

**Validación del uso de inhibidores sintéticos de la aromatasa en la masculinización de la tilapia
*Oreochromis niloticus***

Validation of synthetic aromatase inhibitors for tilapia masculinization *Oreochromis niloticus*

Alanís-González Anabel, Gustavo Alejandro Rodríguez-Montes de Oca[✉], Xitlaly Guadalupe Brito-Martínez y José Cristóbal Román-Reyes

Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Laboratorio de Reproducción y cultivo de peces, correspondencia: E-mail: grodriguez@uas.edu.mx ✉Autor para correspondencia

Recibido: 4/01/2014

Aceptado: 11/07/2014

RESUMEN

La tilapia es una de las especies más cultivadas a nivel mundial; sin embargo, es una especie altamente precoz lo que afecta su crecimiento y ocasiona la superpoblación en las unidades de cultivo. Para prevenir este problema existe la opción de cultivar organismos 100% machos. El uso de hormonas es uno de los métodos más utilizados para inducir la masculinización. Actualmente se experimenta con inhibidores de la aromatasa como posibles sustitutos de hormonas esteroides. Existe evidencia de que dichos inhibidores de la aromatasa han logrado un relativo éxito en la reversión sexual en peces. En el presente estudio se evaluó la eficiencia de dos inhibidores como agentes masculinizantes durante la diferenciación sexual de crías de tilapia alimentadas durante 28 días con dietas suplementadas con andrógeno 17- α -metiltestosterona 60 mg/kg (control positivo), letrozol (50, 100 y 200 mg/kg de alimento) y exemestano (1000, 1500 y 2000 mg/kg de alimento) y un grupo control negativo (sin hormonas) en tres experimentos. Se evaluó la supervivencia y el crecimiento y el porcentaje de masculinización en cada experimento. Los resultados muestran que los tratamientos no afecta la supervivencia observándose valores por arriba del 85% de supervivencia en la mayoría de los casos, sin un efecto negativo en el crecimiento de las tilapias. El porcentaje de masculinización presento diferencias significativas entre los inhibidores y el grupo control; se registró un 100% machos en todos los tratamientos experimentales. Se concluye que el suministro de inhibidores sintéticos de la aromatasa son eficientes para lograr poblaciones de tilapia 100% machos.

Palabras claves: Aromatasa, diferenciación sexual, masculinización, tilapia.

ABSTRACT

Tilapias are one of the main fish species for aquaculture worldwide; however their precocious reproductive behavior negatively affects growth and prompts culture unit overpopulation. To prevent this situation, a viable option is to use 100% male stocks for aquaculture purposes; thus hormone dietary supplementation is one of the most commonly used procedures for tilapia masculinization. A new line of research involves aromatase inhibitors as alternative to steroid hormones, with certain evidence of relative success achieving sex reversion in tilapia. In this study we validated the efficiency of two synthetic aromatase inhibitors during sex differentiation stage on tilapia fry fed for 28 days with diets supplemented with 17 α -methyltestosterone 60 mg/kg (positive control), letrozole at 50, 100 and 200 mg/kg, exemestane at 1000, 1500 and 2000 mg/kg and a negative control group (hormone free) in three experiment. Survival, growth and final sex ratio were evaluated for each experiment. Male percentage showed significant differences among negative control and all treatments, achieving 100% masculinization for all groups. No negative effect was observed on survival (above 85%) and final individual weight in most cases. We conclude that synthetic aromatase inhibitors administration is an efficient method to produce 100% male tilapia populations.

Keywords: Aromatase, masculinization, sex differentiation, tilapia.

INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de la aromatasa son compuestos que suprimen la biosíntesis de estrógenos, (Hinojosa-Cruz *et al.* 2010). La viabilidad de la aromatasa para el manejo de la diferenciación sexual en peces se ha demostrado en varios estudios, existe evidencia en la cual se reporta que diversos inhibidores han logrado un éxito en la masculinización de peces (Afonso *et al.* 2001). El uso de estos inhibidores ha sido ensayado en diversas especies. Gao *et al.* (2010) evaluaron el inhibidor sintético letrozol en el pez sol (*Lepomis macrochirus*) administrando dosis de 50, 150, 250 y 500 mg/kg, logrando un 70% de machos. Por su parte Ruksana *et al.* (2010) describen que la administración de exemestano de 1000 y 2000 mg/kg durante la diferenciación sexual de tilapia contribuye al desarrollo de los testículos, por una total supresión de la actividad de la aromatasa. Dado que estos datos

evidencian si las dosis utilizadas en los trabajos anteriores son suficientes para obtener poblaciones 100% machos, se vislumbra la factibilidad de continuar con nuevos estudios en este tema. Por lo que el objetivo de esta investigación se centró en evaluar el uso de inhibidores sintéticos de la aromatasa, administrando tres diferentes niveles de inclusión durante 28 días, durante la diferenciación sexual de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* variedad Stirling con la finalidad de obtener organismos 100% machos y así mismo determinar si las dosis aplicadas afectan la supervivencia y el crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las larvas de tilapia, fueron transportadas al laboratorio de Reproducción y Cultivo de Peces de la FACIMAR-UAS en Mazatlán Sin., donde se mantuvieron en jarras

de incubación tipo MacDonald. Posteriormente fueron trasladadas a un sistema de recirculación equipado con biofiltro, Luz UV y carbón activado con 30 tanques (6 l), a 27 ± 2 °C. Se colocaron $n=30$ peces y se asignaron a los tratamientos: control (libre de hormonas e inhibidores), exemestano (EXE) (Aromasin®, NOVARTIS) a 1000, 1500 y 2000 mg/kg y letrozol (LET) (Femara®, Pfizer) a 50, 100 y 200 mg/kg y 17α -metiltestosterona (MT) (ARGENT®) a 60 mg/kg. Para la preparación de las soluciones stock, se molieron finamente 9 pastillas de EXE (25 mg c/u) para un total de 180 mg (3 mg/ml) y 12 pastillas de LET (2.5 mg c/u) para un total de 30 mg (2 mg/ml) y se disolvieron en 60 ml de etanol; para MT se disolvió 0.5 g en 500 ml de etanol (1 mg/ml). Se pesaron 50 g de alimento (Otohime 51-11% proteína-lípidos, 360 μm) para cada tratamiento. Para la suplementación del alimento, se utilizó el equivalente en ml de las solución stock re-diluidos en etanol para incorporarlos a las dietas; la dieta control fue tratada únicamente con etanol.

Se realizaron 3 experimentos consecutivos, incluyendo tres replicas en cada experimento de los tratamientos control y MT y

una unidad experimental de cada uno de los niveles de inclusión de los inhibidores de la aromatasas. Las dietas fueron suministradas por 28 días, al finalizar estos se realizó una biometría ($n=10$ por tanque) registrando el peso individual con una balanza digital (300x0.01 g O'haus, EUA) y la longitud total. Se continuo la alimentación por otros 14 d con alimento (Skretting, 57-15% proteína-lípidos) para facilitar el sexado. Una vez alcanzado este tamaño mínimo se realizó un análisis en fresco de la gónada de acuerdo a Guerrero y Shelton (1974). Las variables de peso y supervivencia fueron transformados (raíz cuadrada de arcoseno) y analizadas con un ANOVA de 1 vía. Las diferencias en la proporción de sexos establecieron con tablas de contingencia con chi-cuadrada. Los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ utilizando Minitab ver. 16.

RESULTADOS

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre tratamientos en el peso final individual dentro y entre experimentos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Peso final promedio \pm desviación estándar al día 28 en *O. niloticus*.

	Tratamiento	Nivel (mg/kg)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	$\bar{x} \pm ds$ (g)
Peso final (g)	Control*	0	0.61 \pm 0.21	0.44 \pm 0.21	0.52 \pm 0.12	0.52 \pm 0.19
	17- α -MT*	60	0.63 \pm 0.19	0.36 \pm 0.13	0.54 \pm 0.12	0.51 \pm 0.18
	Letrozol	50	0.53 \pm 0.12	0.43 \pm 0.11	0.65 \pm 0.14	
		100	0.53 \pm 0.15	0.22 \pm 0.06	0.58 \pm 0.14	0.49 \pm 0.15
		200	0.55 \pm 0.09	0.45 \pm 0.09	0.47 \pm 0.10	
	Exemestano	1000	0.59 \pm 0.14	0.42 \pm 0.24	0.61 \pm 0.16	
		1500	0.59 \pm 0.12	0.36 \pm 0.20	0.39 \pm 0.15	0.48 \pm 0.19
		2000	0.60 \pm 0.18	0.44 \pm 0.14	0.19 \pm 0.06	

*Promedio de 3 réplicas por cada experimento

En la supervivencia, de igual manera no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos o entre experimentos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Supervivencia promedio \pm desviación estándar al día 42 (sexado) en *O. niloticus*.

	Tratamiento	Nivel (mg/kg)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	$\bar{x} \pm ds$ (%)
Supervivencia %	Control*	0	94.44	84.44	100	92.9 \pm 9.8
	17- α -MT*	60	94.44	86.67	100	93.7 \pm 13.2
		50	100	100	100	100 \pm 0.0
	Letrozol	100	86.67	46.67	100	77.7 \pm 27.8
		200	96.67	100	100	98.8 \pm 1.9
		1000	90	46.67	100	78.8 \pm 28.3
	Exemestano	1500	93.33	20	66.67	60 \pm 37.1
		2000	100	76.67	6.67	61.1 \pm 48.6

*Promedio de 3 réplicas por cada experimento

Nuestros resultados indican que existen diferencias significativas en la proporción de

sexos con respecto al control, obteniendo 100% machos con MT, EXE y LET (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de significancia de reversión sexual *O. niloticus* y porcentaje de masculinización, comparación del control contra los tratamientos experimentales.

Tratamientos	Nivel (mg/kg)	Exp. 1	Machos (%)	Exp. 2	Machos (%)	Exp. 3	Machos (%)
Control	0	--	60	--	71.4	--	66.6
	0	--	56	--	36.3	--	53.3
	0	--	56.6	--	52.3	--	60
17- α -MT	60	0.000	100	0.000	100	0.000	100
	60	0.000	100	0.000	100	0.000	100
	60	0.000	100	0.001	100	0.000	100
Letrozol	50	0.000	100	0.000	100	0.000	100
	100	0.000	100	0.003	100	0.000	100
	200	0.000	100	0.000	100	0.000	100
Exemestano	1000	0.000	100	0.003	100	0.000	100
	1500	0.000	100	n.d	n.d	0.001	100
	2000	0.000	100	0.000	100	n.d	n.d

*n.d= no determinado debido a supervivencia <40%

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo dan pauta para continuar la producción de crías de tilapia 100% machos, mediante el control de la biosíntesis de estrógenos utilizando inhibidores de la aromatasa. Es importante considerar que a diferencia del uso de MT no se han reportado casos de masculinización paradójica derivado del uso de este tipo de compuestos en tilapia (Phelps y Okoko 2010). Aún cuando los niveles de inclusión de LET son mayores que MT, no se observó un efecto en la supervivencia y crecimiento en tilapia; López *et al.* (2009) indica que LET a 25 y 100 mg/kg no afecta la supervivencia de las crías de tilapia roja. Se observó que EXE disminuyó la supervivencia a 1500 y 2000 mg/kg; sin embargo, no es posible establecer una causa-efecto debido a la concentración. Está reportado que dosis de 5 hasta 200 mg de EXE suprimen estrógenos sin efectos secundarios (Johannessen *et al.* 1997) en humanos.

Los resultados observados son relevantes en dos aspectos: la eficiencia del 100% y un menor tiempo de administración. Gao *et al.* (2010) obtuvieron masculinización de 59, 65, 65 y 70% con dosis de 50, 150, 250 y 500 mg/kg de LET en un periodo de exposición de 30 a 90 días en *L. macrochirus*. Kwon *et al.* (2000) reportan que la administración de fadrozol, similar a LET, en tilapia a 200 y 500 mg/kg durante 30 d, reporta un 92.5-96% machos sin llegar al 100%. En cuanto al segundo punto, Das *et al.* (2012) empleando LET por 90 d, a 100 y 200 mg/kg reportan 97-100% machos en la tilapia mosambica. Ruksana *et al.* (2010) reportan que EXE a 1000 y 2000 mg/kg en *O. niloticus*, durante 35 d produce 100% machos.

CONCLUSIONES

La administración oral letrozol y exemestano durante 28 días fueron eficientes para la obtención de tilapia *O. niloticus* variedad Stirling 100% machos sin un efecto negativo en crecimiento y únicamente en la supervivencia sin ser dependiente de la dosis en EXE.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero CONACYT (# 258447 al primer autor) y al proyecto PROFAPI-UAS 2012/156 “Evaluación de inhibidores naturales y sintéticos de la aromatasa para la producción de crías masculinizadas de tilapia”.

LITERATURA CITADA

- Afonso, B. L. O., Wassermann, G. J. y De-Olivera, R. T. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J. Experimental Zoology*, 290(2): 177-181.
- Das, R., Rather, M. A., Basavaraja, N., Sharma, R. y Udit, U. K. 2012. Effect of Nonsteroidal Aromatase Inhibitor on Sex Reversal of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. pp.64- 9.
- Gao, Z. X., Wang, H. P., Wallat, G., Yao, H., Rapp, D., O’Bryant, P., MacDonald, R. y Wang, W. M. 2010. Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on

- gonadal differentiation of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture Research* 41(9): 1282-1289.
- Guerrero, R. D. y Shelton, W. L. 1974. An aceto-carmin squash method of sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist* 36(1): 36-56.
- Hinojosa-Cruz, J. C., Ramos-García, R. A. y Vital-Reyes, V. S. 2010. Inhibidores de la aromatasa. Aplicaciones potenciales en medicina de la reproducción. *Revista Mexicana de la Medicina de la Reproducción*, 3(2): 63-68.
- Johannessen, D. C., Engan, T., Salle-Di, E., Zurlo, M. G., Paolini, J., Ornati, G., Piscitelli, G., Kvinnsland, S. y Lønning, P. E. 1997. Endocrine and clinical effects of exemestane (PNU 155971), a novel steroidal aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients: a phase I study. *Clinical Cancer Research*. pp. 1101-1108.
- Kwon, J. Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L. M., McAndrew, B. J. y Penman, D. J. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Experimental Zoology*, 287 (1): 46-53.
- López, J. B., Alfonso, O. H. y Ángel, O. M. 2009. Administración oral de inhibidores de la aromatasa (arom P450) como método alternativo de reversión sexual en tilapia roja (*Oreochromis spp*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 22:3.
- Phelps, R. P. y Okoko, M. 2010. A non-paradoxical dose response to 17 α -methyltestosterone by Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.): effects on the sex ratio, growth and gonadal development. *Aquaculture Research* 42(4): 549-558.
- Ruksana, S., Pandit, P. N. y Nakamura, M. 2010. Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 152(1): 69-74.