

Masculinización, crecimiento y supervivencia de tilapia *Oreochromis niloticus* con inhibidores de aromatasa naturales y sintéticos

Masculinization, growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* using natural and synthetic aromatase inhibitors

José Antonio Estrada-Godínez¹, Anabel Alaníz-González¹, María Isabel Abdo-de la Parra²,
María Isaura Bañuelos-Vargas¹, Gustavo Alejandro Rodríguez-Montes de Oca^{1*}

¹Laboratorio de Reproducción y Cultivo de Peces, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, CP. 82000. Mazatlán, Sinaloa, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán. Av. Sábalo Cerritos s/n. Estero del yugo. 82112. Mazatlán, Sin., México.

*Autor de correspondencia: grodriguez@uas.edu.mx

Artículo científico

Recibido: 21 de mayo 2023

Aceptado: 20 de diciembre 2023

RESUMEN. Se evaluó el efecto de inhibidores naturales y sintéticos de la enzima aromatasa sobre el crecimiento, supervivencia y masculinización en crías de tilapia del Nilo. Cinco flavonoides: crisina (CRI), 7-hidroxiflavona (7-HF), apigenina (NA), naringenina (NAR) y 7-metoxiflavona (7-MF) a 1 000, 1 500 y 2 000 mg kg⁻¹; un compuesto no esteroideo: letrozol (LT) a 50, 100 y 200 mg kg⁻¹ y dos esteroides sintéticos: exemestano (EXE) a 1 000, 1 500 y 2 000 mg kg⁻¹ y 17 α -metilttestosterona (MT) a 60 mg kg⁻¹ (C+) y un control negativo libre de compuestos (C-). Cada tratamiento se realizó por triplicado con n = 30 peces por réplica (0.012 \pm 0.01 g) en tanques cilíndricos (6 L) con flujo continuo a 28°C. Los grupos 7-HF a 1 000 y 2 000 mg kg⁻¹ presentaron el crecimiento específico significativamente mayor (16.08 \pm 0.63% y 8.38 \pm 2.11%, respectivamente). La supervivencia fue de 100%, excepto: 7-HF 2000 mg kg⁻¹, NA 1 500 mg kg⁻¹, 7-MF a 1 500 mg kg⁻¹ y EXE 1 500 y 2 000 mg kg⁻¹, con 80 y 90%. El porcentaje de machos en MT, EXE y LT fue 100%, pero los tratamientos con flavonoides fueron muy variables, pero incrementando de un 57% de machos en el C-, de 71 a 86%, para CRI 2000, 7-HI 1 500, y todos los niveles de inclusión de los tratamientos 7-MET, NA y NAR. Se espera continuar la evaluación para establecer la concentración de inhibidores naturales que sea más cercana a 100% de machos.

Palabras clave: Flavonoides, compuestos no esteroideos, esteroides sintéticos, masculinización, tilapia del Nilo.

ABSTRACT. The effect of natural and synthetic aromatase enzyme inhibitors on growth, survival, and masculinization in Nile tilapia offspring was evaluated. Five flavonoids: chrysin (CRI), 7-hydroxyflavone (7-HF), apigenin (NA), naringenin (NAR), and 7-methoxyflavone (7-MF) at 1 000, 1 500, and 2 000 mg kg⁻¹; a non-steroidal compound: letrozole (LT) at 50, 100, and 200 mg kg⁻¹; and two synthetic steroids: exemestane (EXE) at 1 000, 1 500, and 2 000 mg kg⁻¹, and 17 α -methyltestosterone (MT) at 60 mg kg⁻¹ (C+), with a negative control free of compounds (C-). Each treatment was conducted in triplicate with n = 30 fish per replicate (0.012 \pm 0.01 g) in cylindrical tanks (6 L) with continuous flow at 28°C. The 7-HF groups at 1 000 and 2 000 mg kg⁻¹ showed significantly higher specific growth (16.08 \pm 0.63% and 8.38 \pm 2.11%, respectively). Survival was 100%, except for 7-HF 2,000 mg kg⁻¹, NA 1,500 mg kg⁻¹, 7-MF at 1 500 mg kg⁻¹, and EXE at 1 500 and 2 000 mg kg⁻¹, with 80 and 90%. The percentage of males in MT, EXE, and LT was 100%, but the flavonoid treatments varied, increasing from 57% males in C- to 71 to 86% for CRI 2 000, 7-HI 1 500, and all inclusion levels of 7-MET, NA, and NAR treatments. Further evaluation is expected to establish the concentration of natural inhibitors closer to 100% males.

Keywords: Flavonoids, masculinization, Nile tilapia, nonsteroidal compounds, synthetic steroids.

INTRODUCCIÓN

La tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, es una de las especies con mayor producción en el mundo ya que posee varios atributos favorables para su cultivo, como son: rápido crecimiento, tolerancia a una amplia gama de condiciones ambientales, resistencia a estrés y enfermedades, aceptación de dietas comerciales inmediatamente después de la absorción del saco vitelino, entre otras (El-Sayed 2006). No obstante, bajo condiciones de cautiverio, las tilapias maduran sexualmente a tamaños más pequeños de lo que lo hacen en el medio natural. Se ha reportado en cultivo que, *O. niloticus* alcanza la madurez sexual alrededor de los 30-50 g de peso (De Graaf et al. 1999, El-Sayed et al. 2003), en comparación de los 150-250 g a los que alcanzan la primera madurez en condiciones naturales (Ponzoni et al. 2011). Esta precocidad sexual observada en cautiverio puede provocar a la reproducción descontrolada que traería como consecuencia el sobrepoblamiento y el estancamiento del crecimiento de estos peces, particularmente en las hembras (El-Sayed 2006), por esto, actualmente se ha puesto mucho énfasis en el cultivo de poblaciones monosexo, siendo necesario que por lo menos el 95% de los organismos en cultivos sean machos fenotípicos (Omeje et al. 2020).

La obtención de poblaciones monosexo puede lograrse mediante varias técnicas: a) el sexado manual de los juveniles, b) la hibridación, c) la manipulación de cromosomas, d) la manipulación ambiental y e) la aplicación de esteroides sexuales (Pandian y Varadaraj 1987, Budd et al. 2015). Los esteroides actúan como agentes de reversión sexual para la feminización (estrógenos) o la masculinización (andrógenos) de los individuos (Gale et al. 1999). Así mismo, dichos esteroides han sido administrados de dos maneras, ya sea por medio de aspersión en el alimento o por inmersión de las larvas en soluciones que contienen dichos esteroides (Pandian y Sheela 1995, Donaldson y Devlin 1996, Wassermann y Bertolla-Afonso 2003), siendo la primera estrategia la que predomina en su uso en prácticamente la mayoría de los centros de producción de alevines masculinizados de tilapia del Nilo.

No obstante, debido a las estrictas regulaciones internacionales sobre el uso y consumo de productos que contengan químicos sintéticos y hormonas, actualmente se están buscando alternativas más aceptables para el consumo de peces que han pasado por un proceso de reversión sexual (Chakraborti et al. 2014, Gabriel et al. 2015, Gabriel 2019). En ese sentido, se ha demostrado que varios compuestos contenidos en vegetales, conocidos como fitoquímicos, pueden tener diversos efectos benéficos para los peces en cultivo, ya que pueden promover el crecimiento y el consumo de alimento, incrementan la respuesta inmune, actúan como agentes anti-estrés y promueven ciertas propiedades antimicrobianas (Arts y Hollman 2003, Citarasu 2010, Chakraborty y Hancz 2011, Chakraborty et al. 2014). Así mismo, también se ha demostrado que varios fitoquímicos son estructuralmente similares a los esteroides sexuales (fitoestrógenos y fitoandrógenos), por lo que pueden ejercer ciertos efectos sobre la modulación endócrina y por lo tanto pueden también ser utilizados como inhibidores de la aromatasa, misma que consiste en evitar la producción endógena de estrógenos al bloquear la transformación enzimática de la testosterona a estradiol (Rodríguez-Montes de Oca et al. 2014) de forma similar a compuestos esteroideos sintéticos (Alaniz-Gonzalez et al. 2014), o como antagonistas de los receptores de estrógenos dentro de las células, los cuales incluyen ciertos flavonoides, isoflavonoides, antocianinas y saponinas (Gabriel 2019). Existen datos relevantes respecto a la actividad *in-vitro*

de la capacidad de inhibición de la biosíntesis de estrógenos (Jeong *et al.* 1999, Ohno *et al.* 2014), siendo necesario validar dicha información a niveles de inclusión mayores a los ya evaluados en experiencias previas de investigación (Rodríguez-Montes de Oca *et al.* 2014), tanto en eficiencia de masculinización como su efecto en crecimiento y supervivencia.

Aunque existen varios autores que destacan algunos resultados relevantes en cuanto al uso de productos de origen vegetal y sus extractos como fuentes de compuestos naturales para lograr el efecto de masculinización (Woken y Orose 2021, Abaho *et al.* 2022), incluyendo el uso de semillas de papaya *Carica papaya* (Omeje *et al.* 2018, Omeje *et al.* 2020), extractos de hoja y raíz del pino *Pinus kesiya* (Roque *et al.* 2018), el abrojo de flor amarilla *Tribulus terrestris* (Sadek *et al.* 2020, Zaki *et al.* 2021) y extractos de semillas de *Mucuna pruriens* y raíz de *Asparagus racemosus* (Mukherjee *et al.* 2018); sin embargo es importante destacar que aunque se han logrado valores en el orden de 60 a 85% de eficiencia de masculinización; hay varios factores a considerar, tales como la falta de la estandarización en los protocolos de extracción, dosis óptimas y los mecanismos de acción de la mezcla de compuestos activos (Abaho *et al.* 2022). Por lo que continuar con la exploración de compuestos debidamente identificados de forma individual, parece ser una mejor opción para continuar con esta línea de investigación. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la suplementación en el alimento de flavonoides y de compuestos no esteroideos y de esteroides sintéticos sobre el crecimiento, la supervivencia y la eficiencia de masculinización en crías de tilapia del Nilo, *O. niloticus*, mantenidas en un sistema de recirculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se adquirieron huevos fecundados de tilapia del Nilo, *O. niloticus* de una granja comercial, los cuales fueron incubadas a 27 °C en jarras tipo McDonald de 10 L de capacidad; hasta la eclosión de las larvas y absorción del saco vitelino. Una vez listas las crías para iniciar la alimentación exógena, fueron trasladadas a un sistema de recirculación, equipado con un termostato (Finnex®) para mantener la temperatura (27 ± 1 °C). Se manejó un fotoperiodo de 14 horas luz, el cual fue controlado con un interruptor automático (TimeTork 1101P®).

Se evaluaron ocho inhibidores de la aromatasas, los cuales fueron aplicados por aspersión en el alimento de acuerdo con el siguiente diseño experimental. Cinco flavonoides: crisina (CRI) 7-hidroxi-flavona (7-HI), apigenina (API), naringenina (NA), 7-metoxi-flavona (7-MF) incluidos a 1 000, 1 500 y 2 000 mg kg⁻¹ de alimento comercial seleccionados en función de su alta eficiencia de inhibición de aromatasas *in-vitro* (Jeong *et al.* 1999); un compuesto no esteroideo: letrozol (LT) incluido a 50, 100 y 200 mg kg⁻¹ de alimento comercial y dos esteroides sintéticos: exemestano (EXE) incluido a 1 000, 1 500 y 2 000 mg kg⁻¹ de alimento comercial y 17 α-metiltestosterona (MT) a 60 mg kg⁻¹ como control positivo y un control negativo (C-) sin inhibidores de la aromatasas o esteroides sintéticos, repitiendo el protocolo de un experimento previo realizado en nuestras instalaciones para estos tres últimos tratamientos (Alaniz-Gonzalez *et al.* 2014). Cada tratamiento experimental se realizó por triplicado y cada réplica estuvo conformada por 30 organismos (0.012 ± 0.01 g) que fueron puestos en recipientes cilíndricos de polietileno de alta densidad (HDPE) de 6 L de capacidad con flujo y aireación constante, a 27 ± 1°C con un calentador de 1 000 w, en un

sistema de recirculación equipado con filtración por cartucho a 50 micras y carbón activado, lámpara de luz UV (40 w) y filtro biológico, equipado con una bomba periférica de ½ hp, con un flujo aproximado de 100-150 ml min⁻¹ (36 recambios por día en cada recipiente) y una tasa de reposición de agua del 7 al 10% por día en todo el sistema en el tanque de rebombeo, previo a la filtración. Lo anterior con la finalidad de estandarizar condiciones de manejo de los peces y garantizar una eficiente remoción de los compuestos originales y sus derivados previo al regreso del agua a las unidades de cultivo; además de mantener niveles de oxígeno disuelto constantes (4.2 ± 1.3 mg L⁻¹ y de nitrógeno amoniacal total por debajo de 0.8 ± 0.3 mg L⁻¹).

Previo a su inclusión en el alimento, se prepararon soluciones madre de cada uno de los productos utilizados; Para los tratamientos con CRI, 7-HF, NA, NAR y 7-MF, se prepararon soluciones de 50 mg mL⁻¹ diluidas en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma[®]), los otros productos fueron disueltos en alcohol etílico y se obtuvieron las siguientes concentraciones: LT 2 mg mL⁻¹, EXE 3 mg mL⁻¹ y MT 1 mg mL⁻¹. Todas las soluciones fueron puestas en frascos ámbar para impedir su oxidación por el efecto de la luz y se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su empleo.

La cantidad correspondiente de cada inhibidor de la aromataza, de acuerdo con lo expuesto en el diseño experimental, fue diluido en 20 mL de alcohol etílico y se mezcló con 50 g de alimento; en el caso del control negativo, solo se agregó el alcohol etílico. Una vez hecha la mezcla, el alimento fue almacenado por 24 horas en condiciones de obscuridad y a temperatura ambiente para permitir la evaporación del alcohol.

Alimentación

La alimentación fue suministrada en dos etapas. En la primera etapa se utilizó alimento comercial con una formulación de proteína del 51 y 11% de lípidos (Otohime B1[®]) al cual se le incluyeron los inhibidores de la aromataza naturales y sintéticos. Este alimento fue suministrado diariamente durante 28 días, por un periodo de ocho horas cada día, ajustando las raciones alimenticias del 20% de la biomasa por los primeros 8 días, 15% del día 9 al día 18 y el 10% hasta el día 28 (Alaniz-Gonzalez *et al.* 2014).

En la segunda etapa se utilizó un alimento comercial con 57% de proteínas y 15% de lípidos (Skretting[®]), al cual no se le adicionó ninguno de los tratamientos. Este alimento fue suministrado a saciedad 6 veces al día por 14 días solo con el propósito de que los organismos alcanzaran el tamaño suficiente para poder realizar la determinación sexual (2 cm longitud total como mínimo).

Al final de cada etapa de alimentación, los organismos de cada tratamiento fueron anestesiados con 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich[®]) a una dilución de 0.5 mL L⁻¹ y se registró el peso (g) con el empleo de una balanza analítica, con lo cual se estimó la tasa específica de crecimiento (TEC %) de las crías de la siguiente manera:

$$TEC (\%) = \left[\frac{\ln \text{Peso final (g)} - \ln \text{Peso inicial (g)}}{\text{Tiempo (días)}} \right] 100$$

Tiempo (días) en la primera etapa = 28, Tiempo (días) en la segunda etapa = 14

Al final del experimento (segunda etapa de alimentación), se realizó el conteo total de individuos por tratamiento y se estimó la supervivencia de la siguiente forma:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \left[\frac{\text{No. final de pece} - \text{No. inicial de peces}}{\text{Tiempo (días)}} \right] 100$$

Determinación del sexo

Al final de la segunda etapa de alimentación, se procedió a verificar el sexo de los organismos mediante la técnica descrita por Guerrero y Shelton (1974). Para ello, todos los peces de cada tratamiento fueron sacrificados mediante shock térmico. Se procedió a la extracción de las gónadas mediante una incisión en la parte ventral de los organismos y se colocaron en portaobjetos para posteriormente teñirlos con aceto-carmín al 30%; posteriormente el sexo se determinó mediante la observación de las preparaciones en un microscopio compuesto (Marca Motic® Modelo B3-series) a un nivel de magnificación de 100x equipado con una cámara digital Moticam 2500® y las imágenes fueron procesadas mediante el software Image ProPlus 5.0 (Figura 1).

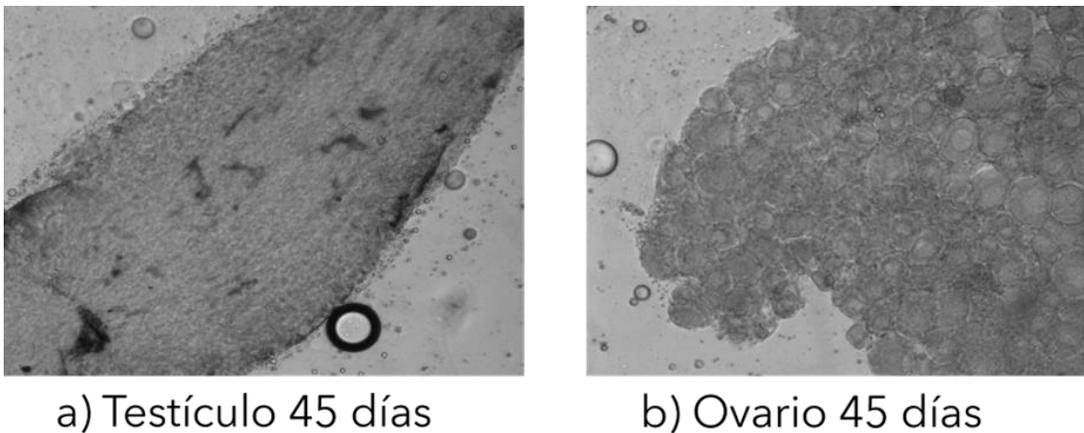


Figura 1. Visualización de las muestras de gónadas de los organismos experimentales para determinación de las proporciones de machos y hembras por tratamiento (1 a 1.5 g peso promedio individual, 2 a 3 cm longitud total), post 45 días de inicio de la alimentación con los tratamientos de andrógenos e inhibidores naturales y sintéticos de la aromatasa. Lado derecho: izquierdo, lado derecho ovario con folículos claramente visibles.

Análisis estadístico

Previo al análisis estadístico de los resultados, la tasa específica de crecimiento y los porcentajes de supervivencia, fueron transformados mediante el arco-seno de la raíz cuadrada; posteriormente se verificó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. Para la evaluación del crecimiento y la supervivencia se realizó un análisis de varianza de una vía con pruebas de comparación de Tuckey para verificar diferencias significativas entre tratamientos. Las posibles diferencias de los porcentajes de masculinización se compararon con la prueba de tablas de contingencia de chi-cuadrada, usando el control negativo C- como referencia de forma individual contra cada uno de los tratamientos experimentales y el control positivo (C+). Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los análisis estadísticos y las gráficas y se

realizaron con la ayuda del software SigmaPlot v. 11.0 para Windows y las tablas de contingencia en Minitab ver 16 para Windows.

RESULTADOS

Crecimiento específico (%)

Durante la primera etapa de alimentación, los peces a los que se les aplicó 7-HF a 1 000 y 2 000 mg kg⁻¹ de alimento, fueron las que presentaron el crecimiento específico significativamente más alto ($P < 0.05$), con $16.08 \pm 0.63\%$ y $8.38 \pm 2.11\%$, respectivamente; mientras que los peces a las que se les aplicó CRI a 1500 mg kg⁻¹ de alimento, presentaron el crecimiento más bajo con $10.52 \pm 2.10\%$ (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio \pm desviación estándar de la tasa específica de crecimiento (TEC, % día⁻¹) en crías de *O. niloticus*. Letras distintas en las columnas representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

| Tratamiento | TEC (% día ⁻¹) | |
|-------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | Primera etapa (28 días) | Segunda etapa (14 días) |
| Control - | 11.99 \pm 1.21 ^{b,c} | 5.77 \pm 3.17 ^d |
| CRI 1000 | 11.16 \pm 1.16 ^{b,c,d,e} | 8.60 \pm 2.80 ^{a,b} |
| CRI 1500 | 10.52 \pm 2.10 ^e | 8.43 \pm 2.48 ^{a,b} |
| CRI 2000 | 10.89 \pm 1.53 ^{b,c,d,e} | 8.22 \pm 3.40 ^{a,b,c} |
| 7-HI 1000 | 16.08 \pm 0.63 ^a | 8.38 \pm 2.11 ^{a,b} |
| 7-HI 1500 | 11.44 \pm 1.25 ^{b,c,d,e} | 8.39 \pm 2.34 ^{a,b} |
| 7-HI 2000 | 15.96 \pm 0.69 ^a | 8.72 \pm 2.60 ^{a,b} |
| NA 1000 | 11.47 \pm 1.04 ^{b,c,d,e} | 8.48 \pm 2.78 ^{a,b} |
| NA 1500 | 11.64 \pm 1.51 ^{b,c,d,e} | 9.21 \pm 2.73 ^a |
| NA 2000 | 11.26 \pm 1.21 ^{b,c,d,e} | 8.69 \pm 2.96 ^{a,b} |
| NAR 1000 | 11.39 \pm 0.97 ^{b,c,d,e} | 8.46 \pm 2.43 ^{a,b} |
| NAR 1500 | 11.83 \pm 1.45 ^{b,c,d} | 7.78 \pm 2.66 ^{a,b,c} |
| NAR 2000 | 11.50 \pm 1.09 ^{b,c,d,e} | 8.29 \pm 2.51 ^{a,b} |
| 7-MET 1000 | 11.08 \pm 1.45 ^{b,c,d,e} | 8.77 \pm 2.44 ^{a,b} |
| 7-MET 1500 | 11.24 \pm 1.49 ^{b,c,d,e} | 8.73 \pm 2.43 ^{a,b} |
| 7-MET 2000 | 10.70 \pm 1.43 ^{b,c,d,e} | 9.01 \pm 2.47 ^{a,b} |
| LT 100 | 11.59 \pm 1.02 ^{b,c,d,e} | 8.34 \pm 2.10 ^{a,b} |
| LT 150 | 10.65 \pm 1.85 ^{d,e} | 9.35 \pm 3.13 ^a |
| LT 200 | 11.36 \pm 0.74 ^{b,c,d,e} | 9.34 \pm 2.09 ^a |
| EXE 1000 | 11.51 \pm 1.38 ^{b,c,d,e} | 8.07 \pm 3.50 ^{a,b,c} |
| EXE 1500 | 10.76 \pm 1.64 ^{c,d,e} | 7.35 \pm 3.84 ^{b,c,d} |
| EXE 2000 | 10.81 \pm 1.87 ^{c,d,e} | 8.58 \pm 4.47 ^{a,b} |
| Control + | 12.15 \pm 1.23 ^b | 6.70 \pm 2.49 ^{c,d} |

CRI: crisina, 7-HI: 7-hidroxiflavona, NA: apigenina, NAR: naringenina, 7-MET: 7-metoxiflavona, LT: letrozol, EXE: exemestano y Control +: 17- α -metiltestosterona.

Para la segunda etapa de alimentación, los peces a las que se les suministró Letrozol en el alimento a razón de 150 y 200 mg kg⁻¹ y API a razón de 1500 mg kg⁻¹, fueron las que presentaron los crecimientos específicos más altos (9.35 ± 3.13%, 9.34 ± 2.09% y 9.21 ± 2.73%, respectivamente), mientras que los peces del grupo control negativo, fueron las que presentaron el crecimiento específico significativamente (P < 0.05) más bajo (5.77 ± 3.17%) (Tabla 1).

Supervivencia (%)

Con respecto a la supervivencia al final de la segunda etapa de alimentación (previo al sexado), se pudo observar que en la mayoría de los tratamientos se presentaron porcentajes promedios cercanos al 100%, no obstante, en cinco tratamientos: 7-HF a 2 000 mg kg⁻¹, API a 1 500 mg kg⁻¹, 7-MF a 1 500 mg kg⁻¹ y EXE a 1 500 y 2 000 mg kg⁻¹, los porcentajes promedios de supervivencia registrados estuvieron entre el 80 y 90%, siendo estos, los porcentajes significativamente más bajos (P < 0.05) durante el experimento (Figura 2).

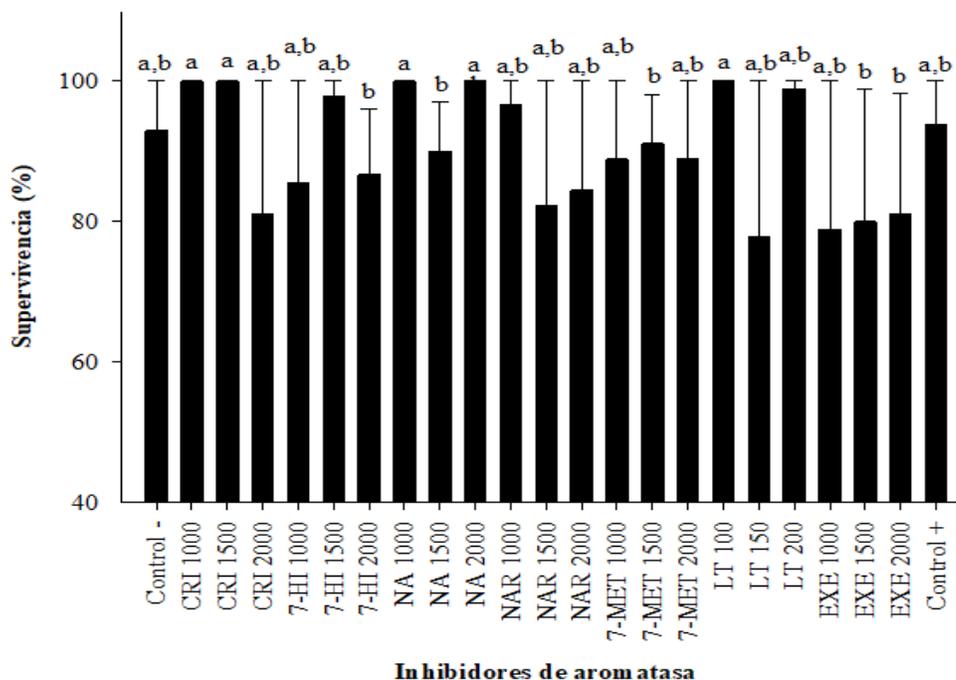


Figura 2. Promedio ± desviación estándar de la supervivencia (%) de crías de *O. niloticus*, tratadas con diferentes inhibidores de la aromatasa. CRI: crisina, 7-HI: 7-hidroxiflavona, NA: apigenina, NAR: naringenina, 7-MET: 7-metoxiflavona, EXE: exemestano incluidas a 1000, 1500 y 2000 mg kg⁻¹ de alimento, LT: letrozol incluido a 100, 150 y 200 mg kg⁻¹ de alimento, Control +: 17- α -metiltestosterona incluido a 60 mg kg⁻¹ de alimento. Letras distintas en las columnas representan diferencias significativas (P < 0.05).

Masculinización (%)

En la evaluación del porcentaje de masculinización de los organismos experimentales, se pudo observar que los tratamientos en los cuales se incluyeron inhibidores sintéticos de la aromatasa (EXE y LT) en el alimento, independientemente del nivel de inclusión, alcanzaron un 100% de eficiencia, al igual que el control positivo (C+) con 17-alfa metiltestosterona (χ^2 p=0.0000),

mientras que los porcentajes obtenidos en los tratamientos donde se incluyeron los flavonoides, fueron muy variables; sin embargo, el análisis estadístico usando tablas de contingencia de chi-cuadrada, estableció que los tratamientos CRI 2000, 7-HI 1500, NA 2000 y los tres niveles de inclusión de NAR y 7-MET presentaron valores de masculinización significativamente mayores que el C- en un intervalo de 70 a 87 % (Tabla 2) comparados contra el control negativo que presentó un 56.6% de machos genéticos (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de machos en crías de tilapia del Nilo *O. niloticus* por tratamiento y nivel de inclusión. Símbolo (*) en % de machos en cada tratamiento indican diferencias significativas con respecto al porcentaje de machos del control negativo C- ($P < 0.05$).

| | Tratamientos | No. machos | No. hembras | % Masculinización | Valor de p (χ^2) |
|--|--------------|------------|-------------|-------------------|-------------------------|
| Controles | C- | 51 | 39 | 57 | |
| | C+ | 90 | 0 | 100* | 0.0000 |
| Inhibidores naturales (Flavonoides) | CRI1000 | 62 | 28 | 69 | 0.089 |
| | CRI1500 | 48 | 42 | 53 | 0.634 |
| | CRI2000 | 65 | 25 | 72* | 0.029 |
| | 7-HI1000 | 63 | 27 | 70 | 0.063 |
| | 7-HI1500 | 68 | 22 | 75* | 0.007 |
| | 7-HI2000 | 42 | 48 | 47 | 0.179 |
| | NA1000 | 59 | 31 | 65 | 0.221 |
| | NA1500 | 45 | 45 | 50 | 0.370 |
| | NA2000 | 64 | 26 | 71* | 0.044 |
| | NAR1000 | 71 | 19 | 79* | 0.001 |
| | NAR1500 | 78 | 12 | 87* | 0.0001 |
| | NAR2000 | 76 | 14 | 84* | 0.0001 |
| | 7-MET1000 | 71 | 19 | 79* | 0.044 |
| | 7-MET1500 | 64 | 26 | 71* | 0.044 |
| 7-MET2000 | 66 | 24 | 73* | 0.044 | |
| Inhibidores sintéticos | EXE1000 | 90 | 0 | 100* | 0.0000 |
| | EXE1500 | 90 | 0 | 100* | 0.0000 |
| | EXE2000 | 90 | 0 | 100* | 0.0000 |
| | LT100 | 90 | 0 | 100* | 0.0000 |
| | LT150 | 90 | 0 | 100* | 0.0000 |
| | LT200 | 30 | 0 | 100* | 0.0000 |

CRI: crisina, 7-HI: 7-hidroxiflavona, NA: apigenina, NAR: naringenina, 7-MET: 7-metoxiflavona, LT: letrozol, EXE: exemestano y Control +: 17- α -metiltestosterona.

DISCUSIÓN

Se describen los efectos observados derivados de la administración de diversos fitoquímicos y su acción in vivo en crías sexualmente indiferenciadas de tilapia del Nilo y su administración en la dieta a diferentes concentraciones y la respuesta observada en eficiencia de masculinización, crecimiento y supervivencia. Cinco de los inhibidores no esteroideos empleados en este trabajo, por su naturaleza química, se clasifican dentro del grupo de sustancias conocidas como flavonoides: la crisina (5-7 dihidroflavona), la apigenina (4',5,7-trihidroflavona), la naringenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromano-4-ona) y la 7-metoxiflavona se encuentran de manera natural en diversos productos naturales tanto de origen animal como vegetal (Astudillo *et al.* 2000, Zanoli *et al.* 2000, Valkama *et al.* 2004, Zhao *et al.* 2008, Rubio *et al.* 2011), y considerando que el 7-hidroflavona (7-hidroxi-2-fenil-4-benzopirona) es un flavonoide sintético (Yahiaoui *et al.* 2008, Panche *et al.* 2016). Varios estudios en medicina humana han demostrado que los flavonoides son potentes inhibidores de la aromatasa, ya que no permiten que se realice la conversión de andrógenos a estrógenos y ello ha contribuido al tratamiento de enfermedades tales como el cáncer de mama (Nijveldt *et al.* 2001, Pouget *et al.* 2002, Kumar y Pandei 2013).

Debido a que la mayoría de los flavonoides se pueden obtener a partir de productos naturales, principalmente a partir de extractos vegetales (Chakraborty *et al.* 2014), en los últimos años se han realizado varios trabajos en los que se ha evaluado el potencial de estos extractos como agentes de reversión sexual en peces teleosteos. Por ejemplo, Gabriel *et al.* (2015), Woken y Orose (2021) y Abaho *et al.* (2022) presentan revisiones acerca del uso de extractos herbales para el control de la reproducción en organismos del género *Oreochromis* sp. Dichos autores reportan que los extractos obtenidos a partir de *Basella alba*, *Quillaja saponaria*, *Trigonella foenum-graecum*, *Glycine max*, *Azadirachta indica*, *Moringa oleífera*, *Papaya carica*, *Mucuna pruriens* y *Tribulus terrestris*, administrados de manera oral por medio de la dieta, favorecen una mayor proporción de machos, sin llegar a los niveles de eficiencia de la hormona sintética MT. En otro estudio, Mukherjee *et al.* (2018) en una revisión del tema, reportan porcentajes de masculinización de crías de tilapia por arriba del 90% cuando se aplican extractos de semillas de *M. pruriens* y extractos de raíz de *Asparagus racemosus* en las dietas; es importante mencionar que en ambos trabajos no fue posible identificar el o los compuestos bioactivos que ejercen dicho efecto; razón por la cual es importante continuar con la evaluación de fitoquímicos debidamente identificados y la dosis-respuesta de cada uno; además de que el método de extracción (acuoso, etanol, metanol o combinado) presenta resultados muy variables que requieren estandarizarse para cada fuente vegetal (Abaho *et al.* 2022).

En el presente trabajo, los porcentajes de masculinización obtenidos mediante la aplicación de flavonoides fueron inferiores a lo reportado por los autores arriba mencionados; solo los tratamientos en el que se incluyó CRI 1500 mg kg⁻¹ y NAR 2000 mg kg⁻¹ de alimento, registraron porcentajes de masculinización por arriba de 80%. No obstante, Rodríguez-Montes de Oca *et al.* (2014) reportó porcentajes de masculinización de alevines de tilapia inferiores al 40% cuando aplicó crisina a una concentración de 500 mg kg⁻¹ de alimento, utilizando crías de tilapia del Nilo 100% hembras genéticas, por lo que, en perspectiva, el margen de incremento de machos fenotípicos en ambos casos oscila entre 30 y 40%. Estos resultados dan la pauta para proponer tentativamente este flavonoide como uno de los de mayor potencial para lograr los objetivos

planteados. Sin embargo, a pesar de que se obtuvo un alto porcentaje de masculinización y un 100% de supervivencia con el tratamiento de crisina a 1500 mg kg^{-1} , y a pesar de que en varios estudios se ha mencionado que la aplicación tanto de extractos herbales como de flavonoides no afecta la supervivencia de los organismos (Ugonna *et al.* 2015, Ghosal y Chakraborty 2017), se ha demostrado *in vitro* que los flavonoides hidroxilados, especialmente la crisina y la apigenina pueden tener efectos tóxicos que llegan a inhibir la síntesis de ADN en ciertas líneas celulares hepáticas de trucha arcoíris, *Onconrhynchus mykiss*, aún a muy bajas concentraciones como $2 \mu\text{M}$ (Tsuji y Walle 2008). Por lo que es recomendable continuar estableciendo diferentes parámetros de respuestas biológicas en los peces a los cuales se les administra y descartar efectos a largo plazo, ya sea en rendimiento productivo o desempeño reproductivo.

Dentro de los resultados más relevantes de este trabajo, está el hecho de poder establecer la repetibilidad de los resultados observados con el uso de inhibidores de aromatasas de origen sintético, dado que tal como se había reportado en un trabajo anterior (Alaniz-Gonzalez *et al.* 2014), en ambos casos se obtuvieron resultados de 100% de efectividad en los porcentajes de masculinización, sin efectos negativos en crecimiento o supervivencia. El letrozol (4,4'-(1,2,4-triazol-1-ylmetil) dibenzonitrilo) es también un producto no esteroideo, pero que no se encuentra dentro del grupo de los flavonoides y que también ha sido señalado como un agente potencial para la inhibición de la aromatasas (Simpson 2003). En este trabajo, se obtuvieron porcentajes de masculinización del 100% cuando se aplicó letrozol a 50, 100 y 200 mg kg^{-1} de alimento, con porcentajes de supervivencia entre el 80 y 100%; no obstante, Gao *et al.* (2010) reportaron resultados inferiores al aplicar este mismo compuesto para la reversión sexual en la mojarra de branquias azules, *Lepomis macrochirus*, con porcentajes de masculinización entre el 60 y 70% al incluir el letrozol a 50, 150, 250 y 500 mg kg^{-1} de alimento, con porcentajes de supervivencia entre 40-45%. Por su parte, Das *et al.* (2012), reportaron porcentajes de masculinización del 100% cuando aplicaron letrozol a 200 mg kg^{-1} de alimento para crías de *O. mossambicus*, con porcentajes de supervivencia por arriba del 90%. Al respecto, Betancur-López *et al.* (2014) obtuvieron porcentajes de masculinización cercanos al 100% con una supervivencia de alrededor del 70% cuando incluyeron el letrozol a 100 mg kg^{-1} en dietas para alevines de tilapia roja, *Oreochromis* sp. Con base en lo anterior se asume que el letrozol aplicado al alimento en dosis entre 100 y 200 mg kg^{-1} es muy efectivo, especies del género *Oreochromis* sp.

En esta investigación, también se emplearon esteroides sintéticos como el exemestano (6-metilideneandrostano-1,4-diene-3,17-dione), que está relacionado estructuralmente con la androstenediona (4-androstene-3,17-dione), la cual es producida por las glándulas suprarrenales y las gónadas de los vertebrados (Simpson 2003). Se observaron porcentajes de masculinización del 100% como los observados al aplicar letrozol y 17α -metiltestosterona, aunque la supervivencia fue de alrededor del 80%. Estos resultados son similares a los reportados por Betancur-López *et al.* (2014), quienes observaron porcentajes de masculinización muy cercanos al 100% cuando incluyeron exemestano a 100 mg kg^{-1} de alimento en tilapia roja, aunque con porcentajes de supervivencia por debajo del 80%. Es importante mencionar, que los resultados presentados en este trabajo para ambos inhibidores sintéticos de la aromatasas son consistentes con los resultados presentados en un trabajo previo (Alaniz-Gonzalez *et al.* 2014), donde se utilizaron los mismos valores de inclusión, ya que en ambos casos los resultados fueron idénticos en cuanto a la eficiencia de masculinización y la supervivencia de los organismos experimentales.

Finalmente, el 17α -metiltestosterona, ha sido el esteroide sintético más utilizado en el proceso de masculinización en peces (Gabriel *et al.* 2015). En este trabajo se aplicó este esteroide a 60 mg kg^{-1} de alimento, observándose un 100% de masculinización con una supervivencia cercana también al 100%. Betancur-López *et al.* (2014) aplicó este andrógeno a la misma concentración en tilapia roja, con porcentajes de masculinización del 94%, pero con una supervivencia de alrededor del 60%. Asimismo, Al-Hakim *et al.* (2012), reportan la que esta hormona a la misma dosis produce porcentajes de masculinización más altos (97-98%) en tilapia del Nilo, *O. niloticus* y en híbridos de *O. mossambicus* x *O. niloticus*, con porcentajes de supervivencia superiores al 95%.

CONCLUSIONES

La aplicación de flavonoides naturales y sintéticos favorece la producción de poblaciones masculinizadas de tilapia del Nilo, aunque, los productos sintéticos esteroideos (exemestano y 17α -metiltestosterona) y no esteroideos (letrozol) son mucho más efectivos cuando se aplican a los alevines por medio de la dieta. Existe la posibilidad de que no se den todos los pasos necesarios para facilitar la absorción de tales compuestos debido al grado de desarrollo del tracto digestivo en peces que aún se encuentran sexualmente indiferenciados. Para que los flavonoides sean una alternativa viable al uso de hormonas sintéticas para la producción de poblaciones masculinizadas de tilapia del Nilo y otras especies, son necesarios más estudios encaminados a conocer en qué medida tales flavonoides pueden ser absorbidos y metabolizados por los organismos en esta etapa de desarrollo y con ello ajustar y probar diferentes concentraciones y métodos de aplicación. Aun así, consideramos que los resultados obtenidos justifican continuar con esta línea de investigación para eventualmente establecer la forma química y concentración adecuada para lograr altos porcentajes de crías monosexo, reduciendo la utilización de análogos sintéticos de hormonas esteroideas sexuales y fomentar el uso de productos naturales para lograr la producción de tilapias con las características requeridas por la industria acuícola.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción y Cultivo de peces, FACIMAR-UAS con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) número de registro 258447 otorgada a A. Alaniz y del proyecto PROFAPI-UAS "Evaluación de inhibidores naturales y sintéticos de la aromataasa para la producción de crías masculinizadas de tilapia".

CONFLICTO DE INTERÉS

"Los autores declaran que no tienen intereses en competencia".

LITERATURA CITADA

- Abaho I, Masembe C, Akoll P, Jones CL (2022) The use of plant extracts to control tilapia reproduction: Current status and future perspectives. *Journal of The World Aquaculture Society* 53: 593-619. <https://doi.org/10.1111/jwas.12863>.
- Alaniz-González A, Rodríguez-Montes de Oca GA, Brito-Martínez XG, Román-Reyes JC (2014) Validación del uso de inhibidores sintéticos de la aromatasa en la masculinización de la tilapia *Oreochromis niloticus*. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan* 2(1): 434-440.
- Al-Hakim NF, Saleh M, Aly K, Tahoun AM (2012) Induction of mono-sex (male tilapia) population by inter-specific hybridization and hormonal sex reversal of Nile tilapia. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries* 17: 23-33.
- Astudillo L, Ávila F, Morrison R, Gutiérrez, M, Bastida J, Codina C, Schmea-Hirshmann G (2000) Biologically active compounds from Chilean propolis. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 45: 577-581.
- Arts IC, Hollman PC (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 317S-325S.
- Betancur-López JJ, Quintero-Velez JC, Ostos-Alfonso H, Barreiro-Sánchez F, Olivera-Ángel M (2014) Effectiveness of the aromatase (P450 Arom) inhibitors Letrozole and Exemestane for masculinization of red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 27: 47-53.
- Budd AM, Banh QQ, Domingos JA, Jerry DR (2015) Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering* 3: 329-355. <https://doi.org/10.3390/jmse3020329>
- Chakraborty SB, Hancz C (2011) Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture* 3: 103-119. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>
- Chakraborty SB, Horn P, Hancz C (2014) Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture* 5: 1-9. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>
- Citarasu T (2010) Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18: 403-414.
- Coward K, Bromage NR (2000) Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10(1): 1-25. <https://doi.org/10.1023/A:1008942318272>
- Das R, Rather MA, Basavaraja N, Sharma R, Udit UK (2012) Effect of nonsteroidal aromatase inhibitor on sex reversal of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgheh* 64: 1-7.
- De Graaf GJ, Galemoni F, Huisman EA (1999) Reproductive biology of pond-reared Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research* 30: 25-33.
- Donaldson EM, Devlin RH (1996) Uses of biotechnology to enhance production. In: Pennel W, Barton B (eds) *Principles of salmonids culture*. Elsevier. Amsterdam. pp. 969-1020.
- El-Greisy ZA, El-Gamal AE (2012) Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38: 59-66.
- El-Sayed A-FM, Mansour CR, Ezzat AA (2003) Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture* 220: 619-632.
- El-Sayed A-FM (2006) *Tilapia Culture*. CAB International. Wallingford. p. 277. <https://doi.org/10.1079/9780851990149.0000>
- Gabriel NN, Qiang J, Kpundeh MD, Xu P (2015) Use of herbal extracts for controlling reproduction in tilapia culture: trends and prospects - a review. *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgheh* 67: 1-22.
- Gabriel NN (2019) Review on the progress in the role of herbal extracts in tilapia culture. *Cogent Food & Agriculture* 5: 1. 1619651. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1619651>
- Gale WL, Fitzpatrick MS, Lucero M, Contreras-Sánchez WM, Schreck CB (1999) Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. *Aquaculture* 178: 349-357.
- Gao ZX, Wang HP, Wallat G, Yao H, Rapp D, O'Bryant P, MacDonald R, Wang WM (2010) Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture Research* 41(9): 1282-1289.

- Ghosal I, Chakraborty SB (2017) Production of monosex all-male Nile tilapia using ethanol extract of *Tribulus terrestris* seeds. Proceedings of the Zoological Society 73: 188-191.
- Guerrero RD, Shelton WL (1974) An aceto-carminine squash method for sexing juvenile fishes. The progressive fish-culturist 36: 56-56.
- Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal 2013: 162750.
- Jeong HJ, Shin YG, Kim IH, Pezzuto JM (1999) Inhibition of aromatase activity by flavonoids. Archives of Pharmacal Research 22: 309-312.
- Macintosh DJ, Little DC (1995) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: Bromage NR, Roberts RJ (eds) Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science. Oxford, UK. pp. 277-320.
- Mukherjee D, Ghosal I, Hancz D, Chakraborty SB (2018) Dietary administration of plant extracts for production of monosex tilapia: searching a suitable alternative to synthetic steroids in tilapia culture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18: 267-275.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. American Journal of Clinical Nutrition 74: 418-425.
- Ohno K, Araki N, Yanase T, Nawata H, Iida M (2004) A Novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. Toxicological Sciences 82: 443-450.
- Omeje VO, Lambrechts H, Brin D (2018) Effect of pawpaw (*Carica papaya*) seed meal on sex determination, growth, and survival, of *Oreochromis mossambicus* fry. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 70: 1-12.
- Omeje VO, Lambrechts H, Brink D (2020) Use of pawpaw (*Carica papaya*) seed in tilapia sex reversal. Reviews in Agricultural Science 8: 230-242. https://doi.org/10.7831/ras.8.0_230
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science 5(47): 1-15
- Pandian TJ, Vardaraj K (1987) Techniques to regulate sex ratio and breeding in tilapia. Current Science 56(8): 337-343.
- Pandian TJ, Sheela SG (1995) Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture 138: 1-22.
- Pouget C, Fagnere C, Basly JP, Besson AE, Champavier Y, Habrioux G, Chulia AJ (2002) Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. Pharmaceutical Research 19(3): 286-291.
- Ponzoni RW, Nguyen NH, Khaw HL, Hamzah A, Bakar KRA, Yee HY (2011) Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special reference to the work conducted by the WorldFish Center with the GIFT strain. Reviews in Aquaculture 3(1): 27-41.
- Rodríguez-Montes de Oca GA, Dabrowski K, Contreras WM (2014) Dietary administration of daidzein, chrysin, caffeic acid and spironolactone on growth, sex ratio and bioaccumulation in genetically all-male and all-female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences 2(3): 91-99.
- Roque RLA, Bolivar RB, Rafael RR (2018) Phytochemical screening and masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) using the needle and root crude extracts of Benguet pine (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon). International Journal of Agricultural Technology (Special Issue) 14(7): 1801-1812.
- Rubio C, Alurralde T, Suárez S, Navarro A (2011) Producción de naringenina por *Aspergillus niger* IB-56. Boletín Microbiológico 26: 23-27.
- Sadek MFA, Nady AS, Abou Zied RM (2022) Effect of some nutritional and environmental factors on production of mono sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Animal and Poultry Production 13(1): 15-23.
- Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 86(3-5): 225-230.
- Tsuji PA, Walle T (2008) Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. Chemo-biological interactions 171: 37-44.
- Ugonna BO, Solomon SG, Olufeagba SO, Okomoda VT (2015) Effect of *Carica papaya* seed meal on growth and as a natural sex-reversal agent for *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). North American Journal of Aquaculture 80(3): 278-285.
- Valkama E, Salminen JP, Koricheva J, Pihlaja K (2004) Changes in leaf trichomes and epicuticular flavonoids during leaf development in three birch taxa. Annals of Botany 94(2): 233-242.
- Wassermann GJ, Bertolla-Afonso LO (2003) Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. Aquaculture Research 34: 65-71.

- Wokeh OK, Orose E (2021) Use of dietary phytochemicals as control for excessive breeding in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences 17(2): 152-159.
- Yahiaoui S, Fagnere C, Pouget C, Buxeraud J, Chulia AJ (2008) New 7,8-benzoflavanones as potent aromatase inhibitors: Synthesis and biological evaluation. Bioorganic and Medicinal Chemistry 16 (3): 1478-1480.
- Zaki M, F, M Said M, Tahoun AA, Amer M (2021) Evaluation of different sex reversal treatments in red tilapia hybrid. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries 25(1): 279-292.
- Zanoli P, Avallone R, Baraldi M (2000) Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. Fitoterapia 71(1): 117-123.
- Zhao J, Dasmahapatra AK, Khan SI, Khan IA (2008) Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). Journal of Ethnopharmacology 120(3): 387-393.