

ÁREA DE BIOLOGÍA ANIMAL

# ESTUDIO MORFOLOGICO E HISTOLOGICO DE LA REVERSION SEXUAL INDUCIDA EN HEMBRAS ESPADAS ADULTAS *xiphophorus helleri*, POR TRATAMIENTO CON 17 ALFA METIL TESTOSTERONA

MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL STUDY OF THE SEXUAL REVERTION INDUCED IN *Xiphophorus helleri* ADULT SWORD FEMALES, BY TREATMENT WITH 17 ALFA METIL TESTOSTERONE

Foto Flickr



Edna Johanna Chaves Hernández<sup>1</sup>

Paola Moreno Especialista en Estudios Amazónicos<sup>2</sup>

Hernán Hurtado Giraldo Ph.D.<sup>3,4</sup>

1 Estudiante Programa de Biología Aplicada, Grupo de Ictiología, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.

2 Asistente de Investigación, Grupo de Ictiología, Programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada

3 Docente Programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.

4 Autor para correspondencia

## RESUMEN

Los individuos macho de *Xiphophorus helleri* tienen alto valor comercial por sus características sexuales secundarias, especialmente la prolongación de la aleta caudal, que los hacen más vistosos que las hembras. Otro factor importante económicamente es el tamaño que es mayor en las hembras que en los machos. La manipulación del fenotipo por tratamiento hormonal puede llevar a la obtención de individuos de gran tamaño, pero con características masculinas. Se tomaron 24 hembras adultas, que fueron alimentadas con Tilapia Reversión, alimento hormonado con  $17\alpha$  metil testosterona (MT) (60 mg MT/ Kg). 4 tratamientos de 6 individuos cada uno, establecidos por tiempo (días), de administración de la reversarina (28 (G1), 42 (G2) y 55 (G3), grupo control GC sin hormona), fueron establecidos para comparar niveles de reversión morfológica e histológica gonadal. La dosis de alimento por grupo correspondió al 6% del peso corporal total de cada uno de los acuarios. El día 42 de tratamiento fue posible establecer 100% de reversión morfológica. El seguimiento histológico gonadal en G1 y G2, evidenció la presencia de células sexuales femeninas e incluso, embriones en avanzado estado de desarrollo. La reversión completa (morfológica e histológica gonadal), fue observada en un individuo del G3. Los resultados de este estudio presentan el tratamiento con estrógenos como una alternativa para la manipulación fisiológica sexual de especies gonocoristas.

**Palabras claves:** Reversión Sexual, Hembras adultas, *Xiphophorus*,  $17\alpha$  metiltestosterona.

## ABSTRACT

*Xiphophorus helleri* have a higher commercial value due to its secondary sexual characteristics, specially the caudal fin extension, which make them more attractive than females. Another economically important factor that body size is larger in females than in males. Phenotype manipulation by hormonal treatment may lead to the obtention of large individual with male characteristics. 24 adult females were taken, and nurtured with Tilapia Reversión, with  $17\alpha$  methyl testosterone (MT) (60 mg MT/ Kg). Four treatments, with six individuals each one were established depending on time (days) under the hormone (28 (G1), 42 (G2) y 55 (G3), control group without hormone, in order to compare sexual reversion levels (fish morphology, and gonadal histology). Feed was administrated at 6% of body mass. At day 42 it was possible to have 100% of morphological reversion. Histological follow-up in G1 and G2 showed sexual cells, and even well developed embryos. Morphological and gonadal reversion was observed in one individual of G3. These results indicates that estrogen treatment is an alternative for the physiological manipulation of gonocoristic species.

## INTRODUCCIÓN

El marcado dimorfismo sexual de *Xiphophorus helleri* hace que la atención del mercado se centre sobre los especímenes macho de la especie, que cuentan con una modificación en el lóbulo inferior de su aleta caudal en forma de espada y con una brillantez de la línea media más marcada con respecto a la de

la hembra (Yanong et al. 2006; Landines et al. 2007). Las técnicas que permitan controlar la presencia de los caracteres más llamativos son de gran interés (Yanong et al. 2006). La reversión sexual inducida por alimentos con adición de hormonas, se presenta como una de estas alternativas para la obtención controlada de características morfológicas comercialmente importantes (Schreck y Moyle, 1990).

La longitud total del cuerpo, la presencia de una llamativa elongación en forma de espada de la aleta caudal y una línea lateral muy marcada en los machos, son los caracteres que establecen el marcado dimorfismo sexual característico de la especie. La longitud total del cuerpo del macho es menor (6-8 cm). con respecto a la de la hembra cuya longitud puede ir más allá de los 9 cm. La coloración de los individuos varía de acuerdo al hábitat (Alderton, 2004), aunque son muy comunes las variedades verdes (color de las formas salvajes) y otras como las rojas, oro, negras y albinas (Axelrod y Wischnat, 1991). Las hembras, además de carecer de la prolongación en su aleta caudal (aleta caudal redondeada), son menos coloridas que los machos (Alderton, 2004, Landines et al. 2007).

Se ha reportado que especies gonocoristas, entre las que se incluye *Xiphophorus helleri*, no sufren reversión sexual naturalmente, después de que se ha llevado a cabo la diferenciación gonadal, en los estadios más tempranos del desarrollo (Baroiller et al. 1999; Bhandari et al. 2004). En los gonocoristas el uso de esteroides para la manipulación fisiológica del sexo ha resultado ser altamente efectiva aplicándola directamente sobre los huevos o a la dieta de los juveniles. Debido a que

muchos de los cultivos actuales trabajan con este tipo de especies (Schreck y Moyle, 1990), el uso experimental de hormonas, en el campo de la acuicultura, se ha convertido en una herramienta muy útil y distribuida a nivel mundial, para la producción, a nivel comercial, de poblaciones monosexuales, (Schreck y Moyle, 1990; Bhandari et al. 2004).

Lo anterior dado que los esteroides externos cumplen 4 papeles fundamentales (Stickney, 2000) que se enumeran a continuación:

Los esteroides externos cumplen la función de "mimetizar" la acción de los factores naturales de determinación genética sexual, logrando modificar el fenotipo o condición sexual gonadal original.

El efecto farmacológico y fisiológico deseado se obtendrá, de manera eficaz, bajo las concentraciones y formas de administración adecuadas.

La exposición a los esteroides externos debe darse en etapas claves de la diferenciación gonadal de los peces.

La reversión lograda durante esta práctica garantiza que no habrá lugar a reversiones espontáneas.

La metiltestosterona (MT) es una hormona calificada como un estrógeno agonista que funciona como disruptor endocrino capaz de ocasionar cambios sexuales en peces adultos (Oliveira et al. 2002; Ankley y Johnson, 2004). La disminución en la expresión de características sexuales en los machos, es un indicativo de la acción de este tipo de estrógeno en peces teleosteos como *Oryzias latipes* y *Pimephales promelas* (Ankley y Johnson, 2004).

Al actuar directamente sobre el eje Hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG), este tipo de

químicos disruptores endocrinos (EDC), inactivan las respuestas normales a diferentes tipos de señales y por esta razón, los peces se hacen más susceptibles a su efecto, especialmente en estadios tempranos de desarrollo (Schreck y Moyle, 1990; Ankley y Johnson, 2004) y cuando se encuentran reproductivamente activos (Ankley y Johnson, 2004).

Dentro de los efectos de los EDC se enumeran los siguientes: La alteración de la morfología (Kristensen *et al.* 2004) y arquitectura histológica de las gónadas en machos (Beatrup y Junge, 2001; Ankley y Johnson, 2004) y en hembras reversadas; obtención de gónadas intersexuales; inhibición de la fecundidad (Kristensen *et al.* 2004; Ankley y Johnson, 2004) y la variación en la concentración de vitelogenina y hormonas en circulación (Ankley y Johnson, 2004).

Estudios del efecto de diferentes eventos, naturales o no, que inducen a la reversión sexual y los diferentes cambios a nivel morfológico, gonadal y hormonal que implican dicha variación, han sido reportados por diferentes autores Takahashi (1975), Beatrup y Junge (2001), Bhandari *et al.* (2003; 2004); Ankley y Johnson (2004), Kristensen *et al.* (2004), Lee *et al.* (2004), entre otros. Estos estudios han sido llevado a cabo en diferentes especies de peces, entre los que se destacan *Epinelephus merra*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Acanthopagrus schlegeli*, *Danio rerio* y *Poecilia reticulata*.

En *H. fossilis*, la MT no produce poblaciones 100% monosexuales dado que en la especie este andrógeno también tiene efectos feminizadores cuando se suministra en dosis muy altas, como por ejemplo, 400 µg/L con un

tiempo de exposición de 1 o 2 horas. Debido a esto, las poblaciones que se obtienen son intersexadas (Haniffa *et al.* 2004).

Para *Xiphophorus helleri*, la reversión sexual incluye el desarrollo completo de caracteres sexuales secundarios masculinos, dentro de los que se encuentra la transformación de la terminación anal en gonopodio, característica de todos los poecílidos (Gratzek y Matthews, 1992).

Yanong *et al.* (2006), reportaron un 100% de masculinización en una población de 440 hembras en estadios avanzados de maduración. La MT fue suministrada a través del alimento preparado mediante el método de volatilización del alcohol que permite que la MT quede en el concentrado. Al día 17 (de 28) de exposición a la hormona, la mayoría de las hembras presentaban la espada, característica apetecida en la industria. Adicional a la reversión de la población experimental, se reportó que en el grupo control no hubo ningún individuo con espada y que las hembras reversadas no regresaron a su estado inicial, evidenciando la estabilidad de la reversión lograda, aun seis meses después de realizado el experimento. Sin embargo, en este trabajo no se determinó si el tratamiento hormonal también llevó a un cambio en las gónadas.

Este estudio de la reversión sexual de hembras adultas de *Xiphophorus helleri*, mediante la administración de Tilapia Reversa con un contenido del 60% de 17α metil testosterona, demuestra que, adicional al desarrollo de las características sexuales secundarias masculinas importantes para la industria de peces ornamentales (Baroiller *et al.* 1999; Yanong *et al.* 2006), también es importante tener en cuenta

la presencia o no de reversión a nivel histológico gonadal, ya que la mayoría de los individuos tratados, aunque muestran reversión en su morfología externa, mantienen gonadas femeninas. Es decir que bajo las condiciones de este estudio, no se genera una reversión sexual completa y funcional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Hembras adultas entre 6cm y 7cm fueron adquiridas en sitios de comercialización especializados en Bogotá. Antes de dar inicio al estudio, los peces fueron aclimatados a la iluminación natural del laboratorio de acuicultura de la estación experimental Río Grande de la Universidad Militar Nueva Granada en Cajicá (Cundinamarca).

Se hizo un seguimiento de parámetros fisicoquímicos como la temperatura, el pH, y el amonio, manteniéndolos dentro de los rangos descritos para esta especie (Axelrod y Wischnath. 1991)

Una totalidad de 24 hembras fueron distribuidas de forma aleatoria en cuatro acuarios, con diferentes tiempos de exposición a la hormona: 28 días (G1), 42 días (G2), y 55 días (3). Un último grupo correspondió al control, el cual fue alimentado con truchina (sin hormona), por tener el mismo contenido proteínico que el experimental (38%).

El alimento experimental denominado Tilapia Reversa, Reversarina para efecto de denominación durante el artículo, contaba con un contenido de 60 mg de 17 $\alpha$  metil testosterona por Kg de alimento. La cantidad suministrada a cada uno de los acuarios correspondía a un 6% del total del peso corporal registrado

en cada uno de los acuarios. La ración era dividida en dos porciones por día.

Los parámetros morfológicos que se tuvieron en cuenta durante el estudio fueron: Peso (g), Longitud Estándar (LE) y Longitud Total (LT) en cm (sin espada) y la presencia o ausencia de la espada y el gonopodio. Estos parámetros fueron tomados semanalmente mediante la utilización de una balanza analítica, para el peso, y un calibrador para el tamaño, adicionalmente, se obtuvo un registro fotográfico con una cámara digital SONY DSC-P72 de 3.2 Mega píxeles.

Con la finalización del periodo experimental de cada uno de los grupos, la mitad de los peces eran sacrificados con el fin de extraerles las gónadas y comparar su estado histológico con el morfológico. El sacrificio comprendió la anestesia con 0.05 g/l (Guayara *et al.* 2006) de MS-222 (Metanosulfonato de triclaína) (Viveiros *et al.* 2001) procedimiento aplicado con el fin de disminuir el estrés y posibles traumas por la manipulación (Tamaru *et al.* 2001) y la posterior decapitación de los individuos. Seguidamente se extrajeron las gónadas para deshidratarlas e incluirlas en parafina. Se obtuvieron cortes de 7  $\mu\text{m}$ , que fueron sometidos a tinción con eosina y hematoxilina (Prophet *et al.* 1992) Para establecer el estado de reversión de las gónadas se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Ausencia/presencia de oocitos primarios
- Ausencia/presencia de oocitos atréticos
- Ausencia/presencia de oocitos vitelogénicos
- Ausencia/presencia de espermatogonias
- Ausencia/presencia de espermatocitos
- Ausencia/presencia de espermatozoides

La histología gonadal de cada individuo fue analizada microscópicamente y registrada con una cámara digital SONY DSC-P72 de 3.2 Mega píxeles. A continuación se realizó una comparación cualitativa entre los estados histológico-gonadal y morfológico de cada uno de los individuos.

## RESULTADOS

La aparición de los caracteres secundarios masculinos empezó a ser evidente en la semana número tres del tratamiento, en la que ya era posible diferenciar una variación en el color en el lóbulo inferior de la aleta caudal. Hacia la sexta semana, 14 de los 18 individuos expuestos al tratamiento podían ser catalogados como machos en su fenotipo sexual. El 100% de la reversión morfológica se obtuvo en la semana 8. La forma dispareja en la que individuos del mismo tratamiento adquirieron su apariencia masculina se atribuyó a que, probablemente, factores como el agua, la temperatura y la alta manipulación de los animales pudieron influir de manera directa en los resultados de este tipo de ensayos (Takahashi, 1975; Ankley y Johnson, 2004).

La masculinización morfológica fue también evidente en un individuo del grupo control, a diferencia de los resultados de Yanong *et al.* (2006), quienes no reportaron masculinizaciones para este grupo. La hembra de mayor tamaño del grupo control, se reversó de manera espontánea, las características morfológicas secundarias masculinas, como la espada, empezaron a ser evidentes en la tercera semana de tratamiento y en la finalización del estudio su aleta caudal presentaba una prolongación



Figura 1. Individuo reversado espontáneamente en el grupo control en la semana 8 del experimento. LT. 8.2 cm.

mayor a la de los individuos sometidos al tratamiento hormonal. (Fig. 1).

El tamaño y peso de los individuos G1, G2 y G3, no fueron diferentes a los del grupo control, es decir, que los machos obtenidos experimentalmente igualaban en tamaño a una hembra y por supuesto, superaban a los individuos de su mismo género en estado natural, esto indica que la hormona no interviene en el proceso de crecimiento (Yanong *et al.* 2006)

La histología gonadal del G1 y el G2 correspondía a la de las hembras no sometidas a la hormona, incluso fue posible establecer la presencia de embriones en avanzado estado de desarrollo (Fig. 2)

Durante la revisión histológica no fue observada ninguna gónada bisexual, como lo observado por Bhandari *et al.* (2004), y solo fue posible obtener un individuo reversado morfológica y gonadalmente, pero sin gonopodio evidente.

La reversión completa a nivel gonadal observada en el G3 (Fig 3), puede ser comparada con aquella que se lleva a cabo en peces





Figura 2. Situación histológica gonadal de hembra del G2. 650XV.

hermafroditas que no presentan ningún tipo de células sexuales masculinas en sus gónadas antes de que se lleve a cabo la reversión sexual, esta situación permite que el ovario modifique su histo-arquitectura y de origen a un testículo plenamente desarrollado (Morrey *et al.* 2002).

## DISCUSIÓN

Para las especies de *Xiphophorus* y *Poecilia* Gratzek y Matthews (1992), reportaron que las hembras adultas son capaces de adquirir gran cantidad de caracteres secundarios masculinos, dentro de los que se destacan la transformación de su terminación anal en gonopodio, sin embargo la funcionalidad de dichos individuos aun no ha sido comprobada. Estos autores justifican dicha reversión en la escasez de elementos ováricos responsables de la producción de las hormonas que inhiban la transformación a tejido testicular.

Este estudio preliminar del efecto de la reversarina sobre la reversión sexual en hembras

adultas de *Xiphophorus helleri*, permitió establecer una reversión morfológica en la totalidad de los individuos, como efecto de la utilización de la MT, acorde con el estudio realizado por Yanong *et al.* (2006), con la misma especie, al finalizar los 55 días de experimento.

El modelo de la ventaja en tamaño, usado para estudiar el mecanismo de reversión sexual en muchos peces hermafroditas (Sakai. *et al.* 2003), fue usado en este estudio como una posible explicación al cambio de sexo espontáneo que se presentó en un solo individuo del GC, dicho cambio incluyó tanto caracteres sexuales secundarios (Fig. 1), como a la histología de la gónada (Fig.4).

En especies gonocoristas, como el espada, la determinación del sexo esta a cargo de la genética, pero al contrario de lo descrito por otros autores, la temperatura y los esteroides exógenos, como en este caso, pueden desencadenar una reestructuración gonadal completa (Viveiros *et al.* 2001), aún en estadios adultos, como lo reflejan los resultados de este experimento.

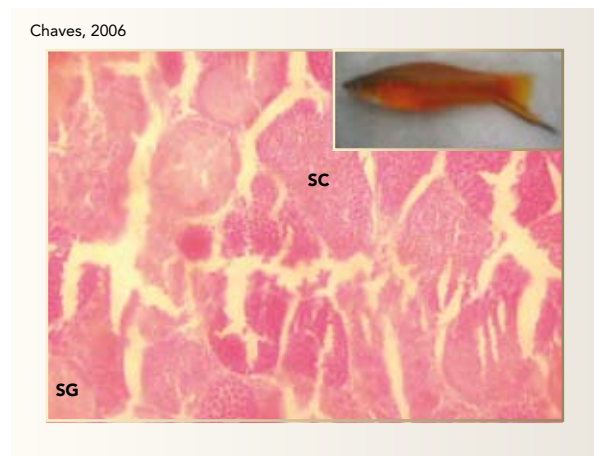


Figura 3. Estado morfológico y gonadal del individuo reversado en el G3. SC. Espermatocitos. SG. Espermatogonias. 650X.

Chaves, 2006

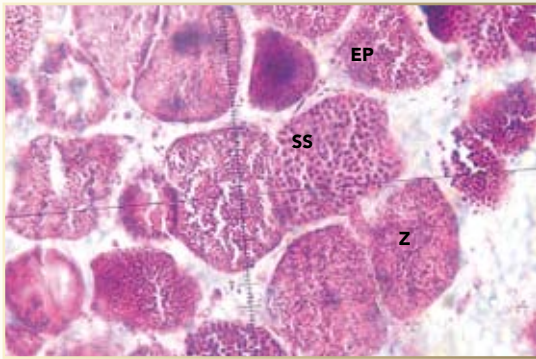


Figura 4. Situación histológica gonadal del único individuo revertido en el GC. SC Espermatocitos. SG Espermatogonias. 810X.

Con respecto a la MT, ha sido posible obtener los resultados esperados en cuanto a la masculinización de las poblaciones, en diferentes experimentos realizados. Viveiros *et al.* (2001) trabajó con hembras que, bajo tratamiento con MT, exhibieron las características histológicas gonadales típicas de los machos de *Clarias gariepinus*, incluso, fue posible determinar que el tratamiento con MT no afectó la masa testicular, el índice gonadosomático, la cantidad ni la calidad del semen en el testículo, ni la fertilidad de los espermatozoides.

El tamaño, como parámetro más importante para que se de la reversión sexual en una hembra (Morrey *et al.* 2002), pudo influir en el resultado observado en el grupo control. Cabe anotar, que este fenómeno de cambio de sexo condicionado por el tamaño, ha sido ampliamente analizado en especies hermafroditas como *Centropyge ferrugata* (Sakai *et al.* 2003), y muchas otras especies de la familia Pseudochromidae (Bandhari *et al.* 2004). Pero autores como Bandhari *et al.* (2004) afirman que el cambio de sexo no se

da en especies gonocoristas cuando la diferenciación gonadal ha tomado lugar.

Los resultados obtenidos a nivel gonadal no dejaron ver muestras de gónadas bisexuales, estado transitorio antes de alcanzar la reversión sexual completa (Bandhari *et al.* 2004). Por el contrario, el tratamiento permitió obtener individuos completamente machos o completamente hembras.

Por otra parte, el estado de preñez observado en las hembras (día 42) alimentadas con MT sugiere que la hormona utilizada en el experimento no está interfiriendo en la secreción de las sustancias endocrinas que se requieren para la producción y maduración de los embriones (Tyagi y Shukla, 2002) y que por el contrario favorece la acción masculinizadora de la MT debido a que, como se mencionó anteriormente, el periodo de reproducción es uno de los dos más susceptibles a manipulación con estrógenos (Ankley y Johnson. 2004).

Salvo el caso reportado para *Carassius auratus*, en donde la 11-Ketosterona posibilita la obtención de tejido sexual masculino en hembras adultas (Baroiller *et al.* 1999), se ha aseverado, que la arquitectura de las gónadas en especies gonocoristas solo puede ser manipulada, mediante la administración de estrógenos externos, durante el periodo de diferenciación sexual (Baroiller *et al.* 1999; Bhandari *et al.* 2004; Lee *et al.* 2004), adicional a esto, la falta de información sobre los efectos de los tratamientos químicos sobre la diferenciación de las gónadas (Baroiller *et al.* 1999) nos impide dar conclusiones certeras acerca de los datos arrojados por el estudio, por esta razón los resultados obtenidos han sido directamente comparados con los reportados para especies hermafroditas.



La no reversión de las gónadas, en la totalidad de los individuos, pudo deberse a que el tiempo de exposición a la hormona no fue el suficiente o que las condiciones de manipulación, así como también, el estado fisiológico del agua influyeron directamente en los efectos de la hormona.

Por estas razones se sugiere que futuros estudios se focalicen en hembras adultas, que sean vírgenes y que se manejen condiciones que permitan realizar un seguimiento fisiológico de la reestructuración gonadal durante la reversión sexual.

El presente estudio deja abierta la posibilidad de obtener machos del tamaño de las hembras (con mayor valor comercial), no solo con el fenotipo sexual correspondiente, sino con un re organización a nivel gonadal completa, esto gracias a la intervención hormonal en estados de madurez sexual.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias, de la Universidad Militar Nueva Granada por ser el apoyo para la realización de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Alderton D. 2004. Livebearers; Understanding Guppies, Mollies, Swordtails, and others. Bowtle Press. California
- 2- Ankley G.T. Johnson R.D. 2004. Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-disrupting Chemicals. *ILAR Journal* 45; 4. 469-483. [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarjournal/45\\_4/pdfs/v4504ankley.pdf](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/45_4/pdfs/v4504ankley.pdf). Minnesota.
- 3- Axelrod HR, Wischath L. 1991. Swordtails and Platies. TFH Publications.
- 4- Baatrup E. Junge M. 2001. Antiandrogens Disrupt Sexual Characteristics in adult Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Environmental Health Perspectives*. 109:1063-1070.
- 5- Baroiller J.F. Guiguen Y. Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55:910 – 931.
- 6- Bhandari RK, Komuro H, Nakamura S, Higa M, Nakamura M. 2004. Sex Inversion of Sexually Immature Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*) by Aromatase Inhibitor. *Zoological Science*. 21:305-310.
- 7- Bhandari RK, Komuro H, Nakamura S, Higa M, Nakamura M. 2003. Gonadal Restructuring and Correlative Steroid Hormone Profiles during Natural Sex Change in Protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*). *Zoological Science*. 20:1399-1404.
- 8- Essenberg J.M. 1926. Complete Sex Reversal in viviparous teleost *Xiphophorus helleri*. University of Oklahoma.
- 9- Gratzek J. Matthews J. 1992. *Aquarology: The Science of Fish Health Management*. Tetra Press. USA.
- 10- Guayara, L., Chaparro, N., Cruz, L., Gómez, E., Rodríguez, D., Hurtado, H. 2006. Relación del tamaño del cuerpo, cerebro y lóbulos olfatorios, ópticos,

- vagales y telencéfalo en Goldfish (*Carassius auratus*). La acuicultura para el tercer milenio: Tendencias y desafíos. Memorias III Congreso colombiano de acuicultura. Santa Marta Colombia. Página 71.
- 11- Haniffa M.A. Sridhar S. Nagarajan M. 2004. Hormonal Manipulation of Sex in Stinging Catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Current Science*. 86:1012 – 1017.
- 12- Kristensen T. Baatrup E. Bayley M. 2005. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol Reduces the Competitive Reproductive Fitness of the Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Biology of Reproduction*. 75:150-156.
- 13- Landines M.A. Sanabria A.I. Daza P.V. 2007. Producción de Peces Ornamentales en Colombia. Promedios. Colombia.
- 14- Lee Y- H. Wu G-C. Du J- L. Chang C-F. 2004. Estradiol 17 $\alpha$  Induced a Reversible Sex Change in the Fingerlings of Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker: The Possible Roles of Luteinizing Hormone in Sex Change. *Biology of Reproduction* 71:1270-1278.
- 15- Morrey C. Nagahama Y. Grau E. G. 2002. Terminal Phase Males Stimulate Ovarian Function and Inhibit Sex Change in the Protogynous Wrasse *Thalassoma duperrey*. *Zoological Science*. 19:103 – 109.
- 16- Oliveira R. Hirschenhauser K. Carneiro L. Canário A.V.M. 2002. Social modulation of androgens levels in male teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 132: 203-215.
- 17- Prophet, A., Arrington, J., Subin, L. 1992. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Registro de Patología de los Estados Unidos de America (ARP). Washington D.C.
- 18- Rodger E. Drane S. Grober M.S. 2005. Sex Reversal in Pairs of *Lythrypnus dallyi*: Behavioral and Morphological Changes. *Biological Bulletin*. 208:120-126.
- 19- Sakai Y. Karino K. Kuwamura T. Nakashima Y. Maruo Y. 2003. Sexually Dichromatic Protogynous Angelfish *Centropyge ferrugata* (Pomacanthidae) Males Can Change Back to Females. *Zoological Science*. 20:627-663.
- 20- Schreck CB, Moyle PB. 1990. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society Bethesda. USA.
- 21- Stickney R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. Jhon Willey and Sons. Inc. Estados Unidos.
- 22- Takahashi H. 1975. Process of Functional Sex Reversal of the gonad on the Female Guppy, *Poecilia reticulata*, treated with Androgens Before Birth. *Development Growth and Differentiation* 17:167–175.
- 23- Tamaru C. Brown C. 2001. *A Manual for Commercial Production of the Swordtail *Xiphophorus helleri**. <http://www.soest.hawaii.edu/SEAGRANT>
- 24- Tyagi R, Shukla AN. 2002. *Anatomy of Fishes*. Anmol Publications PVT. LTD. India.
- 25- Viveiros A. Eding E. Komen J. 2001. Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on seminal vesicle development and semen release response in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Reproduction*. 122: 17-827.
- 26- Yanong R. Hill J. Daniels C. Watson C. 2006. Efficacy of 17 $\alpha$  methyl testosterone for Expression of Male Secondary Characteristics in the Green Swordtail. *North American Journal of Aquaculture*. University of Florida.