

## Ensayos de masculinización de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* suministrando *Tribulus terrestris* en el alimento

### Masculinization assays of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* feeding with *Tribulus terrestris*

### Ensaio de masculinização da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* alimentação com *Tribulus terrestris*

Juan D. Manrique-Orozco<sup>1</sup>; Samir J. Calvo-Cardona<sup>2</sup>; Liliana M. Cardona-Bermúdez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zoot, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Oriente

<sup>2</sup> Zoot, PhD, Grupo de Investigación en Agronomía y Zootecnia -GIAZ

<sup>3</sup> Zoot, MSc, Grupo de Investigación en Innovación y Agroindustria-GIIA, , Tecnoparque

Sena Nudo Rionegro, Centro de la Innovación, la Agroindustria y la Aviación

Email: manriquewe@hotmail.com

**Recibido:** octubre 18 de 2016

**Aceptado:** noviembre 28 de 2018

#### Resumen

*Tribulus terrestris* (TT) es una planta herbácea que induce la producción de testosterona una vez es ingerida. Con el fin de determinar el porcentaje de neomachos de trucha arcoíris, obtenidos a partir de la utilización de *Tribulus terrestris* en el alimento; se trabajó con 1.200 larvas 100% hembras adquiridas comercialmente, que se repartieron equitativamente en 12 tanques de concreto. Se suministró alimento balanceado comercial (50% de PB) desde el día 15 poseclosión y durante 96 días con los siguientes tratamientos: 3.000 mg de TT/kg de alimento (tratamiento A), 5.000 mg TT/kg de alimento (tratamiento B), control positivo 3 mg de MT/kg de alimento (tratamiento C) y control negativo con etanol (tratamiento D). Se determinaron parámetros productivos y diferenciación gonadal mediante la técnica de squash. Se midieron parámetros fisicoquímicos del agua. Con cada tratamiento A y B se obtuvo un porcentaje de machos de 2,67% ( $P > 0,05$ ) y hubo presencia de intersexos pero sin significancia estadística. Las ganancias diarias de peso fueron 0,128, 0,132, 0,109 y 0,088 g/d para los tratamientos A, B, C y D respectivamente. Las ganancias de talla se encontraron entre 0,063 cm (D) y 0,077 cm (B); ambas variables tuvieron diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ). La sobrevivencia, el factor de conversión alimenticia y la incidencia de costos no estuvieron afectados significativamente por los tratamientos. Se concluyó que *Tribulus terrestris* mezclado con alimento balanceado en dosis de 3.000 mg/kg y de 5.000 mg/kg no induce la masculinización de la trucha arcoíris; sin embargo, no incide negativamente en la sobrevivencia de la misma, ejerce un efecto anabólico significativo, reflejado en ganancias de peso y talla y no resulta costoso utilizarlo comparado con el método convencional de la hormona 17 $\alpha$ -metil testosterona. No se recomienda su uso para este fin por la ineficiencia. Este estudio es el primer reporte en Colombia al respecto de este tema.

**Palabras clave:** hormona; inversión sexual; neomachos; protodioscina.

#### Abstract

*Tribulus terrestris* (TT) is herbaceous plant that induces testosterone production once ingested. In order to determine the percentage of rainbow trout neomales, obtained from feeding with *Tribulus terrestris*; 1,200 larvae commercially acquired

100% females, was distributed in 12 concrete tanks and fed commercial balanced food (50% CP) from day 15 poseclosión for 96 days with the following treatments: 3.000 mg TT / kg feed (treatment A), 5,000 mg TT / kg feed (treatment B) control MT positive 3mg / kg feed (treatment C) and negative control with ethanol (treatment D). Productive parameters and gonadal differentiation were determined by squash technique. In water, physico-chemical parameters were measured. With each treatment A and B a percentage of males 2.67% ( $P < 0.05$ ) was obtained and there was the presence of intersex but without statistical significance. The daily weight gains were 0.128, 0.132, 0.109 and 0.088 g/d for treatments A, B, C and D respectively. Size gains found from 0.063 cm (D) until 0.077 cm (B); both variables had statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Survival, feed conversion factor and the incidence of costs were not significantly affected by the treatments. In conclusion, *Tribulus terrestris* mixed with meal doses of 3,000 mg / kg and 5,000 mg / kg does not induce masculinization of rainbow trout; however, no negative impact on the survival of it, has a significant anabolic effect, reflected in gains weight and height and is not expensive to use compared to the conventional method of hormone 17 $\alpha$ -methyl testosterone. Its use for this purpose is not recommended for inefficiency. It is the first study reported in Colombia in this regard.

**Key words:** hormone; sexual inversión; neomales; protodioscin.

## Resumo

*Tribulus terrestris* (TT) é uma planta herbácea que induz a produção de testosterona, uma vez ingerida. Com a fim de determinar a percentagem de neomales de truta arco-íris, obtidos a partir de a utilização de *Tribulus terrestris* no alimento; realizado com 1.200 larvas comercialmente adquiridas 100% do sexo feminino, que foram uniformemente distribuídos em 12 tanques de concreto. Uma dieta comercial foi fornecida (50% PB) a partir do dia 15 poseclosión e durante 96 dias com os seguintes tratamentos: 3.000 mg TT / kg de ração (tratamento A), 5,000 mg TT / kg de ração (B tratamento) controle MT positiva 3mg / kg de ração (tratamento C) e controle negativo com etanol (tratamento D). Os parâmetros de produção e diferenciação gonadal foram determinados pela técnica de polpa. Parâmetros físico-químicos da água foram medidos. Com cada tratamento A e B, se chegou o um percentagem de machos 2,67% ( $P < 0,05$ ) e houve a presença de intersexo mas sem significância estatística. Os pesos alcançados diário foram 0,128, 0,132, 0,109 e 0,088 g/d para os tratamentos A, B, C e D, respectivamente. Os tamanhos obtidos encontrados a partir de 0,063 cm (D) e 0,077 cm (b); ambas variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). A sobrevivência, o fator de conversão do alimentação e a incidência de custos não foram significativamente afetados pelos tratamentos. Em conclusão a *Tribulus terrestris* misturado com doses concentradas de 3,000 mg / kg e 5000 mg / kg não induzem masculinização de truta arco-íris; mas, não tem nenhum impacto negativo sobre a sobrevivência da mesma, tem um efeito anabólico significativo, mostrando-se em peso e lucro de altura e não é custoso para utilizar em comparação com o método convencional de hormônio 17 $\alpha$ -metil testosterona. A sua utilização para esse fim não é recomendado pela ineficiência. É o primeiro estudo relatado na Colômbia no este respeito.

**Palavras chave:** hormonal; inversão sexual; neomales; protodioscina.

## Introducción

La producción de trucha arcoíris en Colombia, representa actualmente un importante renglón de la actividad piscícola. La semilla utilizada depende en un 95% de la importación de ovas embrionadas monosexo de países como Estados Unidos y en algunos casos Dinamarca y Noruega; lo que aumenta el riesgo de introducción de enfermedades exóticas al país y eleva los costos de producción (Betancur López *et al.*, 2010). Adicionalmente, existen reportes donde se evidencia que el desempeño productivo de esta semilla no es superior a la nacional (Vanegas y Villareal, 2001). Lo anterior, sugiere la necesidad de producir semilla a nivel local para abastecer la demanda.

La hormona de origen sintético 17  $\alpha$ -metiltestosterona (MT), ha sido ampliamente utilizada para lograr la inversión sexual, con el fin de obtener neomachos como pie de cría para producir poblaciones 100% hembras. Es un producto de venta controlada y de difícil adquisición para los pequeños productores. Llega

a cuerpos de agua vía alimento no consumido, heces y orina; demandando largos periodos de tiempo para ser degradada acumulándose en sedimentos y es un potencial contaminante que puede causar inversiones indeseadas en poblaciones silvestres (Contreras-Sánchez *et al.*, 2007); se pueden masculinizar peces hembras en ríos contaminados (Falone, 2007) y ocasionar otro tipo de alteraciones en organismos acuáticos como el cangrejo de río (*Procambarus alleni*), donde se ha evidenciado menores porcentajes de eclosión, prolongación del desarrollo embrionario, malformaciones y reducción del crecimiento en juveniles cuando se exponen a concentraciones de 100  $\mu\text{g/L}$  de MT (Vogt, 2007).

La trucha arcoíris producida en el país, se ha posicionado en mercados internacionales como Estados Unidos y Alemania, lo que indica producción más limpia, que involucre el uso de herramientas tecnológicas que ayuden a la preservación de los recursos naturales, a la salud humana, de fácil adquisición y bajo costo. Surge

entonces, una alternativa que podría reemplazar al andrógeno sintético para la masculinización.

La planta *Tribulus terrestris* (TT), es de origen europeo y habita en diversos tipos de suelos en regiones tropicales incluida Colombia; posee cantidades elevadas de protodioscina, precursor de la dehidroepiandrosterona, involucrado en la síntesis de testosterona (Ramírez *et al.*, 2002). Omitoyin *et al.*, (2013), reportaron que los extractos de TT tuvieron efectos positivos en la inversión del sexo (85.7%), la tasa de sobrevivencia (80 a 89.3%) y el crecimiento de peces (0.73 a 0,92 g) como *Oreochromis niloticus*. El objetivo del trabajo fue determinar el porcentaje de neomachos de trucha arcoíris *O. mykiss* obtenidos a partir de la utilización de *Tribulus terrestris* en el alimento.

## **Materiales y métodos**

### **Ubicación**

La investigación se llevó a cabo en la finca Dacha, ubicada en la vereda Llanogrande, Rionegro-Antioquia (latitud 6°07'00.82" N y longitud 75°26'48.41" O), a una altura 2130 m.s.n.m., y con una temperatura ambiente promedio de 17°C, humedad relativa promedio de 79%, clasificada según Holdridge en zona de vida bosque húmedo montano bajo (bh-MB). La finca es abastecida por aguas de la quebrada Piedras Blancas con temperatura promedio de 18°C.

### **Material biológico**

Se trabajó con 1200 larvas con apariencia fenotípica sana (coloración típica de la especie, tamaño del cuerpo, posición lineal al nadar); provenientes de la granja Lagos y Peces ubicada en el Carmen de Viboral (Antioquia). Los animales fueron obtenidos de un lote de ovas embrionadas 100% hembras importadas de Estados Unidos. Las larvas de 14 días post-eclosión fueron trasladadas al sitio experimental en bolsas plásticas con oxígeno, donde se hizo un proceso de aclimatación durante 1 h 40 min. Los peces fueron distribuidos en 12 estanques experimentales en grupos de 100 ejemplares cada uno. Previamente, los animales fueron medidos con un ictiómetro y pesados en una balanza de precisión marca Adam modelo PGW 253M.

Los procedimientos empleados para la manipulación de los animales, fueron realizados utilizando como referencia las normas y procedimientos para el uso de animales en laboratorio, señaladas por Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources (1985). La metodología experimental utilizada con animales

fue avalada por el Comité de Ética y Bioética de la Universidad Católica de Oriente (2015).

### **Tanques experimentales**

El experimento se llevó a cabo en 12 tanques de concreto de 1.30 m de largo, 0.2 m de ancho y 0.4 m de alto. Se estimó un caudal de agua total de 40l/min que se distribuyó equitativamente en los 12 tanques, con flujo de agua en promedio de 3.3 l/min. Se utilizó un compresor MedicAir conectado a un sistema de distribución de mangueras y piedras difusoras para garantizar aireación en los tanques experimentales; la presión fue de 175 psi. Se utilizó polisombra para cubrir los tanques y evitar la luz directa sobre las larvas.

### **Calidad de agua**

Previo al inicio del experimento se realizó análisis del agua en el Laboratorio Censa de la Corporación Autónoma Regional de los Ríos Negro y Nare (CORNARE), para determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Durante el transcurso de la fase experimental, se midió diariamente la concentración de oxígeno disuelto (OD), el porcentaje de saturación (% de Sat) y la temperatura del agua, se utilizó un equipo digital modelo Oxi 3205 SET 3.

### **Preparación de las dietas**

El extracto de TT con un contenido de 95% saponinas y 80% de protodioscina, se adquirió en el laboratorio de suplementos naturales Sorvita (EEUU); la MT fue suministrada por el Laboratorio de Larvicultura de Peces y Alimento vivo (Larpeali) de la Universidad de Antioquia.

Durante los dos primeros meses, se suministró alimento balanceado comercial (50%PB), para lograr tamaño de partícula adecuado, aproximadamente, de 0.425 mm y 0.710 mm el alimento fue molido y tamizado. A partir del día 60 del ensayo se suministró pellets extruídos de 2 mm de diámetro.

Los tratamientos evaluados fueron: 3000 mg de TT/Kg de alimento (tratamiento A), 5000 mg TT/Kg de alimento (tratamiento B), control positivo 3 mg de MT/Kg de alimento (tratamiento C) y control negativo con etanol (tratamiento D). Cada uno con tres replicas. Cada dosis de los diferentes compuestos fue disuelta en etanol absoluto del 98% de pureza en frascos ámbar; posteriormente, fueron mezclados de manera homogénea con el alimento balanceado; una vez evaporado el etanol a temperatura ambiente, se procedió a almacenarlo a 17°C. Los peces fueron alimentados

*ad libitum* con frecuencia de 8 veces/día. Los tratamientos fueron suministrados desde el día 15 post-eclosión durante 96 días.

### Evaluación de parámetros productivos

Se realizaron 6 muestreos a 25 individuos por réplica los días 0, 19, 38, 57, 76, 95 para determinar el peso mediante una balanza digital de precisión (modelo Adam equipment N° 17250) y la longitud total por medio de un ictiómetro. Diariamente, se registró la mortalidad y alimento consumido.

La tasa de sobrevivencia se determinó con la ecuación de Pineda (1999), expresada así:

$$Ts = \left( \frac{\text{Número final de organismos}}{\text{Número inicial de organismos}} \right) \times 100$$

Para el cálculo de la tasa de crecimiento por día se utilizó la fórmula reportada por Pepe-Victoriano (2012), así:

$$Pg = (Wf - Wi)/t$$

Donde

Pg= Peso ganado por día,

Wi= Peso inicial,

Wf= Peso final,

t= Tiempo (días).

Para el cálculo del factor de conversión alimenticia se empleó la ecuación utilizada por Burgos *et al.*, (2006) así:

$$FCA = \frac{\text{Cantidad de alimento suministrado}}{\text{Incremento en peso de la población}}$$

La incidencia de costos se calculó con la fórmula de Poot-Delgado *et al.*, (2009) así:

$$IC = FCA \times \text{Costo por kg de alimento}$$

IC= Incidencia de costos y

FCA= Factor de conversión de alimento

### Determinación del sexo gonadal

Se utilizó la técnica del squash para determinar el sexo gonadal a los 117 días post-eclosión. Para la extracción de las gónadas, se anestesiaron los animales con 2 fenoxietanol (400 ppm), luego se realizó un corte ventral por la línea longitudinal media; se retiraron las vísceras y se procedió a identificar dos hilos tensos transparentes ubicados sobre la vejiga de gas. Las gónadas se retiraron de la cavidad celómica debridándolas de la

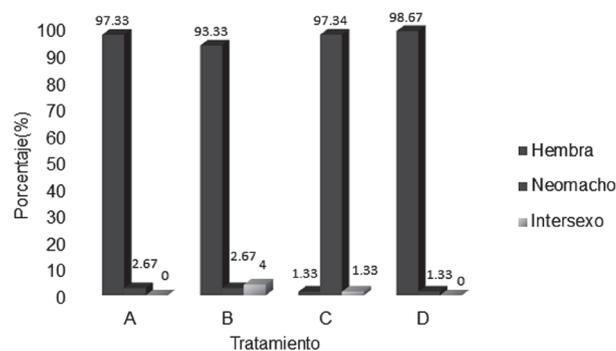
columna vertebral. Se colectaron las gónadas de 25 peces de cada réplica, se colocaron en láminas portaobjetos, se tiñeron con azul de metileno al 3% y se fijaron con el cubreobjetos. Se observaron las placas en microscopio (10x), con el objetivo de hacer un barrido por toda la placa para descartar presencia de ovocitos.

### Análisis estadístico

Se empleó el diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado efecto fijo balanceado. Se realizó análisis descriptivo exploratorio de tipo unidimensional para promedio y desviación típica para cada una de las variables: porcentaje de machos, porcentaje de hembras, porcentaje de intersexos, ganancia de peso, ganancia de talla, factor de conversión alimenticia, incidencia de costos. El análisis fue suplementado con ANOVAS de tipo unidimensional y pruebas de contraste de Tukey con un error tipo I del 5%, realizando previamente la convalidación de los supuestos del análisis de varianza para cada una de las variables. Los análisis estadísticos se hicieron utilizando el programa R Studio versión 3.1.0 de 2016.

### Resultados

En la figura 1 se muestran los porcentajes de hembras, neomachos e intersexos obtenidos con cada tratamiento. Se encontró diferencia significativa para las hembras. El menor porcentaje se reportó para el tratamiento con MT (TC) que corresponde a 1,33%, mientras que el mayor aparece en el control negativo (TD) (98.67%). Con respecto a los neomachos, el esteroide sintético utilizado como control positivo (TC), exhibió el mayor porcentaje (97,34%); las dos dosis utilizadas de TT (TA y TB) produjeron 2,67% de machos fenotípicos. El mayor porcentaje de intersexos se encontró en TB (4%); mientras que en TA y TD no se encontraron. No se presentó diferencia estadística para esta variable.



**Figura 1.** Resultados del squash para cada tratamiento. Las letras diferentes entre columnas muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En la figura 2 se presentan las estructuras gonadales observadas en el microscopio para determinar el sexo de los individuos.

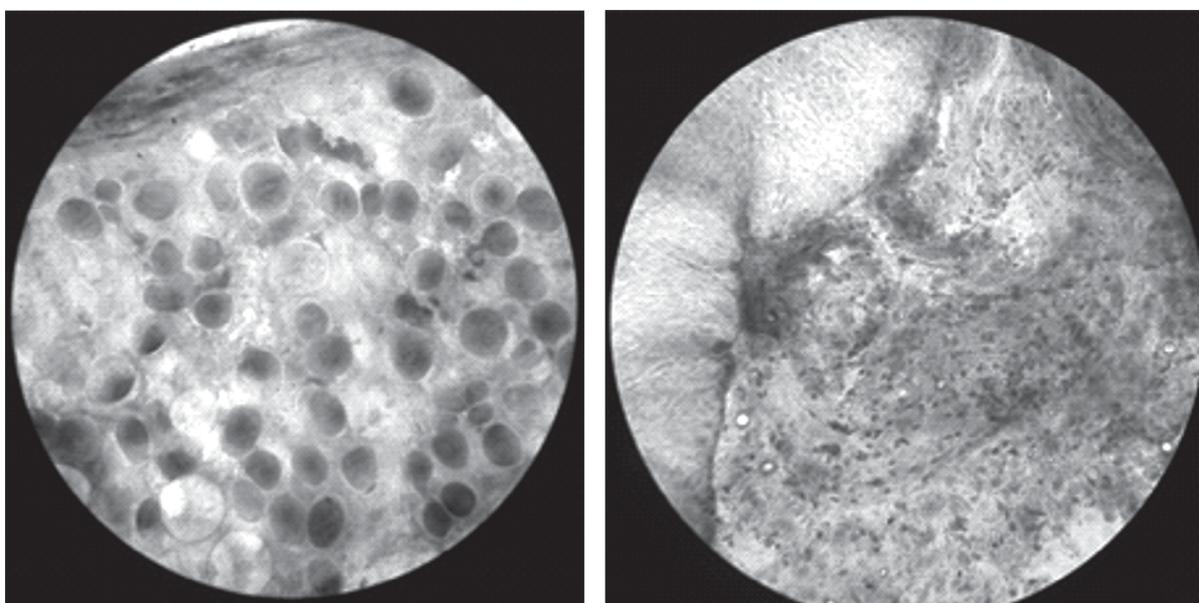
Los pesos iniciales promedio de los animales sometidos a los tratamientos A, B, C y D fueron:  $0.34 \pm 0.93$  g;  $0.37 \pm 1.01$  g;  $0.35 \pm 0.95$  g;  $0.39 \pm 1.05$  g respectivamente. Las tallas iniciales promedio fueron para el tratamiento A de  $2.91 \pm 0.20$  cm, para el B de  $2.87 \pm 0.19$  cm, para el C de  $2.87 \pm 0.23$  cm y para el D de  $2.88 \pm 0.20$  cm. Los pesos finales fueron  $12.67 \pm 3.59$  g para el tratamiento A, para el tratamiento B  $13.07 \pm 4.58$  g;  $10.88 \pm 3.32$  g para el C y para el D  $8.85 \pm 3.36$  g. La talla final menor fue para el tratamiento C ( $8.97 \pm 1.24$  cm), seguido por el tratamiento D ( $8.99 \pm 1.04$  cm), el tratamiento A ( $10.03 \pm 1.2$  cm) y el B ( $10.35 \pm 1.66$  cm).

Con respecto al desempeño productivo, no se encontró diferencia significativa para la variable sobrevivencia (tabla 1); los valores oscilaron entre 60.33% (TD) y 74.33% (TB). La mayor ganancia diaria de peso (0,132 g/d) fue para los animales sometidos a 5000 mg/Kg de *Tribulus terrestris* (TB) y la menor para los individuos del control negativo (TD) (0,088 g/d). El mismo patrón se observó en la ganancia diaria de talla, donde el rango se encontró entre 0,063 cm/d (TD) y 0,077 cm/d (TB). Para ambas variables se encontró diferencia significativa. El menor valor de FCA fue 1.21 (TB) y el mayor 1.42 (TD). La mayor incidencia de costos (\$/lote) fue mayor para TB (19488.6) y la menor la exhibió TD (18047.33). El factor de conversión alimenticia y la incidencia de costos no presentaron diferencia estadística significativa.

**Tabla 1.** Parámetros zootécnicos encontrados en el desarrollo experimental

Tratamiento	Ganancia de peso diaria (g/d)*	Ganancia de talla diaria (cm/d)*	Sobrevivencia (%)*	FCA*	Incidencia de costos (\$)/lote*
A	0,128 <sup>a</sup>	0,073 <sup>a</sup>	71,33 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	18654,33 <sup>a</sup>
B	0,132 <sup>a</sup>	0,077 <sup>a</sup>	74,33 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	19488,6 <sup>a</sup>
C	0,109 <sup>b</sup>	0,072 <sup>b</sup>	65 <sup>a</sup>	1,43 <sup>a</sup>	18238,48 <sup>a</sup>
D	0,088 <sup>b</sup>	0,063 <sup>b</sup>	60,33 <sup>a</sup>	1,42 <sup>a</sup>	18047,33 <sup>a</sup>

\*P<0.05



**Figura 2.** Determinación de sexo gonadal mediante microscopía óptica. a. Observación de ovocitos en hembras a 10X. b. Observación de tejido testicular en machos a 10X.

Los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de agua utilizada en el experimento agua antes del inicio de la fase experimental, se reportan en las tablas 2 y 3 respectivamente. En el análisis de compuestos orgánicos se evidenció la presencia del organofosforado clorpirifós en una concentración de 0,580 µg/L. Es un insecticida de amplio espectro utilizado comúnmente en nuestro medio en actividades agrícolas, veterinarias y domésticas. Es un compuesto que puede causar toxicidad en peces (Aranzazu *et al.*, 2012); algunas pruebas ambientales han permitido identificar que las dosis tóxicas de este compuesto en la trucha son de 0.3 µg/L (Morales y Rodríguez, 2004); mientras que otras reportan una CL50 a las 96 horas para la misma especie de 43.5 µg/L (Agrolac Andina, 2017).

Los valores promedio de temperatura y oxígeno de cada tratamiento monitoreados durante la fase experimental, estuvieron alrededor de 18°C, 6,41mg/l y 6,61mg/l respectivamente, se reportan en la tabla 4.

## Discusión

La obtención de poblaciones monosexo en algunas especies se ha convertido en un reto, principalmente cuando se quieren probar compuestos que no causen daño al hombre y a la naturaleza. Se evaluó la efectividad del TT suministrado en el alimento para obtener neomachos de trucha arcoíris. Bajo las condiciones específicas en las que se llevó a cabo el experimento

respecto a calidad de agua, genética de la semilla utilizada, dosis de TT empleadas y vehículo para suministrarlo; los resultados no fueron los esperados en cuanto a masculinización; el uso de la hormona sintética usada como control positivo, sí resultó en un alto porcentaje de neomachos (97.34%). Se ha notado una reversión sexual del 100% cuando se utiliza MT en concentraciones de 3 mg/Kg de alimento durante un periodo de 60 días y porcentajes del 80% cuando las dosis oscilan entre 0.5 y 1 mg/Kg de alimento (Mejía-Aristizabal y Román-Londoño, 2009). Enciso (2008), menciona que la efectividad de este esteroide se debe a la presencia del grupo metilo en el carbono 17, que impide que el compuesto sea metabolizado y degradado rápidamente en el hígado del pez. Podría considerarse entonces, que parte de la baja efectividad del tratamiento para masculinizar puede deberse al metabolismo hepático de la sustancia.

Otros estudios con TT han evidenciado la obtención de un alto número de machos. Yilmaz *et al.*, (2013), reportaron en trucha arcoíris alimentada con TT a razón de 50 y 100 mg/Kg de peso durante 90 días un porcentaje de machos de 55.55% y 63.46% respectivamente. En tilapia nilótica se alcanzó un 85.7% de machos cuando se les suministró TT a razón de 2.5 g/Kg de alimento (Omitoyin *et al.*, 2013). En trabajos donde se realizó la técnica de inmersión con *Tribulus terrestris* en diferentes especies de peces, se encontró una alta proporción de machos. En el caso de *Ci-*

**Tabla 2.** Parámetros fisicoquímicos encontrados en el cuerpo de agua antes del inicio del experimento.

Parámetro	Concentración
pH Unidades de pH	6.47
Turbiedad (U.N.T)	0.26
Conductividad (µS/cm)	23.5
Alcalinidad Total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	10.82
Dureza total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	8.65
Nitrógeno amoniacal (mg/L NH <sub>3</sub> -N)	<0.40
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	<15.0

**Tabla 3.** Parámetros microbiológicos del agua realizados al inicio del experimento.

Parámetro	Concentración
Hongos filamentosos U.F.C/100 ml*	450
Hongos levaduriformes U.F.C/100 ml*	550

\*Filtración por membrana: agar-glucosa 4% según Saboreaud: 20 ± 0.5 °C; 8 días

**Tabla 4.** Parámetros fisicoquímicos del agua determinados durante el experimento

Tratamiento	Mes	Temperatura (°C)	Oxígeno disuelto (mg/L)
A	junio	18.7±0.21	6.5±0.40
	julio	18.8±0.43	6.54±0.20
	agosto	18.76±0.46	6.47±0.21
B	junio	18.83±0.37	6.56±0.20
	julio	18.79 ±0.41	6.51±0.22
	agosto	18.89±0.38	6.46±0.23
C	junio	18.82±0.41	6.46±0.22
	julio	18.80±0.42	6.45±0.22
	agosto	18.89 ±0.35	6.41±0.22
D	junio	18.73±0.38	6.61±0.19
	julio	18.78 ± 0.47	6.60±0.21
	agosto	18.85± 0.42	6.59±0.23

*chlasoma nigrofasciatum* sometidos a dosis de 9 g de TT/30 L, se alcanzó un 80.42% de machos (Turan y Cek, 2007); en *Poecilia latipinna* se obtuvo un 97% de masculinización con inmersiones en 50 ppm de TT/L (Kavitha y Subramanian, 2011); en *Poecilia reticulata* en dosis de 0.15 g/L hallaron una proporción de sexos macho:hembra de 72:18, lo que corresponde a un 80% de machos (Cek et al., 2007b) y en *Cichlosoma nigrofasciatum* sometido a 0.30 g/L de TT encontraron un porcentaje de machos de 87.23 (Cek et al., 2007a).

Es bien conocido que existen mecanismos endógenos en el animal, que están involucrados en la formación de líneas germinales macho o hembra con organización somática de las gónadas en los procesos de diferenciación sexual. También, es posible que factores externos al animal intervengan en estos procesos, entre ellos la temperatura del agua, compuestos hormonales o no hormonales (extraídos o sintetizados químicamente) o los denominados xenobióticos (Devlin y Nagahama, 2002).

La presencia de organismos intersexo puede deberse posiblemente a que las dosis de TT o de MT consumidas por algunos animales no fue suficiente para que se diera el proceso completo de inversión del sexo. Se ha demostrado que la temperatura del agua (18°C) juega un papel importante en la masculinización de trucha arcoíris y en el caso de la intersexualidad promueve la aparición de un fenotipo masculinizado más completo (Valdivia et al., 2014); aunque este hecho no se evi-

denció en el presente trabajo. El 1.33% de neomachos presentes en el control, que corresponden a un pez, posiblemente pudo haber saltado de otro tanque al momento de alimentar cuando se retiraba la malla que lo cubría.

Los resultados obtenidos en cuanto a masculinización, pueden ser atribuidos a diferentes posibles causas: el método de administración de la sustancia activa en el alimento ya que la efectividad está asociada al consumo del mismo y este a su vez depende de palatabilidad, porcentaje proteína, frecuencia de alimentación, existencia de jerarquías sociales, temperatura y turbidez del agua; según lo reportado por López et al., (2007); aunque en otras especies ha arrojado buenos resultados; la obtención del extracto para mezclar con el alimento balanceado y/o su capacidad para adherirse al mismo y permanecer cuando está en el cuerpo de agua. En este estudio la mezcla del TT se llevó a cabo utilizando etanol absoluto, pero generalmente, se utilizan extractos acuosos de la sustancia. De otro lado, se desconoce el efecto que pueda tener sobre el tratamiento con TT el sulfato de cobre. Esta sustancia fue utilizada cuando se incrementó la mortalidad de los animales y es posible que tenga alguna interacción. Dicha mortalidad ocurrió durante la fase inicial del experimento posiblemente causada por un patógeno de origen microbiano o viral que no fue identificado. La diferencia de casi dos grados centígrados en la temperatura del agua durante el día y la noche (resultados no

mostrados); posiblemente causó que los peces sufrieran de estrés por ser organismos poiquiloterms lo que los hizo más propensos a padecer de enfermedades.

La presencia de clorpirifós en el agua, hipotéticamente pudo alterar los resultados al afectar la diferenciación gonadal, causando bajo efecto de los tratamientos. Este insecticida organofosforado es capaz de ser absorbido, metabolizado y eliminado por los peces; es un disruptor endocrino que puede afectar el desarrollo sexual de numerosas especies (Aranzazu *et al.*, 2012). La expresión de genes como *dmrt1* que están implicados en la diferenciación gonadal y la espermatogénesis en trucha arcoiris, posiblemente pudo afectarse por la presencia de compuestos específicos o por el comportamiento de la temperatura; contribuyendo a la aparición de bajos porcentajes de machos. Adicionalmente, la presencia de clorpirifós en el agua de cultivo pudo afectar el sistema inmunológico de los peces (Díaz-Resendiz y Girón-Pérez, 2014). Estos autores encontraron en tilapia nilótica expuesta a 0.051 mg/l del plaguicida, reducciones significativas en los niveles de inmunoglobulinas, específicamente IgM. En la misma especie, se reportó que la exposición al clorpirifós reduce significativamente el número de células fagocíticas a nivel sanguíneo y su capacidad fagocítica (Girón-Pérez, *et al.*, 2006); esto se pudo relacionar con la mortalidad mencionada anteriormente.

La tendencia en la mortalidad indicó que fue superior en los controles negativos (TD), seguida por el tratamiento con MT (TC) y menor en los animales alimentados con TT; siendo inferior con la mayor dosis (TB). Se ha descrito que algunos compuestos bioactivos como las saponinas que están presentes en el *Tribulus terrestris* tienen actividad antifúngica y antibacteriana (Zhang *et al.*, 2006). Posiblemente, en la presente investigación ocurrió que el extracto de TT que se mezcló con el alimento contribuyó de manera dosis dependiente a que los animales tuvieran menor riesgo sanitario; lo que se reflejó en una menor mortalidad. Gopinath *et al.*, (2012), demostraron que extractos de TT incorporados en nanopartículas de plata exhiben excelente actividad antimicrobiana contra diferentes patógenos aislados que son resistentes a diferentes medicamentos.

En estudios realizados en tilapia nilótica para realizar inversión sexual mediante alimento con TT, la sobrevivencia si tuvo diferencias significativas con respecto a los tratamientos; donde los animales alimentados con la dosis mayor correspondiente a 2.5 g/Kg de alimento sobrevivieron en una tasa del 95.3% (Omitoyin *et al.*, 2013). Para este caso la sobrevivencia no mostró diferencia estadística, coincidiendo con otros estudios donde se trabajó con TT bajo el método de inmersión

de larvas (Çek *et al.*, 2007a); sin embargo, la sobrevivencia fue inferior al 74.3%, mientras que en el trabajo con *Poecilia reticulata* fue de 87% (Cek *et al.*, 2007b).

La ganancia diaria de peso presentó diferencia significativa entre los tratamientos, siendo mayor para los animales alimentados con el TT. Se evidenció entonces que no hay un efecto anabólico ejercido por la hormona masculinizante MT, contrario a lo reportado por Romeiro *et al.*, (2000), pero si es claro en el del extracto natural. Los animales del grupo control ganan menos de 0,1 g/día.

Con respecto a la ganancia de talla diaria se encontró la misma tendencia, dado que el peso y la talla son variables correlacionadas. Evidentemente, los animales alimentados con TT fueron de mayor tamaño. El TT utilizado en el ensayo asegura altos niveles de protodioscina y saponinas. Estos compuestos tienen la capacidad de actuar en el organismo estimulando la secreción de la hormona LH que a su vez induce a la secreción endógena de la testosterona, una vez se da la diferenciación de la gónada que en el caso de la trucha arcoiris ocurre entre los 79 y los 87 días post-fertilización (Marchand *et al.*, 2000). Esta hormona por ser lipídica, es capaz de atravesar las células musculares y estimular la expresión de genes involucrados con la síntesis de proteínas y enzimas requeridas para el metabolismo proteico (Fahey, 1998).

Si bien en este trabajo no se realizó análisis para determinar si había diferencias significativas en los pesos y tallas iniciales y finales; se observa una tendencia en la cual los mayores valores para ambas variables son para la dosis mayor de TT y los menores para el tratamiento con MT. Lo anterior, coincide con un ensayo realizado en *Cichlasoma nigrofasciatum* donde se realizaron inmersiones a diferentes dosis de TT y se encontró que la dosis mayor (9 g/30L) difiere de los demás tratamientos en cuanto a la variable peso, siendo en este caso el mayor reportado (Turan y Cek, 2007). Estos mismos autores encontraron para la variable longitud total que no existe diferencia significativa entre tratamientos. En trucha arcoiris; Yilmaz *et al.*, (2013) encontraron diferencias significativas en cuanto a la longitud total y peso para hembras tratadas con dosis altas y bajas de TT suministradas en el alimento, siendo mayores cuando se suministraron dosis altas.

El factor de conversión alimenticia no presentó diferencia estadística significativa respecto a los tratamientos. Los valores inferiores (TA y TB) que indican que el animal está utilizando menor cantidad de alimento para producir más músculo son coherentes con los mejores resultados obtenidos en las ganancias de peso

y talla, es decir; las truchas a las que se les suministró TT. Para *Oncorhynchus mykiss* en fase de alevinaje y de juveniles se reportan conversiones de 1.3 y 1.4 respectivamente (Arredondo *et al.*, 1996), lo que coincide con los resultados del presente estudio.

Con respecto a la incidencia de costos, no se encontró diferencia estadística significativa entre tratamientos. El menor corresponde al tratamiento control negativo (TD) y el mayor costo a la dosis más alta con *Tribulus terrestris* (TB). Esta no diferencia, es coherente con la no diferencia estadística encontrada en el porcentaje de sobrevivencia, ya que hay que considerar directamente el número de animales producidos por lote. Según lo anterior, se tiene que el valor unitario para producir un juvenil de alrededor de 111 días para el tratamiento de A es de \$87.57 pesos, para el B de \$87.78 pesos, para el C de \$93.53 pesos y para el D de \$100.26 pesos aproximadamente. Si bien se espera que animales a los que no se les suministró ningún compuesto para reversión sea más barato, en este caso la tendencia es que es el más costoso debido a la mortalidad presentada por la probable presencia microorganismos patógenos, que disparó la mortalidad en algunas réplicas experimentales. Mejía-Aristizabal y Román-Londoño, (2009) estimaron el costo de producir un neomacho mediante alimentación con  $17\alpha$ -metil testosterona; el valor aproximado fue de \$329.85 pesos y supera el reportado en este trabajo para el mismo tratamiento y los tratamientos con TT.

Con respecto a la caracterización preliminar del cuerpo de agua se encontró que el potencial de hidrógeno se encuentra en un valor aceptable para la especie. Según Recalde (2014) en los salmónidos, los niveles de pH considerados óptimos son mínimo entre 6,5 y 8,5. Randall y Wright (1989) sugieren que la turbidez no debe superar los 25 U.N.T; para este caso, el valor tan bajo (0.26 U.N.T.) puede dar una idea de los pocos sólidos totales en suspensión, de manera que es baja la probabilidad de que las poslarvas de *O. mykiss* sufran problemas branquiales, lo que se refleja posiblemente en mayores tasas de sobrevivencia y les facilita la identificación del alimento.

En cuanto a la alcalinidad y dureza total, el agua presentó concentraciones menores en comparación con los valores óptimos del cultivo de trucha arcoiris reportados por Barton (1996) y Wedemeyer (1996); donde deben superar los 40 mg/L y los 200 mg/L de  $\text{CaCO}_3$  respectivamente. Sin embargo, no se evidenciaron problemas asociados con la capacidad amortiguadora, que se podría reflejar en variaciones amplias en el pH del agua.

Los resultados obtenidos de nitrógeno amoniacal estuvieron por debajo de 0.4 mg/L. La sensibilidad de la técnica no permitió establecer si era inferior a 0.012 mg/L que es lo recomendado para la especie (Haywood, 1983); no se pudo determinar si este compuesto en algún momento afectó la sobrevivencia de los animales durante su permanencia en el ensayo.

En Colombia el flujo de agua generalmente utilizado para levante de alevines de trucha arcoiris *O. mykiss* es entre 5-70 L/min (Merino, 2005). Para lograr mantener niveles adecuados de oxígeno disuelto y compensar el caudal bajo, se utilizó aireación artificial con el fin de evitar mortalidades; adicionalmente no se evidenciaron cambios significativos de la variable oxígeno disuelto.

A nivel mundial, son pocos los estudios que se han realizado para evaluar la eficiencia de compuestos naturales en la inversión sexual en peces, principalmente con *Tribulus terrestris*. Si bien los resultados en el presente trabajo muestran bajos porcentajes de neomachos obtenidos en trucha arcoiris, es bastante informativo ya que es el primero que se realiza en el país y genera otras expectativas de investigación. Sería interesante repetir estudios con otras dosis de TT, evaluando a su vez concentraciones hormonales, expresión génica y hacer una caracterización histológica de las gónadas, con el fin de dilucidar el mecanismo de acción de los compuestos bioactivos de esta planta en el proceso de diferenciación gonadal de una especie de interés comercial como *Oncorhynchus mykiss*.

Los resultados permitieron concluir que *Tribulus terrestris* mezclado con concentrado en dosis de 3000 mg/Kg y de 5000 mg/Kg resulta en un bajo porcentaje de masculinización de la trucha arcoiris; sin embargo, no incide negativamente en la sobrevivencia de la misma, ejerce un efecto anabólico significativo reflejado en ganancias de peso y talla y no es costoso utilizarlo comparado con el método convencional de la  $17\alpha$ -metiltestosterona; sin embargo, no se recomienda su uso para este fin por la ineficiencia.

### Agradecimientos

Al Tecnoparque Nodo Rionegro del Centro de la Innovación, la Agroindustria y la Aviación, por el apoyo con el talento humano e infraestructura tecnológica para el desarrollo del proyecto.

### Referencias

Agrolac Andina. 2017. Ficha de datos de seguridad de clorpirifós. Recuperado en marzo de 2019, de <http://www.agrolac.com/>

wp-content/uploads/2017/11/Ficha-Seguridad-Clorpirifos-480-EC\_AG-Andina-SAC.pdf

- Aranzazu-Taborda D, Rodríguez Berardo, Duque- Agudelo B. Disrupción endocrina en peces. *Rev Colomb Cienc Pec.* 2012;25(2):312-323.
- Arredondo-Figueroa JL, Valdivia-Soto HR, Hernández-Lastiri L, Campos-Verduzco R. Evaluación del crecimiento, factor de conversión de alimento y calidad del agua del cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en un sistema cerrado. *Hidrobiológica.* 1996;6(1-2):59-65.
- Barton BA. 1996. General biology of salmonids. En: "Principles of Salmonid Culture". Editado por Pennel, W. & Barton, B.A. Elsevier, Amsterdam. Pp. 29-96.
- Betancur-López J, Rivera-Narváez C, Cardona-Trujillo H, Echeverri V, Taborda-Gil C. 2010. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la trucha arcoíris en el departamento de Antioquia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado en agosto de 2015, de [http://www.minagricultura.gov.co/archivos/cadena\\_productiva\\_trucha\\_arcoiris\[1\].pd](http://www.minagricultura.gov.co/archivos/cadena_productiva_trucha_arcoiris[1].pd)
- Burgos IM, García JL, Cárcamo RR, Nieto CO, Guevara FS, Cordero SB, Petro GT. Cultivo de dorada (*Brycon sinuensis* Dahl, 1955) en jaulas flotantes a diferentes niveles de proteína. *Rev Colomb Cienc Pec.* 2006;19(2):204-211.
- Çek Ş, Turan F, Atik E. Masculinization of convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) by immersion in *Tribulus terrestris* extract. *Aquacult Int.* 2007a;15(2):109-119.
- Cek S, Turan F, Atik E. The effects of Gokshura, *Tribulus terrestris* on sex reversal of guppy, *Poecilia reticulata*. *Pakistan journal of biological sciences: Pjbs.* 2007b;10(5):718-25.
- Contreras-Sánchez WM, Padrón-López RM, Hernández-Vidal U, Hernández-Franyutti A, Mcdonal-Vera A, Juárez-Rojop I, Fitzsimmons K. 2007. Elimination of MT from aquaculture masculinization systems: use of catalysis with titanium dioxide and bacterial degradation (07MNE06UA).
- Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 2002;208(3):191-364.
- Díaz-Resendiz KJ, Girón-Pérez MI. Effect of chlorpyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Efecto de clorpirifos sobre la respuesta inmune de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Revista Biotecnología.* 2014;3(1):59-64.
- Enciso-Lizárraga SL. Inducción a la inversión sexual de la cabrilla arena *Paralabrax maculatofasciatus* mediante la administración oral de la hormona 17 $\alpha$ -metiltestosterona. Tesis de Maestría Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Pág 78.
- Fahey TD. 1998. Anabolic-androgenic steroids: mechanism of action and effects on performance. *Encyclopedia of sports medicine and science.* Internet Society for Sport Science.
- Falona SZ. (2007). Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. doi:10.11606/T.18.2007.tde-09042008-133314. Recuperado em 2019-05-12, de [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)
- Figueroa JL, Soto HR, Lastiri LH, Verduzco RC. Evaluación del crecimiento, Factor de conversión de alimento y calidad del agua del cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en un sistema cerrado. *Hidrobiológica.* 1996;(1-2):53-85.
- Girón-Pérez MI, Barcelós-García R, Vidal-Chavez ZG, Romero-Bañuelos CA, Robledo-Marengo ML. Effect of chlorpyrifos on the hematology and phagocytic activity of Nile tilapia cells (*Oreochromis niloticus*). *Toxicol Mech Methods.* 2006;16(9):495-499.
- Gopinath V, MubarakAli D, Priyadarshini S, Priyadarshini NM, Thajuddin N, Velusamy P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2012;96:69-74.
- Hall-Ramírez V, Rocha-Palma M, Rodríguez-Vega E. 2002. Plantas medicinales, Volumen II.
- Haywood GP. Ammonia toxicity in teleost fishes. A review. *Can. Tech. Rep. Fish Aquat Sci.* 1983;1177:1-35.
- Holdridge L. 1978. Ecology based on life zones. San José, Costa Rica. American Institute of Agricultural Sciences (IICA). 216p.
- Institute of Laboratory Animal Resources (US). 1985. Committee on Care, Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health (US). Division of Research Resources. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies.
- Kavitha P, Subramanian P. Effect of *Tribulus terrestris* on monosex production in *Poecilia latipinna*. *Current Science.* 2011;101(1):100-104.
- López CA, Carvajal D, Botero MC. Masculinización de Tilapia roja (*Oreochromis spp*) por inmersión utilizando 17 alfa metiltestosterona. *Rev Colomb Cienc Pec.* 2007;20(3):318-26.
- Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel O, Lareyre JJ, Bernot A, Laudet V, Guiguen Y. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression.* 2000;1493(1-2):180-187.
- Mejía-Aristizabal P, Román-Londoño AM. 2009. Porcentajes de reversión sexual en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para la obtención de neomachos mediante la aplicación de la hormona masculinizante 17  $\alpha$ -metil testosterona por el método de ingestión (larvas) e inmersión (ovas y larvas). Tesis de pregrado Universidad Ces. Pág 46.
- Merino M. 2005. El cultivo de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural, INCODER. 1-6.
- Morales CA, Rodríguez N. El clorpirifos: Posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev Colomb Cienc Pec.* 2004;17(3):255-266.
- Omitoyin BO, Ajani EK, Sadiq HO. Preliminary investigation of *Tribulus terrestris* (Linn., 1753) extracts as natural sex reversal agent

- in *Oreochromis niloticus* (Linn., 1758) larvae. Int J Aquacult. 2013;3(23):133-137.
- Pepe-Victoriano R, Silva A, Vega A, Araya M, Cornejo L. Efecto del Aumento de la Temperatura, Frecuencia de Alimentación y Ración de Alimento en el Crecimiento de Juveniles de Turbot *Psetta maxima*. Int J Morphol. 2012;(3):902-907.
- Pineda R. 1999. Elaboración y evaluación de dietas a partir de harinas de barrilete (*Euthynnus linneatus*) y rasposa (*Haemulon maculiconda*) como alimento de bagre (*Ictalurus punctatus*) en condiciones de laboratorio. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad de Colima, México. 1999:1-61.
- Poot-Delgado C, Salazar-Novelo A, Hernández-Hernández MF. 2009. Evaluación de dietas comerciales sobre el crecimiento de tilapia (*Oreochromis niloticus*)(Linnaeus) etapa crianza. 2 Congreso Internacional de Investigación Cd. Delicias, Chihuahua, México.
- Ramírez H, Palma MR, Vega ER, Cimed F. 2002. Plantas medicinales volumen ii.
- Randall DJ, Wright PA. The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. Can J Zool. 1989;67(12):2936-2942.
- Recalde D. 2014. Manual práctico para el cultivo de Trucha arco iris. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 44.
- Romeiro C, Fenerich-Verani N, Campos B, Livramento Da Silva A. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17  $\alpha$ -metiltestosterona. Rev Bras Zootec. 2000;29(3):654-659.
- Turan F, Cek S. Masculinization of African catfish (*Clarias gariepinus*) treated with gokshura (*Tribulus terrestris*). Isr J Aquacult-Bamid. 2007;59(4):224-229.
- Valdivia K, Jouanno E, Volff JN, Galiana-Arnoux D, Guyomard R, Helary L, Guiguen Y. High temperature increases the masculinization rate of the all-female (XX) rainbow trout "Mal" population. PLoS one. 2014;9(12):e113355.
- Vanegas A, Villareal L. 2001. Evaluación comparativa de parámetros morfométricos entre semilla nacional e importada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de pregrado Universidad de la Salle. Pág 19- 20.
- Vogt, G. Exposure of the eggs to 17 $\alpha$ -methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. Aquat Toxicol. 2007;85(4):291-296.
- Wedemeyer GA. 1996. Physiology of Fish in Intensive Culture Systems. Chapman&Hall, London. Pp. 232.
- Yılmaz E, Çek Ş, Mazlum Y. Effects of synthetic and natural steroids on the growth, sex reversal and gonadal development of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Su Ürünleri Dergisi. Ege J Fish Aqua Sci. 2013;30(3):123-131.
- Zhang JD, Xu Z, Cao YB, Chen HS, Yan L, An MM, Gao PH, Wang Y, Jia XM, Jiang YY. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. J Ethnopharmacol. 2006;103(1):76-84.