11 ^b	0.04	<0.001
15	0.514±0.08 ^c	1.05±0.14 ^a	0.69±0.17 ^b	0.04	<0.001
25	0.68±0.10 ^b	3.12±0.37 ^a	0.94±0.11 ^b	0.13	<0.001
35	0.79±0.14 ^b	3.60±0.20 ^a	1.13±0.20 ^b	0.16	<0.001
40	0.87±0.12 ^b	3.89±0.20 ^a	1.25±0.20 ^b	0.17	<0.001
50	0.91±0.12 ^b	4.2±0.20 ^a	1.3±0.19 ^b	0.18	<0.001
60	0.94±0.12 ^b	4.48±0.23 ^a	1.4±0.19 ^b	0.20	<0.001
70	0.97±0.11 ^b	4.92±0.23 ^a	1.61±0.19 ^b	0.22	<0.001

N = 15 individuos por tiempo; a = literal que expresa mayor crecimiento en comparación con las letras b y c; * Diferencias significativas cuando $P < 0.001$. Diferentes literales expresan diferencias entre grupos.

Por otra parte, el tratamiento con 17 α -metil testosterona también favoreció el aumento de la altura en los organismos MAS a partir del día 25 en comparación con los CTRL ($P < 0.001$) como se muestra en la Tabla 3. Mientras que 17 α -etil estradiol en FEM redujo significativamente las alturas registradas a partir del día 15 en comparación con el CTRL ($P < 0.001$). Por tanto, las hormonas empleas regulan la altura de los organismos.

Tabla 3. Efecto del Tratamiento sobre la altura en *Oreochromis niloticus*

Tiempo (días)	FEM (cm)	MAS (cm)	CTRL (cm)	Error Estándar	Valor de P
5	0.12± 0.04 ^c	0.25 ±0.05 ^a	0.17± 0.04 ^b	0.04	<0.001
10	0.18 ±0.03 ^b	0.33 ±0.05 ^a	0.20 ±0.02 ^b	0.01	<0.001
15	0.21 ±0.02 ^c	0.29 ±0.04 ^a	0.24 ±0.04 ^b	0.01	<0.001
25	0.23 ±0.25 ^b	0.91 ±0.02 ^a	0.28 ±0.04 ^b	0.04	<0.001
35	0.26 ±0.06 ^c	0.96 ±0.07 ^a	0.44 ±0.05 ^b	0.04	<0.001
40	0.23±0.06 ^c	1.11±0.07 ^a	0.49±0.07 ^b	0.05	<0.001
50	0.31±0.06 ^b	1.14±0.07 ^a	0.50±0.07 ^c	0.07	<0.001
60	0.43±0.06 ^b	1.25±0.07 ^a	0.50±0.07 ^c	0.81	<0.001
70	0.46±0.06 ^b	1.413±0.07 ^a	0.52±0.07 ^b	0.07	<0.001

N = 15 individuos por tiempo; a = literal que expresa mayor crecimiento en comparación con las letras b y c; * Diferencias significativas cuando P <0.0001. Diferentes literales expresan diferencias entre grupos.

En términos generales la tasa de crecimiento se triplico en los organismos MAS, derivado del tratamiento hormonales (p <0.001), además, se observó un aumento en la ganancia diaria de peso (Tabla 4). En cambio, en los organismos los FEM hay drástico retraso en el crecimiento.

Tabla 4. Efecto sobre el peso y el crecimiento en *Oreochromis niloticus*

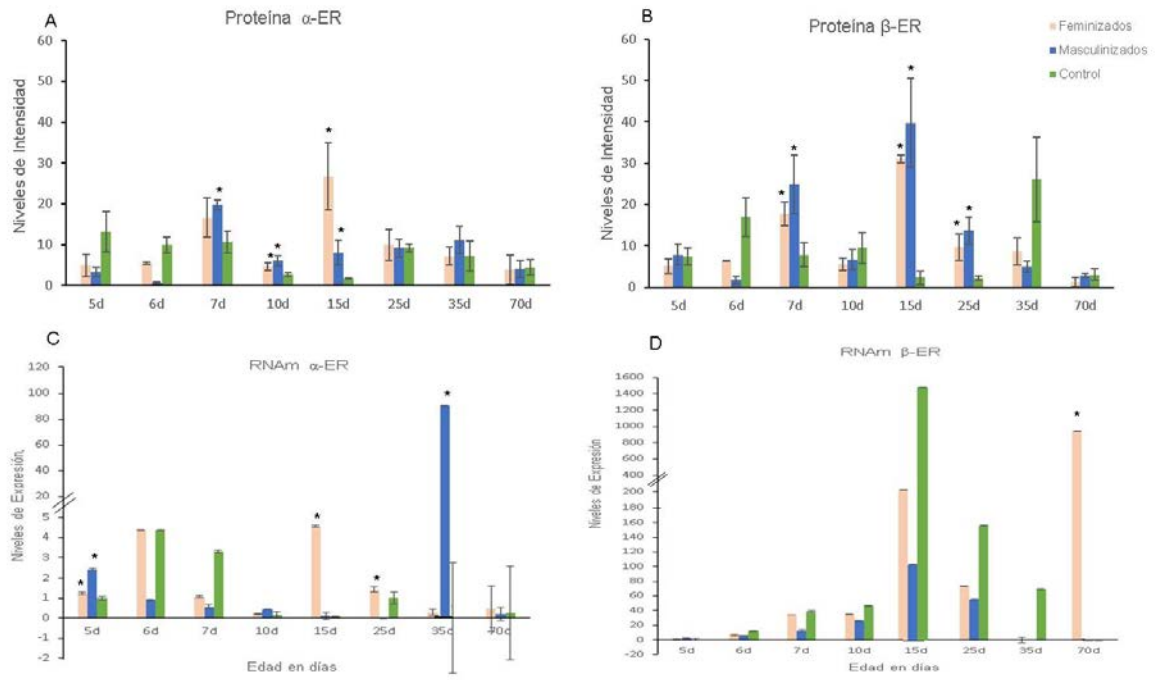
Tratamiento	Tasa de Crecimiento	Error Estándar	Valor de P	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	GDP (g)
FEM	0.46 ^b	0.43	0.2832	0.01 ± 0.01 ^b	0.05±0.02 ^b	7.57 ^{E-04}
MAS	3.38 ^a	0.41	<0.001	0.02 ± 0.03 ^a	1.43±0.18 ^a	2.05 ^{E-02*}
CTRL	0.48 ^b	0.41	0.2538	0.01 ±0.04 ^b	0.11±0.06 ^b	1.67 ^{E-03}

N = 15 individuos por tiempo; a = literal que expresa mayor crecimiento en comparación con las letras b y c; * Diferencias significativas cuando P <0.001. Diferentes literales expresan diferencias entre grupos. GDP= ganancia diaria de peso.

Expresión de receptores α y β estrogénicos en cerebro de Tilapia

En el tejido cerebral de los organismos MAS fue notable un incremento significativo ($P<0.001$) en los niveles de intensidad de la proteína del α -ER a los días 7, 10 y 15 en comparación a los organismos CTRL (Grafica 1, sección A). En el caso de los organismos FEM los niveles de intensidad del α -ER solo aumentaron significativamente ($P<0.001$) a los 7 y 15 días de edad con respecto al CTRL. Interesantemente en este grupo, los niveles de intensidad del α -ER incrementaron significativamente a los días 6 y 15 ($P<0.001$) en comparación a los organismos MAS, sin determinar cambios significativos en los demás tiempos. En cuanto a mensajero de α -ER (sección C, Grafica 1), notablemente incrementaron los niveles ($P<0.001$) a los días 5 y 35 en los organismos MAS en comparación al grupo CTRL; en el caso de los FEM fue a los 15 y 25 días de edad. Pero a los 6, 7, 15 y 25 días la expresión relativa del RNAm de α -ER fue superior en los organismos FEM vs MAS ($P<0.001$).

Con respecto a los niveles de intensidad de la proteína β -ER (Grafica 1, Sección B) en los organismos MAS el mayor incremento ocurrió a los días 7, 15 y 25 en comparación a los organismos CTRL ($P<0.001$). Pero en los organismos FEM la mayor intensidad ($P<0.001$) se localizó a los 7, 15, 25 y 35 días de edad. Al comparar los organismos MAS vs FEM, solo encontramos diferencias significativas al día 15 ($P<0.001$). Por otro lado, la expresión de RNAm del β -ER (Grafica 1, sección D) en los organismos MAS siempre fue menor en comparación a los organismos CTRL, pero en los organismos FEM la máxima expresión fue observada a los 70 días de edad ($P<0.001$), a pesar de que la expresión de este mensajero fue mayor en los días 7, 10, 15, 25 y 70 en comparación con los organismos MAS ($P<0.001$).



Gráfica 1. Respuesta de Intensidad de Fluorescencia / Expresión de Genes de α -ER y β -ER en Cerebro de *Oreochromis niloticus*.

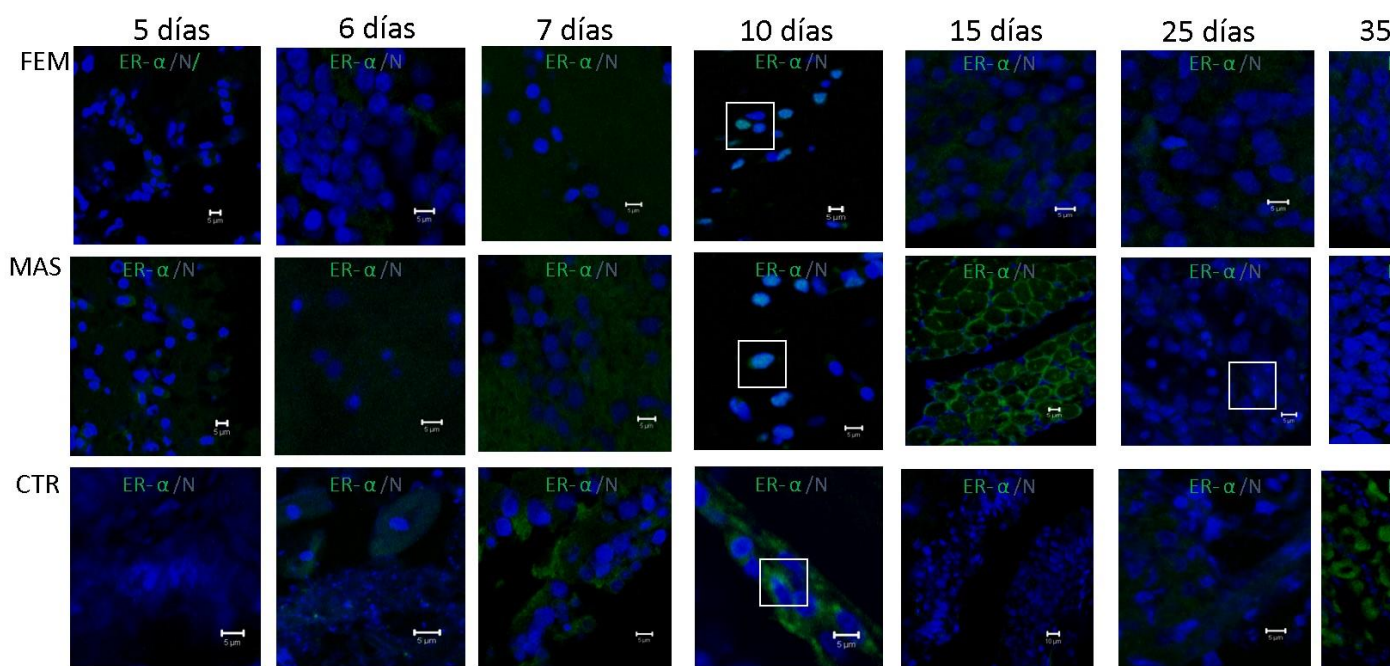


Imagen 1. Inmunofluorescencia del Receptor Estrogénico α en Tejido Cerebral de *Oreochromis*

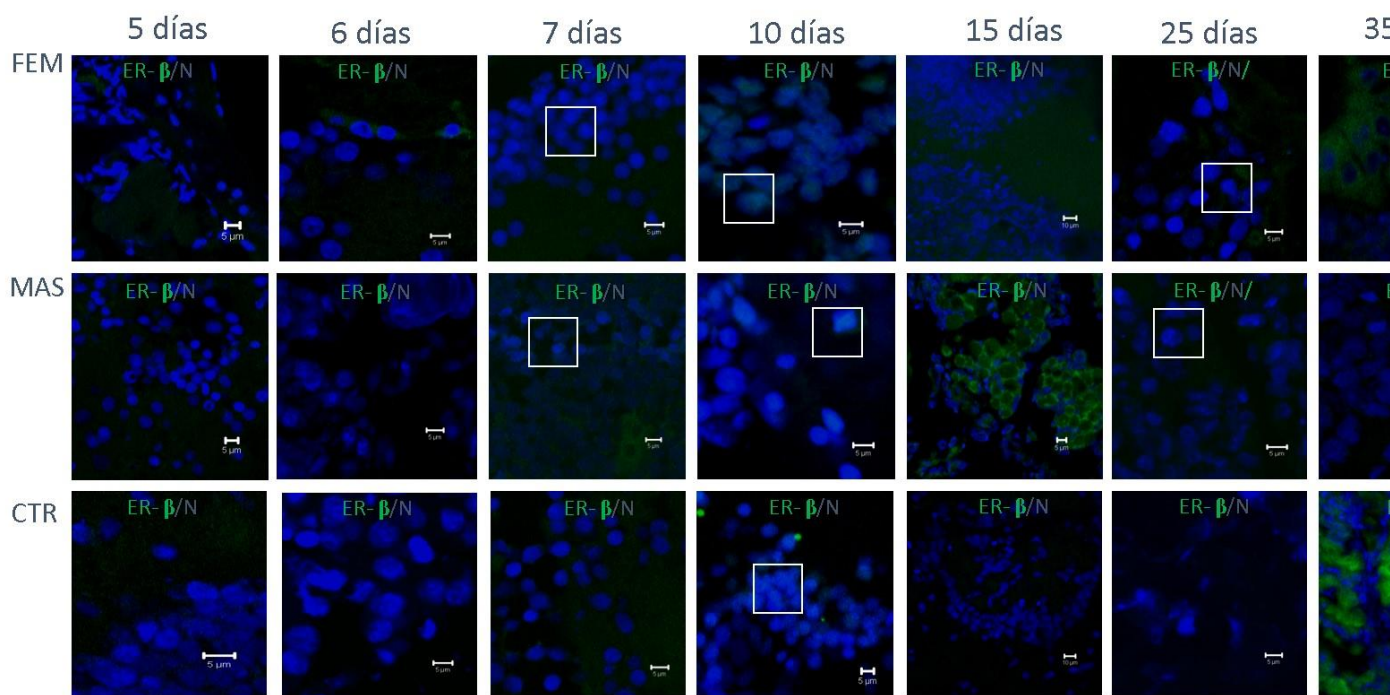


Imagen 2. Inmunofluorescencia del Receptor Estrogénico β en Tejido Cerebral de *Oreochromis*

Determinación de los marcadores de muerte celular en cerebro de Tilapia

Con la finalidad de determinar la relación entre las hormonas con los procesos de apoptosis en el tejido cerebral de la Tilapia, se analizó la presencia de las proteínas Fas, L-Fas, p53, Caspasa 9, Caspasa 3, Bax, y Bcl-2.

a) Vía extrínseca:

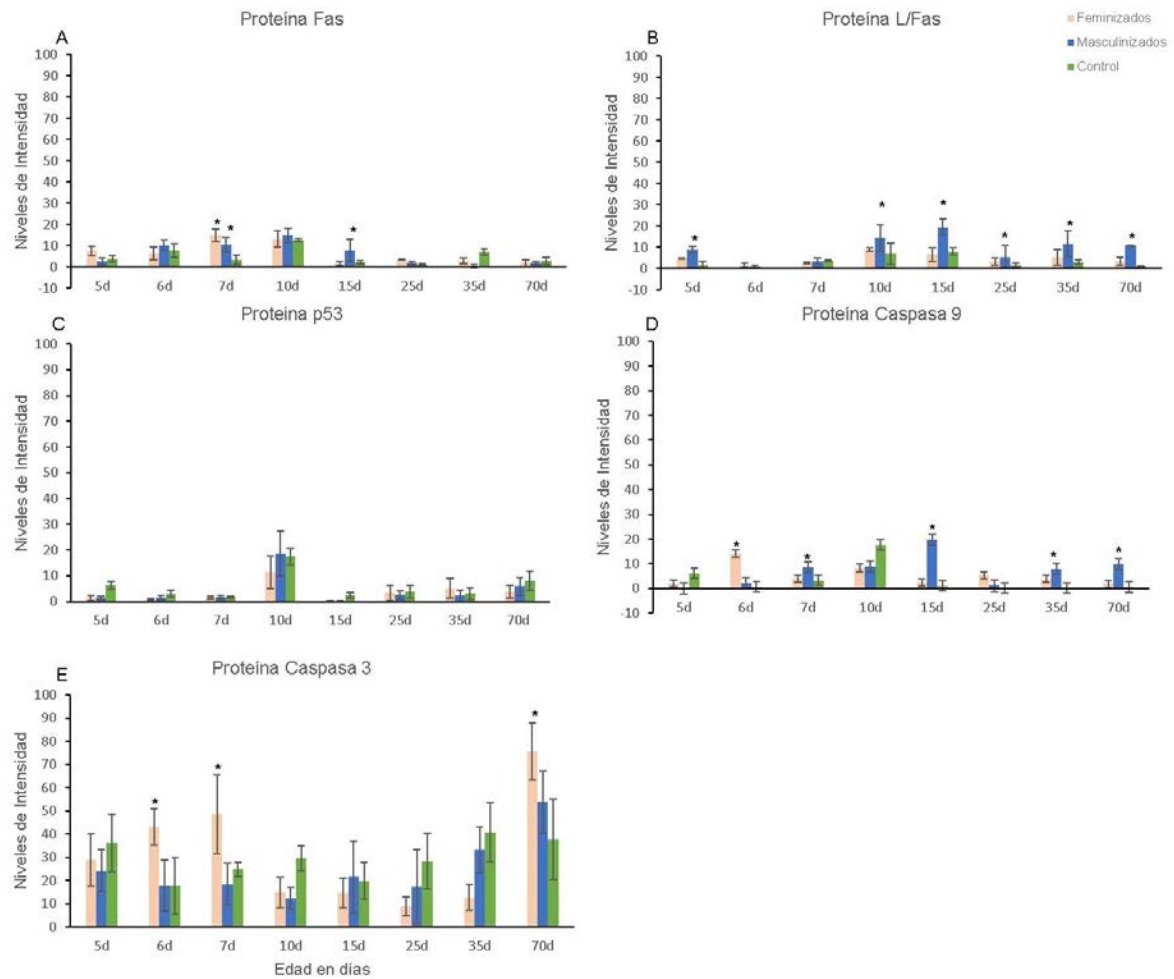
Por inmunofluorescencia, podemos constatar que los niveles de intensidad de la proteína de Fas (Grafica 2, Sección A) fue significancia mayor en los organismos MAS a los 7 y 15 días de edad en comparación a los CTRL ($P<0.001$). Mientras que en los organismos FEM esta proteína solo al día 7 alcanzó niveles significativos en comparación a los organismos CTRL y MAS. Interesantemente el mensajero de Fas (Grafica 3, sección A) aumentó a los días 10, 35 y 70 de edad en los organismos MAS en comparación con los organismos FEM y CTRL ($P<0.001$). No obstante, en los organismos FEM se observó un aumento significativo a los 35 días de edad con respecto a los CTRL.

Respecto al ligando de Fas (Grafica 2, sección B) los niveles de intensidad elevados ($P<0.001$) para los organismos MAS a los días 5, 10, 15, 25, 35 y 70 días en comparación a los organismos FEM y CTRL. Mientras que a los días 5 y 35 los organismos FEM se aumentó el L-Fas comparado con los organismos del grupo CTRL.

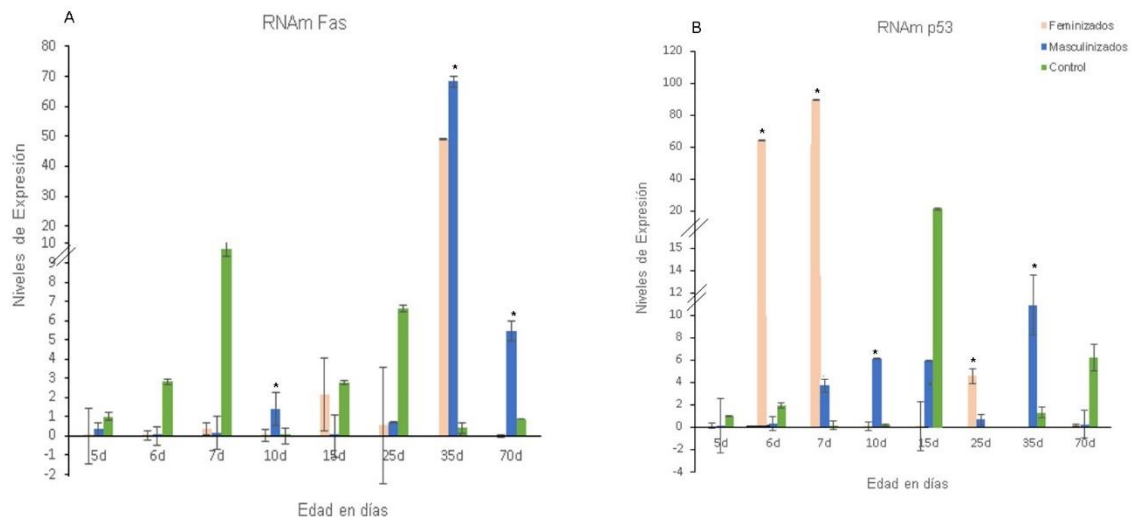
En cuanto la proteína de p53 (Grafica 2, sección C) no se observaron diferencias significativas ($P<0.001$) entre los grupos experimentales MAS y FEM en comparación a los organismos CTRL. Pese a que la expresión del RNAm (Grafica 3, sección B) en los organismos MAS fue significativamente mayor a los días 7, 10, 25 y 35 en comparación los CTRL ($P<0.001$). Mientras que en los organismos FEM el mensajero de P53 se determinó a los 6, 7 y 25 días de edad en comparación a los organismos CTRL ($P<0.001$). Destacadamente la expresión de p53 aumento significativamente con en los organismos MAS vs FEM a los días 10, 15 y 35 de edad.

Altos niveles de intensidad de Caspasa 9 fueron localizados en los organismos MAS a los 5, 10, 15, 35 y 70 de edad en comparación a los organismos FEM y CTRL ($P<0.001$). Sin embargo, en los organismos FEM presentaron mayor intensidad de Caspasa 9 a los días 6 y 25 en comparación con los organismos MAS como se muestra en la Gráfica 2 (Sección D).

En el caso de la Caspasa 3 (Grafica 2, sección E) no se observaron diferencias significativas ($P<0.001$) en el nivel de intensidad de la fluorescencia entre los organismos MAS y los CTRL; pero, los organismos FEM presentaron mayor intensidad ($P<0.001$) a los días 6 y 7 en comparación a los organismos MAS y CTRL.



Gráfica 2. Niveles de intensidad de la Fluorescencia de las Proteínas Relacionadas con la Vía Extrínseca de la Apoptosis: Fas, L/Fas, P53, Caspasa 9 y Caspasa 3 en Cerebro de *Oreochromis niloticus*.



Gráfica 3. Expresión de genes Fas y p53 en la Vía Extrínseca de la Apoptosis en Cerebro de *Oreochromis niloticus*.

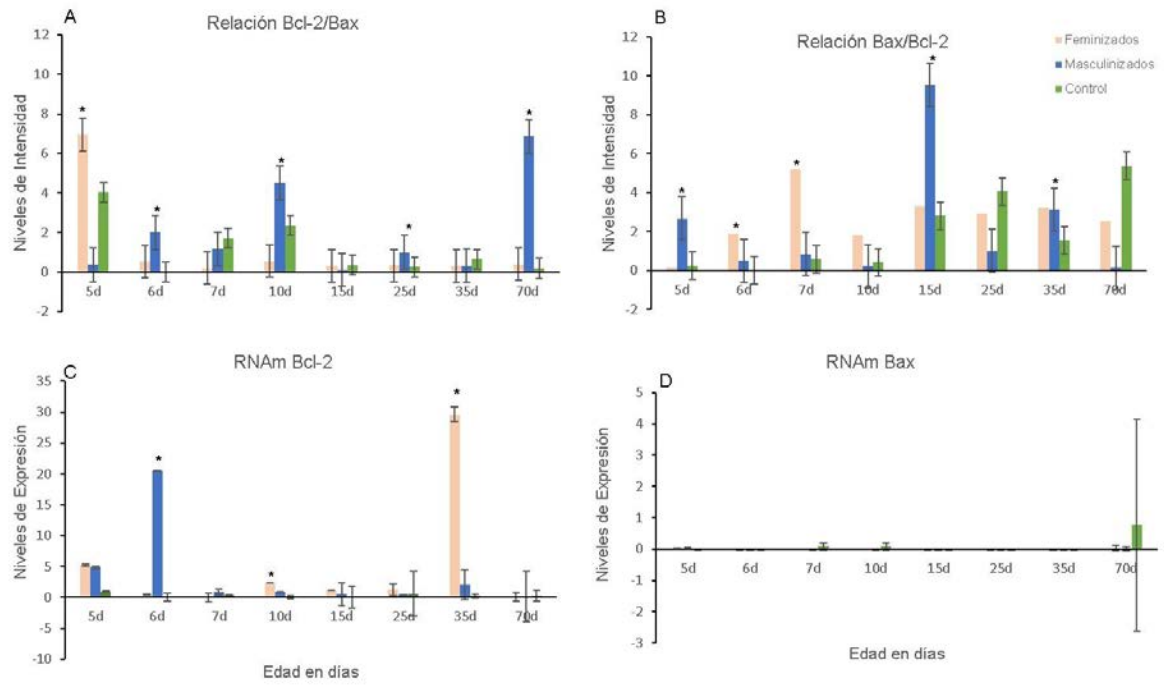
b) Vía intrínseca:

En la Gráfica 4 en la sección A se muestra la relación de intensidad entre Bcl-2/Bax, destacadamente incrementado en los organismos MAS a los días 6, 10, 25 y 70 de edad en comparación a los organismos FEM y CTRL. Pero en los organismos FEM dicha relación aumentó en el día 5.

Tras analizar la relación de los niveles de intensidad de Bax/Bcl-2 (Gráfica 4, sección B) encontramos mayor expresión en los organismos MAS en comparación con los CTRL a los días 5, 6, 15 y 35 de medición; mientras que para los organismos FEM la relación Bax/Bcl-2 fue mayor a los días 6, 7, 10, 15 y 25 versus al grupo CTRL. Esta relación también incremento a los 5 y 15 días de edad entre los organismos MAS vs FEM y en los días 6, 7, 10 y 25 de edad en FEM vs MAS.

En la sección C de la Gráfica 4 se muestra la expresión relativa del RNAm de Bcl-2, en los organismos MAS dicha expresión ($P < 0.001$) es mayor al día 6 en comparación a los organismos FEM y CTRL. En el caso de los organismos FEM se observó mayor expresión ($P < 0.001$) al día 35 de edad en comparación a los organismos MAS y CTRL.

Interesantemente bajos niveles del mensajero Bax fueron determinados en los grupos de estudios sin diferencias significativas entre ellos (Gráfica 4, sección D).



Gráfica 4. Relación Bcl-2 y Bax/ Expresión de Bcl-2 y Bax en la vía Intrínseca de la Apoptosis en Cerebro de *Oreochromis niloticus*.

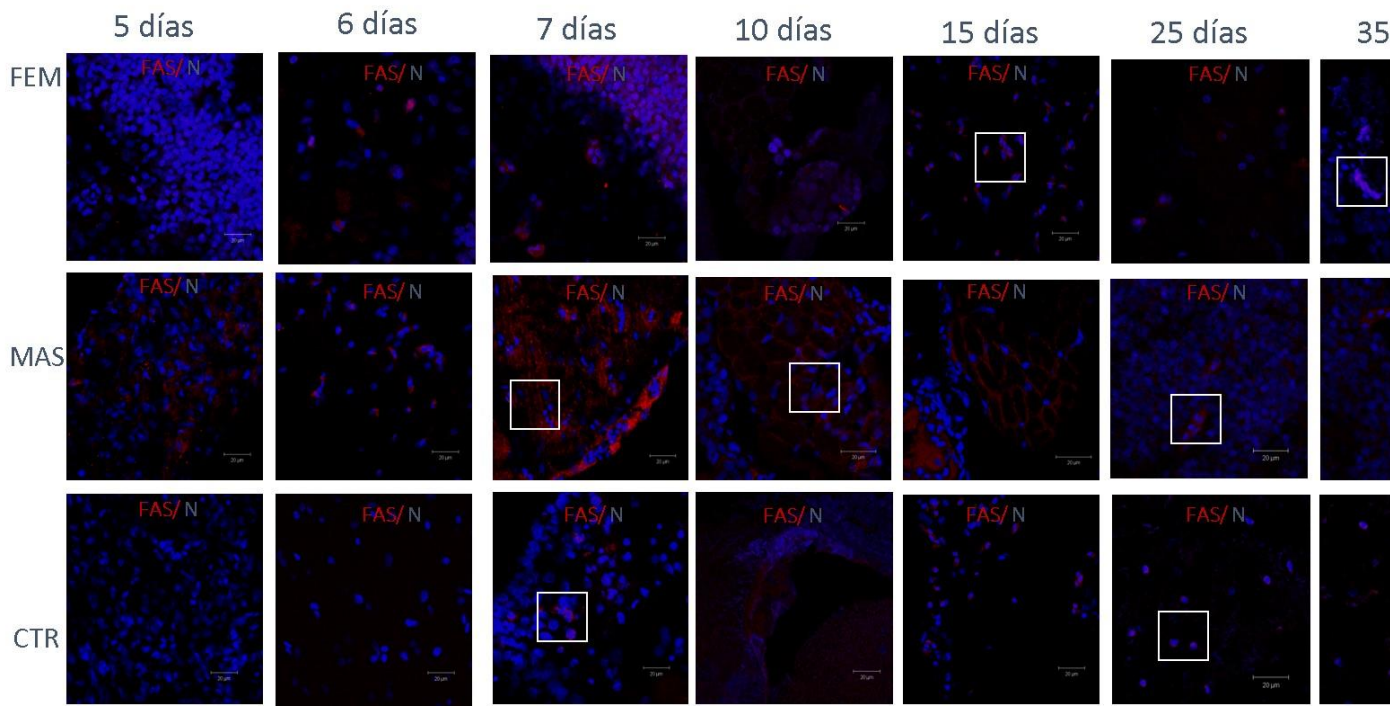


Imagen 2. Inmunofluorescencia de FAS en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*

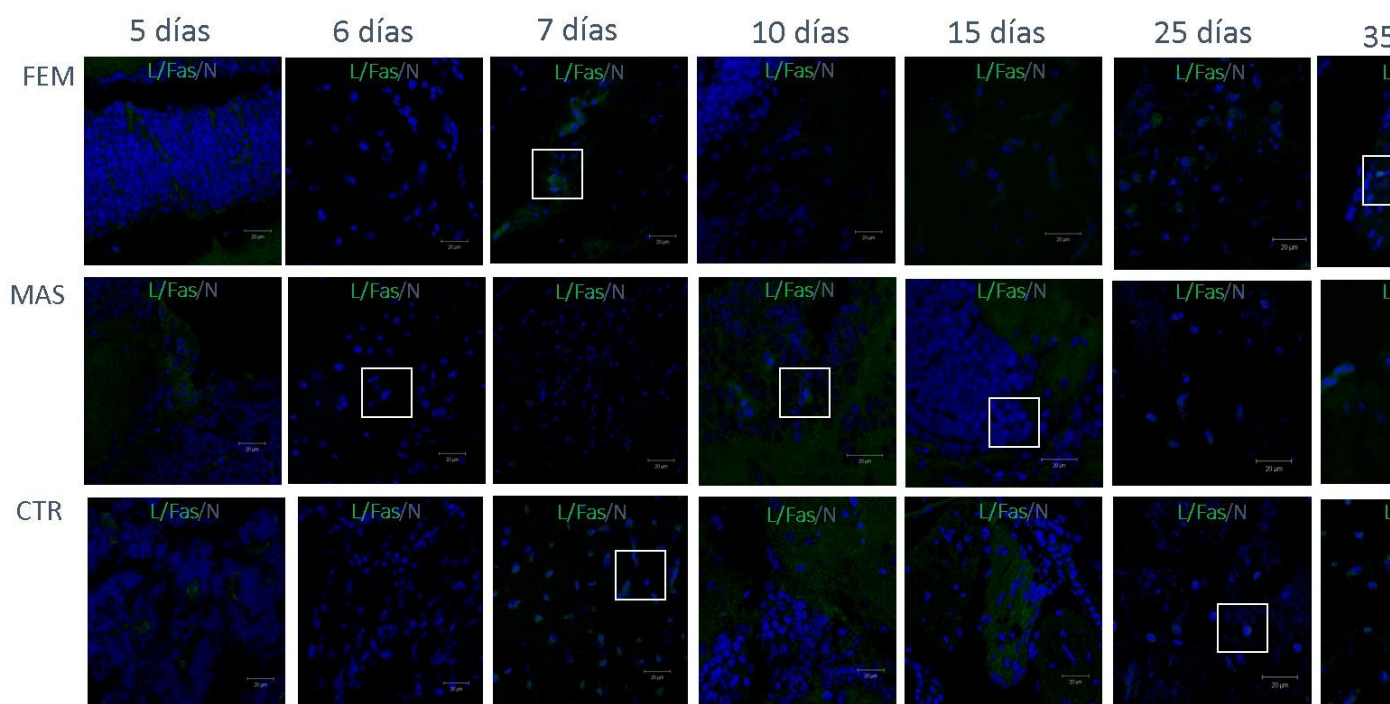


Imagen 3. Inmunofluorescencia L/Fas en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*

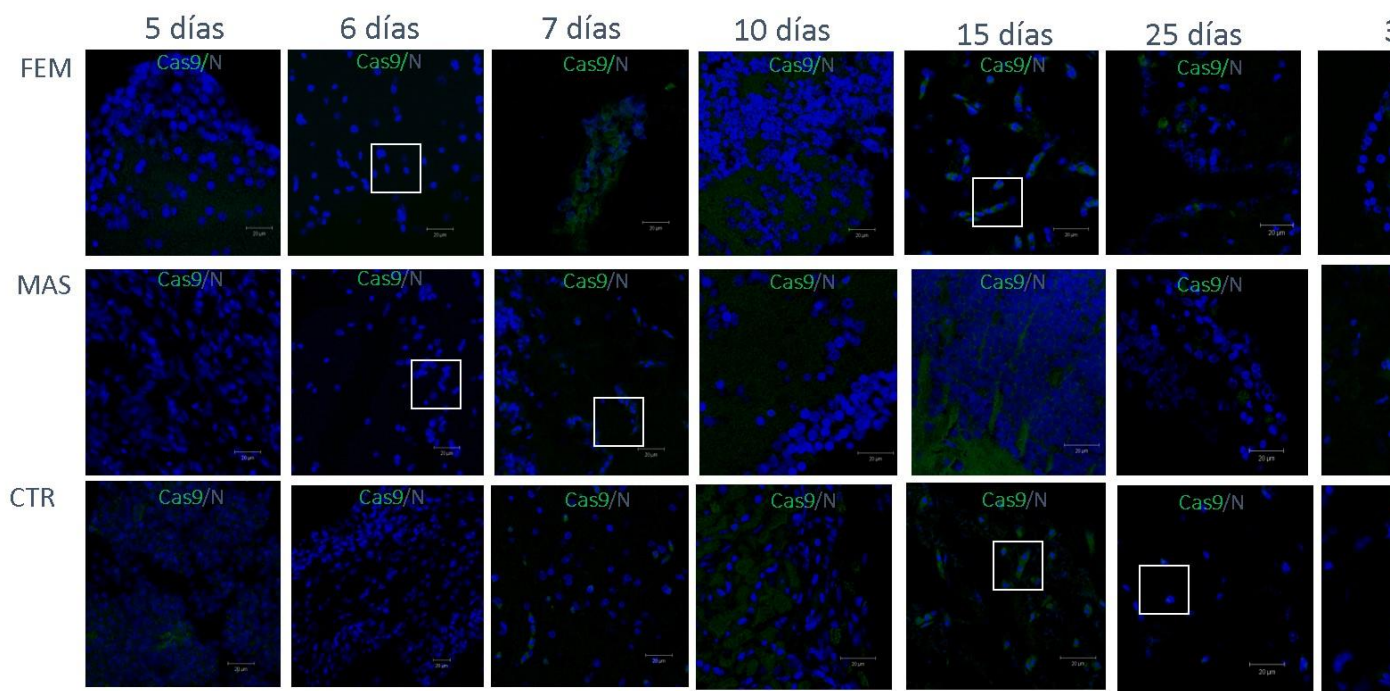


Imagen 4. Inmunofluorescencia de Caspasa 9 en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*

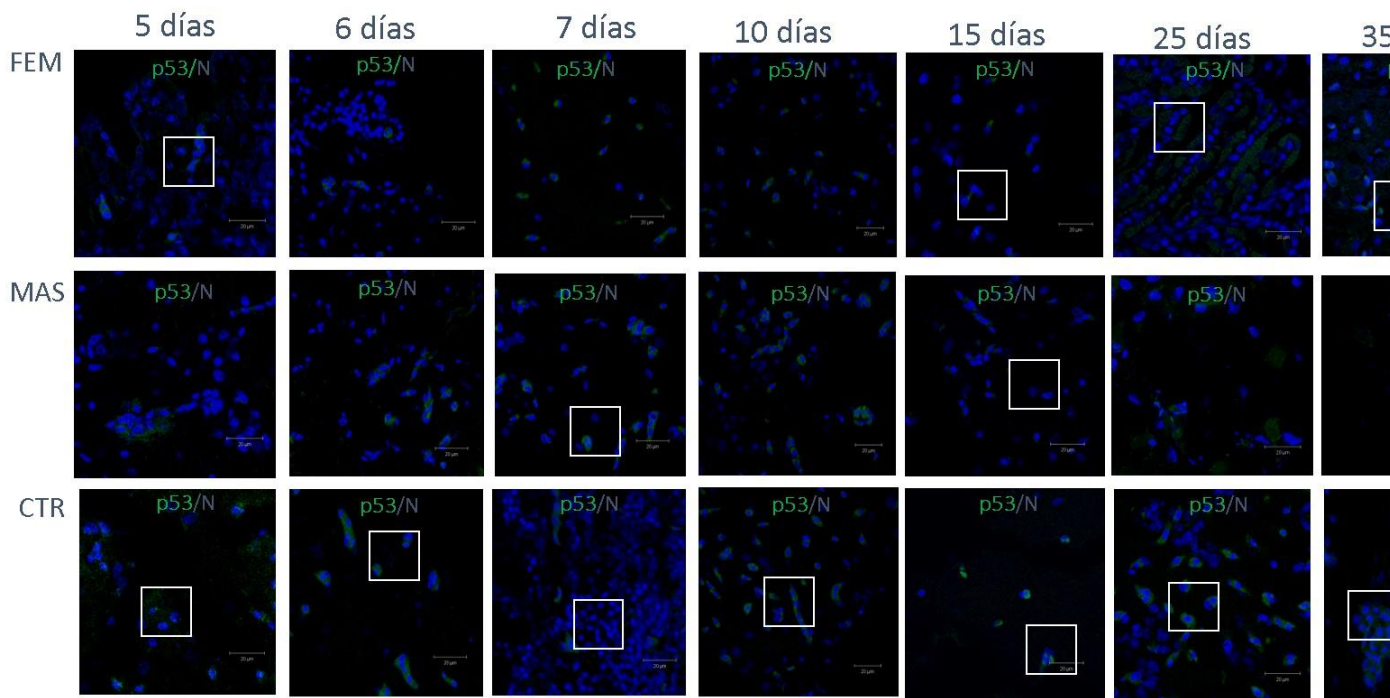


Imagen 5. Inmunofluorescencia de p53 en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*.

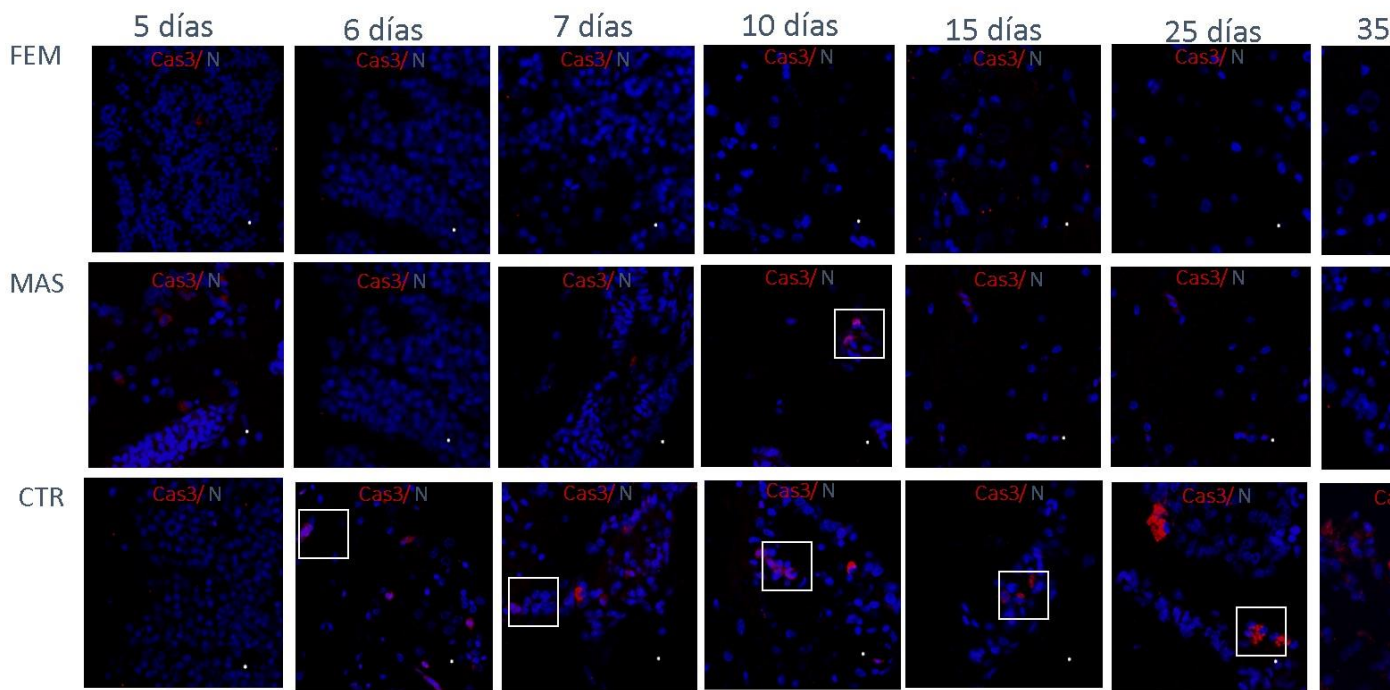


Imagen 6. Inmunofluorescencia de Caspasa 3 en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*

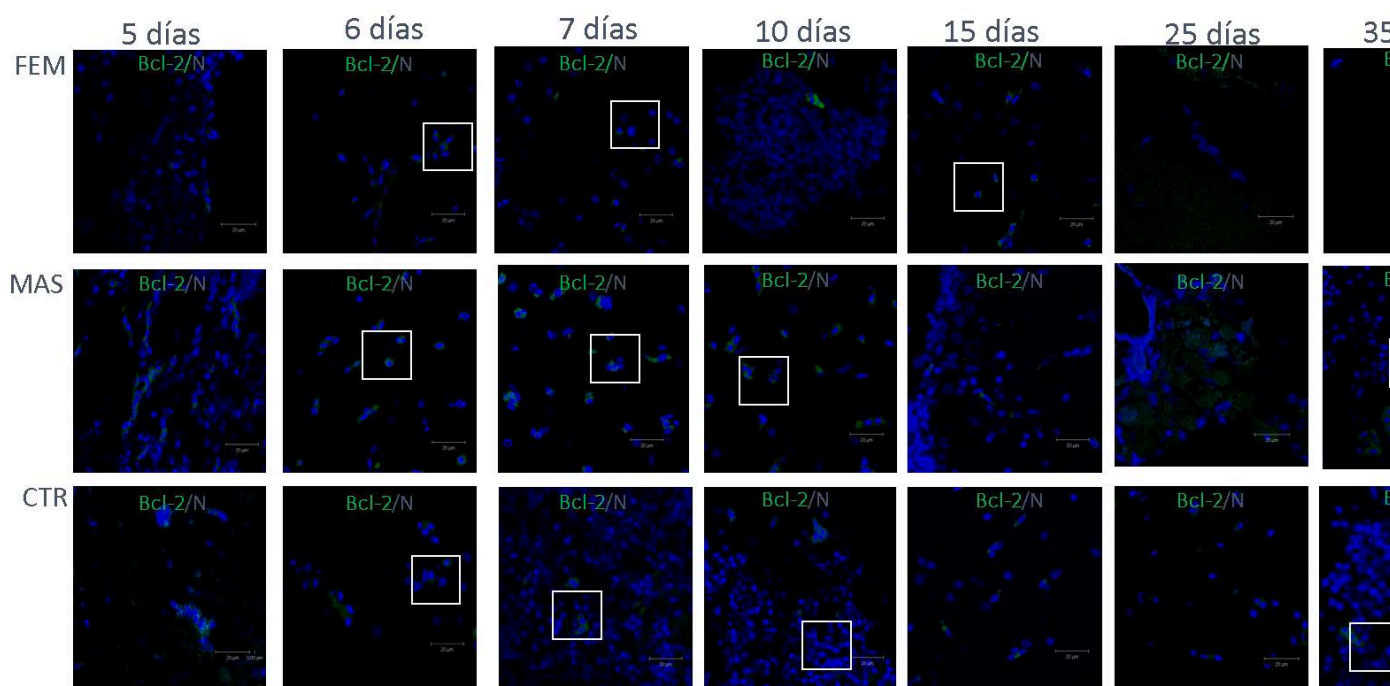


Imagen 7. Inmunofluorescencia de Bcl-2 en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*

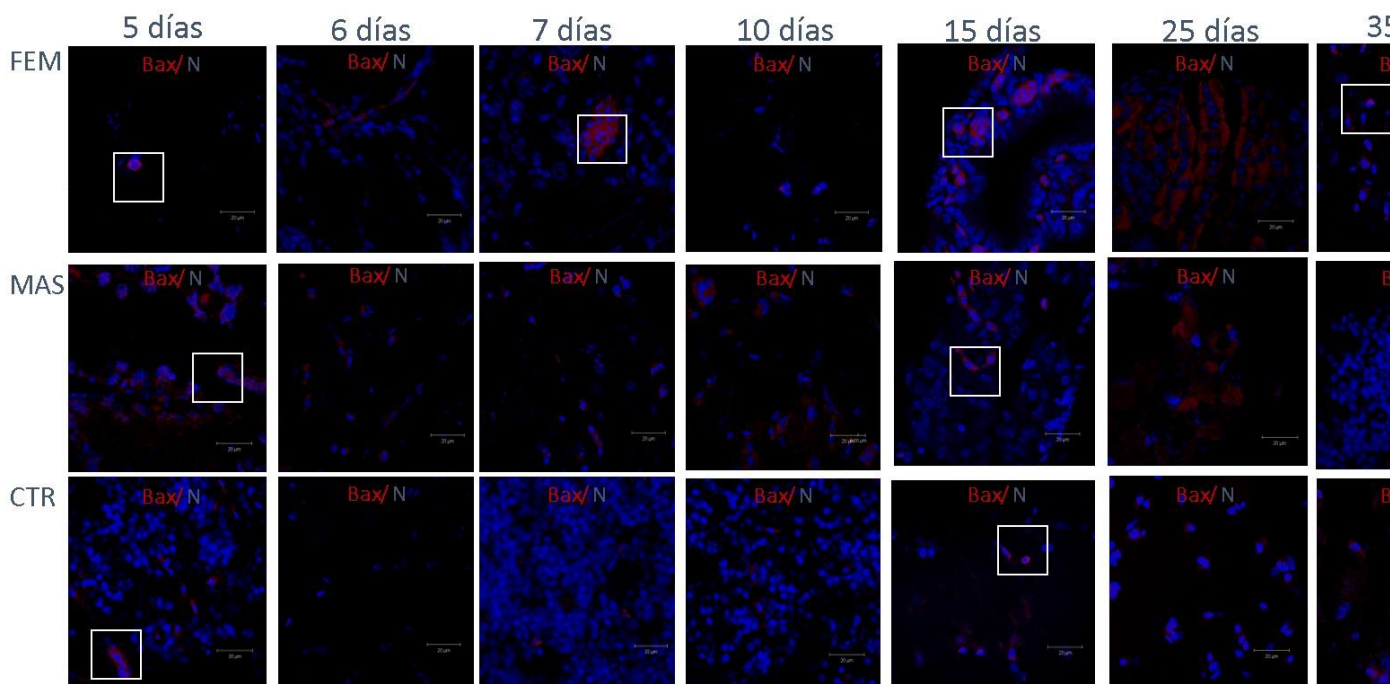
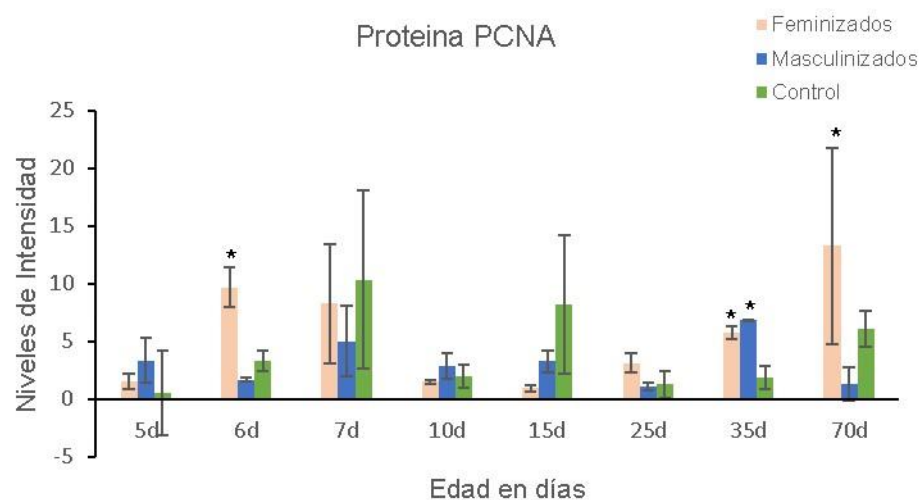


Imagen 8. Inmunofluorescencia de Bax en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*.

Efecto del tratamiento hormonal sobre la proliferación celular en cerebro de tilapia

La proliferación celular fue determinada mediante la inmunolocalización de antígeno nuclear de proliferación (PCNA) (Gráfica 6), en el tejido cerebral de los organismos MAS fue notable un incremento en los niveles de intensidad a los 5, 10 y 35 días de edad en comparación a los organismos CTRL. En el caso de los organismos FEM la mayor intensidad de la fluorescencia fue a los 6, 25 y 70 días en comparación a CTRL. Pero en los organismos FEM se observó mayor intensidad a los 6 y 70 días de edad en comparación con el grupo MAS.



Gráfica 5. Curva de Intensidad de la Fluorescencia de PCNA en Cerebro de *Oreochromis niloticus*.

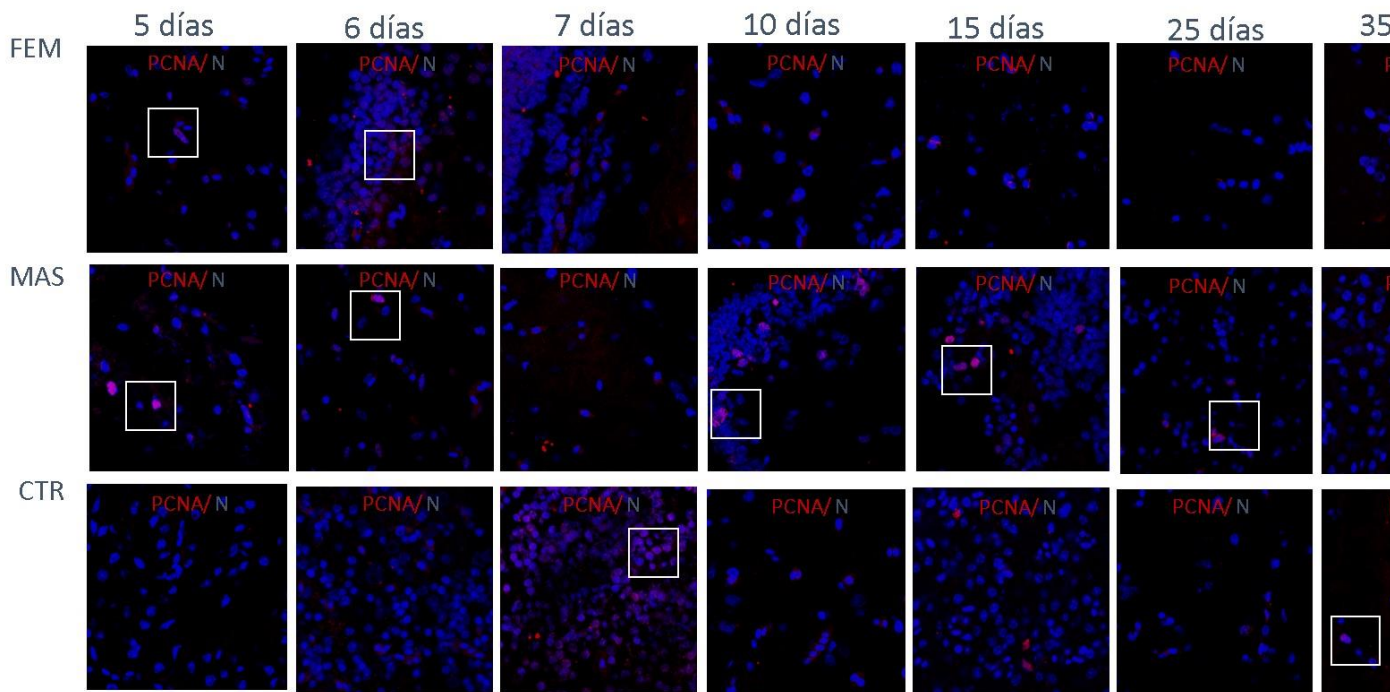


Imagen 9. Inmunofluorescencia de PCNA en Tejido Cerebral de *Oreochromis niloticus*

IX. Discusión

Durante el mecanismo de diferenciación sexual cerebral, la apoptosis tiene un papel fundamental para determinar el acoplamiento y función de los núcleos dismórficos, esto es crucial para el establecimiento de las diferencias entre los fenotipos masculino y femenino. El cerebro en los periodos críticos de la diferenciación sexual es altamente sensible a los esteroides circulantes por medio de la activación de los receptores estrogénicos, que provocan un aumento en la expresión génica, enzimática e incrementan la presencia de globulinas circulantes, capaces de capturar y posiblemente distribuir las hormonas sintéticas en lugares específicos a nivel neuronal. Los esteroides participan durante el desarrollo cerebral en distintos procesos celulares como: proliferación, diferenciación, migración, mielinización, sinaptogénesis, y apoptosis (McCarthy, 2013).

Los resultados de este estudio demuestran la participación de la apoptosis en la organización del tejido cerebral durante el período crítico de diferenciación sexual en tilapias del Nilo tratadas con $17\ \alpha$ -etil estradiol y $17\ \alpha$ -metiltestosterona. El período crítico de la diferenciación sexual cerebral se identificó entre los días 7 al 15 de edad para los organismos MAS y del día 6 al 10 para los organismos FEM en nuestro modelo de estudio. Tiempo en el que la presencia de los receptores estrogénicos α -ER y β -ER apareció de manera más evidente en el tejido cerebral. Estudios previos han demostrado que el periodo crítico de la determinación sexual en tilapia del Nilo ocurre en los primeros 18 días post eclosión. Se ha reportado que durante este periodo los embriones son altamente sensibles a la presencia de andrógenos y a los precursores de esteroides, ya sea por la inclusión de estos compuestos hormonales mediante la técnica de inmersión o por su exposición en la dieta (Devlin & Nagahama, 2002). Por otra parte, Ijiri *et al.* (2008) plantean con sus estudios que el periodo crítico de diferenciación de las células germinales primordiales ya sea en ovario o testículo, se encuentra entre los días 9 y 10 post eclosión. Se sabe que los estrógenos son esenciales para funciones reproductivas y no reproductivas, incluyendo crecimiento y diferenciación en diferentes tejidos. Los estrógenos afectan el desarrollo de numerosas regiones del cerebro y la medula espinal, así como la supervivencia y diferenciación de poblaciones específicas de neuronas y glía, así como la sinaptogénesis. Los efectos de los estrógenos en el sistema nervioso central son permanentes tanto en estructura como en función, y contribuyendo a la regulación neuroendocrina y del comportamiento, además de poseer efectos neuroprotectores (Zhang *et al.*, 2013). En el 2005 los estrógenos fueron catalogados como una pieza fundamental en el proceso de diferenciación sexual en los organismos vertebrados como los peces

teleósteos (Wang *et al.*, 2005). También se ha demostrado la participación de las hormonas esteroides en la diferenciación sexual del cerebro durante el desarrollo neonatal (Arnold, 2009).

La función de las hormonas esteroides depende de su interacción con los receptores membranales y/o nucleares. La presencia de estrógenos endógenos y muchos xenoestrógenos son reguladores de la activación transcripcional de los dos subtipos de receptores nucleares de estrógenos (ER) α y β . Los ER funcionan como factores de transcripción que al unirse a su ligando forman dímeros, los cuales pueden unirse a elementos de respuesta de algunos genes específicos y pueden regular su expresión. Esto se debe mediante a la activación de la transcripción génica a partir de la unión a un factor genómico denominado elemento de respuesta al estrógeno (ERE), ya sea con la formación de un dímero o un heterodímero y sus respectivos coactivadores (Saito & Cui, 2018). Con esta unión ocurre una translocación al núcleo y directamente reclutan a los receptores relacionados con los ERE con los genes específicos; sin embargo, las señales de los estrógenos son mediadas a través de cascadas de señalización iniciadas por ER desde el citosol. Se ha demostrado que en ratones hembra modificados genéticamente el α -ER tiene la capacidad de unirse a ERE, que les trajo como consecuencia infertilidad y algunas anomalías en el aparato reproductor. Una probable vía de señalización de α -ER para ejercer su acción es iniciada en la membrana mediante la activación de PI3K / Akt. El estradiol activa la vía PI3K / Akt en los núcleos hipotalámicos (Saito & Cui, 2018). Los subtipos α -ER y β -ER muestran patrones de expresión diferencial y pueden inducir efectos similares, específicos o incluso opuestos en expresión génica y tienen funciones fisiológicas parcialmente diferentes (Mattson & Brunstroém, 2017). Por ejemplo, se sabe que las acciones neuroprotectoras de los estrógenos se modulan mediante la activación de α -ER (Dubal *et al.*, 2001; McCullough *et al.*, 2003). Sin embargo, en este estudio, en el caso de los organismos FEM, el tratamiento con 17 α -etinil estradiol estimulo la presencia de ambos receptores α y β en tejido cerebral de tilapia en todas las edades. Con lo cual podemos asumir que en que los ER funcionan como factores de transcripción que están involucrados con la regulación de la sobrevivencia celular por medio de la activación del α -ER, o hacia la vía de la muerte por apoptosis mediante la presencia del β -ER en el tejido cerebral en las etapas tempranas de desarrollo para estos organismos; en este sentido podemos sospechar que estos cambios están regulados por otro factor de transcripción génica como lo es el FOX-L2 que se encarga de la diferenciación del ovario, síntesis de hormonas femeninas que se activa en el desarrollo

fetal y neonatal, sino que, además, bloquea la expresión de los genes masculinos en la gónada en desarrollo, que se ha reportado su activación en peces teleósteos al día 5 post eclosión, con lo cual también este gen es el responsable de liberar a la enzima *cyp11a1* la cual es responsable de la síntesis de la hormona $17\text{-}\beta$ estradiol, la cual se ha reportado una elevada expresión génica al día 6 días post-eclosión lo cual coincide con la expresión de FOX-L2 el cual activa la transcripción de la enzima *cyp11a1* (Yan *et al.*, 2012). Esta transcripción es responsable de la esteroideogénesis de E2 mediante la enzima *cyp11a1*, $3\text{-}\beta$ hidroxil-delta-5-esteroide deshidrogenasa (*hsd3b*), *cyp17a1*, y la $17\text{-}\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (*hsd17b1*), lo que sugiere el papel fundamental del estrógeno durante la diferenciación ovárica de la tilapia del Nilo. En gónadas masculinas indiferenciadas, el factor de transcripción *Dmrt-1* que es el encargado de diferencias a las células de Leydig y las de Sertolí quien esta encargada de determinar el fenotipo masculino, este último factor mostró una expresión génica dominante después del día 6 post eclosión. Sin embargo, la expresión de ARNm de *cyp11c1*, una enzima responsable de la síntesis de 11-cetotestosterona (11-KT) se detectó en las gónadas masculinas hasta el día 35 post eclosión. Estos resultados evidencian que 11-KT no es esencial para iniciar la diferenciación testicular. Por lo tanto, existe una especificidad del sexo para las hembras la activación del factor de transcripción por medio de la expresión de *foxl2* y *cyp19a1a* en gónadas femeninas y para el fenotipo masculino la activación del factor de transcripción *Dmrt-1* en gónadas masculinas durante el período de 5 a 6 días post eclosión respectivamente; este evento es crítico para la diferenciación de las gónadas a los ovarios o testículos en la tilapia del Nilo. Sin embargo, los factores que desencadenan la expresión del dimorfismo sexual de estos genes son desconocida en estos organismos (Yan *et al.*, 2012). En contraste, en los mamíferos, el factor principal que estimula la expresión del gen *cyp19a1a* y la actividad enzimática son dependientes de la FSH. Aunque la relación entre los GTH (particularmente FSH) y la aromatasa no ha sido clara en los peces, la posibilidad en este sentido es que la expresión de GTH en la hipófisis aumente en el fenotipo femenino después de 5 días post eclosión y el aumento de la activación génica de *cyp19a1a* en la gónada de tilapia del Nilo a los 6 días post eclosión no puede ser excluidos de este proceso. Además, es necesario hacer énfasis en los estudios de las gonadotropinas pituitarias que son necesarias para la normalizar la función del desarrollo gonadal en las especies acuáticas.

Se ha reportado que las hormonas esteroideas son un poderoso agente neuroprotector en el sistema nervioso central, que protegen a las células neuronales de la muerte celular por

apoptosis (Gu *et al.*, 2010). En este estudio observamos que las células neuronales de tilapia del Nilo presentan un incremento en la expresión de Bcl-2 en los organismos MAS en los días 6, 7 y 10 de edad (post tratamiento) con 17α - metil-testosterona en comparación a los FEM y los CTRL; mientras que la expresión de Bax disminuyó, así como de las caspasas efectoras 9 y 3 en estos organismos en todos los tiempos de medición. Lo cual indica que el tratamiento con 17α - metil-testosterona protege a estas células neuronales de la apoptosis. En algunos estudios basados en citometría de flujo han demostrado que el tratamiento con esteroides protege a las células del hipocampo y células corticales de los procesos degenerativos y apoptóticos inducidos por estrés oxidativo o citotoxicidad (Pabon *et al.*, 2014; Brann *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que las hormonas esteroides suprimen la fosforilación de las quinasas c-JUN durante el daño neuronal y en la misma medida disminuyen la expresión de los genes Bax y caspasa 3, mientras que aumentan la expresión de Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2009).

Bcl-2 y Bax son los dos miembros más importantes en la regulación de la apoptosis, por un lado, Bax puede promover la apoptosis celular mediante su translocación a la membrana mitocondrial permitiendo un aumento en la permeabilidad mitocondrial (Liang *et al.*, 2014) (Li *et al.*, 2013). En condiciones normales, Bax que presenta dos subtipos (Bax α y Bax β) se encuentra en forma de monómero inactivo unido a la membrana mitocondrial externa (MME) o en el citoplasma celular. Durante la apoptosis, Bax se reubica e inserta en la MME para oligomerizar homodímeros y formar poros, permitiendo la liberación de los factores pro apoptóticos como el citocromo C (Renault *et al.*, 2013). El desequilibrio entre las proteínas anti-y pro-apoptóticas Bcl-2 y Bax aumenta la permeabilidad de MME; al permitir la movilización y la formación de dímeros y oligómeros de Bax en la mitocondria, así como la formación de poros lo que aumenta la permeabilidad mitocondrial y la salida de otras proteínas proapoptóticas, como citocromo C (Li *et al.*, 2013). Una vez que está en el citosol, el citocromo C se une al factor activador de apoptosis 1 (Apaf-1) (Kim *et al.*, 2008) y en presencia de dATP, Apaf-1 luego se oligomeriza en complejos heptaméricos que reclutan y activan a la caspasa 9, y a su vez activar a la caspasa 3 e iniciar la cascada proteolítica final de la apoptosis (Wurstle *et al.*, 2012).

En los estudios de Luzio *et al.* (2016) acerca de la determinación del sexo del pez cebra (*Danio rerio*) tratados con las hormonas a 17-etinilestradiol con una dosis 4 ng / L y fradozol un compuesto inhibidor de la aromatasa a una dosis de 50 g / L durante 35 días

post fertilización, se les se realizó un análisis de expresión génica qPCR; evaluaron los genes y proteínas de los receptores de muerte FAS y TRADD, anti apoptóticos como el caso de BCL-2 y MDM2, pro apoptóticos Caspasa 2 y 6 y se verificó la proliferación celular con los marcadores BIRC5 y JUN; estos organismos presentaron una inhibición de la apoptosis en los organismos femeninos mediante la participación de vías anti apoptóticas, mientras que en los organismos masculinos la apoptosis parecía ser crucial para el desarrollo del ovario en edades juveniles además de delimitación de las estructuras testiculares, además se demostró que la proteína JUN fue necesaria en los ovarios juveniles, mientras que la proteína BIRC5 parecía estar involucrada en la espermatogénesis del pez Cebra. Ambos tratamientos con EE2 y Fradozol, aumentaron el estímulo de apoptosis en la gónada de pez Cebra. Se observó que los pocos organismos femeninos presentaban resistencia a la reversión sexual inducida por el tratamiento con Fradozol ya que estos habían aumentado los niveles de las proteínas anti apoptóticas, mientras que los organismos masculinos con el tratamiento con la EE2 mostraron un aumento con la expresión de los genes y las proteínas pro apoptóticas. En general, estos hallazgos muestran que las vías de apoptosis están involucradas en la diferenciación de pez Cebra y que los disruptores endocrinos pueden interrumpir este proceso.

Nuestros resultados correspondientes a los organismos FEM presentaron una mayor actividad de los marcadores de muerte por apoptosis donde Bax se aumenta entre los días 6, 7 y 10 de medición con un sucesivo aumento en la presencia de las Caspasa 9 en el día 6 y de Caspasa 3 a los días 6, también se presenta un incremento en la expresión de ambos ER α y β a los días 6 y 7 respectivamente, acompañados de una disminución de la expresión de Bcl-2 en estos dos tiempos de medición. En contraste a esto en los estudios de Luzio *et al.* (2016) en el pez Cebra ellos reportaron que, durante la diferenciación masculina, este proceso implica una mayor cantidad de factores pro apoptóticos en comparación a la diferenciación femenina debido a que se aumenta significativamente la actividad de las proteínas anti apoptóticas MDM2 y BCL-2, independientemente de la exposición a EE2 o Fradozol. De hecho, informes anteriores han demostrado la aparición de actividad anti apoptótica en el ovario de pez Cebra (Pradhan *et al.*, 2012). El MDM2 es uno de los dos principales reguladores negativos de p53 (Bose & Ghosh, 2007; Wade *et al.*, 2013), que es un factor transcripcional regulador de los genes involucrados en la inducción de apoptosis en la vía intrínseca (Haupt *et al.*, 2003; Ostrakhovitch & Cherian, 2005). Esta proteína está presente principalmente en el citosol (Wade *et al.*, 2010). En relación con BCL-2, esta proteína es prominente en la

membrana nuclear, más específicamente en la membrana externa, esta proteína también se ha asociado a la inhibición de la función p53 (Froesch *et al.*, 1999), lo que refuerza que tanto MDM2 como BCL-2 suprimen la apoptosis en las hembras de pez cebra a través de la vía p53 (Luzio *et al.*, 2016).

En los experimentos conducidos por Lei *et al.* (2017) observaron que al modificar algunos genes como el *eftud 2* en el pez Cebra durante el desarrollo temprano del SNC, la proteína p53 contribuyó en el proceso de apoptosis observado en esta etapa. El aumento en la tasa de apoptosis en algunas regiones cerebrales durante el desarrollo temprano del pez Cebra también se observó cuando se utilizaron xenoestrogenos con el fin de estudiar la activación de Pkc (Hrubik *et al.*, 2016). Estos autores, también reportan un incremento en la expresión de genes pro apoptóticos como Caspasa 9 y PUMA. Se sabe que PUMA está regulado por p53, cuya expresión aumenta rápidamente durante el estrés provocado por sustancias genotóxicas y conduce a la apoptosis (Yu & Zhang, 2008; (Zhou *et al.*, 2015). Sin embargo, en este estudio no se observaron cambios relacionados con la expresión de p53.

Además, se ha reportado que el tratamiento con E2 a la tilapia masculina provocó un incremento rápido de los niveles transcripcionales de la expresión ARNm de las tres isoformas de vitelogenina junto con un aumento en, pero no del β -ER, lo que sugiere que α -ER puede estar involucrado principalmente en la inducción de vitelogénesis en esta especie. En teleosteos, ambos receptores α -ER y β -ER se expresan ampliamente en tejidos masculinos y femeninos, y su expresión varía mucho entre los tejidos, el sexo y la especie en que se estudia (Nagler *et al.*, 2007). En la tilapia de Mozambique, la expresión de transcripciones α -ER y β -ER en el hígado y el cerebro varían con la temperatura, la etapa de desarrollo y la exposición a los tratamientos hormonales, lo que sugiere que estos dos receptores poseen un papel esencial en la diferenciación sexual y la vitelogénesis (Davis *et al.*, 2007). Otro efecto es que durante la vitelogénesis el tratamiento hormonal con EE2 se establecen las condiciones para que funcione el eje GH / IGF-I en peces machos de una manera similar a la de las hembras, lo cual se puede establecer como un evento base en estos peces para determinar la base del dimorfismo dependiendo del género que se estudie (Davies *et al.*, 2008).

En los estudios realizados por Koganti *et al.* (2017) en donde administraron 17- β estradiol para provocar hipertrofia muscular en la trucha arcoíris determinaron que a 24 hora después del tratamiento, dicha hormona tiene un efecto regulador en

diferentes factores de transcripción de proliferación dentro de los cuales se incluyen incluyendo OCT4, SOX2 y KLF4; dentro de los cuales es para nuestro interés la actividad de SOX2 también SRY determinante del fenotipo masculino.

Efecto de los tratamientos hormonales sobre la talla de *Oreochromis niloticus*

Los resultados indican que de la hormona 17- α metiltestosterona presenta un efecto positivo para los organismos MAS en el aumento de las medidas morfométricas en comparación a los organismos CTRL y los FEM, lo cual en una producción acuícola reflejaría un aumento en el rendimiento de los cultivos de Tilapia del Nilo, manteniendo la uniformidad de las tallas de los organismos masculinizados. Los resultados de Vienne *et al.* (2017) concuerdan con estos resultados y sustentan que el comportamiento morfométrico ratifica la relación con la tasa de crecimiento, dependiendo de la línea genética. El dimorfismo sexual que estas especies de peces teleósteos indican una mayor respuesta en el crecimiento del fenotipo masculino, en organismos masculinizados con fenotipo y genotipo XX en comparación a otras especies de la misma familia de los peces teleósteos como el caso del pez Platija (Kobelkosky, 2004), Tilapia Mozambica y/o la Tilapia Roja dependiendo mucho de las condiciones ambientales en las que se encuentre la cría de los organismos (dos Santos *et al.*, 2013).

Los estudios realizados por López *et al.* (2016) quienes evaluaron 5 generaciones de Tilapia del Nilo muestran que por cada generación había un aumento en la tasa de crecimiento del 4%, lo que mejoró notablemente la ganancia diaria de peso. Lo cual ofrece un mayor rendimiento de la talla de estos organismos ofreciendo un mayor rendimiento en el filete obtenido. Nebo *et al.* (2013) reportaron hallazgos en cuanto a la morfometría de las fibras musculares de estos organismos que indicaban una elevación del anabolismo reflejado en la hipertrofia muscular de los peces tratados con hormonas androgénicas en la etapa juvenil alrededor de los 10 a 15 días de edad posteriores al tratamiento hormonal. Además, se observó un aumento en el diámetro de las fibras musculares entre 30 y 40 μm de diámetro en los organismos estudiados. Se ha reportado que, en algunas especies acuáticas como la trucha arcoíris y algunas especies de salmónidos, el músculo representa más del 50% del total del individuo, lo cual exhibe un crecimiento indeterminado en comparación a otros organismos vertebrados (Koganti *et al.*, 2016). Además, el tejido muscular de los peces alberga algunos receptores hormonales capaces de inducir señales celulares encargadas de presentar modificaciones en el metabolismo muscular, como es el caso del receptores estrogénicos alfa y beta que

se activan por la presencia de hormonas esteroides (Nagler *et al.*, 2007). Por otro lado, los organismos FEM presentaron un retraso en el crecimiento; estudios previos afirman que la presencia de 17- β estradiol aumenta considerablemente la maduración sexual en ciertas especies acuáticas como los salmónidos y la trucha arcoíris, conduciendo a un incremento de los procesos metabólicos de alta demanda energética durante el desarrollo folicular (Lubzens *et al.*, 2010); trayendo consigo un aumento del contenido de agua en músculo, reducción de la calidad muscular (Davidson *et al.*, 2014) y aumento en la degradación de proteína muscular (Cleveland & Weber, 2011). También se ha observado disminución en los niveles del factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1) (Hanson *et al.*, 2014), a diferencia de las especies de roedores, bovinos y porcinos en las que los estrógenos tienen efectos anabólicos (Kamanga-Sollo *et al.*, 2010). Los estrógenos ejercen un efecto catabólico ya que reducen la sensibilidad hepática para su síntesis, promueven la señalización hacia los factores liberadores de la gonadotropina (GH), y disminuyen la producción de IGF-1 (Norbeck & Sheridan, 2011; Lerner *et al.*, 2012).

En algunos peces la presencia de la hormona 17- β estradiol y los andrógenos, presentan un impacto negativo y positivo respectivamente conforme a los genes involucrados en el crecimiento corporal (Hanson *et al.*, 2014), estos efectos son principalmente relacionados con su señalización hacia GH y a su vez con IGF-1 inducida por los mecanismos proteolíticos de los estrógenos en músculo (Lerner *et al.*, 2012). Aunque la producción de esteroides sexuales aumenta significativamente durante la maduración sexual, los peces pueden estar expuestos a esteroides naturales o sintéticos en la edad juvenil; el aumento de éstos durante la maduración sexual contribuye a la distribución de las reservas energéticas y nutrientes para el desarrollo corporal y gonadal (Cleveland *et al.*, 2015). Existe la posibilidad de un incremento de la degradación de proteínas musculares en los peces tratados con estrógenos (Cleveland & Weber, 2011) ya que aumentaron la disponibilidad de aminoácidos durante la exposición hormonal; mientras que con el tratamiento con andrógenos, los procesos anabólicos de regulación son positivos ya que ayudan a conservar la proteína muscular, además de que regulan positivamente la expresión de IGF-1, IGF-2 y IGF-5 en el músculo de los peces (Bower & Johnston, 2010).

Se ha demostrado un aumento en la expresión del α -ER en los circuitos gustativos del cerebro en el pez, los cuales son claves en el control de la ingesta de alimentos, lo que sugiere que los compuestos de estrógenos podrían regular el comportamiento de

alimentación en los peces y explicar parcialmente la anorexia observada en varias especies, incluida la lubina, durante el período reproductivo tardío (Cerdá'-Reverter *et al.*, 1999). Esto probablemente también estaría relacionado con diferencias estacionales o sexuales en la selección de macronutrientes o ritmos estacionales de la actividad de alimentación nocturna *versus* diurna en peces como la lubina (Sánchez- Vázquez *et al.*, 1998; Muriach *et al.*, 2008).

X. Conclusión

Ambos tratamientos hormonales producen apoptosis para poder delimitar la diferenciación sexual cerebral de los fenotipos masculinos y femeninos. Los hallazgos de nuestros resultados sustentan que para los organismos MAS el proceso de apoptosis depende de la activación del β -ER. Por otra parte, el α -ER aumenta la activación del mensajero de Bax, lo que detalla que la muerte por apoptosis está implícita en la formación de este fenotipo cuando se realiza la reversión sexual en la tilapia del Nilo con la hormona 17- α . Metilttestosterona. Mientras que para los organismos FEM, el α -ER regula a la vía extrínseca de la apoptosis regulando a Fas, L/Fas y Caspasa 9, mientras que en la vía intrínseca regula la actividad de Bax. El β -ER en los FEM regula a Fas y Caspasa 9 en la vía extrínseca, mientras que en la vía intrínseca se estimula la regulación tanto de Bcl-2 como de Bax, con lo que podemos asumir que el tratamiento con la 17 - α etinil estradiol aumenta la apoptosis en los periodos críticos de la diferenciación sexual cerebral en la tilapia de Nilo en los organismos FEM entre los días 6 y 10, mientras que para los MAS el periodo crítico de la diferenciación sexual se da entre los días 7 y 15.

XI. Literatura Citada

1. Abucay, J.S., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., and Beardmore, J.A. 1999. Environmental sex determination: the effect of temperatura and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*: 173:219–234.
2. Alonso, S.R., Abreu, P., Leopez-Coviella, I., Hernandez, G., and Fajardo, N. 1996. Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: A transynaptic view. *Cell Mol Neurobiol*: 3:357–382.
3. Anderson, J.L., Rodríguez M. A., Braasch, I., Amores, A., Hohenlohe, P., Batzel, P., and Postlethwait, J.H. 2012. Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics. *PLoS One* 7: e40701.
4. Aravindakshan, J., Gregory, M., Marcogliese, D. J., Fournier, M., and Cyr D. G. 2004. Consumption of Xenoestrogen-Contaminated Fish during Lactation Alters Adult Male Reproductive Function. *Toxicological Sciences*: 81: 179–189.
5. Bao, L., Su, Z., Hui, Z., Jie, Z., Qianqian, H. Xinchun, Ye., and Guiyun, C. 2015. Neuroprotective Effects of 17 β -Estradiol against Thrombin-Induced Apoptosis in Primary Cultured Cortical Neurons. *Pharmacology*: 96:284–289.
6. Baroiller, J.F. 2009. Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*: 153:30–38.
7. Beardmore, J.A., Mair, G.C., and Lewis, R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*:197: 283-301.
8. Beckerman, R., and Prives, C. 2010. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*: 2: a000935
9. Bellott, D.W., Skaletsky, H., Pyntikova, T., Mardis, E. R., Graves, T. 2010. Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition. *Nature*: 466: 612–616.
10. Bergamaschi, D. et al. 2006. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet*: 38: 1133–1141.
11. Bergero, R., and Charlesworth, D. 2009. The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends Ecol. Evol*: 24: 94–102.

12. Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., and Zhao, L. P. 2000 The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*: 403: 909–913.
13. Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010. Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*: 298(6): R1615-R1626.
14. Brann, D., Raz, L., Wang, R., Vadlamudi, R., and Zhang, Q. 2012. Oestrogen signalling and neuroprotection in cerebral ischaemia. *J Neuroendocrinol*: 24: 34–47.
15. Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., and Wood, E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 79:305–14.
16. Casper, A., and Van Doren, M. 2006. The control of sexual identity in the *Drosophila* germline. *Development*: 133: 2783 -2791.
17. Chan, W.Y., and Rennert, O.M. 2002. Molecular aspects of sex differentiation. *Current Molecular Medicine*: 2: 25–37.
18. Chang, J.C.H., Wu, S.M., Tseng, Y.C., Lee, O., Baba, P.P., and Hwang, Y.C. 2007. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. *J. Exp. Biol*: 210: 3494-3504.
19. Cleveland, B.M., and Weber, G.M. 2011. Effects of sex steroids on indices of protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) white muscle. *General and comparative endocrinology*, 174(2): 132-142.
20. Cleveland, B.M., and Weber, G.M. 2015. Effects of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*, 216: 103-115.
21. Cline, T.W., and Meyer, B.J. 1996. Vive la difference: males vs females in flies vs worms. *Annu. Rev. Genet*: 30: 637-702.
22. Cnaani, A. et al. 2008. Genetics of sex determination in tilapiine species. *Sex. Dev*: 2: 43–54.
23. Cnaani, A., and Levavi-Sivan, B. 2009. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. *Sex Dev*: 3: 164–175.
24. Cnaani, A., and Thomas, D. K. 2008. Sex-linked markers and microsatellite locus duplication in the cichlid species *Oreochromis tanganyicae*. *Biol. Lett*: 4: 700–703.

25. Cnaani, A., Lee, B. Y., Ozouf-Costaz, C., Bonillo, C., Baroiller, F. 2007. Mapping of Sox2 and Sox14 in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Sex Dev*: 1: 207–210.
26. Cnaani, A., Zilberman, N., Tinman, S., Hulata, G. & Ron, M. 2004. Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F-2 tilapia hybrid. *Mol. Genet. Genomics*: 272: 162–172.
27. Coe, T.S., Soffker, M.K., Filby, A.L., Hodgson, D., and Tyler, C.R. 2010. Impacts of early life exposure to estrogen on subsequent breeding behavior and reproductive success in zebrafish. *Environ Sci Technol*: 44:6481–7.
28. Cooke, B., Hegstrom, C.D., Villeneuve, L.S. and Breedlove, S.M. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol*: 19: 323–362.
29. Cutting, A., Chue, J., and Smith, C.A. 2013. Just how conserved is vertebrate sex determination? *Dev Dyn*: 242:380–387.
30. Davidson, J. et al., 2014. Growth performance, fillet quality, and reproductive maturity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured to 5 kilograms within freshwater recirculating systems. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 5(4): 1.
31. Devlin, R.H., and Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*: 208:191–364.
32. Döhler, K., Hines, M., Coquelin, A., Davies, F., Shryne, J., Sickmoler, P., Jarzab, B. and Gorski, R. 1986. Pre and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology*. 42: 443 – 448.
33. Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., Wise, P.M. 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*: 19:6385–6393.
34. Dubal, D.B., Zhu, H., and Yu, J. 2001. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*: 98: 1952–1957.
35. Ellegren, H. 2011. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat. Rev. Genet*: 12: 157–166.
36. Erskine, M.S., Tobet, S.A., and Baum, M.J. 1988. Effect of birth on plasma testosterone, brain aromatase activity, and hypothalamic estradiol in male and female ferrets. *Endocrinology*: 122:524-30.

37. Eshel, O., Shirak, A., Weller, J. I., Hulata, G. and Ron, M. 2012. Linkage and Physical Mapping of Sex Region on LG23 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) G3 Journal: 2: 35- 42.
38. Eshel, O., Shirak, A., Weller, J. I., Slossman, T., Hulata, G. 2010. Finemapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Anim. Genet: 42: 222–224.
39. FAO, Fisheries and Aquaculture Department. 2014. FishStat database. Available: <http://faostat.fao.org/site/629/default.aspx>. [[ftp://ftp.fao.org/FI/ STAT/summary/b-1.pdf](ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/b-1.pdf)]
40. FAO. 2000. Fishstat Plus. Version 2.0 Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>.
41. FAO. 2006. Proyecto de evaluación alianza para el campo. FAO. 73p.
42. Farmer, J.L., and Edward, F. O. Creating Females? Developmental Effects of 17_ - Ethynylestradiol on the Mangrove Rivulus' Ovotestis Integrative and Comparative Biology:52 (6): 769–780.
43. Fleming, A., and Vilain, E. 2004. The endless quest for sex determination genes. Clinical Genetics: 67: 15–25.
44. Gale, W.L., Fitzpatrick, M.S., Lucero, M., Contreras-Sánchez, W.M., and Schreck, B.C.1999. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
45. Gilling, C. J., Skibinski, D. O. F., & Beardmore, J. A. 1996. Sex Reversal of Tilapia Fry by Immersion in wáter containing estrogens. Aquaculture. ICLARM: 41: 314 – 319.
46. Gilling, C., Skibinski, D., and Beardmore, J., 1996. Sex reversal of tilapia fry by immersion in water containing oestrogens, The Third Int. symposium on Tilapia in Aquaculture. Manila, Philippines, pp. 314-319.
47. Godwin, J. 2010. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. Front Neuroendocrinol: 31:203–216.
48. Goy, R.W., and McEwen, B.S. 1980. Sexual Differentiation of the Brain. MIT Press, Cambridge.
49. Green, B.N.W., Veverica, K.L., and Fitzpatrick, M.S. 1997. Fry and fingerlings production. In: Eгна H, Boyd C (Eds.), Dynamics of Pond Aquaculture, CRC Press, Boca Raton, Florida: 215-243.

50. Gu, Y., Xi, G., Liu, W., Keep, R.F., and Hua, Y. 2010. Estrogen reduces iron-mediated brain edema and neuronal death. *Acta Neurochir Suppl*: 106: 159–162.
51. Guiguen, Y., Barioller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., and Fostier, A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev*: 54: 154–162.
52. Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., and Chang, C.F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol*: 165(3):352–366.
53. Hanson, A.M., Kittilson, J.D., Martin, L.E., and Sheridan, M.A., 2014. Environmental estrogens inhibit growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by modulating the growth hormone-insulin-like growth factor system. *General and comparative endocrinology*, 196: 130-138.
54. Herrera, G.H., Vergara, O.M., Rosado-García, A., and Rosales, T. A. 2005. Diferenciación sexual en el sistema nervioso central. *Vet Méx*: 36:339-360.
55. Hines, G.N., Boots, L.R., Wibbels, T. and Watts, S.A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cyprinoidei). *General Comparative Endocrinology*: 114: 235-248.
56. Horn, H.F., and Vousden, K.H. 2007. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*: 26: 1306–1316.
57. Hrubik, J., Glisic, B., Samardzija, D., Stanic, B., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., and Andric, N. 2016. Effect of PMA-induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*: 190: 24–31.
58. Ijiri, S., H., Kaneko, T., Kobayashi, D. S., Wang, F., and Sakai, S. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod*: 78: 333–341.
59. INECC. 2009. Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, p, 22.
60. Irene, M., Ghobrial, M.D., Thomas, E., Witzig, M.D., Alex, A., and Adjei, M.D. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin*: 55:178 –194.)
61. Irie, S., Li, Y., and Kanki, H. 2001. Identification of two Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) promoters in human cancer cells. *DNA Seq*: 11:519 –526.

62. Jobling, S., and Tyler, C. R. 2003. Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. *Parasitology*: 126: S103–S108.
63. Kamanga-Sollo, E., White, M., Hathaway, M., Weber, W., and Dayton, W. 2010. Effect of estradiol-17 β on protein synthesis and degradation rates in fused bovine satellite cell cultures. *Domestic animal endocrinology*: 39(1): 54-62.
64. Kazeto, Y., Ijiri, S., Place, A.R., Zohar, Y., and Trant, J.M. 2001. The 5'- flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*: 288:503–8.
65. Kim, H.E., Jiang, X., Du, F., and Wang, X. 2008. PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1. *Mol Cell*: 30:239– 247.
66. Kimelberg, H., Feurstel, P., Jin, Y., Paquette, J., Boulos, A., Keller, R.W. and Trammer, B.I. 2000. Acute treatment with tamoxifen reduces ischemic damage following middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport*: 11:2675–2679.
67. Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Abe, S.I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Mol Endocrinol*: 23:167–76.
68. Kitano, T., Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Koyanagi, T., and Abe, S.I. 2007. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and muüllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev*: 74:1171–7.
69. Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, H. 2000. Differential expresión of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech Dev*: 99:139–142.
70. Kobelkowsky, A. 2004. Sexual dimorphism of the flounder *Bothus robinsi* (Pisces: Bothidae). *Journal of morphology*: 260(2): 165-171.
71. Koganti, P.P. et al., 2017. Estradiol regulates expression of miRNAs associated with myogenesis in rainbow trout. *Molecular and cellular endocrinology*, 443: 1-14.
72. Koopman, P. 2001. Sry, Sox9 and mammalian sex determination. In *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*, pp 25–56. Eds G Scherer & M Schmid. Basel: Birkhäuser Verlag.

73. Kosatsky, T., Przybysz, R., Shatenstein, B., Weber, J. P., and Armstrong, B. 1999. Fish consumption and contaminant exposure among Montreal-area sportfishers: Pilot study. *Environ. Res*: 80: S150–S158.
74. Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*: 407: 789–795.
75. Kumar, R.S., and Trant, J.M. 2001. Piscine glycoprotein hormone gonadotropin and thyrotropin receptors: a review of recent developments. *Comp Biochem Physiol B*: 129:347–355.
76. Kwon, B.J., McAndrew, D.J., and Penman, D. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Mol. Reprod. Dev*: 59: 359– 370.
77. Landowski, T.H., Moscinski, L., Burke, R. 2001. CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma*:42: 835– 846.
78. Lee, B.Y., Hulata, G., and Kocher, T. D. 2004. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*: 92: 543–549.
79. Lee, B.Y., Penman, D. J. and Kocher, T. D. 2003. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Anim. Genet*: 34: 379–383.
80. Lee, Y.M., Seo, J.S., Kim, I.C., Yoon, Y.D., and Lee, J.S. 2006. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochem Biophys Res Commun*: 345:894–903.
81. Lei, L., Shou-Yu, Y., Ran, Y., Jia-Yu, C., Yumei, L., Ye, B., Nannan, C., Qinchao, Z., Xiaojun, Z., Chuan-Yun, L. and Jing-Wei, X. 2017. Spliceosomal protein *eftud2* mutation leads to p53-dependent apoptosis in zebrafish neural progenitors. *Nucleic Acids Research*: 45: 63422–3436.
82. Lerner, D.T., Sheridan, M.A., and McCormick, S.D. 2012. Estrogenic compounds decrease growth hormone receptor abundance and alter osmoregulation in Atlantic salmon. *General and comparative endocrinology*, 179(2): 196-204.
83. Li, H., Baoying, W., Chunhui, Z., Yan, F., Shaolan, W., Muhammad, S., Chenghu, H., Mingshu, M., Fangying, D., and Xiaorui, Y. 2013. 17 β -Estradiol Impedes Bax-Involved Mitochondrial Apoptosis of Retinal Nerve Cells Induced by Oxidative

- Damage via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signal Pathway. *J Mol Neurosci*: 50:482–493.
84. Li, T., Kon, N., Jiang, L., et al. 2012. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*: 149:1269–1283.
 85. Liang, K., Ye, Y., Wang, Y., Zhang, J., and Li, C. 2014. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3k/Akt signaling pathway. *J Neurol Sci*: 344: 100–104.
 86. Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell*: 44:517–531.
 87. Loffler, K.A., and Koopman, P. 2002. Charting the course of ovarian development in vertebrates. *Inter J of Develop Biol*: 46: 503–510.
 88. Lopes, C.A., Pereira, R. Grazyella, M., Yoshida, N., Miwa, K., Soriani, R., Sheila, N., de Oliveira, A., dos Santos, I., and Nguyen, H. Correlated changes in body shape after five generations of selection to improve growth rate in a breeding program for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Brazil *J Appl Genetics*:
 89. Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., and Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3): 367-389.
 90. Mair, G.C., Abucay, J.S., Skibinski, D.F., and Beardmore, J.A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*:54: 396-404.
 91. Mancini, M., Nicholson, D.W., and Roy, S. 1998 The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*: 140:1485–1495.
 92. Mank, J.E., Promislow, D.E.L., Avise, J.C. 2006. Evolution of alternative sexdetermining mechanisms in teleost fishes. *Biol J Linn Soc Lond*: 87: 83–93.
 93. Marchand, O., Govoroun, M., D’Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J.J., Bernot, A., Laudet, V., and Guiguen, Y. 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta*: 1493:180–7.
 94. Marshall-Graves, J.A. 2000. Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis – a feminist view. *Biol of Reprod*: 63:667–676.

95. Matthews, J., and Gustafsson, J.A. 2003. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Intervent*: 3:281–92.
96. Mattsson, A., Brunström, B. 2017. Effects of selective and combined activation of estrogen receptor α and β on reproductive organ development and sexual behaviour in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *PLoS One*:12(7): e0180548.
97. Mayer, A., Mosler, G., Just, W., Pilgrim, C. and Reisert, I. 2000. Developmental profile of Sry transcripts in mouse brain. *Neurogenetics*: 3: 25–30.
98. McCarthy, M. 2013. Sexual Differentiation of the Brain in Man and Animals: Of Relevance to Klinefelter Syndrome? *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)*: 163C:3–15.
99. McCullough, L.D., Blizzard, K., Simpson, E.R., Oz, O.K., and Hurn, P.D. 2003. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J. Neurosci*: 23: 8701–8705.
100. Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., and Pakdel, F. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod*: 66:1881–92.
101. Mittwoch, U. 2000. Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Gen & Metab*: 71: 405–410.
102. Mittwoch, U., 2006. Sex is a threshold dichotomy mimicking a single gene effect. *Trends Genet*. 22: 96–100.
103. Mor, G., Kohen, F., García-Velasco, J., Nilsen, J., Brown, W., and Naftolin, F. 2000. Regulation of Fas Ligand expression in breast cancer cells by estrogen: Functional differences between estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 73:185-194.
104. Morelli, M.A., and Cohen, P.E. 2005. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reprod*: 130: 761–781.
105. Muriach, M., Bosch-Morell, F., Arnal, E., Alexander, G., Blomhoff, R., and Romero, F.J. 2008. Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells in vivo and in vitro. *J Physiol Biochem*: 64(2):149-57.
106. Nagata, S. 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*: 36(1): 489–517.

107. Nagler, J.J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D.G., and Rexroad, C. 2007. The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ER α 2 and both ER β isoforms. *Gene*, 392(1): 164-173.
108. Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., and Nagahama, Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J Exp Zool*: 281:362–372.
109. Nash, J.P., Kime, D.E., Vand der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., and Tyler, C.R. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish, en: *Environmental Health Perspectives*: 112: 1725-1733.
110. Nebo, C. et al., 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*: 164(4): 268-274.
111. Nielsen, J., Mor, G., and Naftolin, F. 2000. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol*: 43:64-78.
112. Norbeck, L.A., and Sheridan, M.A. 2011. An in vitro model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: effects of 17 β -estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*: 173(2): 270-280.
113. Orlando, E.F., Katsu, Y., Miyagawa, S., and Iguchi, T. 2006. Cloning and differential expression of ER- α , ER- β , aromatase- α , and aromatase- β in the brain, liver, and gonad of self-fertilizing hermaphroditic and male reproductive morphs of the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *J Mol Endocrinol*: 37:353–65.
114. Pabon, M., Tamboli, C., Tamboli, S., Acosta, S., De La Pena, I., Sanberg, P.R., Tajiri, N., Kaneko, and, Borlongan, C.V. 2014. Estrogen replacement therapy for stroke. *Cell Med*: 6: 111–122.
115. Park, S.Y., and Jameson, J.L. 2005. Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinol*: 146: 1035–1042.
116. Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., and Kah, O. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen Compar Endocrinol*: 142:60–6.

117. Que'rat B. 1994. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates In: KG, Davey, RE, Peter, Tobe SS (eds.), Perspectives in Comparative Endocrinology. Ottawa: National Research Council of Canada: 27–35.
118. Reed, J.C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol: 124:1– 6.
119. Reed, J.C. 1997. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. Semin Hematol: 34: 9 –19.
120. Renault, T.T., Teijido, O., Antonsson, B., Dejean, L.M., Manon, S. 2013. Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x (L): keep your friends close but your enemies closer. Int J Biochem Cell Biol 45:64–67.
121. Reverter, J.M., Sorbera, L.A., Carrillo, M., and Zanuy, S. 1999. Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). Am J Physiol: 277(6):1627-34.
122. Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C. and Bedecarra's, P. 2003. AMH/MIS: what we know about the gene, the protein and its regulation. Molecular and Cellular Endocrinology: 211: 21–31.
123. Ridha, M.T., and Lone, K.P. 1990. Effect of oral administration of different levels of 17alpha399 methyltestosterone on the sex reversal, growth and food conversion efficiency of the tilapia 400 *Oreochromis spilurus* (Günther) in brackish water, Aquac. Res: 21(4):391-397.
124. Roberts, E.K., Padmanabhan, V., and Lee, T.M. 2008. Differential Effects of Prenatal Testosterone Timing and Duration on Phenotypic and Behavioral Masculinization and Defeminization of Female Sheep. Biol Reprod: 79: 43–50.
125. Robinson, S.M., Fos, T.O., Dikkes, P., and Pearlstein, R.A. 1986. Sex differences on the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and suprachiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. Brain Res: 371: 380-384.
126. Rougeot, C., Krim, A., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P., and Melard, C. 2007. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Theriogenology: 67:1046–52.
127. Rougeot, C., Prignon, C., Kengne, C. V. N., and Melard, C. 2008. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture: 276: 205–208.

128. Samuels-Lev, Y. et al. 2001. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*: 8: 781–794.
129. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A., and Tabata, M. 1998. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol Behav*: 65(2):211-8.
130. Santos, V.B.D., Mareco, E.A., and Dal Pai Silva, M. 2013. Growth curves of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains cultivated at different temperatures. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35(3): 235-242.
131. Sawyer, S.J., Gerstner, K.A., and Callard, G.V. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen Compar Endocrinol*: 147:108–17.
132. Schafers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., and Segner, H. 2007. Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Toxicol Environ Health*: 70:768–79.
133. Scharl, M. 2004. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev*: 14: 634–641.
134. Scholz, S., and Klüver, N. 2009. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. *Sex Dev*: 3:136–151.
135. Scorrano, L., and Korsmeyer, S. 2003 Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*; 304: 437– 444.
136. Sharpe, R.M. 2004. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*: 20: 91–110.
137. Shirak, A., Palti, A., Cnaani, A., Korol, A., Hulata, G., Ron, M., and Avtalion, R.R. 2002. Association Between Loci With Deleterious Alleles and Distorted Sex Ratios in an Inbred Line of Tilapia (*Oreochromis aureus*). *The American Genetic Association*: 93:270-276.
138. Shirak, A., Seroussi, E., Cnaani, A., Howe, A.E., Domokhovsky, R., Zilberman, N., Kocher, T.D., Hulata, G. and Ron, M. 2006. Amh and Dmrt2 Genes Map to Tilapia (*Oreochromis spp.*) Linkage Group 23 Within Quantitative Trait Locus Regions for Sex Determination. *Genetics* 174: 1573–1581.

139. Simoni, M., Gromoll, J., and Nieschlag, E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*: 18:739–773.
140. Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., and Bulun, S.E. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Rev*: 15:342–55.
141. Soriano, M.E., and Scorrano, L. 2011. Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell* 145:15–17.
142. Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E., and Callard, G.V. 2001. Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 78:427–39.
143. Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*: 281: 1312–1316.
144. Tong, S.K., and Chung, B.C. 2003. Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 86:381–6.
145. Tong, S.K., Hsu, H.J., and Chung, B.C. 2010. Zebrafish monosex population reveals female dominance in sex determination and earliest events of gonad differentiation. *Dev Biol*: 344(2):849–856.
146. Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., and Place, A.R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*), *J. Exp. Zool*: 29: 290-302.
147. Tripathi, N., Hoffmann, M., Weigel, D., and Dreyer, C. 2009. Linkage analysis reveals the independent origin of Poeciliid sex chromosomes and a case of atypical sex inheritance in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Genetics*: 182:365–374.
148. Urbatzka, R., Lorenz, C., Lutz, I., and Kloas, W. 2010. Expression profiles of LHb, FSHb and their gonadal receptor mRNAs during sexual differentiation of *Xenopus laevis* tadpoles. *Gen Comp Endocrinol*: 168:239–244.
149. Vera-Cruz, E.M., and Mair, G.C. 1994. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*: 122:237-248.
150. Vera-Cruz, M.E., Mair, C.G., and Marino, P.R. 1996. Feminization of genotypically YY Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Asian Fisheries Science*: 9: 161-167.

151. Vienne, L.C., Oponda, B.S., Zubaida, S., and Basiao, U. 2017. Morphological Differences in Five Strains of Genetically Improved Nile Tilapia (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) Using Geometric Morphometrics. *J. ISSAAS*: 23 (1): 44-55.
152. Vilain, E. and McCabe, E.R. 1998. Mammalian sex determination: from gonads to brain. *Molecular Genetics and Metabolism*: 65: 74–84.
153. von Hofsten, J., Karlsson, J., Jones, I., and Olsson, P.E. 2002. Expression and regulation of Fushi Tarazu Factor-1 and steroidogenic genes during reproduction in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Biol Reprod*: 67:1297–304.
154. Vousden, K.H., and Prives, C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*:137(3):413-31.
155. Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*: 296:1635–1636.
156. Wang, H. and Tsang, B.K. 2007. Nodal signalling and apoptosis. *Reproduction*: 133: 847–853.
157. Wassermann, G.J., and Afonso, L.O. 2003. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research*: 34: 65–71.
158. Wilhelm, D., Palmer, S., and Koopman, P. 2007. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev*: 87: 1–28.
159. Wilson, C.A., and Davies, D.C. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*: 133: 331–359.
160. Wu, F.R., Zhang, X.Y., Zhang, W.L., Huang, B.F., Liu, Z.H., Hu, C.J., and Wang, D.S. 2009. Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*: 153:44–48.
161. Wurstle, M.L., Laussmann, M.A., and Rehm, M. 2012. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res*: 318:1213–1220.
162. Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., and Kitano, T. 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Commun*: 359: 935–940.
163. Yan, H., Ijiri, S., Wu, Q., Kobayashi, T., Li, S., Nakaseko, T., Adachi, S. and Nagahama, Y.2012. Expression Patterns of Gonadotropin Hormones and Their

- Receptors During Early mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J Endocrinol*: 194:223–41.
164. Yu, C., Yin, M. Yang, R., and Mark, N. 2013. MEK1/2 Inhibition Suppresses Tamoxifen Toxicity on CNS Glial Progenitor Cells. *The Journal of Neuroscience*: 38:15069–15074.
165. Yu, J., and Zhang, L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*: 27: S71–S83.
166. Zapata, J.M., Pawlowski, K., and Haas, E. 2001. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains *J Biol Chem*:276: 24242–24252.
167. Zhang, Y., Jin, Y., Behr, M.J., Feustel, P.J., Morrison, J.P., and Kimelberg, H.K. 2005. Behavioral and histological neuroprotection by tamoxifen after reversible focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*: 196: 41– 46.
168. Zhang, Z., Liew, C.W., Handy, D.E., Zhang, Y., Leopold, J.A., Hu, J., Guo, L., Kulkarni, R.N., Loscalzo, J., and Stanton, R.C. 2010. High glucose inhibits glucose-6 phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *FASEBJ* : 24: 1497–1505.
169. Zhou, L.Q., and Dean, J. 2015. Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends Cell Biol*: 25(2):82–91.
170. Zhou, R., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, X., Si, J., Gan, L., Li, J., and Liu, Y. 2015. The developmental toxicity and apoptosis in zebrafish eyes induced by carbon-ion irradiation. *Life Sci*: 139: 114–122.
171. Morales, D.A. 2003. *Biología, Cultivo y Comercialización de la Tilapia*. AGT Editor, S.A. 1er ED. Pps: 201.
172. Wilbert, E.L.G. 2007. *Colección de Acuicultura. Crianza de Tilapia*. Empresa Editora Macro. 1era ED. Pps: 110.