



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO REPRODUCTIVO DE LA CABRILLA
SARDINERA *Mycteroperca rosacea* RELACIONADO
CON LA MADURACIÓN FINAL Y REVERSIÓN
SEXUAL EN CONFINAMIENTO.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Daniel Romo Mendoza

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2019.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 04 del Mes de SEPTIEMBRE del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ESTUDIO REPRODUCTIVO EN LA CABRILLA SARDINERA *Mycteroperca rosacea* RELACIONADO CON LA MADURACIÓN FINAL Y REVERSIÓN SEXUAL EN CONFINAMIENTO"

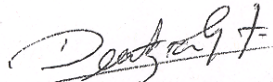
Presentada por el alumno:

Daniel Romo Mendoza

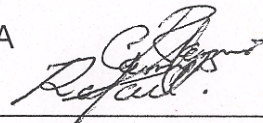
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

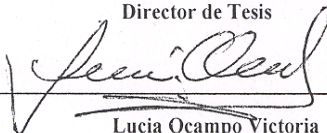
LA COMISIÓN REVISORA



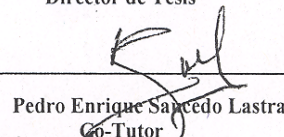
Danitzia Guerrero Tortolero
Director de Tesis



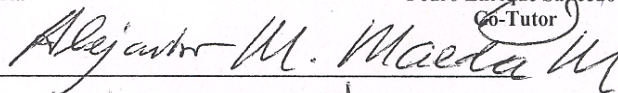
Rafael Campos Ramos
Director de Tesis



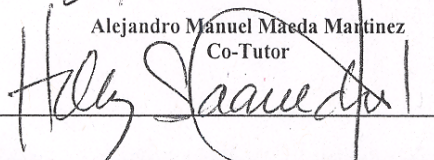
Lucia Ocampo Victoria
Co-Tutor



Pedro Enrique Saucedo Lastra
Co-Tutor



Alejandro Manuel Maeda Martínez
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos
Humanos Conformación de Comités

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Rafael Campos Ramos
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dra. Lucia Ocampo Victoria
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero
Dr. Rafael Campos Ramos
Dra. Lucia Ocampo Victoria
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

Jurado de Examen

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero
Dr. Rafael Campos Ramos
Dra. Lucia Ocampo Victoria
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

Suplentes

Dr. Gopal Murugan
Dr. Pedro Cruz Hernández

Resumen

La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es una especie endémica del Golfo de California con mucha demanda comercial. Esta especie ha sido estudiada con fines de piscicultura. Sin embargo, el manejo de reproductores y la reproducción en confinamiento requieren de más investigación. En el presente trabajo se evaluó la inducción a la maduración final de ovocitos, así como los factores sociales y la expresión del gen de aromatasa que influyeron en la reversión sexual en cautiverio. El tamaño de los ovocitos durante la migración (MVG) y el rompimiento de la vesícula germinal (RVG) se revisaron para esta especie. La histología en ovarios y los niveles plasmáticos de estradiol-17 β (E2) y testosterona (T) se analizaron a las 0, 12, 16 y 24 h después de una dosis de 1000 UI kg⁻¹ de peso corporal de gonadotropina coriónica humana (hCG) y se compararon con hembras control inyectadas con solución salina. Las observaciones histológicas se verificaron en un segundo ensayo mediante biopsias intraováricas *in vivo* después de usar la misma dosis inicial y una segunda dosis resolutive de 500 UI kg⁻¹ de hCG 16 o 24 h más tarde. En el grupo experimental de peces, los esteroides E2 y T alcanzaron picos al mismo tiempo y fueron significativamente más altos que en los peces control. Las biopsias intraováricas *in vivo* mostraron que en ovocitos vitelogénicos a partir de 455 μ m de diámetro, la MVG y la RVG fueron concomitantes con la coalescencia de una gota de aceite entre 16 y 24 h después de la primera inyección. La gota de aceite se convirtió en un marcador morfológico, así como en un indicador predictivo de la competencia y la sincronización de los ovocitos vitelogénicos y la eficacia para responder a la terapia hormonal de maduración final. Durante la temporada reproductiva (abril-junio) y post-reproductiva (julio-septiembre) se acondicionaron dos unidades sociales de hembras (hembras monosexo), tres unidades de machos (machos monosexo) y dos con el sexo mixto (sexo mixto). Se analizaron los esteroides sexuales y al final del experimento, el sexo de las cabrillas se definió mediante histología de las gónadas. Se observó que sólo los machos monosexo cambiaron de sexo a hembras inmaduras (neohembras). Sin embargo, el cambio de sexo produjo síntomas de estrés y alta mortalidad. El cambio de sexo se desencadenó en la etapa post-reproductiva en verano, de acuerdo con los niveles bajos de perfiles hormonales, por lo que la gónada no estuvo involucrada en el proceso sexual. Lo anterior se corroboró mediante la expresión del gen de aromatasa en la gónada, la cual no fue significativamente diferente entre los grupos. Sin embargo, la expresión de la aromatasa cerebral en los peces intersexuales fue significativamente más alta que en las hembras monosexo, sexo mixto y neohembras. Estos resultados sugieren el cerebro medió interacciones sociales entre machos monosexo, incluido el estrés, que provocaron un aumento en la aromatización a partir de testosterona a estradiol, dando lugar a una intersexualidad, seguida de un cambio de sexo protándrico a hembra.

Palabras Clave: maduración final; cambio de sexo; factores sociales; esteroides sexuales; aromatasa

Vo. Bo.

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero

Dr. Rafael Campos Ramos

Summary

The leopard grouper *Mycteroperca rosacea* is an endemic species of the Gulf of California with high commercial demand. This species has been studied for fish farming purposes. However, the management of broodstock and reproduction in confinement require more research. In the present work, the induction to the final maturation of oocytes as well as the social factors and the expression of the aromatase genes that influenced sex reversal in captivity were evaluated. The size of the oocytes during the migration (GVM) and the breakdown (GVBD) of the germinal vesicle was reviewed in this species. Histology in ovaries and plasma levels of estradiol-17 β (E2) and testosterone (T) were analyzed at 0, 12, 16 and 24 h after a dose of 1000 IU kg⁻¹ body weight of human chorionic gonadotropin (hCG) and compared with control females injected with saline. Histological observations were verified in a second trial by intraovarian biopsies *in vivo* after using the same initial dose and a second resolving dose of 500 IU kg⁻¹ of hCG 16 or 24 h later. In the experimental fish group, the steroids E2 and T reached peaks at the same time and were significantly higher than in the control fish. *In vivo* intraovarian biopsies showed that in vitellogenic oocytes from 455 μ m in diameter, the GVM and the GVBD were concomitant with the coalescence of one oil drop between 16 and 24 h after the first injection. The oil drop became a morphological marker, as well as a predictive indicator of the competition and synchronization of vitellogenic oocytes and the efficacy to respond to the hormone therapy of final maturation. During the reproductive (April-June) and post-reproductive (July-September) seasons, two social units of females (monosex females), three units of males (monosex males) and two with mixed sex (mixed sex) were experimentally established. The sex steroids were analyzed and at the end of the experiment, the sex of groupers was defined by histology of the gonads. It was observed that only social units with monosex males changed sex to immature females (neofemales). However, sex change produced symptoms of stress and high mortality. The change of sex was triggered during the post-reproductive stage in summer, according to the low levels of hormonal profiles, so the gonad was not involved in the sexual process. This was corroborated by the expression of the aromatase gene in the gonad, which was not significantly different between the groups. However, the expression of brain aromatase in intersex fish was significantly higher than monosex females, mixed-sex and neofemales. These results suggest that the brain mediated social interactions between monosex males, including stress, which caused an increase in the aromatization from testosterone to estradiol, resulting in intersexuality, followed by a protandric change of sex to female.

Keywords: *Mycteroperca*; final maturation; sex change; social factors; sex steroids; aromatase

Vo. Bo.

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero

Dr. Rafael Campos Ramos

Dedicatoria

A mis Padres y hermanos

Este trabajo se realiza, eliminando cualquier necesidad y situación personal, en el espíritu del progreso regional de Baja California Sur en la esperanza de poder mantener todo lo que se ha logrado en el transcurso de estos 485 años de historia conocida y 45 como parte de la vida nacional.

Se desea, que con la investigación regional por parte de aquellos que aquí habitan, se pueda mantener un nivel de vida adecuado para todos los que integran la zona. De tal forma que quede patente el esfuerzo en proveer el desarrollo sustentable para las generaciones lejanas.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., como Institución receptora de mis estudios de posgrado. A la Dra. Danitzia A. Guerrero y el Dr. Rafael Campos del Laboratorio de Endocrinología por su constante apoyo en mis estudios de doctorado en el CIBNOR. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado, con número de becario 492833/281768. Igualmente, a mi comité tutorial: Dra. Lucía Ocampo, Dr. Alejandro Maeda y Dr. Pedro E. Saucedo por todas sus atenciones al seguimiento de mis estudios. A la Dra. Grecia Vázquez, Dr. Mario A. Burgos, Dr. Edgar R. Esquivel del Laboratorio de Endocrinología por todo su apoyo académico. A Gilberto Colado, Jorge Angulo y Enrique Calvillo por la asistencia técnica y a la Dra. Carmen Rodríguez y a la Sra. María Eulalia Meza del laboratorio de histología. A Ira Fogel que proporcionó un valioso apoyo editorial en los artículos, que en paz descansa. A todos en la Dirección de Posgrado del CIBNOR. A todos mis compañeros del Posgrado por su amistad y convivencia. Este estudio fue apoyado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo los proyectos Ciencia Básica CONACyT 0223157 otorgado a la Dra. Danitzia A. Guerrero y el proyecto 258504 otorgado al Dr. Rafael Campos.

Contenido	Pág
Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1.INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	6
2.2 Reproducción en cautiverio	9
2.3 Factores sociales involucrados en el cambio de sexo	12
2.4 Expresión del gen aromatasa	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Procedencia de los peces	18
6.2 Manejo de peces	18
6.3 Identificación del sexo en los peces	19
6.4 Medición de hormonas esteroides	19
6.5 Histología de gónadas	20
6.6 Diseño experimental	20
6.6.1 Análisis histológico de la maduración final de ovocitos	20
6.6.2 Confirmación <i>in vivo</i> de observaciones histológicas a través de biopsias intraováricas	21
6.6.3 Evaluación de la fertilización y fecundidad	22
6.6.4 Factores sociales en el cambio de sexo en confinamiento	23
6.6.5 Expresión relativa de genes de aromatasa	23
6.7 Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Desarrollo y maduración final de ovocitos	26
7.2 Esteroides sexuales en ovocitos competentes	33
7.3 Diámetro inicial de ovocitos y desove	34
7.4 Cambios en esteroides sexuales	36
7.5 Supervivencia en las unidades sociales	40
7.6 Observación de gónadas en unidades sociales	41
7.7 Expresión relativa de los genes de aromatasa	45
8. DISCUSIÓN	47

9. CONCLUSIONES	57
10. LITERATURA CITADA	58
11. ANEXOS	69
11.1 Primer artículo publicado	
11.2 Segundo artículo publicado	

Lista de figuras	Pág.
Figura 1. Eje reproductivo en vertebrados: cerebro-pituitaria-gónada, tomado de Guerrero-Tortolero (2004).....	3
Figura 2. Desarrollo y maduración de ovocitos en peces, que comprende una fase pre-vitelogénica, una fase de vitelogénesis, y una fase de maduración, tomado de Mañanos <i>et al.</i> (2008).....	5
Figura 3. Cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> (Foto Buckhorn, M., en: Fishbase).....	7
Figura 4. Distribución de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> en el suroeste de la Península de Baja California en el Pacífico, y Golfo de California (línea roja), mapa tomado de Fishbase.org.....	7
Figura 5. Etapas de ovocitos en la cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> . Crecimiento primario: (A) estadio cromatina-nucléolo, y estadio (B) peri-nucléolo (abajo, esquina izquierda). Crecimiento pre-vitelogénico: (B y C), mostrando el estadio de alvéolos corticales; (D) estadio vitelogénico temprano. n = núcleo, nu = nucléolo, ac = alvéolos corticales, va = vesículas de aceite, vg = vesícula germinal, gv = gránulos de vitelo, ga = gotas de aceite, ce = cromosomas emplumados, zr = zona radiata, ccg = capa celular granulosa. Escala = 100 μm	27
Figura 6. Vitelogénesis avanzada y principio de la maduración final en ovocitos en cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> . (A) Vitelogénesis avanzada. (B) Vesícula germinal. (C) Desplazamiento de vesículas de aceite hacia un polo. (D) Migración de la vesícula germinal concomitante con la coalescencia de una gota de aceite. va = vesículas de aceite, vg = vesícula germinal, gv = gránulos de vitelo, ga = gota de aceite, v = vitelo, ce = cromosomas emplumados. Escala = 100 μm	28
Figura 7. Migración de la vesícula germinal concomitante con la coalescencia de una gota de aceite (A y B). Rompimiento de la vesícula germinal (rvg) concomitante con la coalescencia de una gota de aceite (C y D). vg = vesícula germinal, v = vitelo, ga = gota de aceite. Escala = 100 μm	29
Figura 8. Disección de ovarios maduros de <i>Mycteroperca rosacea</i> , en donde se observan ovocitos en su etapa de hidratación inicial, después del rompimiento de la vesícula germinal.....	30
Figura 9. Coalescencia de la gota de aceite en relación con el tamaño del ovocito en hembras maduras de <i>Mycteroperca rosacea</i> . El tiempo a las 12 h corresponde a la etapa de desplazamiento de las gotas de aceite; a las 16 a la etapa de migración y a las 24 h al rompimiento de la vesícula germinal. A las 36 h, al desove. Letras distintas denotan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).....	32
Figura 10. Ovogénesis; crecimiento, desarrollo vitelogénico, y maduración final de ovocitos de <i>Mycteroperca rosacea</i>	33
Figura 11. Observación simultánea de la migración de la vesícula germinal	

y la coalescencia de una sola gota de aceite, por histología (en la parte central) y en ovocitos intraováricos aclarados con solución de Serra, en cada extremo.....	35
Figura 12. Observación de la coalescencia de una sola gota de aceite después de agregar agua destilada a los ovocitos en procesos de maduración final.....	36
Figura 13. Niveles (promedio \pm DE) de estradiol-17 β en plasma de cabrilla sardinera en hembras y machos monosexo y hembras y machos en sexo mixto, durante las temporadas de reproducción (abril a junio) y post-reproducción (julio septiembre). Diferentes letras muestran diferencias significativas en cada mes ($P < 0.05$).....	38
Figura 14. Niveles (promedio \pm DE) de 11-ketotestosterona en plasma de cabrilla sardinera en hembras y machos monosexo y hembras y machos en sexo mixto, durante las temporadas de reproducción (abril a junio) y post-reproducción (julio septiembre). Diferentes letras muestran diferencias significativas en cada mes ($P < 0.05$).....	39
Figura 15. Niveles (promedio \pm DE) de testosterona en plasma de cabrilla sardinera en hembras y machos monosexo y hembras y machos en sexo mixto, durante las temporadas de reproducción (abril a junio) y post-reproducción (julio septiembre). Diferentes letras muestran diferencias significativas en cada mes ($P < 0.05$).....	40
Figura 16. Histología de las gónadas de cabrilla sardinera después de seis meses de confinamiento. (A) Hembra monosexo inmadura con crecimiento de ovocitos primario. (B) Hembra monosexo inmadura con un grupo de espermatogonias y espermatocitos. (C y D) Neohembras inmaduras de unidades sociales de machos monosexo. Escala de barra = 100 μ m.....	42
Figura 17. Histología de las gónadas de cabrilla sardinera después de seis meses de confinamiento. (A) Macho maduro inactivo de una unidad social de sexo mixto. (B) Macho intersexo inmaduro con testículos con ovocitos primarios dispersos. (C y D) Machos intersexo inmaduros en etapa sexual de transición avanzada con ovo-testes. Escala de barra = 100 μ m.....	43
Figura 18. Expresión relativa del gen de aromatasa en ovario <i>cyp19a1a</i> entre las unidades sociales en la cabrilla sardinera.....	45
Figura 19. Expresión relativa del gen de aromatasa <i>cyp19a1b</i> en cerebro entre unidades sociales en la cabrilla sardinera.....	46

Lista de tablas

	Pág.
Tabla I. Oligonucleótidos utilizados en la expresión relativa de genes de aromatasa en gónada y cerebro de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	25
Tabla II. Niveles plasmáticos (Media \pm DE) de estradiol-17 β , y testosterona en los tiempos de muestreo 0, 12, 16 y 24 h, (n = 3 / cada tiempo) en hembras maduras de cabrilla sardinera. Diferentes letras en cada renglón indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0.05$).....	33
Tabla III. Desempeño reproductivo de hembras de cabrilla sardinera que mostraron la gota de aceite durante la migración de la vesícula germinal, y tuvieron maduración final de ovocitos con hCG a 24-25 °C. No se observó una diferencia significativa.....	34
Tabla IV. Biometría de cabrilla sardinera mostrando la longitud estándar, el peso corporal y el sexo de la gónada en las unidades sociales con sextetos de machos monosexo después de seis meses en confinamiento. Los datos están organizados de mayor a menor de acuerdo con la longitud registrada en abril. †: Cabrilla que no sobrevivió.....	44

Abreviaturas

11-KT 11-ketotestosterona

ADNc ADN complementario

ANOVA análisis de varianza

E2 Estradiol-17 β

ELISA Ensayo inmuno-enzimático antígeno anticuerpo competitivo

GnRH Hormona liberadora de gonadotropinas

GnRH α Hormona análoga liberadora de gonadotropina

GTH1 Hormona folículo estimulante en teleósteos

GTH2 Hormona Luteinizante en teleósteos

hCG hormona gonadotropina coriónica heteróloga / hormona coriónica humana

LHRH α Hormona análoga liberadora de la hormona luteinizante

MVG Migración de la vesícula germinal

RVG Rompimiento de la vesícula germinal

T Testosterona

VG Vesícula germinal

1. INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo en peces es un conjunto de procesos sucesivos, que inician en las células germinales inmaduras, hasta la producción de gametos maduros, y cuya finalidad es alcanzar la perpetuación de la especie (Mañanos *et al.*, 2008). El crecimiento y la diferenciación de los gametos se denomina gametogénesis; en hembras se lleva a cabo la ovogénesis, mientras que, en los machos, la espermatogénesis (Mañanos *et al.*, 2008). El ciclo reproductivo comprende dos fases principales; la fase de crecimiento y desarrollo gonadal (vitelogénesis) y la fase de maduración, que culmina con la ovulación y desove en hembras, y en la espermiación y salida de espermatozoides en los machos (Mañanos *et al.*, 2008).

Entender el control neuroendocrino de la reproducción en los peces marinos en confinamiento es uno de los aspectos más importantes en el cultivo de peces (Kah *et al.*, 2007; Zohar *et al.*, 2010). La reproducción en peces se sincroniza mediante la detección de factores ambientales externos, como el fotoperiodo y la temperatura, que activan mecanismos endocrinos internos (Rottman *et al.*, 1991). Los cambios estacionales son percibidos por foto-receptores y quimiorreceptores del órgano pineal, localizado en la base del cráneo, perteneciente al sistema nervioso central (Ekström y Meissl, 1997). La glándula pineal, a través de la producción de melatonina, sincroniza el reloj biológico interno del pez, con los días y estaciones del año, lo cual se define como ciclos circadianos anuales, que los peces perciben y sincronizan para reproducirse en el mejor momento del año, incrementando así la supervivencia de la progenie (Bromage *et al.*, 2001). El sistema endocrino reproductivo está conformado por el hipotálamo, la glándula pituitaria y la gónada, en donde los dos primeros ejercen un control neuroendocrino, y reciben una retroalimentación por las hormonas producidas en la gónada (Mylonas y Zohar, 2001; Van Der Kraak *et al.*, 1998), involucrando la movilización de reservas energéticas de vitelo que el ovocito acumulará durante su crecimiento, y que será fundamental para llevar a cabo la maduración final,

desove, y la supervivencia de la larva al eclosionar (Habibi y Andreau-Vieyra, 2007). Al mismo tiempo, el eje hipotálamo-pituitaria-gónada, regula el comportamiento reproductivo y los cambios sociales en su hábitat (Hoar, 1969). Recientemente se ha encontrado que la activación del eje gonadotrópico que activa la pubertad y la subsecuente reproducción en vertebrados está mediado por el sistema de péptido Kisspeptina-receptor KISS-KISSR. Estos consisten en los genes parálogos (que divergieron después de un proceso de duplicación) KISS1 y KISS2, junto a sus receptores KISS1R y KISS2R, respectivamente. En peces, el sistema KISS2 fue descubierto recientemente, el cual se expresa simultáneamente con el sistema KISS1, como en el caso del pez cebra (*Danio rerio*) y la dorada (*Dicentrarchus labrax*) (Biran *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2013). La administración de los dos tipos de Kisspeptina en diversas especies de peces demuestra hasta el momento una selección al azar de la dominancia entre la kisspeptina 1 y la kisspeptina 2 como hormona principal (Kanda y Oka, 2012). En algunas especies solo el gen KISS2 se encuentra presente como en el pez fugu (*Takifugu niphobles*), pez globo (*Tetraodon nigroviridis*) y el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) (Tena-Sempere *et al.*, 2012). Hasta el momento, los receptores de la Kisspeptina (KISSR), para peces parecen ser indiferentes al tipo de péptido activador, argumentando que presentan competencia para el acoplamiento al receptor (Lee *et al.*, 2009).

En el comienzo de la temporada reproductiva de peces, la unión de la kisspeptina con su receptor en el hipotálamo, activa factores de transcripción en las neuronas gonadotrópicas a nivel cerebro, para que, a su vez, se sintetice la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es reconocida por receptores en la glándula pituitaria, que a su vez produce gonadotropinas GTH1 (equivalente en mamíferos a la hormona folículo estimulante; FSH) y GTH2 (equivalente en mamíferos a la hormona luteinizante; LH), las cuales son reconocidas por los receptores en las gónadas, para llevar a cabo el desarrollo vitelogénico y la

maduración de los gametos (Benoit y Assenmacher, 1952; Peter, 1983; Kanda y Oka, 2012; Swanson *et al.*, 2003).

Durante el crecimiento del ovocito (Fig. 1), la testosterona se convierte en estradiol, vía la enzima aromatasa (Nagahama, 1994). El estradiol-17 β , estimula al hígado para sintetizar vitelogenina, la cual se libera al torrente sanguíneo, y en donde los receptores del ovocito incorporan esta fosfolipoglicoproteína necesaria para la vitelogénesis, promoviendo la nutrición y crecimiento de los ovocitos (Nagahama, 1994).

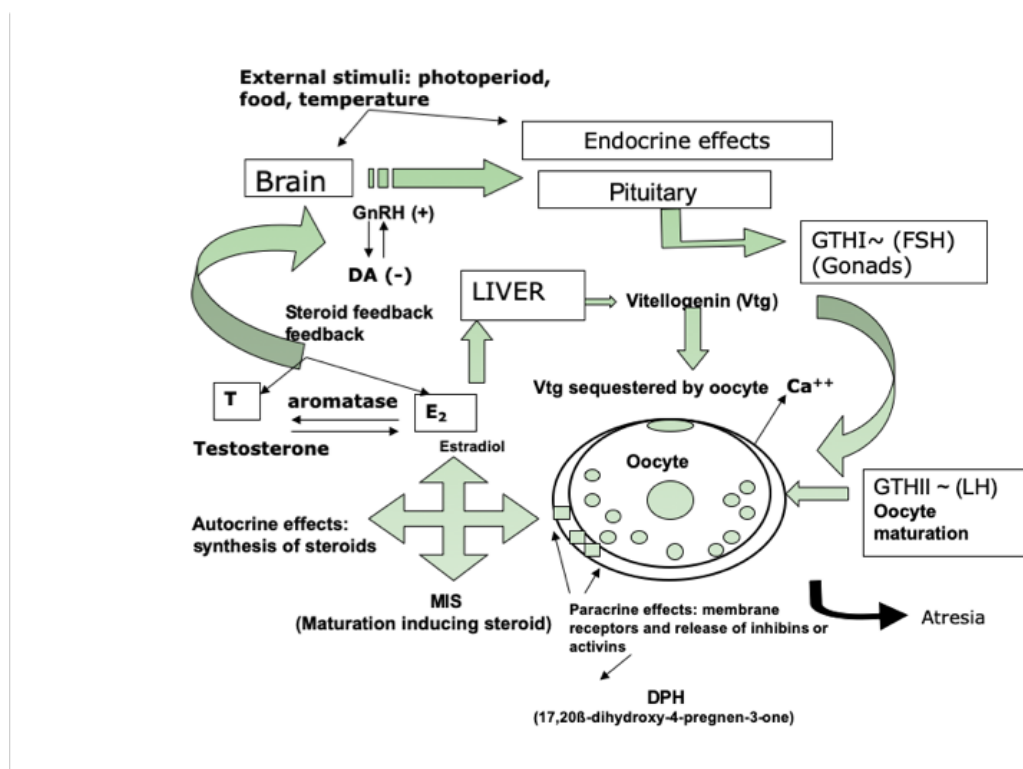


Figura 1. Eje reproductivo en vertebrados: cerebro-pituitaria-gónada, tomado de Guerrero-Tortolero (2004).

Una vez que el ovocito ha alcanzado su máximo crecimiento, ocurre un cambio esteroidogénico, en donde después de un incremento de la hormona luteinizante (GTH2), se estimula la producción de derivados de la progesterona (como la

dihidroxi-pregnona), considerada como la hormona inductora a la maduración final, la cual actúa como inductor para la reanudación de la meiosis, y a su vez, la migración y rompimiento de la vesícula germinal y, por último, la hidratación final del ovocito (Nagahama, 1994).

Después de este estímulo hormonal, la vesícula germinal (el núcleo del ovocito), que se encontraba en una posición central, comienza a migrar hacia el polo animal del ovocito (Migración de la vesícula germinal: MVG), que es en donde se formará el micrópilo, por donde entrará un solo espermatozoide en la fertilización (Jalabert *et al.*, 1991). Una vez que la vesícula germinal ha migrado al polo animal, la membrana nuclear se rompe (Rompimiento de la vesícula germinal: RVG), dejando un núcleo disperso (Jalabert *et al.*, 1991). Poco después del RVG, el vitelo en forma líquida llena el ovocito, y la hidratación aumenta significativamente su tamaño, mientras que las gotas de aceite se hacen más evidentes y coalescentes, formando progresivamente una sola, o varias gotas de aceite con un tamaño, que varía según la especie (Fig. 2). Cuando el ovocito alcanza su máxima hidratación, procede la ovulación, ya sea en una membrana ovárica que se extiende en el conducto ovárico, o bien, directamente a la cavidad abdominal, para que finalmente ocurra el desove, es decir, la salida de los huevos a través del poro genital (Mañanos *et al.*, 2008; Wallace y Selman, 1981).

La hidratación de los ovocitos en peces teleósteos, están regulados por varios mecanismos celulares (Skoblina, 2010). Al comienzo de la maduración final del ovocito, a nivel de la membrana celular, la bomba de sodio y potasio (Na^+/K^+) aumenta la concentración de iones inorgánicos, lo que da como resultado la absorción de agua (LaFleur y Thomas, 1991; Wallace y Selman, 1981), mientras que la escisión proteolítica de proteínas de vitelo, acumula aminoácidos libres (Greeley *et al.*, 1986; 1991.), creando una fuerza osmótica para hidratar el ovocito (Craik y Harvey, 1987; Thorsen y Fyhn, 1996). La hidratación también se facilita a

través de poros en la membrana mediante proteínas de acuaporina (Fabra *et al.*, 2005; 2006).

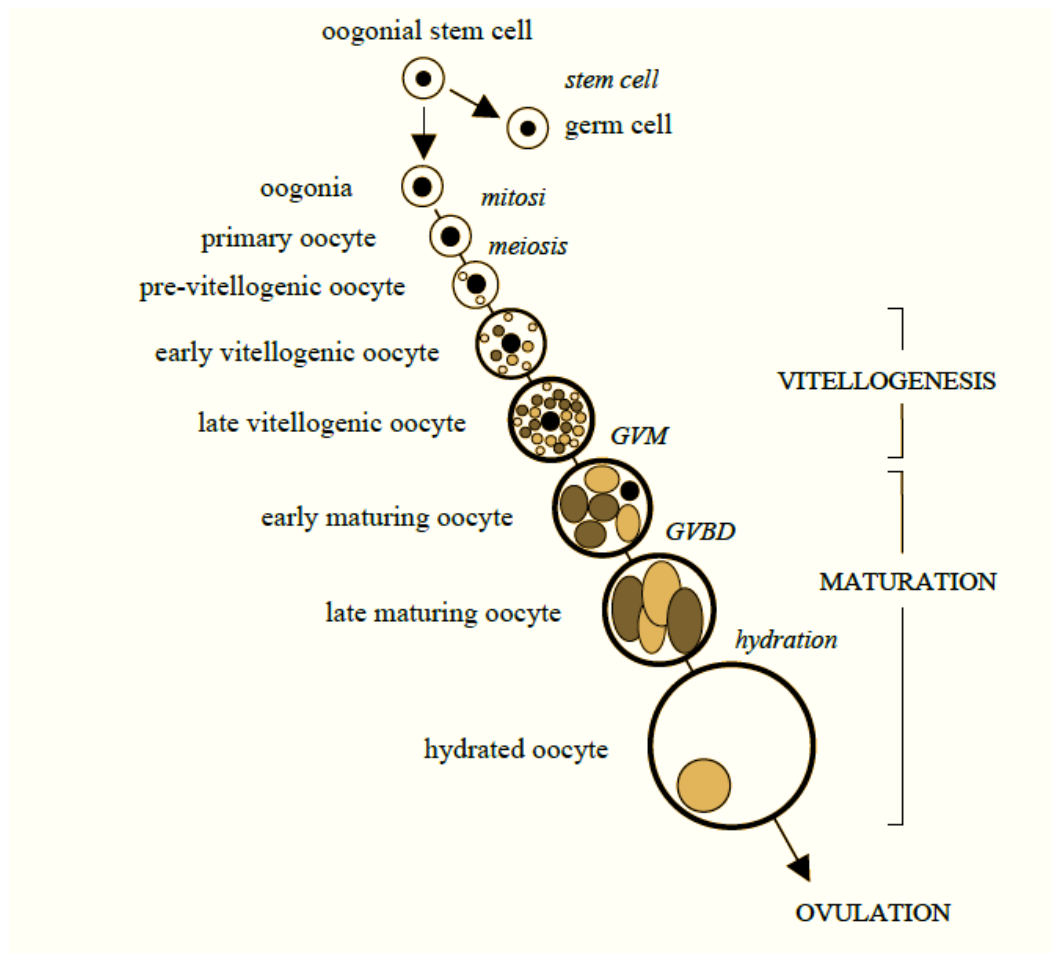


Figura 2. Desarrollo y maduración de ovocitos en peces, que comprende una fase pre-vitelogénica, una fase de vitelogénesis, y una fase de maduración, tomado de Mañanos *et al.* (2008).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*

La familia Serranidae es un importante recurso pesquero económico en todo el mundo, y muchas naciones promueven su piscicultura para producir un rendimiento más sostenible (Tupper y Sheriff, 2008). Los meros viven en aguas marinas cálidas y templadas en todo el mundo y tienen un valor económico considerable en las pesquerías costeras de las zonas subtropicales y tropicales (Pierre *et al.*, 2008). La mayoría de las especies se distribuyen en la región Indo-Pacífica, seguida por el Atlántico oriental y las regiones mediterráneas, y en la zona intertropical americana; los géneros más representativos de la subfamilia son *Epinephelus* y *Mycteroperca* (Heemstra y Randall, 1993). La mayoría de las especies cultivadas pertenecen al género *Epinephelus* (Tupper y Sheriff, 2008), y poco se conoce en especies de *Mycteroperca*, en donde *M. microlepis* (Goode y Bean) y *M. bonaci* (Poey) tienen potencial acuícola en el sureste de los Estados Unidos de América y el Caribe (Tucker, 1999).

La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets) (Fig. 3) es una especie endémica del Golfo de California. Esta especie tiene una distribución confinada (Fig. 4), desde la costa sureste del Pacífico en Baja California Sur, hasta la costa sur del estado de Jalisco, a través del Golfo de California (Thomson *et al.*, 2000).



Figura 3. Cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Foto Buckhorn, M., en: Fishbase).



Figura 4. Distribución de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en el suroeste de la Península de Baja California en el Pacífico, y Golfo de California (línea roja), mapa tomado de Fishbase.org.

Es interesante señalar que esta especie es gonocórica (Erisman *et al.*, 2008), mientras que la mayoría de las especies de la subfamilia Epinephelinae, son hermafroditas protogínicas, es decir, presentan comportamientos reproductivos

secuenciales, en donde los individuos comienzan como hembra funcional, y en función de la talla, o bien, factores sociales, cambian posteriormente a macho funcional, permaneciendo así durante el resto su vida adulta reproductiva (Avisé y Mank, 2009; Sadovy y Colin, 1995). Como en muchas especies de meros, los juveniles de cabrilla sardinera tienen una fase bisexual inmadura del desarrollo gonadal, en la que aparentemente, sólo se asocia a la diferenciación sexual de machos (Erisman *et al.*, 2008). Los peces alcanzan su estado adulto a partir de los 30 cm de longitud total (Erisman *et al.*, 2008).

La cabrilla sardinera habita áreas poco profundas de arrecifes rocosos, a profundidades inferiores a los 50 m, y su reclutamiento depende de la abundancia de lechos de *Sargassum* (C. Agardh), a lo largo de la costa rocosa (Aburto-Oropeza *et al.*, 2007; Heemstra y Randall, 1993; Thomson *et al.*, 2000). La temporada reproductiva ocurre de abril a junio, en donde los adultos forman agregaciones de desove de varios peces, independientemente del ciclo lunar (Erisman *et al.*, 2007; Sala *et al.*, 2003). El tamaño al 50% de madurez es de 270 mm en longitud para las hembras, y de 230 mm para los machos en longitud (Erisman *et al.*, 2008).

Las agregaciones naturales hacen que esta especie sea particularmente vulnerable a la sobreexplotación, con una tendencia decreciente en la población natural (UICN 2016). El manejo de la pesquería y el cultivo a gran escala de la cabrilla sardinera, podrían atenuar la sobrepesca, y aumentar la producción de esta especie para compensar la elevada demanda en el mercado (Sala *et al.*, 2004).

La cabrilla sardinera ha sido objeto de investigación ecológica y de acuicultura, con estudios centrados en el patrón sexual, el manejo de reproductores, la reproducción, el cultivo de larvas, y la producción de juveniles (Burgos-Aceves *et al.*, 2010 2012; Gracia-López *et al.*, 2004; Kiewek-Martínez *et al.*, 2010a.).

La propagación artificial mediante inducción hormonal, cultivo larvario y producción de juveniles es factible a escala experimental (Gracia-López *et al.*, 2004). En comparación con otras especies cultivadas, la cabrilla sardinera, al igual que la mayoría de los serranidos, es una especie de crecimiento lento (Díaz-Uribe *et al.*, 2001). Actualmente, la producción en acuicultura es nula, debido a la falta de control de la reproducción en cautiverio y el desconocimiento en el manejo de reproductores (Burgos-Aceves *et al.*, 2010). Como consecuencia, no hay suministro de juveniles para ofrecer a los piscicultores, lo cual ha creado una demanda de investigación para mejorar todos los aspectos en su producción. La cabrilla sardinera ha demostrado tener una buena supervivencia en los estanques supralitorales del CIBNOR (Burgos-Aceves *et al.*, 2010); es una especie fácil de manejar, no es agresiva, y vive la mayor parte del tiempo en el fondo de los estanques, lo que facilita el cultivo cuando se mezcla con otras especies de peces, como el huachinango *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy), que muestra potencial de reproducción y crianza en cautiverio (Guerrero-Tortolero *et al.*, 2016), y otros serránidos, como la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner). Por lo tanto, la cabrilla sardinera y otras especies de serránidos podrían ser buenos candidatos para el policultivo de peces marinos.

2.2 Reproducción en cautiverio

La acuicultura de meros o cabrillas en Asia actualmente producen más del 80% de la producción a nivel mundial. Sin embargo, aún presentan dificultades tecnológicas para la maduración final y el desove en confinamiento (Pierre *et al.*, 2007; Tupper y Sheriff, 2008). En todas las especies estudiadas en cautiverio, incluyendo la cabrilla sardinera, son capaces de desarrollar una vitelogénesis avanzada, pero no alcanzan la maduración final del ovocito, y el desove espontáneo de forma natural es muy raro, y generalmente no presenta fertilización del macho (Kiewek-Martínez *et al.*, 2010a; Marte, 1989; Marino *et al.*, 2003; Toker, 1994; Watanabe *et al.*, 1995). Esta disfunción reproductiva se produce en muchos peces cultivados, debido a la falta de liberación de la hormona luteinizante (GTH2)

de la pituitaria durante la temporada de desove (Zohar y Mylonas, 2001), aunado a las condiciones biológicas y físicas en cautiverio, las cuales no proporcionan las señales ambientales necesarias para completar la maduración final, dando lugar a atresia de los ovocitos (Mañanos *et al.*, 2008). Por otra parte, la cabrilla sardinera en cautiverio también tiene dificultades para el mantenimiento de reproductores sanos y funcionales para su reproducción (Burgos-Aceves *et al.*, 2010). Por ejemplo, los machos pueden no presentar esperma, cuando las hembras están maduras, o bien, las hembras no alcanzan a madurar suficiente sus gametos en el ovario, para lograr la maduración final, para el desove, aunque los machos presenten esperma fluyente, lo que puede resultar en una falta de sincronización reproductiva (Burgos-Aceves *et al.*, 2010). Otra preocupación es la súbita e inesperada alta mortalidad que ocurre en el cautiverio, en donde es difícil discernir entre enfermedad o condiciones inadecuadas o de confinamiento que provocan estrés en los reproductores (Burgos-Aceves *et al.*, 2010).

En la mayoría de las especies de meros, las hembras son hormonalmente inducidas a la maduración final, dependiendo de las especie; el tratamiento hormonal puede consistir en la administración de análogos, tales como la hormona análoga liberadora de gonadotropina (GnRHa), que actúa a nivel cerebro, y la hormona análoga liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa), que actúa a nivel pituitaria, o la hormona gonadotropina coriónica heteróloga (hCG), que actúan directamente en la gónada, substituyendo la hormona luteinizante (Denson *et al.*, 2007; Forniés *et al.*, 2001; Mañanos *et al.*, 2002; Zohar y Mylonas, 2001;). Estos tratamientos se aplican en hembras con ovocitos post-vitellogénicos (ovocitos que tienen su máximo de contenido de vitelo), que corresponden a un diámetro, ya previamente estudiado y conocido en la especie, teniendo así, una posibilidad más alta de éxito, a que el ovocito comience su maduración final. La inducción de la maduración final se evalúa generalmente después de medir el incremento del tamaño del ovocito, la fecundidad relativa (número de huevos generados por el peso corporal de la hembra) y la tasa de eclosión de huevos

(Garber *et al.*, 2009). Sin embargo, los tratamientos hormonales usualmente requieren, tipo y dosis de la hormona, una o más inyecciones, pueden ser implantes, en lugar de inyecciones, pueden incluir inhibidores de antagonistas, tales como la dopamina, y diferentes tiempos de administración, lo que crea una matriz compleja de variables, la cual puede dificultar el éxito en la sincronización en la ovulación, o bien, en la espermiación, dado que, en algunas especies, lo machos también son inyectados (Zohar y Mylonas, 2001). Esta matriz compleja de variables se optimiza mediante ensayo y error, de una manera empírica, y aun así, el resultado no siempre es el esperado, o no es reproducible (Zohar y Mylonas, 2001). La cabrilla sardinera ha sido inducida al desove con el uso de la hormona coriónica humana (hCG), a una dosis de 1000 UI Kg⁻¹ por Kg de peso en la primera inyección, más 500 UI Kg⁻¹ 24 h después (Kiewek-Martínez *et al.*, 2010a). Esta doble dosis de la hormona ha sido utilizada en varias especies de meros (Tseng y Ho, 1979; Marte, 1989; Watanabe *et al.*, 1995).

En general, los ovocitos vitelogénicos en meros se inducen a la maduración final cuando alcanzan un rango de 400 a 560 µm en diámetro, dependiendo de la especie (Tucker, 1994). Sin embargo, en todos los estudios reportados, el ovocito presenta la vesícula germinal (VG), es decir el núcleo, en una posición central, antes de migrar al polo animal (Kungvankij *et al.*, 1986; Marte, 1989; Marino *et al.*, 2003; Tucker, 1994; Watanabe *et al.*, 1995). En la cabrilla sardinera, el rango óptimo en el diámetro de ovocitos para inducir a la maduración final fue de 498-523 µm (Kiewek-Martínez *et al.*, 2010a), aunque en este estudio se reportó que el rompimiento de la vesícula germinal se registró con un diámetro menor de 369 ± 48 µm, lo cual significa que los ovocitos ya habían comenzado la maduración final antes de la inducción, por lo que se requiere confirmar estas observaciones. En algunas especies marinas, que son muy difíciles de reproducir en cautiverio, como es el robalo, *Centropomus undecimalis* (Bloch), los ovocitos responden a una inducción hormonal, siempre y cuando ya se encuentren en el proceso de maduración final, es decir, ya con la vesícula germinal migrada (Rhody *et al.*,

2013); esto significa que el tratamiento hormonal, solamente acelera el proceso de maduración y evita una regresión, como una atresia celular. Sin embargo, no es el caso en meros que se cultivan en todo el mundo.

La etapa o estadio de maduración final puede determinarse, ya sea midiendo el diámetro medio o máximo del ovocito, la posición de la VG, o identificando el inicio de la coalescencia de las gotitas lipídicas de aceite (Mylonas *et al.*, 2010). En la maduración final inducida por hormonas, es necesario identificar los cambios morfológicos de los ovocitos, los cuales se pueden utilizar para monitorear el progreso de la acumulación máxima de vitelo, seguida de la maduración final, y el subsecuente desove; con la identificación de estos cambios estructurales celulares en el ovocito, la fase de optimización del tratamiento hormonal deja de ser empírico, y se convierte en cuantificable (Mylonas *et al.*, 1997). Como antecedente en la cabrilla sardinera, se tienen dos reportes en donde se muestra una sola gota de aceite después del rompimiento de la VG, correspondiendo a la etapa más temprana de maduración de la hidratación de ovocitos (Erisman *et al.*, 2007; Kiewek-Martinez *et al.*, 2010b). Sin embargo, no está claro el tiempo que tarda la coalescencia de la gota de aceite durante la maduración final del ovocito.

2.3 Factores sociales involucrados en el cambio de sexo

En especies de peces hermafroditas secuenciales que habitan los arrecifes, los individuos funcionan como un sexo y cambian para funcionar como el otro, de acuerdo con interacciones sociales de comportamiento (Sadovy y Colin, 1995). En los peces protándricos, un individuo comienza su vida reproductiva como macho y luego cambia a hembra funcional, mientras que en las especies protogínicas, ocurre lo contrario. En algunas especies ocurren cambios sexuales bidireccionales en serie, en donde un pez puede alternar entre hembra y macho funcional (Avisé y Mank, 2009; Mei y Gui, 2015; Zhou y Gui, 2010).

La mayoría de los meros son hermafroditas protógínicos (Smith, 1965). Algunas especies son monándricas, en donde todos los machos se derivan de hembras adultas, como la trucha de coral común australiana *Plectropomus leopardus* (Lacepède) (Ferreira 1995), entre otras. Varias especies son diándricas, en donde los juveniles muestran una fase bisexual inmadura, que se diferencia progresivamente en hembras o machos primarios, como en el mero *Epinephelus coioides* (Hamilton) (Liu y Sadovy de Mitcheson, 2009). La fase bisexual también ocurre en el mero gonocórico de Nassau *E. striatus* (Bloch) (Sadovy y Colin, 1995) y en la cabrilla sardinera (Erisman *et al.*, 2008). Durante la vida reproductiva adulta de las especies diándricas, las hembras cambian de sexo, originando machos secundarios, como ocurre en el mero grasiento *E. tauvina* (Forskål) (Abu-Hakima, 1987) y como ya se ha mencionado anteriormente en la cabrilla sardinera gonocórica (Erisman *et al.*, 2008), entre otras especies.

Las investigaciones de laboratorio y en campo, han mostrado que los machos primarios y secundarios en peces hermafroditas secuenciales son originados por factores sociales (Debas *et al.*, 1989; Liu y Sadovy, 2004a; Liu y Sadovy de Mitcheson, 2011; Munday *et al.*, 2006; Robertson y Choat, 1974; Sadovy de Mitcheson y Liu, 2008; Shapiro, 1987). Los factores sociales también han revelado cambios sexuales bidireccionales en dos especies ambisexuales: el mero cola de chocolate *Cephalopholis boenak* (Bloch) (Liu y Sadovy, 2004b) y el mero polinesio *E. microdon* (Bleeker) (Debas *et al.*, 1989). Sin embargo, más allá de estas dos observaciones, no hay ningún informe de un cambio completo en el sexo de macho a hembra en meros adultos, ya sea en una hermafrodita protógínico diándrico o bien, en una especie de mero gonocórica.

2.4 Expresión del gen aromatasa

En los peces que cambian de sexo, ya sea inducido artificial o naturalmente, los niveles de esteroides sexuales desempeñan un papel central en la diferenciación de las gónadas, en concordancia con las enzimas involucradas en la producción

de esteroides (Devlin y Nagahama, 2002). La aromatase citocromo P450, es la enzima que convierte los andrógenos en estrógenos; está codificado por el gen *cyp19* (Simpson *et al.*, 1994) y los peces tienen dos tipos de aromatasas codificadas por dos genes distintos: el tipo de ovario (*cyp19a1a*) y el tipo de cerebro (*cyp19a1b*) (Huang *et al.*, 2009; Kwon y Kim, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es un recurso pesquero artesanal con importancia económica para la región del noroeste con un valor de 9 dólares por kilo y es una especie muy explotada (Díaz-Uribe *et al.*, 2001). Adicionalmente, es una especie importante en la pesca deportiva. La acuicultura de esta especie podría contribuir a incrementar la producción piscícola marina en la región. Sin embargo, su reproducción en cautiverio aún presenta dificultades técnicas que hay que solventar. Con el fin de confirmar el tamaño y citología de las distintas fases de desarrollo de los ovocitos, hasta alcanzar la maduración final, previo al desove, en este estudio se hace una descripción de los cambios morfológicos que ocurren en los ovocitos durante las distintas etapas en su maduración, y se evalúa, si alguno de estos cambios, podría ser utilizado de una manera cuantificable; es decir, como un marcador que permita predecir el éxito de la inducción hormonal en esta especie. Por otra parte, el manejo de las cabrillas en cautiverio generalmente se realiza con sexos aislados lo que facilita la reproducción y maduración inducida artificialmente. Sin embargo, dada la alta plasticidad sexual que existe en los serránidos, se desconoce cuáles son los efectos del aislamiento sexual en la cabrilla sardinera.

4. HIPÓTESIS

Si la migración de la vesícula germinal es simultánea con la coalescencia de una única gota de aceite en los ovocitos durante la maduración final en la cabrilla sardinera, entonces, este cambio morfológico podrá servir para predecir de una forma cuantificable, la potencialidad de los ovocitos para responder a la maduración final, cuando los reproductores sean inducidos mediante un tratamiento hormonal. Por otra parte, si el aislamiento de peces de acuerdo con su sexo implica el que se presenten interacciones sociales específicas, entonces dicho aislamiento se verá reflejado en un cambio de sexo en los peces.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Investigar la maduración final de ovocitos durante una inducción hormonal y la reversión sexual en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en confinamiento.

5.2 Objetivos específicos

1. Estudiar si un cambio morfológico identificado durante la maduración final de ovocitos puede predecir de una forma cuantificable, el éxito que tendrá un tratamiento hormonal de inducción.
2. Analizar *in vivo* si los cambios morfológicos identificados por histología son equivalentes con la identificación de estructuras que sean observables a través de biopsias ováricas.
3. Analizar el diámetro de los ovocitos durante la migración y el rompimiento de la vesícula germinal en reproductores que respondieron a la maduración final.
4. Analizar los cambios asociados a hormonas esteroides 17β -estradiol y testosterona, previos a la maduración final de los ovocitos.
5. Investigar la influencia de los factores sociales en la reversión sexual, cuando la cabrilla sardinera es separada por sexo durante las temporadas reproductiva y post-reproductiva.
6. Cuantificar esteroides sexuales plasmáticos y la expresión de los genes de aromatasa en gónada *cyp19a1a* y en cerebro *cyp19a1b* para establecer sus efectos en una reversión sexual.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Procedencia de los peces

Los ejemplares adultos de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* se capturaron en el Golfo de California cerca de Isla San José (25°N, 110.7°W) durante la primavera de las temporadas reproductivas de 2014 a 2017 (n = 60). Las cabrillas se mantuvieron en un estanque supralitoral, de 16 m × 7 m × 1.8 m (200,000 L), bajo fotoperiodo y temperatura del agua ambientales. Los peces se alimentaron con cabeza de camarón de *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes), trozos de calamar gigante *Dosidicus gigas* (D'Orbigny) y sardina de América del Sur *Sardinops sagax* (Jenyns), cuatro veces a la semana, a saciedad (hasta que los peces ya no aceptan más alimento). La longitud total en el momento de la captura osciló entre 42-64 cm y con un peso corporal de 0.8-3.6 kg, valores que corresponden a peces adultos con potencial reproductivo (Erisman *et al.*, 2008).

6.2 Manejo de peces

Antes de cualquier procedimiento, los peces se colocaron individualmente en un tanque de 300 L con agua de mar a 24-25 °C, al cual, se le agregó una solución de 5 a 25 mg L⁻¹ del Eugenol (aceite de clavo), como anestésico, hasta que el pez se invirtió e inmovilizó. Posteriormente se protegió con una toalla húmeda gruesa para su biometría, toma de sangre, muestra de gametos, estado de salud, y lo que fuera necesario examinar, incluyendo un marcaje en la aleta dorsal con un cintillo plástico de color. Posteriormente, el pez se recuperó en menos de cinco minutos en un tanque de 7,000 L, con aireación y con recirculación de agua. De esta manera los peces medidos e identificados en su sexo fueron colocados en los diferentes tanques experimentales, en donde permanecieron durante la temporada reproductiva (de abril a junio: 24 a 26 °C) y post-reproductiva (de julio a septiembre: 27 a 30 °C). A los tanques con cabrillas se les colocó un techo de malla para proteger a los peces de la luz solar directa, se mantuvo una aireación constante y un recambio de agua de mar filtrada al 200% todos los días.

Los peces utilizados para el análisis histológico se les aplicó anestesia terminal con una sobredosis del anestésico metanesulfonato de tricaina (MS-222) a 350 mg L⁻¹, seguido por una punción en el cerebro, para posteriormente realizar la disección de las gónadas.

6.3 Identificación del sexo en los peces

Cada pez fue anestesiado en un tanque con 200 L de agua marina, aireación y a una temperatura de 24-25 °C. Se agregó el anestésico hasta que el pez se invirtió e inmovilizó. Los machos fueron identificados mediante la observación de espermatozoides, después de una suave presión en el abdomen, y las hembras mediante biopsias intraováricas. El procedimiento consistió en insertar una cánula de polietileno de 1.0 mm de diámetro, por el poro genital, hasta llegar a uno de los ovarios. Posteriormente, se realizó una succión suave con una jeringa hipodérmica de 5 mL para poder observar a simple vista los ovocitos. Los ovocitos se observaron al microscopio y se determinó su grado de maduración (Mañanos *et al.*, 2008).

6.4 Medición de hormonas esteroides

Se extrajo sangre periférica de la vena caudal (0.8 mL) con una aguja calibre 23 unida a una jeringa de 3 mL que fue recubierta previamente con heparina para evitar la coagulación. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1300 RPM/10 min y el plasma se almacenó a -80 °C, para su posterior análisis. De cada muestra de plasma se tomaron 400 µL y se añadió 1.5 mL de éter dietílico, para extraer los esteroides. Las hembras y machos fueron analizados para estradiol-17β (E₂) (# 582251, EIA Kit, sensibilidad: 15 pg/mL), y testosterona (T) (#582701, EIA Kit, sensibilidad: 6 pg/mL). Todos los kits tienen un 100% de reacción cruzada con su respectivo anticuerpo (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) y se cuantificaron mediante placas de ensayo inmuno-enzimático antígeno anticuerpo competitivo (ELISA), siguiendo el protocolo del fabricante. Los estándares y las muestras de plasma se ensayaron por duplicado.

6.5 Histología de gónadas

Las gónadas se fijaron en solución de Davidson (Shaw y Batalla, 1957) durante 24 h, seguido de etanol al 70%. Los tejidos se colocaron en bloques de parafina, para posteriormente hacer cortes a 5 μm en micrótopo, la tinción se llevó a cabo con hematoxilina y eosina, y las laminillas fueron montadas con resina (Humason, 1972). Las gónadas fueron fotografiadas con una cámara Olympus conectada a un microscopio Olympus CX-31.

6.6 Diseño experimental

6.6.1 Análisis histológico de la maduración final de ovocitos

Un total de 33 hembras con ovocitos vitelogénicos avanzados con un diámetro $>400 \mu\text{m}$ fueron seleccionadas mediante biopsias intraováricas bajo anestesia y mantenidas en tanques de agua de 7,000 L a 24-25 °C con recirculación de agua. Este tamaño es adecuado para inducir la maduración final en varias especies de meros (Tucker, 1994). Se tomaron muestras de sangre para el análisis de esteroides sexuales y las hembras se dividieron aleatoriamente en dos grupos. El primer grupo experimental de 24 hembras fue inducido a la maduración final, recibiendo una inyección dorsal intramuscular cada una, con una dosis de 1000 UI kg^{-1} de peso corporal, de gonadotropina coriónica humana (CHORULON, Intervet International, Boxmeer, Países Bajos). Posteriormente, tres hembras recibieron anestesia terminal a las 12h, mientras que las hembras que respondieron al tratamiento recibieron anestesia terminal a las 16 (n = 3) y 24 h (n = 3), con una previa toma de sangre en cada una de ellas. El segundo grupo de nueve hembras fue el grupo control, y cada hembra recibió 0.3 mL kg^{-1} de peso corporal de una solución salina fisiológica (0.7% NaCl) y se procesaron de la misma manera. Se realizó la disección de las gónadas y se fijó una porción central del ovario, para su análisis histológico.

Los ovocitos en diferentes etapas de desarrollo fueron fotografiados y se midieron, tanto el diámetro, así como la gota de aceite de los ovocitos, utilizando el programa ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

6.6.2 Confirmación *in vivo* de observaciones histológicas a través de biopsias intraováricas

Para el análisis *in vivo* de ovocitos se realizó un segundo experimento, con el objeto de validar las observaciones histológicas obtenidas en el primer experimento. Se utilizaron 36 hembras, en donde cada una procedente de un tanque específico estuvo identificada con una tira de plástico delgada con un código de color en la aleta dorsal. Catorce hembras con ovocitos vitelogénicos avanzados con diámetros $>400\ \mu\text{m}$ y 14 hembras con ovocitos $<400\ \mu\text{m}$ fueron inducidas a la maduración final, con una dosis inicial de hCG con $1000\ \text{UI kg}^{-1}$ de peso corporal, seguido de $500\ \text{UI kg}^{-1}$ de peso corporal a las 24 h (Kiewek-Martinez *et al.*, 2010a; Tseng y Ho, 1979; Watanabe *et al.*, 1995). Adicionalmente, se inyectaron ocho hembras con la solución salina, como controles, representando ambos grupos del diámetro del ovocito; cuatro y cuatro, respectivamente. Cada grupo se monitoreó en tanques de 7,000 L de agua de mar a 24-25 °C. Se tomaron biopsias intraováricas ($n = 50-100$ ovocitos) de la siguiente manera: A las 12 h, tres hembras de cada grupo fueron revisadas. A las 16 h, todas las hembras fueron revisadas y aquellas que respondieron al tratamiento de maduración se separaron en un tanque. A las 24 h, todas las hembras fueron revisadas nuevamente y se aplicó la segunda dosis. Las hembras que respondieron al tratamiento de 24 h fueron separadas en otro tanque. Las muestras de ovocitos *in vivo* en proceso de maduración final se fotografiaron inmediatamente y se midieron sus diámetros. Posteriormente, se les agregó agua destilada y se volvieron a fotografiar. En algunas muestras, el citoplasma de los ovocitos se aclaró con una gota de solución de Serra, compuesta de formalina al 37%, etanol, y ácido acético glacial, en una proporción de 4: 4: 2 (Harvey y Carolsfeld, 1993).

Los ovocitos se protegieron con un cubreobjetos, y después de que el citoplasma se observó claro, la posición de la vesícula germinal fue fotografiada.

6.6.3 Evaluación de la fertilización y fecundidad

En cada tanque, se colocaron dos machos con esperma fluyente al tacto abdominal. Previamente, el esperma se colectó en tubos de 30 mL estériles y se sometió a una prueba sencilla de motilidad en agua de mar, la cual consistió en tomar una pequeña alícuota del esperma en un portaobjetos, y observarla al microscopio. El esperma debió de estar completamente inmóvil; se colocó una gota de agua de mar, observando la inmediata activación de los espermatozoides. El esperma intacto se mantuvo en refrigeración. Cuando los ovocitos muestreados mediante biopsia ovárica se observaron con un diámetro alrededor de 850 μm , translúcidos, y flotantes en agua de mar, significó que la hembra se encontraba lista para desovar. Se registró el peso corporal de la hembra y se realizó un masaje abdominal suave, de atrás hacia delante, hasta observar la salida de los huevos por el poro genital, los cuales se colocaron en un tazón de vidrio seco de 2 L. Los ovocitos se fertilizaron mediante el método seco (Tseng y Poon, 1983), lo cual consistió en colocar 0.5 mL de esperma sobre los huevos, distribuyéndolo en diferentes puntos con una micropipeta. Se agregó medio litro de agua de mar, e inmediatamente se revolvió brevemente. Se agregó un 1L de agua de mar y se volvió a revolver suavemente por cinco minutos. Posteriormente, el tazón con los huevos fertilizados se vertió e incubó en un tanque de 60 L con aireación suave con piedra difusora y a 24-25 °C, por dos a tres h. El porcentaje de fertilización se determinó a partir de tres muestras ($n = 100-150$ huevos cada una). Los huevos que mostraron un desarrollo embrionario normal de 8 a 16 blastómeros en el polo animal estaban fertilizados, mientras que los huevos opacos o sin división celular, no lo estuvieron. Después de 6 h, los huevos se recogieron en una malla de 400 micras y se colocaron en una probeta graduada de vidrio. La fecundidad se calculó volumétricamente, en donde 1 mL tuvo en promedio 2,300 huevos, que, multiplicado por el número total de mL en la probeta, se obtuvo el número total de

huevos. Posteriormente se dividió entre el peso de la hembra y se obtuvo el número de huevos por kg de peso, expresado como huevos kg^{-1} . La viabilidad se estimó como el porcentaje de huevos flotantes y este se convirtió a número de huevos viables kg^{-1} .

6.6.4 Factores sociales en el cambio de sexo en confinamiento

Una vez culminado el segundo experimento en el mes de abril, los peces quedaron separados por sexo o con ambos sexos en los tanques de reproducción. Cada tanque de reproducción se definió como una unidad social con seis peces cada uno (sexteto de peces). Se establecieron dos unidades sociales con solo hembras (Hembras monosexo), tres unidades sociales con solo machos (Machos monosexo) y dos unidades sociales de sexo mixto (Sexo mixto) cada una con tres hembras y tres machos. El experimento culminó en septiembre del 2018. La identidad sexual de las gónadas se basó en observaciones en *M. rosacea* silvestre (Erisman *et al.*, 2008), mientras que el intersexo según observaciones en *E. akaara* en confinamiento (Okumura, 2001).

6.6.5 Expresión relativa de genes de aromatasa

El ARN total se extrajo de seis gónadas y seis cerebros provenientes de seis hembras monosexo, así como de seis hembras y seis machos de las unidades sociales de sexo mixto, utilizando el reactivo Tripure (Roche). Debido a que las unidades sociales de machos monosexo cambiaron de sexo, el ARN total se extrajo de seis peces en intersexo y seis hembras *de novo* (neohembras). El ARN total se trató con el kit Turbo DNA-free (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA). Posteriormente se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit cDNA Select iScript™, Oligo dT-20 (Bio-Rad Laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de qPCR se realizó utilizando oligos específicos de los genes *cyp19a1a* y *cyp19a1b*, diseñados a partir de secuencias parciales ya reportadas en *M. rosacea* (GeneBank números de acceso: JX274418.1 y JX274419.1, respectivamente), así como oligos de β -actina como gen de

referencia de la secuencia reportada en *E. akaara* (GeneBank número de acceso: HQ007251.1) (Tabla I). La mezcla maestra de qPCR fue: 3 μL de cDNA (dilución 1: 5), 0.4 μL de cada oligo (sentido y anti-sentido) a partir de una solución 10 μM stock (0.4 pmol / μL), 5.4 μL de agua libre de nucleasa (Sigma-Aldrich) y 10 μL (1X) SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad Laboratories); 20 μL de volumen final por reacción. El programa del termo ciclador CFX96 Touch TM (Bio-Rad Laboratories) fue: activación enzimática 98 °C durante 30 s, 40 ciclos a 98 °C, 10 s; 60 °C durante 15 s para alineamiento y extensión, y una curva de separación: 65 a 95 °C en incrementos de 0.5 °C, cada 5 s. Se obtuvo una curva de calibración para cada gen después de mezclar 2 μL de cada muestra, diluirla 1: 5 con agua libre de nucleasas y hacer cinco diluciones seriadas. El valor del umbral de referencia se ajustó en cada curva de calibración, lo que dio como resultado un 100% de eficiencia ($E = 2$) (Rasmussen, 2001), utilizando el CFX Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories). La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ (Livak y Schmittgen, 2001), en donde el promedio de la expresión relativa (Cq) de las hembras en las unidades sociales de sexo mixto se consideró como el control, mientras que las hembras monosexo, los machos en sexo mixto, los intersexo y neohembras (procedentes de las unidades de macho monosexo) como tratamientos. El doble delta ($\Delta\Delta$) se llevó a cabo mediante dos substracciones: 1) se substrajo el valor Cq del control al del valor Cq de β -actina control (Cq-control) y en el caso de cada uno de los tratamientos: el valor Cq del tratamiento al del valor Cq de β -actina tratamiento (Cq-tratamiento) y 2) se substrajo el valor Cq-tratamiento al del Cq-control.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados en la expresión relativa de genes de aromatasa en gónada y cerebro de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño de producto (bp)
Cyp19a1aQPCR1F ¹	CAGCAGACAGTGGAGGTCAG	71
Cyp19a1aQPCR1R ¹	ACATGACCCAAACCGTCCAG	
Cyp19a1bQPCR1F ²	ACCTCCAGAAGTCGATGGGA	134
Cyp19a1bQPCR1R ²	GTTTGAGACGTCCACCACGA	
β-actinQPCR1F ³	GAGGGGTATCCTGACCCTGA	118
β-actinQPCR1R ³	CTCCTCAGGGGCAACTCTCA	

Notas: ¹GeneBank no. JX274418.1; ²GeneBank no. JX274419.1; ³GeneBank no. HQ007251.1

6.7 Análisis estadístico

Los datos de esteroides sexuales, diámetro de ovocitos, fecundidad, y viabilidad de huevos, se expresaron como Promedio ± Desviación estándar (DE). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con una evaluación previa de la normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) y una homogeneidad de varianza (prueba de Levene). En el caso del diámetro de los ovocitos (vitelogénicos, en migración, y en rompimiento de vesícula germinal), las diferencias entre las medias se analizaron con la prueba de Tukey. Para las mediciones de esteroides sexuales durante las etapas reproductiva y post-reproductiva, se utilizó un ANOVA de dos vías en donde los factores fueron sexo y mes. Los datos de expresión relativa de aromatasas no mostraron normalidad; por lo tanto, se analizaron con estadística no paramétrica, utilizando la prueba de H de Kruskal-Wallis, presentando la mediana y el intervalo de confianza al 95%. La subsecuente comparación de las medianas se realizó con la prueba de Dunn. La significancia estadística se estableció en $P < 0,05$, utilizando el software SPSS 17.0 (IBM SPSS, Armonk, NY).

7. RESULTADOS

7.1 Desarrollo y maduración final de ovocitos

La histología de los ovarios mostró que el grupo control y el grupo inducido por hormonas tuvieron ovocitos en crecimiento primario, representado por el estadio de cromatina-nucleolar, midiendo $55 \pm 12 \mu\text{m}$, con dos nucléolos grandes adyacentes a la membrana nuclear (Fig. 5A), y el estadio peri-nucleolar, con varios nucléolos dispuestos en la periferia de la vesícula germinal (VG), midiendo $102 \pm 16 \mu\text{m}$ (Fig. 5B). El crecimiento pre-vitelogénico de los ovocitos comenzó en el estadio de alvéolo cortical, midiendo $220 \pm 30 \mu\text{m}$, con alvéolos situados en la periferia del citoplasma basófilo, una fina zona radiata, una capa de células de granulosa, y pequeñas gotas o vesículas de aceite alrededor de la VG (Figs. 5B y 5C). La VG mostró cromosomas en forma de plumaje ("*lampbrush chromosomes*"). A medida que continuó la entrada de vitelo al ovocito, se presentó un aumento de tamaño durante la fase vitelogénica, con un rango de 300 a 470 μm y con un promedio de $410 \pm 52 \mu\text{m}$ (Figs. 5D y 6A).

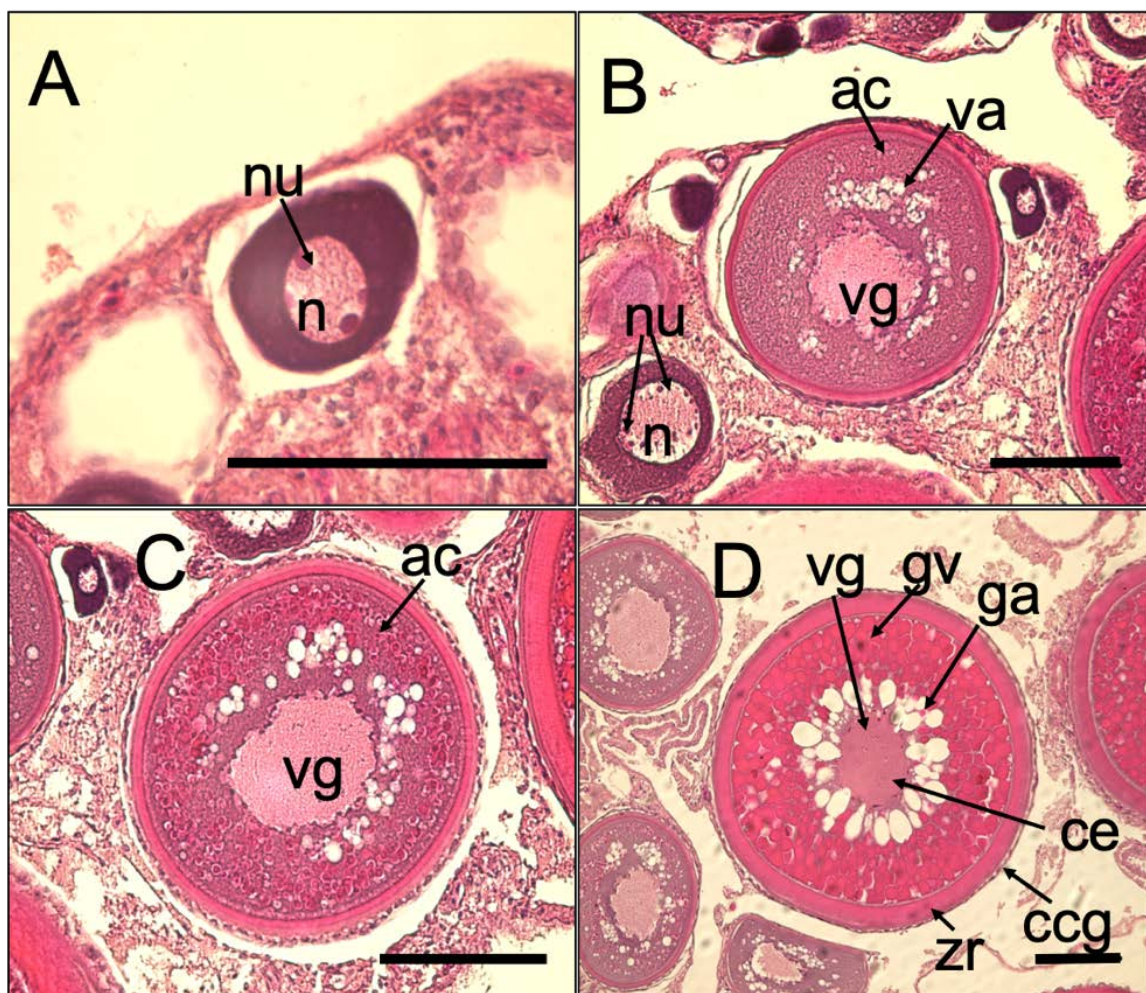


Figura 5. Etapas de ovocitos en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Crecimiento primario: (A) estadio cromatina-nucléolo, y estadio (B) peri-nucléolo (abajo, esquina izquierda). Crecimiento pre-vitelogénico: (B y C), mostrando el estadio de alvéolos corticales; (D) estadio vitelogénico temprano. n = núcleo, nu = nucléolo, ac = alvéolos corticales, va = vesículas de aceite, vg = vesícula germinal, gv = gránulos de vitelo, ga = gotas de aceite, ce = cromosomas emplumados, zr = zona radiata, ccg = capa celular granulosa. Escala = 100 μ m.

En los ovocitos vitelogénicos, la zona radiata se volvió más gruesa; el citoplasma eosinofílico se llenó con gránulos de vitelo y la VG, situada en el centro del ovocito, mostró cromosomas emplumados más grandes y notorios; rodeando a la VG, se observaron pequeñas vesículas de aceite (Fig. 6B).

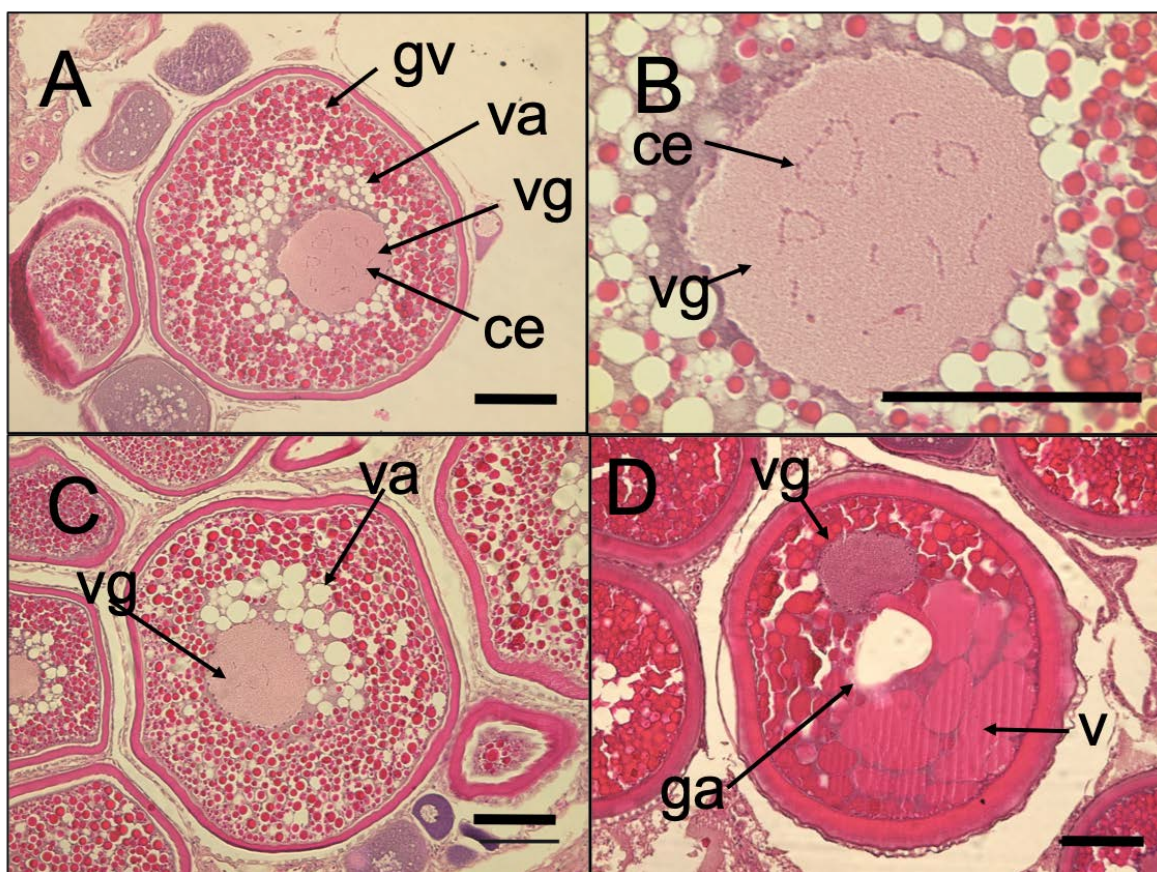


Figura 6. Vitelogénesis avanzada y principio de la maduración final en ovocitos en cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. (A) Vitelogénesis avanzada. (B) Vesícula germinal. (C) Desplazamiento de vesículas de aceite hacia un polo. (D) Migración de la vesícula germinal concomitante con la coalescencia de una gota de aceite. va = vesículas de aceite, vg = vesícula germinal, gv = gránulos de vitelo, ga = gota de aceite, v = vitelo, ce = cromosomas emplumados. Escala = 100 μ m.

Previamente a la maduración final del ovocito, la migración comenzó con cierta coalescencia y desplazamiento de las pequeñas gotas de aceite hacia un lado de la VG. Dicho desplazamiento concentró las pequeñas gotas de aceite hacia el polo vegetal del ovocito (Fig. 6C). En esta etapa, los cromosomas emplumados ya no se observaron. La maduración final se logró en los ovarios de nueve hembras experimentales inducidas con la hormona hCG y se confirmó en seis mediante histología. Tanto la migración de la VG (Fig. 6D y Figs. 7A y 7B), así como el rompimiento de esta (Figs. 7C y 7D), se observó entre las 16 y 24 h después de la

primera inyección. No hubo cambios morfológicos en ovocitos vitelogénicos en las cabrillas control

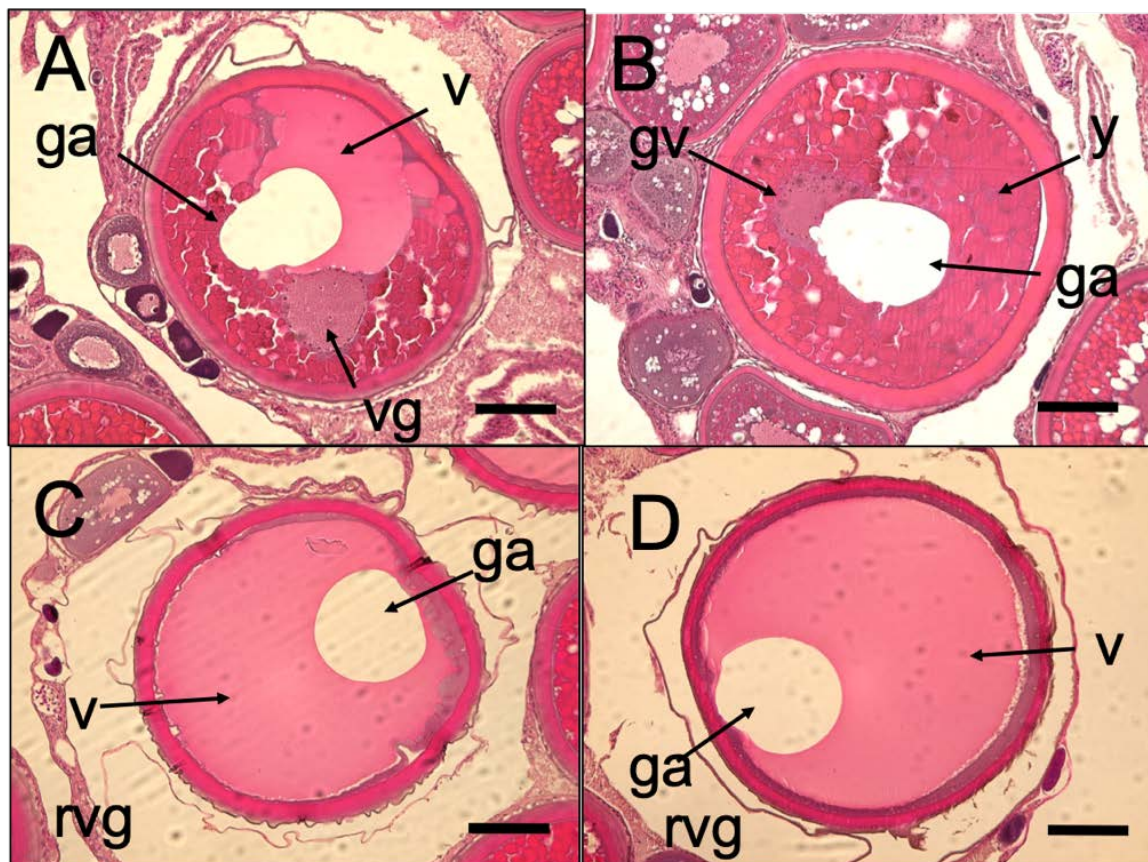


Figura 7. Migración de la vesícula germinal concomitante con la coalescencia de una gota de aceite (A y B). Rompimiento de la vesícula germinal (rvg) concomitante con la coalescencia de una gota de aceite (C y D). vg = vesícula germinal, v = vitelo, ga = gota de aceite. Escala = 100 μ m.

Macroscópicamente los ovarios contenían ovocitos visibles en su etapa inicial de hidratación (ovarios maduros) (Fig. 8).



Figura 8. Disección de ovarios maduros de *Mycteroperca rosacea*, en donde se observan ovocitos en su etapa de hidratación inicial, después del rompimiento de la vesícula germinal.

La migración de la VG ocurrió en ovocitos vitelogénicos con un rango de 425-470 μm de diámetro, con un promedio de $454 \pm 10 \mu\text{m}$. Cuando la VG se localizó aproximadamente a la mitad del desplazamiento hacia el polo animal, las gotitas de aceite se aglomeraron rápidamente, alcanzando aproximadamente de un medio a tres cuartas partes (90-120 μm) del diámetro final de la única gota de aceite observable en el ovocito desovado. Adicionalmente, aproximadamente un tercio de los gránulos de vitelo se observaron disueltos, es decir, ya en una forma líquida (Figs. 7A y 7B).

Después de que la VG alcanzó el polo animal, se desintegró (rompimiento de la membrana nuclear), dejando los ovocitos un poco sueltos de sus folículos y midiendo en promedio $485 \pm 16 \mu\text{m}$ (Fig. 7C y 7D). En este estadio del ovocito, la gota de aceite midió $164 \pm 6 \mu\text{m}$, y todos los gránulos de vitelo se observaron disueltos.

Con respecto a la coalescencia de la gota de aceite en relación con el tamaño del ovocito, se observó que la gota de aceite casi estuvo formada entre las 16 y 24 h después de la primera inyección. La prueba de ANOVA mostró una diferencia significativa en diámetro entre los estadios de ovocitos vitelogénicos avanzados, la migración de la VG y el rompimiento de la VG ($P < 0.05$). El análisis posterior entre las medias mostró que estas tres etapas de ovocitos fueron significativamente diferentes entre sí ($P < 0.05$). El tamaño promedio de los ovocitos en el desove fue de $880 \pm 8 \mu\text{m}$, y la gota de aceite midió $179 \pm 4 \mu\text{m}$ (Fig. 9).

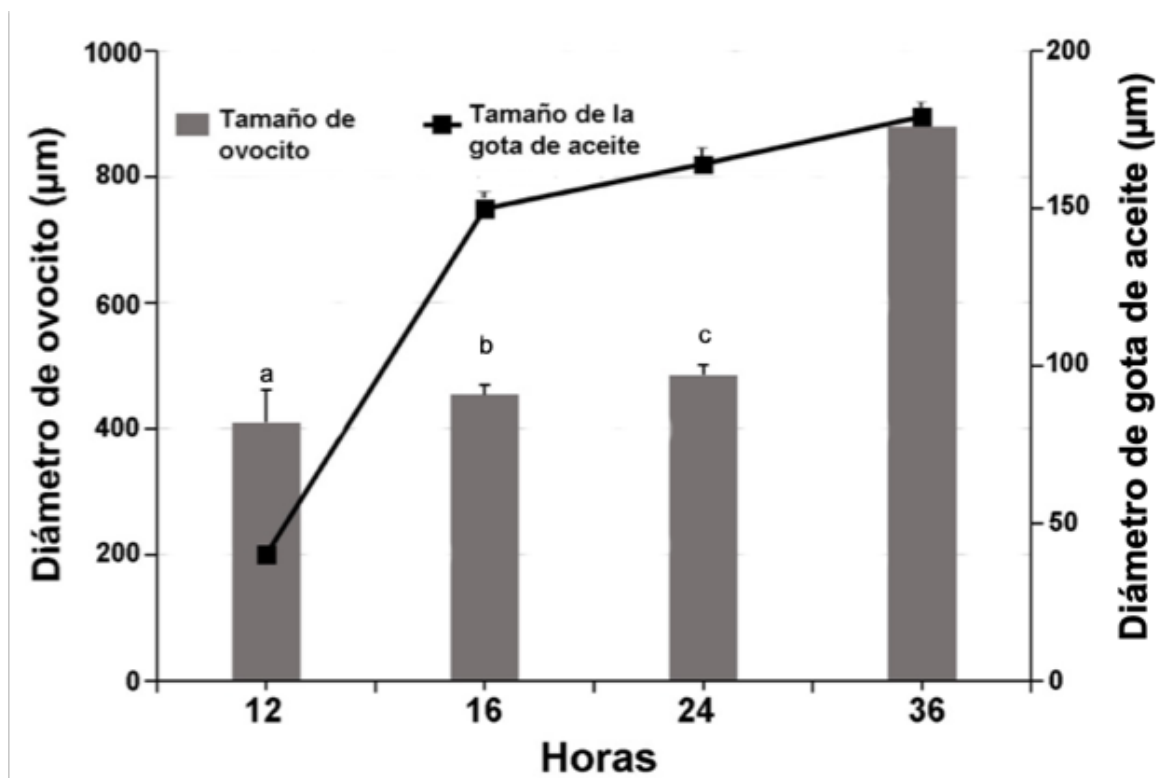


Figura 9. Coalescencia de la gota de aceite en relación con el tamaño del ovocito en hembras maduras de *Mycteroperca rosacea*. El tiempo a las 12 h corresponde a la etapa de desplazamiento de las gotas de aceite; a las 16 a la etapa de migración y a las 24 h al rompimiento de la vesícula germinal. A las 36 h, al desove. Letras distintas denotan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Una síntesis del proceso de crecimiento y desarrollo vitelogénico y de la maduración final de ovocitos de *M. rosácea* se presenta en la figura 10.

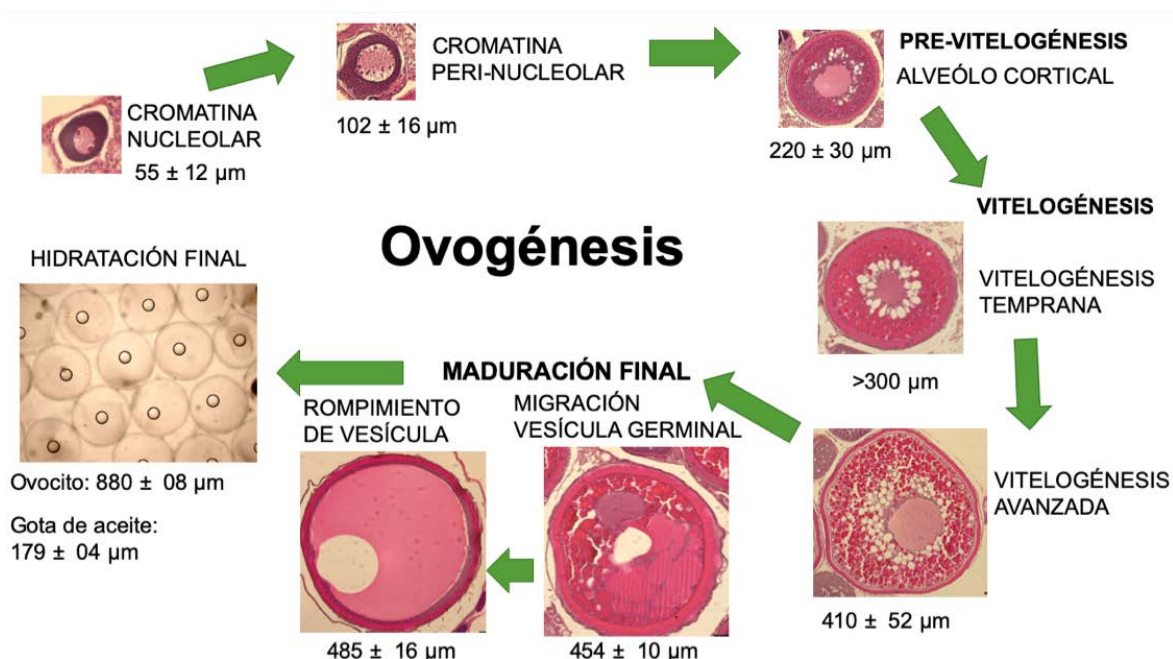


Figura 10. Ovogénesis; crecimiento, desarrollo vitelogénico, y maduración final de ovocitos de *Mycteroperca rosacea*.

7.2 Esteroides sexuales en ovocitos competentes

La primera inyección de hCG desencadenó un pico de E_2 de $20 \pm 4.1 \text{ ng mL}^{-1}$, y T de $18 \pm 3.0 \text{ ng mL}^{-1}$ a las 16 h, y que prosiguió de forma similar a las 24 h (Tabla II). Estadísticamente, a las 12, 16 y 24 h, los niveles plasmáticos de E_2 y T fueron significativamente mayores que el grupo de cabrillas control ($P < 0.05$).

Tabla II. Niveles plasmáticos (Media ± DE) de estradiol-17 β , y testosterona en los tiempos de muestreo 0, 12, 16 y 24 h, ($n = 3$ / cada tiempo) en hembras maduras de cabrilla sardinera. Diferentes letras en cada renglón indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0.05$).

Tiempo	Estradiol-17 β (ng mL $^{-1}$)		Testosterona (ng mL $^{-1}$)	
	Control	Inducido	Control	Inducido
0	7 ± 1.1 a	8 ± 2.0 a	11 ± 1.1 a	12 ± 1.1 b
12	8 ± 2.0 a	14 ± 2.0 b	11 ± 2.3 a	16 ± 1.1 b
16	8 ± 2.0 a	20 ± 4.1 b	11 ± 1.1 a	18 ± 3.0 b
24	8 ± 3.0 a	19 ± 3.0 b	10 ± 1.1 a	21 ± 2.3 b

7.3 Diámetro inicial de ovocitos y desove

En el segundo experimento, 10 de las 14 hembras del primer grupo, con diámetros de ovocitos $<400 \mu\text{m}$ (310-348 μm) y ocho de las 14 hembras en el segundo grupo, con diámetro de ovocitos $>400 \mu\text{m}$ (416-428 μm), no mostraron la gota de aceite y no presentaron maduración final. En todas las demás hembras; cuatro en el primer grupo con un rango de 370-395 μm y seis en el segundo, con un rango de 412-480 μm , cuando la gota de aceite se observó, ya sea a las 16, o 24 h, se obtuvieron huevos viables, en un tiempo de 26 a 40 h después de la primera inyección (10 a 16 h después de la segunda inyección). En las muestras intraováricas se observó que los ovocitos más grandes crecieron hasta 520 μm , como efecto de la hidratación temprana.

En las hembras que respondieron a la maduración final, no se encontraron diferencias significativas en fecundidad ($P > 0.05$), o en la viabilidad de los huevos ($P > 0.05$), entre los dos grupos de peces (Tabla III). La fecundidad tuvo un rango entre 96 y 230×10^3 huevos kg^{-1} (promedio global: 168×10^3 huevos kg^{-1}). La fertilización varió entre 70 y 100% (promedio global: 88%). Los huevos viables tuvieron un rango entre 55 y 90% (promedio global: 71% = 114×10^3 huevos kg^{-1}). No hubo cambios morfológicos en ovocitos intraováricos en las hembras control.

Tabla III. Desempeño reproductivo de hembras de cabrilla sardinera que mostraron la gota de aceite durante la migración de la vesícula germinal, y tuvieron maduración final de ovocitos con hCG a 24-25 °C. No se observó una diferencia significativa.

Desempeño reproductivo	Tamaño de ovocito (μm)	
	<400	>400
Peso corporal promedio (kg)	2.5 ± 0.4	2.7 ± 0.5
Fecundidad: $\times 10^3 \text{ kg}^{-1}$	154 ± 51	182 ± 33
Huevos viables: $\times 10^3 \text{ kg}^{-1}$	99 ± 22	129 ± 26

En los ovocitos que se trataron con la solución aclaradora del citoplasma Serra, inmediatamente después de obtener la biopsia intraovárica *in vivo*, se logró identificar la migración de la VG, simultáneamente con la coalescencia de una

gota de aceite, a las 16 o 24 h (Fig. 11). Estos resultados confirmaron las observaciones histológicas.

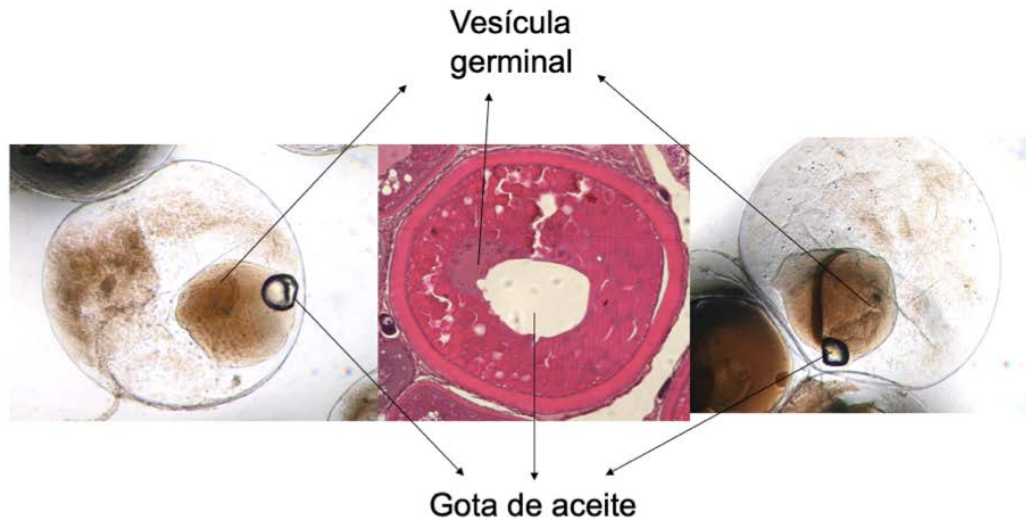


Figura 11. Observación simultánea de la migración de la vesícula germinal y la coalescencia de una sola gota de aceite, por histología (en la parte central) y en ovocitos intraováricos aclarados con solución de Serra, en cada extremo.

De igual manera, en los ovocitos intraováricos *in vivo* que se trataron con agua destilada, se mejoró notablemente la observación de una gota de aceite en la periferia a las 16 y 24 h después de la primera inyección (Fig. 12). En estas observaciones, la VG no se identificó debido a que el citoplasma del ovocito se observó opaco.

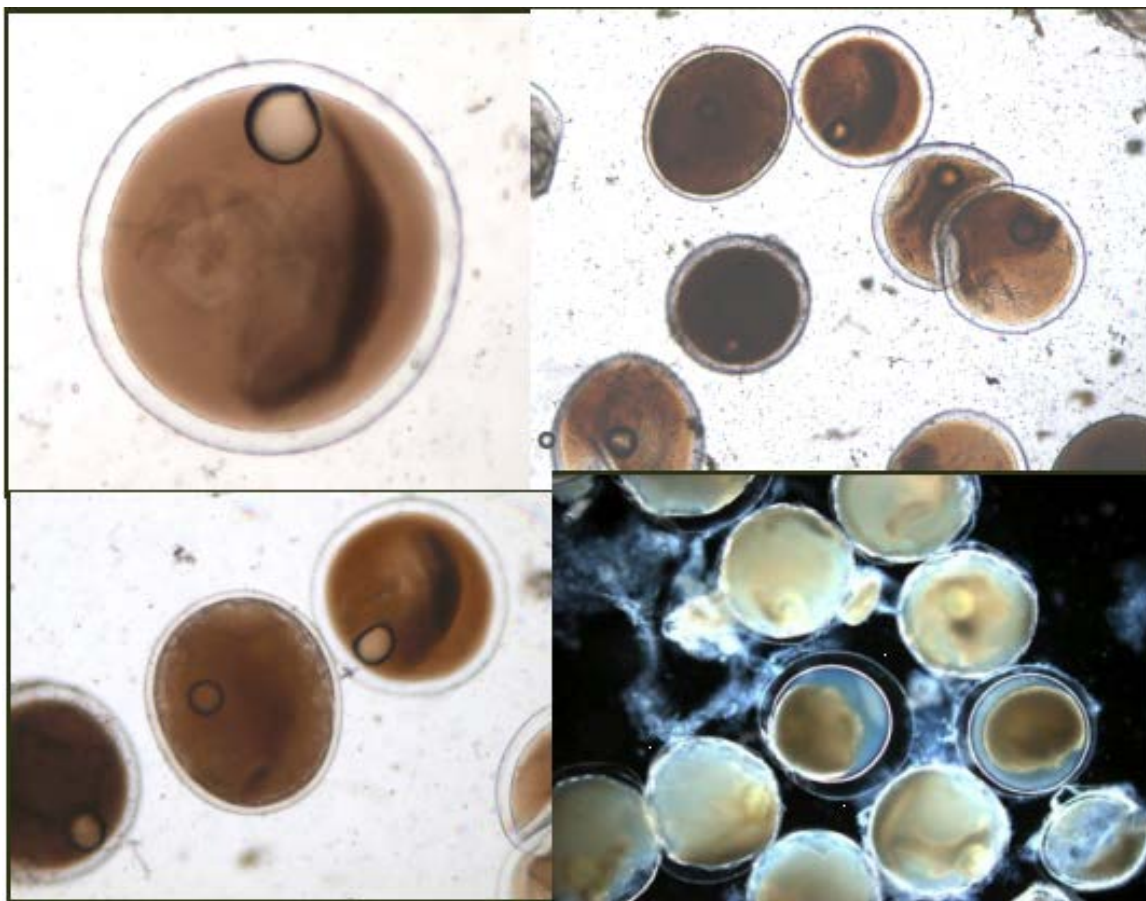


Figura 12. Observación de la coalescencia de una sola gota de aceite después de agregar agua destilada a los ovocitos en procesos de maduración final.

7.4 Cambios en esteroides sexuales

En todas las unidades sociales, los esteroides sexuales tuvieron los niveles más altos en la primavera, con un pico en mayo, disminuyendo levemente en junio y luego disminuyeron de manera aguda en julio, agosto y septiembre (Figs. 13, 14 y 15). Los niveles en los meses de primavera de 17β -estradiol (E2) en plasma en las hembras fueron significativamente más altos que en los machos ($P < 0.05$), independientemente de la unidad social. En mayo, las hembras monosexo y las hembras en sexo mixto alcanzaron picos de 15 ± 1.7 y 14 ± 2.1 ng mL^{-1} , respectivamente, mientras que en los machos monosexo y los machos en sexo mixto tuvieron 6 ± 1.7 y 4.5 ± 1.2 ng mL^{-1} , respectivamente (Fig. 13). En contraste, los niveles en plasma de 11-ketotestosterona (11-KT) en los machos

fueron significativamente más altos que en las hembras ($P < 0.05$), independientemente de la unidad social. En mayo, los machos monosexo y los machos en sexo mixto alcanzaron un nivel máximo de 3.7 ± 0.5 y 3.6 ± 0.5 ng mL⁻¹, respectivamente, mientras que los valores de hembras monosexo y hembras en sexo mixto se mantuvieron constantes, pero en mayo tuvieron un nivel máximo de 0.8 ± 0.3 y 0.6 ± 0.2 ng mL⁻¹, respectivamente (Fig. 14). Los niveles en los meses de primavera de testosterona (T) en plasma en los machos fueron significativamente más altos que en las hembras ($P < 0.05$), independientemente de la unidad social. En mayo, los machos monosexo y los machos en sexo mixto alcanzaron un pico de 22 ± 3.3 y 23 ± 3.8 ng mL⁻¹, respectivamente, mientras que las hembras monosexo y las hembras en sexo mixto tuvieron 16 ± 1.2 y 15 ± 3.2 ng mL⁻¹, respectivamente (Fig. 15). Durante junio y julio, los niveles de E2, 11-KT y T disminuyeron, y desde agosto estos esteroides permanecieron bajos, sin diferencias significativas, hasta septiembre ($P > 0.05$).

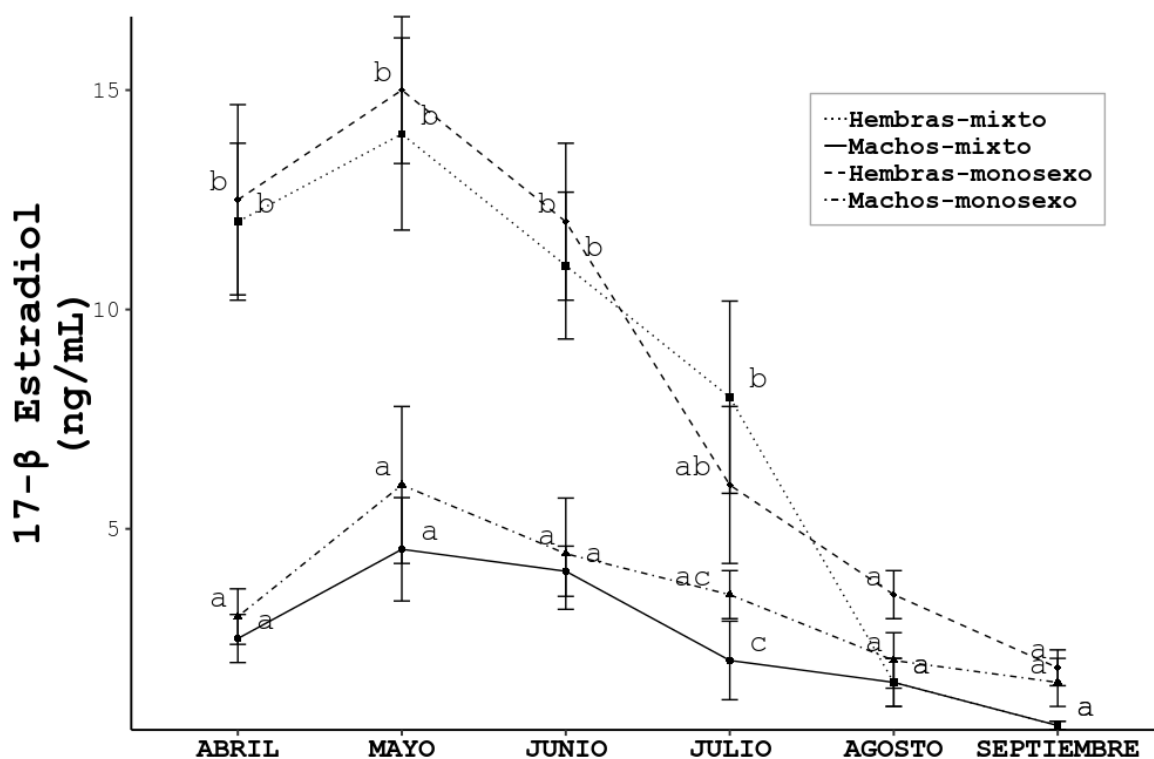


Figura 13. Niveles (promedio \pm DE) de estradiol-17 β en plasma de cabrilla sardinera en hembras y machos monosexo y hembras y machos en sexo mixto, durante las temporadas de reproducción (abril a junio) y post-reproducción (julio septiembre). Diferentes letras muestran diferencias significativas en cada mes ($P < 0.05$).

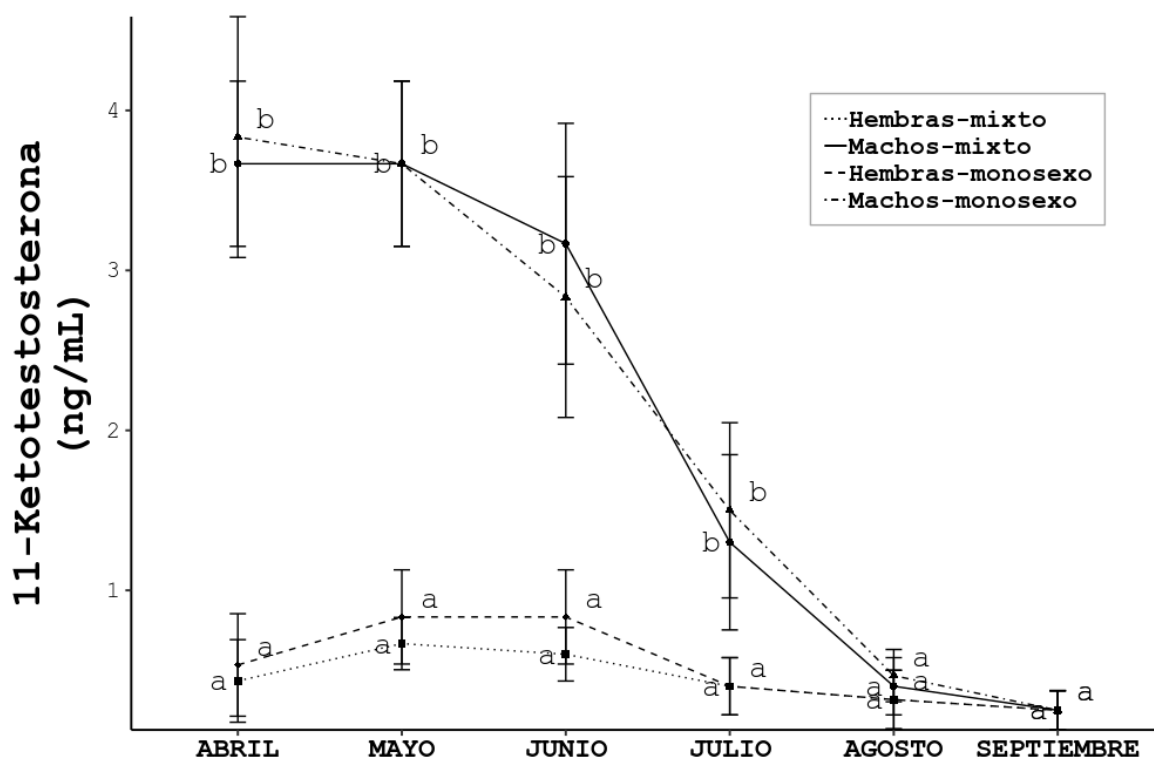


Figura 14. Niveles (promedio \pm DE) de 11-ketotestosterona en plasma de cabrilla sardinera en hembras y machos monosexo y hembras y machos en sexo mixto, durante las temporadas de reproducción (abril a junio) y post-reproducción (julio septiembre). Diferentes letras muestran diferencias significativas en cada mes ($P < 0.05$).

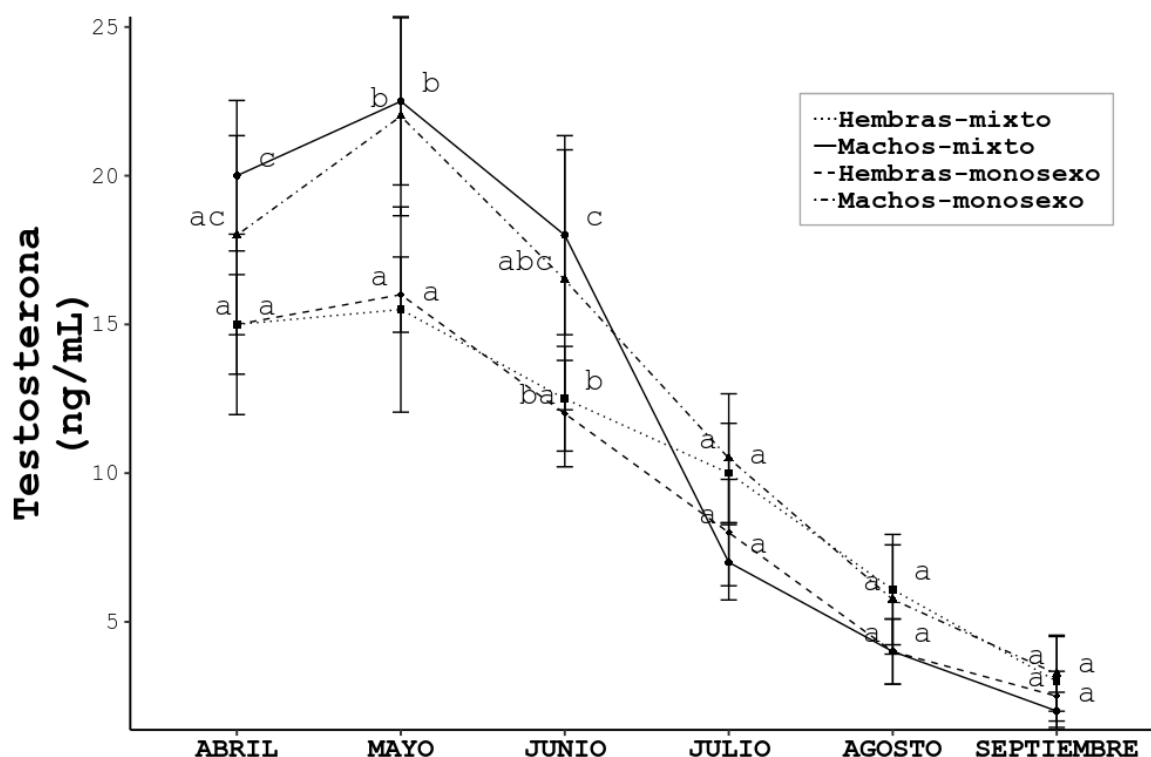


Figura 15. Niveles (promedio \pm DE) de testosterona en plasma de cabrilla sardinera en hembras y machos monosexo y hembras y machos en sexo mixto, durante las temporadas de reproducción (abril a junio) y post-reproducción (julio septiembre). Diferentes letras muestran diferencias significativas en cada mes ($P < 0.05$).

7.5 Supervivencia en las unidades sociales

Dos hembras de dos unidades monosexo diferentes murieron en julio y agosto, respectivamente y las hembras restantes sobrevivieron. Todas las hembras y machos de las unidades sociales de sexo mixto sobrevivieron. En septiembre, la mayoría de los machos en las unidades sociales monosexo mostraron síntomas de estrés: actividad alimenticia reducida, seguida de letargo y posteriormente poca capacidad de respuesta, momento en el que se aplicó anestesia terminal. Cabe mencionar que no todos los machos tuvieron los síntomas al mismo tiempo, y en general, uno o dos peces comenzaron, y el resto siguió deteriorándose en las siguientes dos semanas. Durante el proceso, dos machos mostraron un cambio de coloración de marrón a un color blanquecino. En la primera unidad social de

machos monosexo todos los peces murieron; en la segunda un pez sobrevivió y en la tercera, dos peces sobrevivieron.

7.6 Observación de gónadas en las unidades sociales

Al final del experimento, las hembras de las unidades sociales monosexo y de sexo mixto presentaron ovarios pequeños con ovocitos en crecimiento primario; mostrado por los estadios de cromatina-nucléolo y perinucleolar (Fig. 16A). La identidad sexual correspondió a hembras inmaduras. Sin embargo, una hembra monosexo mostró predominantemente ovocitos primarios, combinados con muy pocos grupos de espermatogonias y espermatocitos dispersos en el tejido (Fig. 16B).

Los machos en las unidades sociales de sexo mixto presentaron testículos pequeños con grupos de espermatogonias, algunos con un lumen central conteniendo pequeñas cantidades de espermatocitos. La identidad sexual correspondió a machos maduros inactivos (Fig. 17A). En las unidades sociales de machos monosexo, se identificó un macho sobreviviente como se describe anteriormente en la Fig. 17A. Seis se encontraron en una etapa sexual de transición, en la que dos sobrevivieron y tenían predominantemente testículos intersexuales, con tejido testicular normal con ovocitos primarios dispersos, identificados como machos inmaduros intersexo (Fig. 17B), mientras que cuatro tenían un patrón de intersexo definido como ovo-testes, en donde los ovocitos primarios se encontraron separados del tejido testicular (Fig. 17C), con una regresión testicular evidente en algunos individuos (Fig. 17D). Los once machos restantes cambiaron de sexo a neohembras, teniendo pequeños ovarios en crecimiento primario (Figs. 16C y 16D), como las hembras inmaduras monosexo y en sexo mixto. La identidad sexual y la biometría de “machos” monosexo en las unidades sociales, según la histología del tejido gonadal se muestran en la tabla IV.

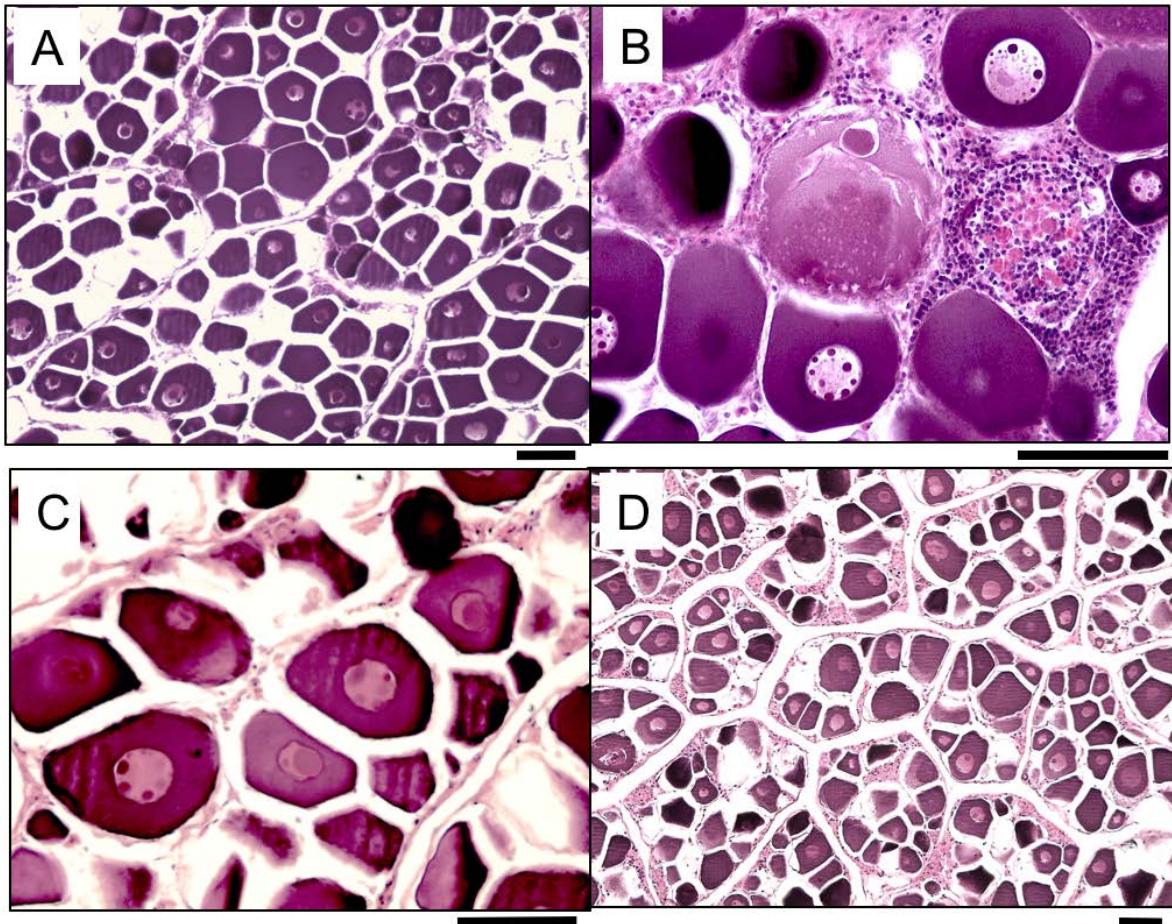


Figura 16. Histología de las gónadas de cabrilla sardinera después de seis meses de confinamiento. (A) Hembra monosexo inmadura con crecimiento de ovocitos primario. (B) Hembra monosexo inmadura con un grupo de espermatogonias y espermatocitos. (C y D) Neohembras inmaduras de unidades sociales de machos monosexo. Escala de barra = 100 μm .

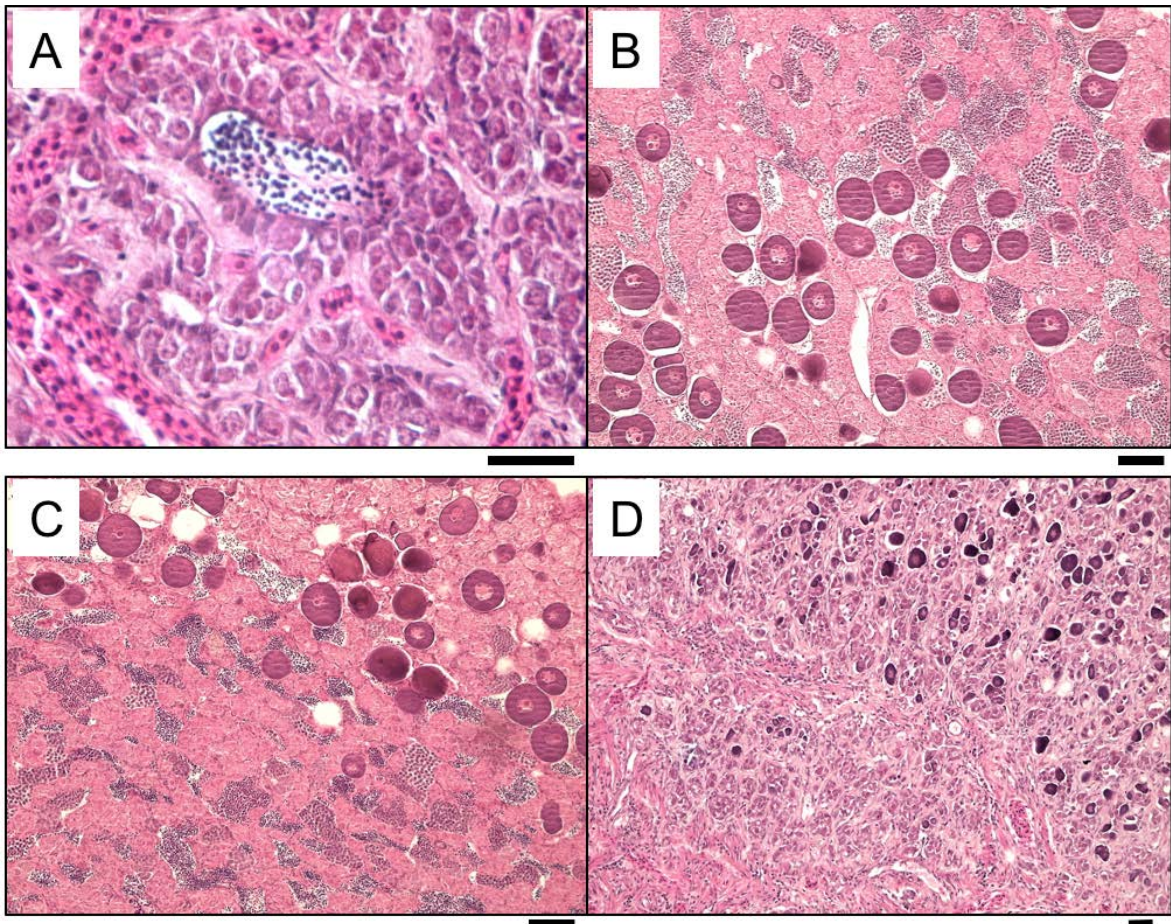


Figura 17. Histología de las gónadas de cabrilla sardinera después de seis meses de confinamiento. (A) Macho maduro inactivo de una unidad social de sexo mixto. (B) Macho intersexo inmaduro con testículos con ovocitos primarios dispersos. (C y D) Machos intersexo inmaduros en etapa sexual de transición avanzada con ovo-testes. Escala de barra = 100 μ m.

Tabla IV. Biometría de cabrilla sardinera mostrando la longitud estándar, el peso corporal y el sexo de la gónada en las unidades sociales con sextetos de machos monosexo después de seis meses en confinamiento. Los datos están organizados de mayor a menor de acuerdo con la longitud registrada en abril. †: cabrilla que no sobrevivió.

	Longitud estándar (mm)		Peso corporal (g)		Sexo de la gónada
	Abr	Sep	Abr	Sep	
Unidad social #1					
1	620	620	2700	2750	Hembra inmadura †
2	610	610	2500	2450	Ovo-testes †
3	590	590	2500	2400	Hembra inmadura †
4	560	560	2400	2350	Hembra inmadura †
5	530	530	2200	2200	Ovo-testes †
6	510	510	1800	1900	Hembra inmadura †
Unidad social #2					
7	630	630	2600	2450	Ovo-testes †
8	500	500	1400	1350	Macho maduro inactivo
9	480	480	1200	1100	Ovo-testes †
10	440	440	1100	950	Hembra inmadura †
11	430	430	1000	1000	Hembra inmadura †
12	420	420	900	900	Hembra inmadura †
Unidad social #3					
13	640	640	3600	3500	Hembra inmadura †
14	600	600	2500	2600	Intersexo inmaduro
15	580	580	3300	3150	Hembra inmadura †
16	500	500	1400	1300	Intersexo inmaduro
17	470	480	1500	1300	Hembra inmadura †
18	430	430	1100	1050	Hembra inmadura †

7.7 Expresión relativa de los genes de aromatasa

La expresión relativa del gen en ovario *cyp19a1a* no fue significativamente diferente entre los grupos sociales ($P > 0.05$) (Fig. 18). Sin embargo, la expresión de *cyp19a1b* en cerebro mostró una diferencia significativa ($P < 0.001$) (Fig. 19). La prueba múltiple de Dunn indicó que los intersexos tuvieron un valor significativamente más alto de 2.73 (2.36–3.21) en comparación con las hembras monosexo 1.52 (1.08–1.89, $P = 0.029$), hembras en sexo mixto 1.27 (0.67–1.97, $P = 0.008$) y con neohembras 1.17 (0.83–1.68, $P = 0.003$), mientras que se obtuvo un valor no significativo en comparación con los machos en sexo mixto 2.15 (1.53–2.58, $P = 0.673$).

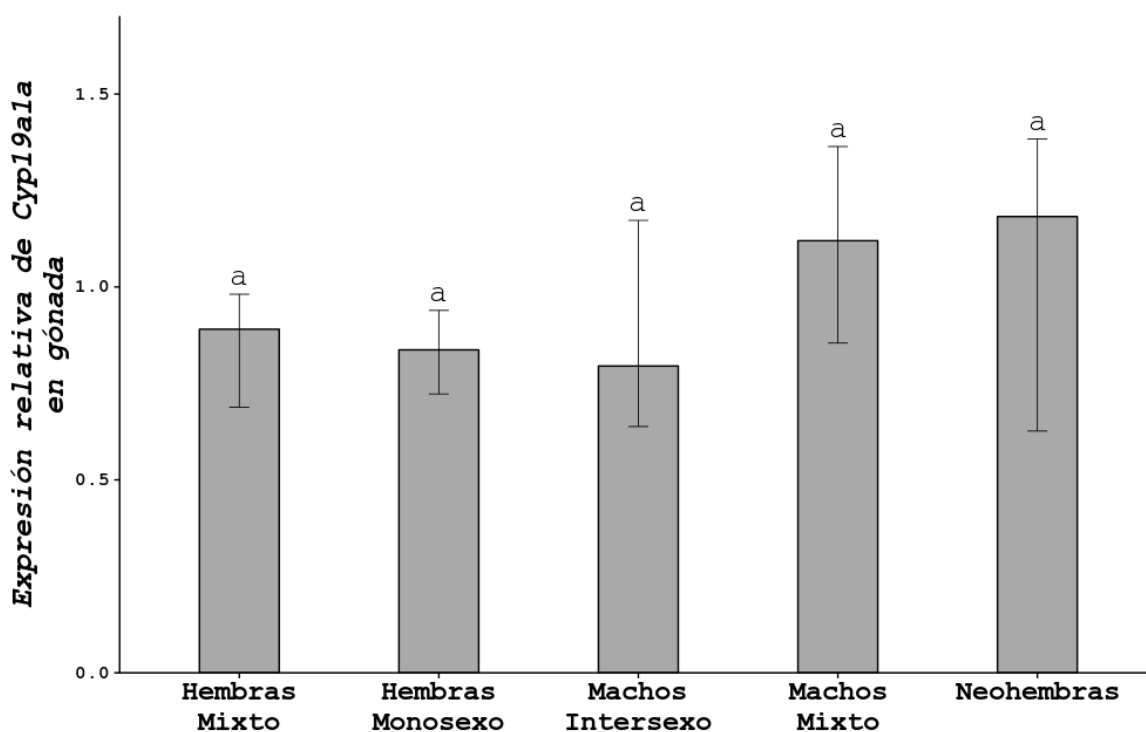


Figura 18. Expresión relativa del gen de aromatasa en ovario *cyp19a1a* entre las unidades sociales en la cabrilla sardinera.

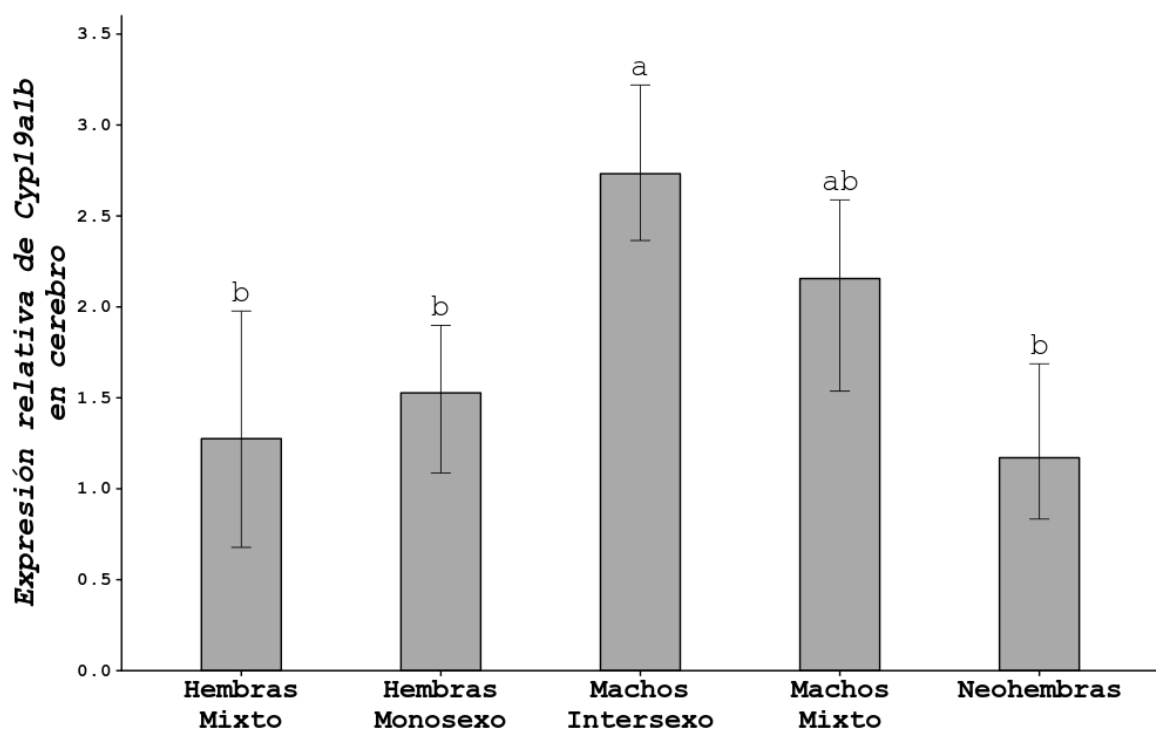


Figura 19. Expresión relativa del gen de aromatasa *cyp19a1b* en cerebro entre unidades sociales en la cabrilla sardinera.

8. DISCUSIÓN

Los estadios de ovocitos durante la maduración final en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* fueron muy similares a los descritos en el mero negro hermafrodita protogínico *M. bonaci* descrito por Brulé *et al.* (2003) y el mero atigrado *M. tigris* (Valenciennes) descrito por Caballero-Arango *et al.* (2013). Estas dos especies fueron estudiadas en el sur y noroeste del Golfo de México, respectivamente. En el mero rojo *Epinephelus morio* (Valenciennes) descrito por Moe (1969) en el este del Golfo de México, también se observaron cromosomas emplumados que posteriormente desaparecieron al inicio de la maduración final. Estos cromosomas están involucrados en la transcripción de grandes cantidades de ARN para la síntesis de proteínas antes de la maduración final (Guraya, 1986). En general, la gametogénesis en la cabrilla sardinera también concordó con previas descripciones (Erisman *et al.*, 2007; Kiewek-Martinez *et al.*, 2010b), mostrando, además, etapas de ovocitos en desarrollo similares a las descritas en la subfamilia Epinephelinae.

En el presente estudio la migración de la vesícula germinal (VG) fue concomitante con la coalescencia de una única gota de aceite entre 16 y 24 h. La coalescencia inicial y el desplazamiento de las pequeñas gotas de aceite, a un lado de la VG, fue un cambio morfológico característico en el ovocito, lo que indicó el inicio de la migración hacia el polo animal, tal y como se describió en la dorada *Sparus aurata* L. (Gothilf *et al.*, 1997). Estos patrones fueron similares también en *M. bonaci* (Brulé *et al.*, 2003). En esta etapa el proceso de desarrollar un ovocito completamente lleno de vitelo pudo haber estado relacionada con la síntesis de estradiol (Nagahama, 1994), como se observó un aumento en los niveles de E₂ y T a las 12 h y un pico a las 16 y 24 h después de la primera inyección, indicando que los ovocitos en vitelogénesis avanzada llegaron a su máximo crecimiento. El vitelo en los ovocitos es crucial para la supervivencia de las larvas eclosionadas,

ya que es la única reserva nutricional hasta el inicio de la alimentación exógena (Manaños *et al.*, 2008).

El desplazamiento y la coalescencia de pequeñas gotas de aceite a un lado de la VG, facilitó una mayor y más rápida coalescencia posterior de la única gota de aceite, aún un tanto amorfa, pero que recuperó progresivamente su forma redondeada al momento de la ruptura de la VG. Al mismo tiempo, los gránulos de vitelo se fusionaron llenando el ovoplasma de vitelo líquido, para proseguir con la entrada temprana de agua, en el proceso de la última hidratación. La importancia biológica de haber identificado la etapa de ruptura de la VG es que desencadena la reanudación de la meiosis I, liberando el primer cuerpo polar, y convirtiéndose en un ovocito secundario con un núcleo haploide (Goetz, 1983; Nagahama, 1994). El aclaramiento del citoplasma del ovocito no fue una tarea fácil y fue muy común que los ovocitos se inflaran o hincharan, siendo muy difícil el evitarlo. Sin embargo, varias muestras mostraron la VG y la gota de aceite en la periferia, indicando que la VG ya había migrado en su comienzo de maduración final. Alternativamente, el uso de agua destilada resultó también en una hinchazón del ovocito, facilitando la observación de la gota de aceite en la periferia del ovocito, durante la migración y rompimiento de la VG, sin la necesidad de la técnica de aclaramiento de Serrá. En síntesis, ya sea a través del aclaramiento o mediante una gota de agua destilada, estas observaciones *in vivo* validaron las observaciones histológicas de coalescencia de la gota de aceite, simultánea con la migración de la VG.

Los ovocitos pre-ovulados alcanzaron hasta 520 μm de diámetro, lo que concordó con el estudio exhaustivo de Erisman *et al.* (2007), en donde los ovarios maduros mostraron ovocitos hidratados ($\sim 500\text{-}550 \mu\text{m}$). Los ovocitos aumentaron $\sim 330 \mu\text{m}$ durante la fase final de hidratación y simultáneamente ovularon en la cavidad ovárica, alcanzando $\sim 880 \mu\text{m}$ en el desove. En contraste, el aumento de la gota de aceite, desde el rompimiento de la VG hasta el ovocito desovado fue

insignificante ($\sim 15 \mu\text{m}$), de 164 a 179 μm de la coalescencia final, lo cual hizo muy evidente su formación temprana al comienzo de la maduración final del ovocito.

La migración y el rompimiento de la VG se evidenció a las 16 o 24 h, después de la primera inyección, lo que coincidió con un tiempo de 18 y 24 h, en el mero de siete bandas *E. septemfasciatus* (Thunberg) después de un implante de hormona liberadora de la hormona luteinizante (Shein *et al.*, 2004). Cuando la gota de aceite se observó a las 16 h, las hembras tuvieron signos de un ovario maduro, mientras que el vientre distendido se observó aproximadamente después de 20 h. Cuando la gota de aceite se observó a las 24 h, tardó más, hasta 28-30 h. Sin embargo, la segunda inyección resolutive de la ovulación, inyectada a las 16 o 24 h, produjo una rápida hidratación de ovocitos, tanto en las hembras más tempranas como en las tardías y el desove tuvo lugar entre 10 y 16 h después. Estos resultados coinciden con el momento de la ovulación y desove en varias especies de *Epinephelus* (Marte, 1989; Tucker, 1994; Watanabe *et al.*, 1995).

En especies silvestres de *Epinephelus* y *Mycteroperca*, la ovulación parece tener lugar durante un período de tiempo corto, y bajo condiciones ecológicas, reproductivas y de comportamiento muy específicas (Erisman *et al.*, 2007; Moe, 1969). En la acuicultura de meros, una vez que los ovocitos ovulan en la cavidad ovárica, el período de latencia es de hasta 2 h (Tucker, 1994), lo cual está relacionado con el éxito de la fecundación (Marino *et al.*, 2003; Źarski *et al.*, 2011). En este estudio se obtuvo una fertilización promedio del 88%, lo que significó que se desovaron los huevos en el momento adecuado. La importancia biológica de estos dos procesos es que, después de la ovulación, la meiosis se detiene en la metafase II y se reanuda en la fertilización (Goetz, 1983).

Nuestros resultados indicaron que sólo los ovocitos con diámetros cercanos, o preferentemente mayores de 400 μm , con la VG en posición central, fueron competentes para entrar a la maduración final, tal como está reportado en las

especies cultivadas como *E. coioides* (Liu y Sadovy de Mitcheson, 2009), *E. septemfasciatus* (Shein *et al.*, 2004), *E. striatus* (Sadovy y Colin, 1995) y *E. akaara* (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, el promedio del diámetro en los ovocitos sólo fue un parámetro preliminar, ya que 15 hembras en el primer ensayo (63%) y ocho hembras con ovocitos > 400 μm en el segundo (57%), fallaron en la inducción de la maduración. El fracaso de la maduración en los meros inducidos con un tratamiento hormonal es común y puede ocurrir debido a una mala sincronización en el eje cerebro-pituitaria-gónada, o bien, por estrés, o condiciones ambientales inadecuadas, que pueden actuar en el cerebro, para inhibir las secreciones neuroendocrinas y bloquear el eje reproductivo (Mañanos *et al.*, 2008). Por el contrario, la coalescencia de una única gota de aceite durante la maduración se convirtió en un marcador morfológico, un indicador predictivo de la competencia de los ovocitos, y en una efectividad para responder a la inducción hormonal, ya que la gota de aceite se observó fácilmente en los ovocitos vitelogénicos que sólo fueron competentes. También permitió evaluar la sincronización de ovocitos, en donde el porcentaje de ovocitos (con y sin la gota de aceite), se midió fácilmente en una muestra intraovárica.

La ocurrencia simultánea de la migración de la VG y la coalescencia de una gota de aceite fue similar en *M. bonaci* (Brulé *et al.*, 2003) y *M. tigris* (Caballero-Arango *et al.*, 2013). Sin embargo, en imágenes de ovocitos en maduración final reportadas en meros, no se observa esta simultaneidad, como en el mero rojo *E. morio* rojo (Moe, 1969), *E. margatus* (Lowe) (Mandich *et al.*, 2003; Reñones *et al.*, 2010), *E. septemfasciatus* (Shein *et al.*, 2004) y el mero panal de abeja *E. merra* (Bloch) (Tatsuya *et al.*, 2012). En *E. septemfasciatus*, la gota de aceite fue evidente mucho después del rompimiento de la VG, en el ovocito hidratado a las 42 h (Shein *et al.*, 2004). Por lo tanto, se sugiere que la coalescencia de la gota de aceite tarda mucho más tiempo en las especies de *Epinephelus*. Estas observaciones sugieren un patrón diferente de maduración final de ovocitos entre especies de *Epinephelus* y *Mycteroperca*.

La ocurrencia simultánea también es evidente en la lobina rayada *Morone saxatilis* (Walbaum) (Mylonas *et al.*, 1997) y en la dorada *Sparus aurata* (Gothilf *et al.*, 1997). En el robalo, *Centropomus undecimalis* (Bloch), la técnica de montaje en húmedo durante la migración de la VG y la coalescencia de una gota de aceite permitió evaluar la condición reproductiva en hembras en cautiverio, y mejoró la selección de reproductores que estuvieran listos para la inducción hormonal (Rhody *et al.*, 2013). Lo anterior también ocurre en el mero negro protándrico, *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker), cultivado en Asia (Yueh y Chang, 2000) y el jurel mayor *Seriola dumerili* (Risso) (Mylonas *et al.*, 2004). En la perca de agua dulce, *Sander lucioperca* L., mejoró la sincronización en la ovulación y la producción bajo condiciones controladas (Żarski *et al.*, 2012). Por lo tanto, la coalescencia de una gota de aceite durante la migración de la VG fue un marcador morfológico valioso, que predijo la eficacia de una terapia hormonal para inducir a la maduración final en la cabrilla sardinera, y que se puede utilizar en otras especies de *Mycteroperca* de importancia para la acuicultura.

Cabe señalar que la separación de hembras y machos constituye una práctica común en la acuicultura, ya que facilita el manejo con la identificación del sexo, para posteriormente inducir a la maduración final de ovocitos y al desove en las hembras, mientras que también los machos se pueden estimular hormonalmente en caso necesario.

La única hembra adulta en una de las unidades sociales monosexo, que presentó pocos grupos de espermatogonias dispersos en la gónada en septiembre, un tipo de intersexo, apoya la observación de dos casos raros de cambio sexual completo y funcional de hembra a macho en *M. rosacea* documentado en cautiverio durante el pico de reproducción (Kiewek-Martínez *et al.*, 2010a), así como las observaciones en la especie gonocórica *E. striatus*, en donde potencialmente puede ocurrir un cambio de sexo protogínico bajo ciertas condiciones sociales

(Sadovy y Colin, 1995). Esto sugiere que ocurrieron interacciones sociales durante la primavera en las unidades de hembras monosexo, con respecto a la ausencia de machos. Sin embargo, el cambio de sexo de hembra a macho en cautiverio es inusual en las especies de meros gonocóricas y protogínicas.

El cambio de sexo en adultos de macho a hembra en *M. rosacea* concuerda con una investigación previa en *E. akaara*, en donde machos adultos con longitudes mayores de 30 cm cambiaron de sexo en cautiverio (Tanaka *et al.*, 1990). En ese informe, 30 machos se mantuvieron aislados durante nueve meses y solo unos pocos desarrollaron ovocitos maduros (Kuwamura y Nakashima, 1998). Nuestro estudio concordó con las etapas de transición gonadal, en donde los testículos se diferenciaron progresivamente en ovotestes, como ocurrió en *E. akaara* (Okumura, 2001) y confirman los hallazgos originales de Tanaka *et al.* (1990).

El cambio de sexo de macho a hembra en las unidades sociales monosexo se desencadenó durante la temporada post-reproductiva, posiblemente desde agosto hasta septiembre. El que se hayan encontrado niveles bajos de esteroides en plasma a finales del verano, sugiere que el cambio de sexo no se produjo por cambios hormonales en la gónada. Lo anterior concuerda con niveles muy bajos de esteroides en plasma durante el verano en *M. rosacea* silvestre (Burgos-Aceves *et al.*, 2012). En *E. akaara*, los perfiles de esteroides de los peces con reversión sexual de hembra a macho fueron identificados durante la temporada reproductiva, ya que los niveles se encontraban altos. Sin embargo, una vez que terminó el período posterior al desove, fue imposible distinguirlos en comparación con machos primarios (Li *et al.*, 2007). Es decir, una vez que se produce un cambio de sexo funcional, los esteroides sexuales corresponden al nuevo sexo del individuo, por lo que no hay manera de distinguir un macho primario de uno secundario.

De igual manera en nuestro estudio, no hubo forma de diferenciar una neohembra de una hembra. Sobre la base de la longitud del cuerpo y los pesos corporales, no hubo indicios de una influencia de jerarquía social en el cambio de sexo; es decir, no hubo un macho mayor dominante o una subordinación de un macho más pequeño en cada una de las unidades sociales de macho monosexo, lo cual concuerda con previos estudios sociales en meros: *E. akaara* (Okumura, 2001), *C. boenak* (Liu y Sadovy, 2004b) y *M. rosacea* (Kiewek-Martinez *et al.*, 2010b).

El principal factor social observado en las unidades de machos monosexo fue el estrés durante la temporada post-reproductiva. Las interacciones sociales entre machos aparentemente compitieron con respecto a la resistencia al estrés; los síntomas en septiembre parecieron estar asociados con las altas temperaturas de verano y la obvia debilidad progresiva en cada uno de los machos, lo que pudo indicar un ambiente social estresante. Sin embargo, es difícil discernir si los síntomas de estrés fueron una consecuencia del proceso de cambio de sexo o del confinamiento *per se*, ya que las hembras monosexo y las unidades sociales mixtas no presentaron estos síntomas, ni cambiaron de sexo. Por lo tanto, se sugiere que se produjeron interacciones de estrés entre los machos aislados y seguramente afectaron la supervivencia, pero no está claro si estaban vinculados a una reversión de sexo, lo que requerirá de más investigación.

El estrés puede estar vinculado a estímulos ambientales para producir un cambio sexual protogínico, así como mediar el cambio de sexo a macho inducido por la temperatura y también un cambio de sexo regulado socialmente (Goikoetxea *et al.*, 2017). En este contexto, nuestro estudio también puede sugerir que el estrés estuvo involucrado en un cambio de sexo protándrico, mostrando una potencial plasticidad sexual en una especie con un patrón reproductivo sexual gonocórico.

Los pocos estudios sobre la actividad de la enzima aromatasa y su expresión genética en meros protogínicos muestran cambios estacionales bien marcados.

En *E. akaara* y *E. coicoides*, la aromatasa en gónada fue mayor en los ovarios que en los testículos durante la temporada de reproducción en primavera (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004). Posteriormente, disminuyó considerablemente durante el período posterior al desove como parte del ciclo reproductivo anual, sin una diferencia en cuanto al sexo de los peces (Li *et al.*, 2007). Esto concordó con la expresión en la gónada *cyp19a1a* entre hembras, neohembras y machos en las diferentes unidades sociales en nuestro estudio al final de la época post-reproductiva. Sin embargo, se ha observado que los niveles de aromatasa cerebral no son constantes ni predecibles en los peces. Durante la temporada de reproducción, la aromatasa cerebral fue mayor en las hembras que en los machos de *E. akaara* (Li *et al.*, 2007), mientras que fue similar entre los sexos en *E. coicoides* (Zhang *et al.*, 2004). En otras especies de peces, como en adultos de Medaka *Oryzias latipes* (Temminck y Schlegel), la expresión en cerebro *cyp19a1b* fue mayor en hembras que en machos (Jawahar y Gunasekera, 2008), mientras que fue similar en el pez cebra *Danio rerio* (Hamilton) (Sawyer *et al.*, 2006). Durante la diferenciación sexual en la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (L.), la expresión del cerebro *cyp19a1b* fue similar entre los sexos (Kwon *et al.*, 2001), mientras que en poblaciones monosexuales de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fue más alta en machos que en hembras (Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2011). En nuestro estudio, el cambio de sexo de macho a hembra surgió inicialmente a través de una etapa de transición intersexual, en donde aumentó la expresión de aromatasa *cyp19a1b* en cerebro; la progresión de la identidad sexual en la gónada mostró que los testículos regresaron a una etapa inmadura como ovo-testes, y finalmente cambiaron el sexo a neohembra inmadura. Lo anterior concuerda con lo observado en el mero ambisexual *E. microdon*, en donde la regresión a una etapa gonadal inmadura fue una condición fisiológica obligada, antes de un cambio de sexo (Debas *et al.*, 1989).

Existen pocos estudios en meros protogínicos que analicen a peces en una condición intersexo, lo cual es entendible por tratarse de un periodo de transición

sexual. En hembras de *E. akaara*, el aumento de la actividad de la aromatasa cerebral durante la reproducción sugiere una retroalimentación de aumentar la síntesis de estrógenos vía neural (cerebral), pero los niveles de aromatasa no se pudieron analizar específicamente en los peces que de forma natural revirtieron el sexo de hembra a macho (Li *et al.*, 2007), en donde los niveles de aromatasa tendrían que haber disminuido. De forma interesante, la observación de un cambio de sexo incompleto (de hembra a macho) en el mero oscuro *E. marginatus* (Lowe), cuando se realizó la reversión de sexo mediante la inhibición de la aromatasa después de la temporada de reproducción, resultó en individuos intersexuales (García *et al.*, 2013). En otro estudio en *E. coicoides* durante la temporada reproductiva, mostró que hembras tratadas con metil-testosterona que resultaron en intersexo, presentaron una expresión de aromatasa en gónada intermedia entre las hembras que no revirtieron el sexo (con la expresión más alta) y los neomachos (hembras revertidas a machos con la expresión más baja), mientras que la expresión de aromatasa cerebral en intersexos presentó un aumento pero sólo de forma temporal, lo que sugirió una participación en el proceso de cambio de sexo de hembra a macho (Zhang *et al.*, 2004), lo cual concordó con nuestro estudio.

El cambio de sexo de macho a hembra es muy poco frecuente en los meros protogínicos, por lo que es apropiado citar al pargo negro *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker), (Familia Sparidae), un hermafrodita marino protándrico. El cambio sexual natural de macho a hembra se produjo a los tres años, después de un aumento progresivo pero moderado en la actividad de la aromatasa gonadal, comparado con una alta actividad de la aromatasa cerebral, que dio como resultado 35.7% de hembras y 64.3% de machos y peces bisexuales (Lee *et al.* al., 2001).

Con todo lo anterior, se propone una hipótesis para explicar el proceso “social” de cambio de sexo que ocurrió en las unidades de machos monosexo, la cual, en

ausencia de compuestos hormonales femeninos, el cerebro medió interacciones sociales entre machos monosexo, incluida la interacción de estrés. Fisiológicamente, se comprobó que ocurrió una mínima esteroidogénesis en las gónadas en la temporada post-reproductiva y que existió un aumento en la aromatización a partir de testosterona a estradiol en cerebro, dando lugar a una intersexualidad, seguida de un cambio de sexo protándrico a hembra, proceso muy documentado en la plasticidad sexual en peces (Devlin y Nagahama, 2002).

Para fines de reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera y de acuicultura de esta especie, el aislamiento de los machos puede resultar en estrés y alta mortalidad, posiblemente porque se está produciendo un cambio de sexo. Por lo tanto, debe evitarse el confinamiento de machos aislados y siempre mantener ambos sexos en los estanques o tanques de reproducción. Nuestro estudio es el primer informe sobre el cambio de sexo protándrico (de machos a hembras) en cautiverio en adultos de cabrilla sardinera gonocórica *M. rosacea*. Este estudio contribuyó al conocimiento de la plasticidad sexual en la subfamilia Epinephelinae.

9. CONCLUSIONES

1. En la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, la migración y el rompimiento de la vesícula germinal fue simultánea con la coalescencia de una gota de aceite.
2. La coalescencia de una gota de aceite fue un marcador morfológico valioso, que predijo la eficacia de una terapia hormonal, para inducir a la maduración final en la cabrilla sardinera, y que se puede utilizar en otras especies de *Mycteroperca* de importancia para la acuicultura.
3. Fisiológicamente, se observó una esteroidogénesis muy baja en las gónadas en la temporada post-reproductiva, mientras que existió un aumento en la aromatización a partir de testosterona a estradiol en cerebro, dando lugar a una intersexualidad, seguida de un cambio de sexo protándrico a hembra.
4. Para fines de reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera y de acuicultura de esta especie, el aislamiento de los machos puede resultar en estrés y alta mortalidad, posiblemente porque se está produciendo un cambio de sexo. Por lo tanto, debe evitarse el confinamiento de machos aislados.
5. Se evidenció un cambio de sexo protándrico (de machos a hembras) en cautiverio en adultos de cabrilla sardinera gonocórica *M. rosacea* que contribuyó al conocimiento de la plasticidad sexual en la subfamilia Epinephelinae.

10. LITERATURA CITADA

Abu-Hakima, R. 1987. Aspects of the reproductive biology of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskål), in Kuwaiti waters. J. Fish Biol. 30:213-222.

Aburto-Oropeza, O., E. Sala, G. Paredes, A. Mendoza, E. Ballesteros. 2007. Predictability of reef fish recruitment in a highly variable nursery habitat. Ecology. 88:2220-2228.

Avise, J. C., J. E. Mank. 2009. Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes. Sex Dev. 3:152-63.

Benoit, J., I. Assenmacher. 1952. Influence of high and low lesions of the infundibulum on gonad stimulation in the domestic drake. C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 235:1547-1549.

Biran, J., S. Ben-Dor, B. Levavi-Sivan. 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. Biology Reprod. 79:776-786.

Bromage, N. R., M. Porter, C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture. 197:63-98.

Brulé, T., X. Renán, T. Colás-Marrufo, Y. Hauyon, A. N. Tuz-Sulub, C. Déniel. 2003. Reproduction in the protogynous black grouper (*Mycteroperca bonaci* (Poey)) from the southern Gulf of México. Fishery Bull. 101:463-475.

Burgos-Aceves, M. A., R. Campos-Ramos, D. A. Guerrero-Tortolero. 2012. Leukophilia during maturation of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. Mar. Biol. Res. 8:195-200.

Burgos-Aceves, M. A., R. Campos-Ramos, D. A. Guerrero-Tortolero. 2010. Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. Fish Physiol. Biochem. 36:1263-1269.

Caballero-Arango, D., T. Brulé, V. Noh-Quñones, T. Colás-Marrufo, E. Pérez-Díaz. 2013. Reproductive biology of the tiger grouper in the southern Gulf of México. Trans. Am. Fish. Soc. 142:282-299.

Craik, J. C. A., S. M. Harvey. 1987. The causes of buoyancy in egg of marine teleosts. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 67:169-182.

Debas, L., A. Fostier, J. Fuchs, M. Weppe, G. Neledec, A. Benett, Aquacop, C. Cauty, C. Jalabert. 1989. The sexuality of cultured hermaphroditic fish species: analysis of morphological and endocrinological features in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon*, as a basis for further research to control reproduction in the grouper. En: Advances in Tropical Aquaculture (Feb 4 – March 20, 1989 Tahiti). AQUACOP IFREMER Actes de Colloque 9. pp. 543-557. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1439/>.

Denson, M. R., W. E. Jenkins, D. L. Berlinsky, T. I. J. Smith. 2007. A comparison of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass *Centropristis stiata* (Linnaeus, 1758). Aquacult. Res. 38:918-925.

Devlin, R. H., Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. 208:191-364.

Díaz-Urbe, F. G., J. F. Elorduy-Garay, M. T. González-Valdovinos. 2001. Age and growth of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in the southern Gulf of California, Mexico. Pac. Sci. 791:171-182.

Erisman, B. E., J. A. Rosales-Casián, P. A. Hastings. 2008. Evidence of gonochorism in a grouper, *Mycteroperca rosacea*, from the Gulf of California, Mexico. Environ. Biol. Fishes. 82:23-33.

Erisman, B. E., M. L. Buckhorn, P. A. Hastings. 2007. Spawning patterns in the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in comparison with other aggregating groupers. Mar. Biol. 151:1849-1861.

Escobar, S., A. Felip, M. M. Gueguen, S. Zanuy, M. Carrillo, O. Kah, A. Servili. 2013. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Comp. Neurol. 521:933-948.

Ekström, P., H. Meissl. 1997. The pineal organ of teleosts fish. Rev. Fish Biol. Fisher. 7:199-284.

Fabra, M., D. Raldúa, M. Bozzo, P. M. Deen, E. Lubzens, J. Cerdà. 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. Dev. Biol. 295:250-262.

Fabra, M., D. Raldúa, D. M. Power, P. M. Deen, J. Cerdà. 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. Science. 307:545.

Ferreira, B. P. 1995. Reproduction in the common coral trout *Plectropomus leopardus* (Serranidae: Epinephelinae) from the central and northern Great Barrier Reef, Australia. *Bull. Mar. Sci.* 56:653-669.

Forniés, M. A., E. Mañanos, M. Carrillo, A. Rocha, S. Laureau, C. C. Mylonas, Y. Zohar, S. Zanuy. 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture*. 202:221-234.

Garber, A. F., S. E. Fordham, J. E. Symonds, E. A. Trippel, D. L. Berlinsky. 2009. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 296:179-183.

García, C. E., O. Araújo, B. C. Mello, P. H. Narcizo, A. M. Rodrigues-Filho, J. A. Medrado, A. T. Zampieri, R. A. Floeter-Winter, L. M. Guimarães, R. G. Moreira. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192:170-180.

Goetz, F. W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. En: Hoar, W. S., D. J. Randall, E. M. Donaldson (eds.). *Fish Physiology*, Vol. IXA, Academic Press, New York. pp 117-170.

Goikoetxea, A., E. V. Todd, N. J. Gemmell. 2017. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish? *Reproduction*. 154:149-160.

Gothilf, Y., I. Meiri, A. Elizur, Y. Zohar. 1997. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids mRNAs gonadotropin I-subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.* 57:1145-1154.

Gracia-López, V., J. Rodríguez-Romero, J. M. Pérez-Ramírez. 2004. Hormone induced spawning (HCG) and embryonic and larval development of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877). *Cienc. Mar.* 30:279-284.

Greeley, M. S., H. Hols, R. A. Wallace. 1991. Changes in size, hydration and low molecular mass osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes *in vivo*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A:639-647.

Greeley, M. S., D. R. Calder, R. A. Wallace. 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comp. Biochem. Physiol.* 84B:1-9.

Guerrero-Tortolero, D. A., D. Romo-Mendoza, J. C. Pérez-Urbiola, R. Campos-Ramos. 2016. Timing of puberty and reproductive performance in wild-reared and hatchery-reared Pacific Red Snapper *Lutjanus peru*. *Isr. J. Aquacult-Bamid*. 1300:1-7.

Guerrero-Tortolero, D. A. 2004. The hormonal transduction of photoperiod information and its effects on growth and reproduction in finfish. Tesis (PhD.). Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland. 265 p.

Guraya, S. S. 1996. The cell and molecular biology of fish oogenesis. *Monogr. Dev. Biol.* 18:1-223.

Habibi, H. R., C. V. Andreau-Vieyra. 2007. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish. En: Babin, P. J., J. Cerdà, E. Lubzens (eds.). *The fish oocyte from basic studies to Biotechnological applications*, Chapter 9. Springer. pp 235-253.

Harvey, B., J. Carolsfeld. 1993. Assessment of maturity in breeders. En: Harvey, B., J. Carolsfeld, E. M. Donaldson (eds.). *Induced breeding in tropical fish culture*. International Development Research Centre, Ottawa, Canada. pp 95-104.

Heemstra, P. C., J. E. Randall. 1993. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. *FAO Species Catalogue*, FAO Fisheries Synopsis no. 125, Vol 16, Rome. 382 p.

Hoar, W. S. 1969. Reproduction. En: Hoar, W. S., D. J. Randall (eds.). *Fish Physiology*, Vol. III. Academic press. pp 1-72.

Huang, W., L. Zhou, Z. Li, J. F. Gui. 2009. Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper. *Mol. Cell. Endocrinol.* 307:224-236.

Humason, G. L. 1972. *Animal tissue techniques*. Editorial W. H. Freeman and Co. Tercera edición. San Francisco. 496 pp.

IUCN, 2016. The IUCN red list of threatened species. Version 2016-1. Accessed 30 June 2016. <<http://www.iucnredlist.org>>.

Jalabert, B., A. Fostier, B. Breton, C. Weil. 1991. Oocyte maturation in vertebrates. En: Pang, P. K. T., M. P. Schreibman (eds.). *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implication*, Vol. 4, Part A, Reproduction. Academic Press, San Diego, CA. pp 23-90.

Jawahar, G. P., R. M. Gunasekera. 2008. Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka

(*Oryzias latipes*): Implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158:131-137.

Kah, O., C. Lethimonier, G. Somoza, L. G. Guilgur, C. Vaillant, J. J. Lareyre. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153:346-364.

Kanda, S., Y. Oka. 2012. Evolutionary insights into the steroid sensitive *kiss1* and *kiss2* neurons in the vertebrate brain. *Front. Endocrinol.* 3 (28): 1-10.

Kiewek-Martinez, M., V. Gracia-López, M. Carrillo. 2010a. Comparison of the effects of HCG and LHRHa on the induction of ovulation of wild and captive leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*. *J. World Aquacult. Soc.* 41:733-745.

Kiewek-Martínez, M., V. Gracia-López, C. Rodríguez-Jaramillo. 2010b. Evidence of sexual transition in leopard Grouper (*Mycteroperca rosacea*) individuals held in captivity. *Hidrobiologica.* 20:213-221.

Kuwamura, T., Y. Nakashima. 1998. New aspects of sex change among reef fishes: recent studies in Japan. *Environ. Biol. Fishes.* 53:125-135.

Kungvankij, P., L. B. Jr. Tiro, B. P. Pudadera, I. O. Potestas. 1986. Induced spawning and larval rearing of grouper (*Epinephelus salmoides* Maxwell). Fisheries and Aquaculture Management Division. FAO, Rome. 15 p.

Kwon, J. Y., J. Kim. 2013. Differential expression of two distinct aromatase genes (*cyp19a1a* and *cyp19a1b*) during vitellogenesis and gestation in the viviparous black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Anim. Cells Syst.* 17:88-98.

Kwon, J. Y., B. J. McAndrew, D. J. Penman. 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.* 59:35-370.

LaFleur, G. J., P. Thomas. 1991. Evidence for a role of Na⁺, K⁺ – ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation. *J. Exp. Zool.* 258:126-136.

Lee, Y. H., J. L. Du, W. S. Yueh, B. Y. Lin, J. D. Huang, C. Y. Lee, M. F. Lee, E. L. Lau, F. Y. Lee, C. Morrey, Y. Nagahama, C. F. Chang. 2001. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *J. Exp. Zool.* 290:715-726.

- Li, G. L., X-Ch. Liu, H. R. Lin. 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Anim. Reprod. Sci.* 99:156-166.
- Liu, M., Y. Sadovy de Mitcheson. 2011. The influence of social factors on juvenile sexual differentiation in a diandric, protogynous grouper *Epinephelus coioides*. *Ichthyol. Res.* 58:84-89.
- Liu, M., Y. Sadovy de Mitcheson. 2009. Gonad development during sexual differentiation in hatchery-produced orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae). *Aquaculture.* 287:191-202.
- Liu, M., Y. Sadovy. 2004a. Early gonadal development and primary males in the protogynous epinepheline, *Cephalopholis boenak*. *J. Fish Biol.* 65:987-1002.
- Liu, M., Y. Sadovy. 2004b. The influence of social factors on adult sex change and juvenile sexual differentiation in a diandric, protogynous epinepheline, *Cephalopholis boenak* (Pisces, Serranidae). *J. Zool.* 264:239-248.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method. *Methods.* 25:402-408.
- Mandich, A., A. Massari, S. Bottero, G. Marino. 2002. Histological and histochemical study of female germ cell development in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Eur. J. Histochem.* 46:87-100.
- Mei, J., J. F. Gui. 2015. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. *Sci. China Life Sci.* 58:124-136.
- Munday, P. L., J. W. White, R. R. Warner. 2006. A social basis for the development of primary males in a sex-changing fish. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*. 273:2845-2851.
- Mañanos, E., N. Duncan, C. C. Mylonas. 2008. En: Cabrera, E., V. Robles, M. P. Herráez (eds.). *Reproduction and control of ovulation, spermatation and spawning in cultured fish. Methods in Reproductive Aquaculture: marine and freshwater species.* CRC Press, Boca Raton, FL. pp 3–80.
- Mañanos, E., M. Carrillo, L. A. Sorbera, C. C. Mylonas, J. F. Asturiano, M. J. Bayarri, Y. Zohar, S. Zanuy. 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J. Fish Biol.* 60:328-339.

- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. G. Finoia, Y. Zohar, C.C. Mylonas. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*. 219:841-858.
- Marte, C. L. 1989. Hormone-induced spawning of cultured tropical finfishes. En: *Advances in Tropical Aquaculture* (Feb 4 – March 20, 1989 Tahiti). AQUACOP IFREMER Actes de Colloque 9. pp. 519-539.
- Moe, M. A. Jr. 1969. Biology of the red grouper, *Epinephelus morio* (Valenciennes) from the eastern Gulf of Mexico. Florida Department of Natural Resources, Marine Research Laboratory. Professional Paper Series 10. 95 p.
- Mylonas, C. C., A. Fostier, S. Zanuy. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165:516-34.
- Mylonas, C. C., N. Papandroulakis, A. Smboukis, M. Papadaki, P. Divanach. 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture*. 237:141-154.
- Mylonas, C. C., Y. Zohar. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 10:463-491.
- Mylonas, C. C., L. C. Woods, Y. Zohar. 1997. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. *J. Fish Biol.* 50:34-49.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International J. Dev. Biol.* 38:217-229.
- Okumura, S. 2001. Evidence of sex reversal towards both directions in reared red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Fish. Sci.* 67:535-537.
- Peter, R. E. 1983. The Brain and Neurohormones in teleost reproduction. En: Hoar, W. S., D. J. Randall, E. M. Donaldson (eds.). *Fish Physiology Vol. IXA*, Academic Press, New York. pp 97-135.
- Pierre, S., S. Gaillard, N. Prevot-D'alvise, J. Aubert, O. Rostaing-Capaillon, D. Leung-Tack, J-P. Grillasca. 2008, Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquat. Conserv.* 18:297-308.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the light cycler. En: Meuer, S., C. Wittwer, K. Nakagawara (eds.). *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications*. Springer Press, Heidelberg. pp 21-34.

- Reñones, O., A. Grau, X. Mas, F. Riera, F. Saborido-Rey. 2010. Reproductive pattern of an exploited dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) (Pisces: Serranidae) population in the western Mediterranean. *Sci. Mar.* 74:523-537.
- Robertson, D. R., J. H. Choat. 1974. Protogynous hermaphroditism and social systems in labrid fish. En: Mather, P. (ed.). *Proceedings of the Second International Symposium on Coral Reefs*, vol. 1, (Great Barrier Reef Committee), Brisbane, Australia, pp. 217--225.
- Rhody, N. R., C. L. Neidig, H. J. Grier, K. L. Main, H. Migaud. 2013. Assessing reproductive condition in captive and wild common snook stocks: A comparison between the wet mount technique and histological preparations. *Trans. Am. Fish. Soc.* 142:979-988.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman, F. A. Chapman. 1991. Introduction to Hormone-Induced Spawning of Fish. SRAC Publication No. 421. 4 p.
- Sadovy, Y., P. L. Colin. 1995. Sexual development and sexuality in the Nassau grouper. *J. Fish Biol.* 46:961-976.
- Sadovy de Mitcheson, Y., M. Liu. 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish Fish.* 9:1-43.
- Sala, E., O. Aburto-Oropeza, M. Reza, G. Paredes, L. G. López-Lemus. 2004. Fishing down coastal food webs in the Gulf of California. *Fisheries.* 29:19-25.
- Sala, E., O. Aburto-Oropeza, G. Paredes, G. Thompson. 2003. Spawning aggregations and reproductive behavior of reef fishes in the Gulf of California. *Bull. Mar. Sci.* 72:103-121.
- Sawyer, S. J., K. A. Gerstner, G. V. Callard. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147:108-117.
- Shapiro, D. Y. 1987. Differentiation and evolution of sex change in fishes: A coral reef fish's social environment can control its sex. *Bioscience.* 37:490-497.
- Shaw, B. L., H. I. Battle. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35:325-347.
- Shein, N. L., H. Chuda, T. Arakawa, K. Mizuno, K. Soyano. 2004. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish. Sci.* 70:360-365.

- Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, G. D. Means, M. W. Kilgore, M. M. Hinshelwood, S. Graham-Lorence, B. Amarneh, Y. Ito, C. R. Fisher, M. D. Michael, C. R. Mendelson, S. E. Bulun. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15:342-355.
- Smith, C. L. 1965. The patterns of sexuality and the classification of serranid fishes. *Am. Mus. Novit.* 2207:1-20.
- Skoblina, M. N. 2010. Hydration of oocytes in teleost fishes. *Russ. J. Dev. Biol.* 41:1-12.
- Swanson, P., T. J. Dickey, B. Campbell. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28:53-59.
- Tanaka, H., K. Hirose, K. Nogami, K. Hattori, N. Ishibashi. 1990. Sexual maturation and sex reversal in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Bull. Nat. Res. Inst. Aqua.* 17:1-15.
- Tatsuya, K., N. Masaru, M. Ryosuke, K. Katsuya, H. Hikari, U. Katsuhisa, S. Balasubramanian, K. Hirohiko. 2012. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture.* 358:85-91.
- Tena-Sempere, M., A. Felip, A. Gomez, S. Zanuy, M. Carrillo. 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175:234-243.
- Thomson, D. A., L. T. Findley, A. N. Kerstitch. 2000. Reef fishes of the Sea of Cortez, the rocky-shore fishes of the Gulf of California. Editorial University of Texas Press. Segunda edición. Austin, TX. 374 p.
- Thorsen, A., H. J. Fyhn. 1996. Final oocyte maturation in vivo and in vitro in marine fishes with pelagic eggs; yolk protein hydrolysis and free amino acid content. *J. Fish Biol.* 48:1195-1209.
- Tseng, W. Y., C. T. Poon. 1983. Hybridization of *Epinephelus* species. *Aquaculture.* 34:177-182.
- Tseng, W. Y., S. K. Ho. 1979. Induced breeding and early development of red grouper (*Epinephelus akaara*, Temminck and Schlegel) in Hong Kong. Marine Science Laboratory, Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong. 16 p.

- Tucker, J. W. 1999. Species profile: grouper aquaculture. SRAC Publication No. 721. 11 p.
- Tucker, J. W. Jr. 1994. Spawning by captive serranid fishes: a review. *J. World Aquacult. Soc.* 25:345-359.
- Tupper, M., N. Sheriff. 2008. Capture-based aquaculture of groupers. En: Lovatelli, A., P. F. Holthus (eds.). Capture-based aquaculture. Global overview. FAO Fisheries Technical Paper, No. 508. FAO, Rome. pp 217-253.
- Van der Kraak, J., P. Chang, D. M. Janz. 1998. Reproduction. En: Evans, D. H. (ed.). *The Physiology of fishes*. Editorial CRC Press, USA. Segunda edición. pp 465-488.
- Vizziano-Cantonnet, D., I. Anglade, E. Pellegrini, M. M. Gueguen, A. Fostier, Y. Guiguen, O. Kah. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170:346-355.
- Wallace, R. A., K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21:325-343.
- Watanabe, W. O., S. C. Ellis, E. P. Ellis, W. D. Head, C. D. Kelley, A. Moriwake, C. S. Lee, P. K. Bienfang. 1995. Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture.* 138:205-219.
- Yueh, W. S., C. F. Chang. 2000. Morphological changes and competence of maturing oocytes in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Zool. Stud.* 39:114-122.
- Żarski, D., D. Kucharczyk, K. Targońska, K. Palińska, K. Kupren, P. Fontaine, P. Kestemont. 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquacult. Res.* 43:713-721.
- Zhang, Y., W. Zhang, L. Zhang, T. Zhu, J. Tian, X. Li, H. Lin. 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. *J. Steroid Biochem.* 92:39-50.
- Zhou, L., J. F. Gui. 2010. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiol. Biochem.* 36:181-193.

Zohar, Y., J. A. Munoz-Cueto, A. Elizur, O. Kah. 2010. Neuroendocrinology of reproduction n in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165:438-455.

Zohar, Y., C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture.* 197:99-135.