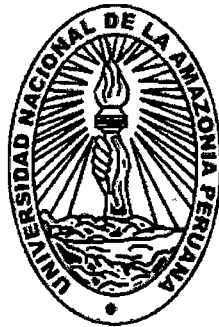


T
591.46
A45

**NO SALE A
DOMICILIO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



324

**DETERMINACIÓN DEL SEXO DEL PAICHE, *Arapaima gigas*
(CUVIER 1829) UTILIZANDO TÉCNICAS INMUNO-ENZIMÁTICAS
(EIA) ESPECÍFICAS PARA LA VITELOGENINA Y LOS ESTEROIDES
SEXUALES 17 β -ESTRADIOL Y 11-K TESTOSTERONA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

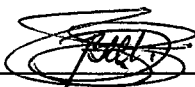
**PRESENTADA POR LA BACHILLER
MIRIAM ADRIANA ALVÁN AGUILAR**

IQUITOS - PERÚ

2010

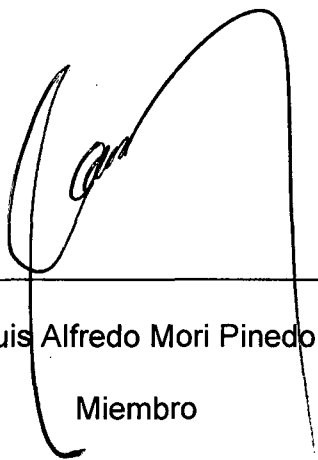
DONADO POR:
Miriam Adriana Alván Aguilar
Iquitos, 08 de 03 de 2011

JURADO CALIFICADOR



Dra. Blanca Díaz Bardales

Presidente



Dr. Luis Alfredo Mori Pinedo

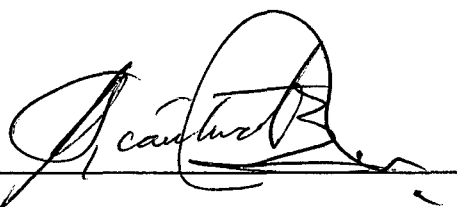
Miembro



M.Sc. Juan Carlos Castro Gómez

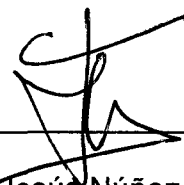
Miembro

ASESORES



Dr. Fernando Alcántara Bocanegra

UNAP - IIAP



Dr. Jesús Núñez Rodríguez

IRD

DEDICATORIA

A mis hijos, Mateo y Mei Ling, los motores de mi vida.

A mi esposo Fred, por sus consejos y por estar siempre cuando lo necesito.

A mis queridos padres, Edgar y Ligia, por el amor, comprensión y apoyo brindado en mi formación personal y profesional.

A mis queridas hermanas, Jessenia, Karla y Katty, por el soporte afectivo que es muy importante en mi vida.

Miriam Adriana

AGRADECIMIENTO

A través de estas páginas quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que de una manera u otra hicieron posible la realización del presente trabajo de tesis. En ese sentido, vaya mi agradecimiento:

- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana-IIAP, a través de la persona del Ing. M.Sc. Salvador Tello Martín, Director del Programa de Investigación para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del IIAP, por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo en el Centro de Investigaciones de Quistococha (CIQ).
- Al Proyecto INCAGRO, por el financiamiento de la presente investigación a través del Subproyecto “Reproducción inducida del paiche *Arapaima gigas* y manejo de alevinos en condiciones controladas” (Contrato N° 2007-00543-AG-INCAGRO/FDSE).
- A los distinguidos científicos, Jesús Núñez Rodríguez (IRD) y Fernando Alcántara Bocanegra (IIAP-UNAP), asesores de la tesis, por brindarme los conocimientos y orientaciones técnico-científicos necesarios para el adecuado desarrollo de este trabajo.
- Al Blgo. M.Sc. Fred Chú Koo, responsable del Proyecto Acuicultura del IIAP y coordinador técnico del Subproyecto “Reproducción inducida del paiche *Arapaima gigas* y manejo de alevinos en condiciones controladas”, por la oportunidad de realizar esta tesis.

- Al personal técnico del Programa AQUAREC del IIAP y en especial a los biólogos Carlos Chávez y Manuel Navas por el valioso apoyo en la colecta de los peces para los datos de longitud y peso, colocación de chips y extracción de sangre.
- Al bachiller Alberto Casanova, por el apoyo brindado en el análisis de laboratorio de las muestras.
- A la Dra. Carmen García Dávila, Jefa del Laboratorio de Genética y Biología Molecular del IIAP, por permitir el uso del equipo Microplate Reader para la lectura de absorbancia de las muestras.
- A todas aquellas personas que de una u otra manera me incentivaron y apoyaron sinceramente.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. ANTECEDENTES.....	19
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO.....	24
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
3.3. REGISTRO DE DATOS.....	26
3.4. TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y OBTENCIÓN DEL PLASMA.....	27
3.5. INMUNOENSAYO (EIA) CON VITELOGENINA (Vtg).....	28
3.5.1. Protocolo del Inmunoensayo con Vtg.....	29
3.5.2. Optimización del protocolo EIA con Vtg.....	31
3.5.3. Sexaje del paiche, <i>Arapaima gigas</i> utilizando el inmunoensayo (EIA) con Vtg.....	34
3.5.4. Cuantificación de la vitelogenina (Vtg).....	34
3.5.5. Monitoreo mensual de los niveles de Vtg (mg/ml) en el plasma del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	35
3.6. INMUNOENSAYO (EIA) CON LOS ESTEROIDES SEXUALES 17 β -ESTRADIOL (17 β -E ₂) Y 11-K TESTOSTERONA (11-KT).....	35
3.6.1. Protocolo de los inmunoensayos con 17 β -E ₂ y 11- KT.....	35
3.6.2. Cuantificación de los esteroides sexuales y sexaje del paiche, <i>Arapaima gigas</i> utilizando los inmunoensayos (EIA) de 17 β -E ₂ y 11-KT.....	38

3.7.	CONFIRMACIÓN DEL SEXAJE.....	39
3.8.	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	39
IV.	RESULTADOS.....	40
4.1.	REGISTRO DE DATOS DE LOS PECES.....	40
4.2.	INMUNOENSAYO (EIA) CON VITELOGENINA.....	41
	4.2.1. Optimización del protocolo EIA con Vtg	41
	4.2.2. Sexaje utilizando el EIA con Vtg.....	44
	4.2.3. Monitoreo mensual de la concentración de la Vtg (mg/ml).....	48
4.3.	INMUNOENSAYO (EIA) CON 17 β -E ₂ y 11-KT.....	50
	4.3.1. Niveles plasmáticos de 17 β -E ₂ y 11-KT (pg/ml).....	50
	4.3.2. Sexaje utilizando el EIA con 17 β - E ₂ y 11-KT.....	51
4.4.	COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE Vtg, 11-KT y 17 β -E ₂ CON RESPECTO A LA EDAD Y EL SEXO DEL PAICHE.....	54
4.5.	CONFIRMACIÓN DEL SEXAJE.....	58
	4.5.1. Confirmación del sexaje de adultos.....	58
	4.5.2. Confirmación del sexaje de juveniles.....	60
V.	DISCUSIÓN.....	62
VI.	CONCLUSIONES.....	69
VII.	RECOMENDACIONES.....	71
VIII.	RESÚMEN.....	72
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	73
X.	ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Tratamientos de incubación con (ICP♂) y sin (ISP♂) plasma de macho diluido (1:3000) aplicados en individuos ♂ y ♀ del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	32
Tabla 2	Tratamientos de la combinación de 04 diluciones del plasma con 03 diluciones del Anti Vtg1, evaluados para el protocolo del sexaje del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	33
Tabla 3	Cantidad (µl) y componentes del B1c, NSB, B ₀ , S1-S8 y las muestras aplicadas en la etapa 1 (primera incubación) del inmunoensayo con 11-KT.....	37
Tabla 4	Cantidad (µl) y componentes del B1c, NSB, B ₀ , S1-S8 y las muestras aplicadas en la etapa 1 (primera incubación) del inmunoensayo con 17β-E ₂	37
Tabla 5	Densidad óptica (D.O) promedio de la diferencia entre individuos ♂ y ♀ de <i>A. gigas</i> incubados con (ICP♂) y sin (ISP♂) el plasma de un paiche macho, aplicados a la combinación de 4 diluciones del coating con 3 diluciones del Anti Vtg ₁	42
Tabla 6	Media ± D.S, Valores mínimos-máximos y prueba de <i>t</i> de Student de los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) y los esteroides sexuales 17β-E ₂ y 11-KT (pg/ml) entre sexos en individuos adultos y juveniles del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	54
Tabla 7	Confirmación del sexaje entre los análisis de Vtg, 11-KT, 17β-E ₂ y la observación <i>in situ</i> de las gónadas en individuos adultos del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	59
Tabla 8	Confirmación del sexaje entre los análisis de 11-KT, 17β-E ₂ y la observación <i>in situ</i> de las gónadas en individuos juveniles del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Ubicación geográfica del Centro de Investigaciones de Quistococha (CIQ) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).....	25
Figura 2.	Registro del peso (A) y la longitud total (B) del paiche <i>Arapaima gigas</i>	26
Figura 3.	Búsqueda y lectura del chip electromagnético de identificación en un ejemplar adulto de <i>Arapaima gigas</i> , utilizando el lector de chips modelo Ex Pocket Reader	27
Figura 4.	Extracción de sangre de la vena caudal del paiche <i>Arapaima gigas</i> . A: extracción de la sangre, B: distribución de la sangre en tubos eppendorf.....	28
Figura 5.	Distribución de los componentes (Blc, NSB, B ₀ , S1-S8, TA y muestras de plasma) en los espacios de la placa (Nunc Maxisorp®) para el inmunoensayo con los esteroides sexuales 11-KT y 17β- E ₂	36
Figura 6.	Peso (kg) promedio de 39 individuos adultos y 19 individuos juveniles del paiche <i>Arapaima gigas</i> utilizados en este estudio.....	40
Figura 7.	Longitud (cm) promedio de 39 individuos adultos y 19 individuos juveniles del paiche <i>Arapaima gigas</i> utilizados en este estudio	40
Figura 8.	Resultados de coloración en la placa en el experimento 1. Incubación de las muestras con (ICP♂) y sin (ISP♂) el plasma de un paiche macho conocido.....	41
Figura 9.	Relación de los valores de densidad óptica (D.O) de la vitelogenina entre las diluciones del plasma y del Anti Vtg ₁ aplicados en este estudio a individuos de <i>Arapaima gigas</i>	43

Figura 10.	Resultados de coloración en las placas del análisis de sexaje con vitelogenina de 39 individuos adultos de <i>Arapaima gigas</i>	44
Figura 11.	Valores de densidad óptica (D.O) de la Vtg a 490 nm de 39 individuos adultos de <i>Arapaima gigas</i>	45
Figura 12.	Valores promedios de la concentración de Vtg (pg/ml) en 19 hembras adultas de <i>Arapaima gigas</i>	46
Figura 13.	Resultados de coloración en las placas del análisis de sexaje con vitelogenina aplicados a 19 individuos juveniles del paiche <i>Arapaima gigas</i>	47
Figura 14.	Valores promedios de densidad óptica (D.O) de la Vtg a 490 nm de 19 individuos juveniles del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	48
Figura 15.	Niveles de Vtg (mg/ml) de 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero-Junio del 2008).....	49
Figura 16.	Niveles promedios de la Vtg (mg/ml) de 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero-Junio del 2008).....	49
Figura 17.	Niveles plasmáticos de 17β -E ₂ y 11-KT (pg/ml) de 39 individuos adultos del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	50
Figura 18.	Niveles plasmáticos de 17β -E ₂ y 11KT (pg/ml) de 19 individuos juveniles del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	50
Figura 19	Determinación del sexo en paiches adultos usando las proporciones 11-KT/ 17β -E ₂ y 17β -E ₂ /11-KT.....	52
Figura 20.	Determinación del sexo en paiches juveniles usando las proporciones 11-KT/ 17β -E ₂ y 17β -E ₂ /11-KT.....	53
Figura 21.	Prueba de <i>t</i> de Student de los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) y los esteroides sexuales 17β -E ₂ y 11-KT (pg/ml) entre sexos en individuos adultos del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	55

Figura 22.	Prueba de <i>t</i> de Student de los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales 17β-E ₂ y 11-KT (pg/ml) entre sexos en individuos juveniles del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	56
Figura 23.	Correlación entre los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) y los esteroides sexuales 17β-E ₂ y 11-KT (pg/ml) en individuos adultos del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	57
Figura 24.	Correlación entre los niveles plasmáticos de 17β-E ₂ y 11-KT (pg/ml) en individuos juveniles del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	58
Figura 25.	Gónada femenina del paiche, <i>Arapaima gigas</i> . A: hembra juvenil, B: hembra adulta.....	61
Figura 26.	Gónada masculina del paiche, <i>Arapaima gigas</i> . A: macho juvenil, B: macho adulto.....	61

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1.	Materiales y equipos utilizados en el presente estudio.....	81
Anexo 2.	Esquema de las etapas que componen el protocolo del Inmunoensayo EIA con Vtg para el sexaje del paiche, <i>Arapaima gigas</i>	82
Anexo 3.	Esquema de las etapas que componen el protocolo laboratorial propuesto por CAYMAN CHEMICAL para el Inmunoensayo EIA con 17 β -E ₂	83
Anexo 4.	Esquema de las etapas que componen el protocolo laboratorial propuesto por CAYMAN CHEMICAL para el Inmunoensayo EIA con 11-KT.....	84
Anexo 5.	Preparación de soluciones buffer para el inmunoensayo (EIA) con Vtg.....	85
Anexo 6.	Preparación de soluciones buffer para el inmunoensayo (EIA) con 11KT y 17 β -E ₂	86
Anexo 7.	Preparación de los reactivos específicos para el inmunoensayo (EIA) con 11-KT y 17 β -E ₂	87
Anexo 8.	Códigos de chip, datos de peso y longitud total de 39 individuos adultos (6 años) del paiche <i>Arapaima gigas</i>	88
Anexo 9.	Códigos de chip, datos de peso y longitud total de 19 individuos adultos (3 años) del paiche <i>Arapaima gigas</i>	89
Anexo 10.	Densidad óptica (D.O) de la Vtg en individuos (♂ y ♀) de <i>Arapaima gigas</i> incubados sin (ISP♂) el plasma de un paiche macho, aplicados a la combinación de 04 diluciones del plasma con 03 diluciones del Anti Vtg ₁	90
Anexo 11.	Densidad óptica (D.O) de la Vtg en individuos (♂ y ♀) de <i>Arapaima gigas</i> incubados con (ICP♂) el plasma de un paiche macho, aplicados a la combinación de 04 diluciones del plasma con 03 diluciones del Anti Vtg ₁	91

Anexo 12.	Valores promedio de la densidad óptica (D.O) y niveles de Vtg (mg/ml) de 39 individuos adultos del paiche.....	92
Anexo 13.	Valores promedios de densidad óptica (D.O) y niveles de Vtg (mg/ml) de 19 individuos juveniles del paiche.....	93
Anexo 14.	Valores promedios de densidad óptica (D.O) de la Vtg en 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero, Marzo, Abril Mayo y Junio).....	94
Anexo 15.	Valores promedios de los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) en 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero, Marzo, Abril, Mayo y Junio).....	94
Anexo 16.	Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 1: 16 individuos (1-16) de paiches adultos.....	95
Anexo 17.	Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 2: 16 individuos (17-32) de paiches adultos.....	96
Anexo 18.	Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 3: 7 individuos (33-39) de paiches adultos y 9 individuos (1-9) de paiches juveniles.....	97
Anexo 19.	Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 4: 10 individuos (10-19) de paiches juveniles.....	98
Anexo 20.	Análisis del esteroide 17β -E ₂ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 1: 16 individuos (1-16) de paiches adultos.....	99
Anexo 21.	Análisis del esteroide 17β -E ₂ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 2: 16 individuos (17-32) de paiches adultos.....	100
Anexo 22.	Análisis del esteroide 17β -E ₂ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 3: 7 individuos (33-39) de paiches adultos y 9 individuos (1-9) de paiches juveniles.....	101

Anexo 23.	Análisis del esteroide $17 \beta\text{-E}_2$ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 4: 10 individuos (10-19) de paiches juveniles.....	102
Anexo 24.	Niveles (pg/ml) de 11KT y $17 \beta\text{-E}_2$ y valores de la relación $\text{E}_2/11\text{KT}$ y $11\text{KT}/\text{E}_2$ de 39 individuos adultos del paiche. Individuos marcados no fueron correctamente sexados.....	103
Anexo 25.	Niveles (pg/ml) de 11KT y $17 \beta\text{-E}_2$ y valores de la relación $\text{E}_2/11\text{KT}$ y $11\text{KT}/\text{E}_2$ de 19 individuos juveniles del paiche.....	104

I. INTRODUCCIÓN

La determinación del género de los peces en piscicultura es un requisito para constituir un plantel de reproductores que tenga una adecuada proporción sexual, con la finalidad de producir un número apropiado de larvas y alevinos para fomentar una producción acuícola sostenida, sea cual fuese la especie cultivada (Takemura & Oka, 1998). Generalmente, una proporción sexual equilibrada es deseable cuando la formación de parejas es indispensable para realizar la reproducción en cautiverio sea esta natural o inducida.

En la mayoría de las especies ícticas del mundo, las características sexuales fenotípicas son más o menos fáciles de identificar aún en edades tempranas (ejemplares juveniles) mediante la observación directa de las características específicas externas. En algunos casos, acciones como biopsias intra-ováricas o endoscopias en animales anestesiados permiten la identificación del sexo, aún fuera de la época de reproducción o en animales inmaduros (Kynard & Kieffer, 2002; Hurvitz *et al.*, 2007; Bryan *et al.*, 2007; Swenson *et al.*, 2007). Sin embargo, estos métodos son altamente invasivos, generalmente dificultosos, estresantes y pueden conllevar a la muerte del pez.

El paiche (*Arapaima gigas*) es uno de los peces de agua dulce más grandes del mundo, cuyo cultivo actualmente se viene promoviendo en las regiones amazónicas del Perú, Colombia y Brasil. En el Perú, es la especie cultivada con mayor potencial de exportación y su cultivo puede expandirse con facilidad además de las zonas de selva baja hasta ciudades de selva alta y selva central como Pozuzo, Aucayacu, Tingo María, y de la costa norte del país (Chu-Koo & Alcántara, 2009).

Esta especie no presenta características sexuales externas que sean distinguibles (Saavedra-Rojas *et al.*, 2005). Según Bard & Imbiriba (1986), presenta algunas diferencias en la coloración solamente cuando el animal está en edad adulta y en época reproductiva, el macho presenta un color rojo intenso en la región inferior de la cabeza, los lados del cuerpo y la región de la cola, mientras que la hembra presenta una coloración menos intensa y es ligeramente más robusta que los machos (Fontenele, 1952; Alcántara *et al.*, 2006). Sin embargo, estas características no son considerados los suficientemente confiables para distinguir el sexo de esta especie, debido a que esta pigmentación puede variar de acuerdo al color del agua o a la turbidez del ambiente donde el pez vive (Alcántara *et al.*, 2006), lo que puede llevar a resultados erróneos o interpretaciones subjetivas.

Actualmente no existe ningún método de eficacia comprobada para la determinación del sexo en el paiche lo que dificulta su manejo y es uno de los cuellos de botella tecnológicos de mayor preocupación para el desarrollo de esta promisoría actividad productiva en la región amazónica. Debido al enorme potencial que el paiche tiene para la piscicultura amazónica (Rebaza *et al.*, 2005; Chu-Koo *et al.*, 2007) y por la buena demanda de su carne en el mercado interno como externo (UNCTAD/BTFP, 2005; Alcántara *et al.*, 2006; Muller, 2006) se hace necesario entonces buscar alternativas viables y altamente confiables para la identificación del género en este recurso íctico a fin de realizar un manejo eficiente de los planteles de reproductores con fines de producción masiva de semilla en cautiverio que pueda sostener dicha actividad productiva en el tiempo.

El uso de técnicas Inmuno-enzimáticas (EIA), de inmunoaglutinación y radioinmunoensayos (RIA) en la cuantificación de ciertas moléculas biológicas como los esteroides sexuales y la vitelogenina (Vtg), una glico-lipo-fosfoproteína específica de la hembra, han sido reportados como métodos eficientes para la determinación del sexo en algunas especies de peces. La cuantificación de los esteroides sexuales permitieron la determinación del sexo en tres especies de esturión: *Acipenser stellatus* (Ceapa *et al.*, 2002), *Acipenser transmontanus*, (Webb *et al.*, 2002) y *Acipenser persicus* (Malekzadeh *et al.*, 2006); en el salmón, *Salmo trutta* (Pottinger *et al.*, 2005) y en la perca europea, *Perca fluviatilis* (Rougeot *et al.*, 2007); mientras que la cuantificación de la vitelogenina permitieron sexar especies como el lenguado del pacífico, *Hippoglossus stenolepis* (Matsubara & Sawano, 1992), el atún cola amarilla, *Thunnus albacares* (Takemura & oka,1998) y el salmón, *Salmo trutta* (Pottinger *et al.*, 2005).

En *Arapaima gigas*, estudios previos de cuantificación del esteroide sexual: 17 β -estradiol (17 β -E₂) (García, 2008); así como de obtención de anticuerpos específicos para la vitelogenina de esta especie (Dugué *et al.*, 2008) resaltaron la potencialidad del uso de la técnica inmuno-enzimática (EIA) para su sexaje. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivos:

Objetivo General.

- Evaluar el uso de técnicas inmuno-enzimáticas (EIA) específicas para una glico-lipo-fosfoproteína: Vitelogenina (Vtg) y dos esteroides sexuales: 17 β -Estradiol (17 β -E₂) y 11-K Testosterona (11-KT), ligadas al sexo en peces como métodos de determinación de género en ejemplares adultos y juveniles de la especie paiche, *Arapaima gigas*.

Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de sexaje para el paiche *Arapaima gigas* utilizando una técnica inmuno-enzimática (EIA) específica para la glico-lipo-fosfoproteína Vitelogenina (Vtg).
- Sexar ejemplares adultos y juveniles de *Arapaima gigas*, mediante la determinación de los valores de densidad óptica (D.O) y los niveles de Vtg (mg/ml) presente en el plasma sanguíneo.
- Monitorear mensualmente los niveles de Vtg (mg/ml) en hembras adultas de *Arapaima gigas*.
- Determinar los niveles plasmáticos de las hormonas esteroides 17 β -E₂ y 11-KT (pg/ml) en el plasma sanguíneo de ejemplares adultos y juveniles de *Arapaima gigas*.
- Sexar ejemplares adultos y juveniles de *Arapaima gigas* mediante la proporciones de los niveles plasmáticos 11-KT/17 β -E₂ y 17 β -E₂/11-KT.
- Comparar los niveles plasmáticos de la Vtg, 17 β -E₂ y 11-KT con respecto a la edad y el sexo de los paiches analizados.

II. ANTECEDENTES

WALLACE & SELMAN (1981) señalan que la vitelogenina (Vtg) es una proteína específica de las hembras, que aparece en los peces durante el periodo reproductivo. La Vtg es sintetizada en el hígado, bajo la estimulación de estrógenos para posteriormente ser liberada en la circulación sanguínea, transportada a los ovarios e incorporada durante el desarrollo de los ovocitos.

GAZOLA & BORELLA (1997) determinaron los niveles de Testosterona (T) y 11-ketotestosterone (11-KT) en el pez amazónico *Piaractus mesopotamicus* (pacú). Ellos evaluaron dos periodos del ciclo reproductivo de esta especie (en reposo y en maduración), donde reportaron altos niveles de T y 11-KT durante el estadio de maduración de esta especie (T = 2400 ± 56 pg/ml; 11-KT = 2300 ± 60 pg/ml) y bajos niveles en el periodo de reposo.

TAKEMURA & OKA (1998) lograron determinar el sexo del atún cola amarilla *Thunnus albacares*, analizando muestras del tejido de la superficie del cuerpo (mucus) y utilizando a la lipoproteína Vtg como marcador. Debido a que esta especie es sensible al manipuleo, ellos desarrollaron un método simple para la toma de muestras, a través de un aparato colector hecho a mano, con la finalidad de causar el menor estrés posible a los peces analizados.

BAROILLER et al. (1999) mencionan que en los peces, el esteroide Testosterona (T), no está directamente implicado en el mecanismo de diferenciación sexual, pero juega un rol intermediario como precursor de la 11-K Testosterona (11-KT) y

el 17 β -estradiol (E₂), los cuales están directamente implicados en la diferenciación sexual.

CEAPA et al. (2002) señalan que los niveles de Vtg, E₂, T y 11 KT presentes en el plasma sanguíneo, son herramientas muy útiles para identificación del sexo del esturión *Acipenser stellatus*. Además sugieren que los altos niveles de T y 11-KT encontrados durante el periodo de migración en hembras y machos de esta especie, podrían indicar que estos esteroides sexuales estén envueltos en la estimulación del comportamiento migratorio de esta especie.

DEVLIN & NAGAHAMA (2002) afirman que los mecanismos de determinación sexual en peces están bajo control genético (cromosomas sexuales y autosomas), medioambiental (T^o, densidad y pH) y de factores fisiológicos (hormonas esteroides sexuales), los cuales actúan en sinergia para inducir los procesos de diferenciación sexual. Ellos también señalan que las hormonas más investigadas son los andrógenos, en particular la Testosterona (T) y 11-K Testosterona (11-KT), y los estrógenos principalmente el 17 β -estradiol (17 β -E₂).

WEBB et al. (2002) determinaron el sexo y el estado de madurez sexual de una especie de esturión, *Acipenser transmontanus*, que como el paiche no presenta características sexuales externas, mediante la determinación de los niveles de T, 11-KT, 17 β -E₂ y Calcio (Ca⁺⁺) presentes en el plasma sanguíneo de esta especie. Ellos resaltan como mejores indicadores a la T y al 17 β -E₂, donde el 79% de machos y el 85% de hembras fueron correctamente identificados. Ellos también

señalan que las concentraciones de estos esteroides sexuales son bajas y casi indetectables antes de la diferenciación gonadal de esta especie.

MONTEIRO (2005) Al caracterizar el perfil hormonal de los esteroides sexuales Testosterona (T), 17β -estradiol (17β -E₂) y 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) en el plasma sanguíneo del paiche, *Arapaima gigas* (de 3 y 4 años de edad) en Recife (Brasil), reportó altos niveles de T y 17β -E₂ al inicio de la época lluviosa, en cuanto que la 17α -OHP, tuvo oscilaciones constantes y pequeños valores al final de ese periodo. Además señala que los machos de esta especie presentan bajas concentraciones de 17β -E₂ y altas concentraciones de T, difiriendo de las hembras ($p < 0.05$), mientras que las concentraciones de 17α -OHP fueron similares entre machos y hembras ($p > 0.05$).

POTTINGER et al. (2005) analizando las concentraciones plasmáticas de 17β -E₂, Vtg y la Fosfoproteína Fosforo Alkali Lábil (ALP) como indicadores sexuales del sexo femenino en el salmón, *Salmo trutta*, encontraron que durante los primeros meses de reproducción de esta especie (Febrero a Mayo), la concentración de 17β -E₂ y ALP es alta, lo que permitió la identificación del sexo en un 15-50%, a diferencia de la Vtg que presentó una baja efectividad (1-8%). Además reportan que las hembras de *Salmo trutta* y *Salmo salar* presentan niveles de Vtg ($> 800 \mu\text{g ml}^{-1}$), mientras que en los machos los niveles de Vtg son inferiores a $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.



MALEKZADEH et al. (2006) lograron determinar el sexo y los estadios de maduración del esturión persa, *Acipenser persicus* con un 91 % de certeza, analizando los niveles de esteroides sexuales y los parámetros de longitud furcal de esta especie.

DUGUÉ et al. (2008) estimularon la producción de Vtg en juveniles de *A. gigas* administrando dosis continuas de 17 β -estradiol (E₂). Luego de extraer el plasma rico en Vtg, aislaron esta proteína mediante el método de electroforesis (PAGE-SDS), la purificaron, la inyectaron en conejos y obtuvieron anticuerpos específicos para ella, recomendando su uso en ensayos EIA como potencial herramienta para el sexaje del paiche.

OHTA et al. (2007) señalan que el esteroide sexual 11-KT juega un rol principal en los cambios de coloración de aleta anal de adultos de *Pseudolabrus sieboldi*, un pez marino hermafrodita, indicando que este andrógeno sexual podría jugar un rol principal durante la reversión sexual y el periodo reproductivo de esta especie.

ROUGEOT et al. (2007) mencionan que las hormonas esteroidales juegan un importante papel durante el proceso de diferenciación sexual de los peces. Estudiando el rol de la Testosterona (T), 17 β -estradiol (17 β -E₂) y 11-K Testosterona (11-KT) en *Perca fluviatilis*, ellos encontraron un gradual incremento de los niveles de estos esteroides después de la diferenciación sexual del pez. Además señalan que la presencia de estos esteroides antes de la fertilización de los huevos, indican que estos son maternalmente transferidos.

GARCÍA (2008) al determinar los niveles de estradiol en plasma sanguíneo de individuos adultos (5 años) y juveniles (2 años) del paiche, *Arapaima gigas*, reportó para los individuos adultos, diferencias ligadas al sexo de esta especie, donde los machos presentan concentraciones bajas (15.65 pg/ml) y las hembras concentraciones relativamente elevadas (160.16 pg/ml) de este esteroide.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones de Quistococha (CIQ), sede del Programa de Investigación para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), un ente estatal de investigación con especialización en la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad amazónica.

El CIQ es un complejo de 49 hectáreas, que se encuentra localizado en el margen derecho de la carretera Iquitos-Nauta (Km. 4.5, distrito de San Juan Bautista), entre las coordenadas geográficas 03° 48' 48.9" S y 73° 19' 18.2" W, con una altitud de 128 msnm, en el Departamento de Loreto (Figura 1). Dentro de sus instalaciones cuenta con varios laboratorios especializados, entre ellos el Laboratorio de Reproducción Inducida de Peces Amazónicos, el Laboratorio de Entomología, el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, el Laboratorio de Fitoquímica y Productos Naturales, el Laboratorio de Taxonomía y Esclerocronología y el Laboratorio de Bromatología y Limnología donde se ejecutó la fase laboratorial del presente estudio.

El CIQ es el principal centro de investigación del IIAP, en ella se conducen numerosos estudios y tesis en rasgos de vida de peces, biología molecular, genética y acuicultura, siendo esta última, una de las principales líneas temáticas del IIAP. En el CIQ se producen alrededor de 7 millones de post-larvas de peces amazónicos anualmente (Chu-Koo & Alcántara, 2007) que sirven para abastecer a los piscicultores de toda la región amazónica y posee una infraestructura acuícola importante (50 estanques de diversos usos y dimensiones).

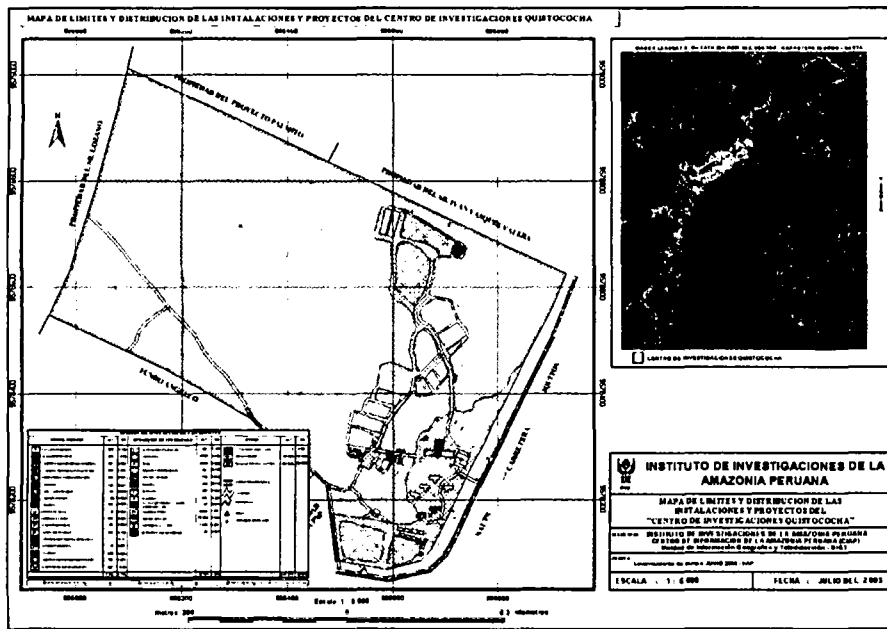


Figura 1. Ubicación geográfica del Centro de Investigaciones de Quistococha (CIQ) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP)

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Un total de 58 ejemplares de la especie paiche (39 adultos y 19 juveniles de 6 años y 3 años, respectivamente) fueron utilizados en el presente estudio. Los peces fueron proporcionados por el subproyecto “Reproducción inducida del paiche (*Arapaima gigas*) y manejo de alevinos en condiciones controladas”, ejecutado por el IIAP y el IRD (Institut de Recherche pour le Développement – Francia) con el financiamiento de INCAGRO (Innovación y Competitividad para el Agro Peruano) y que forman parte del plantel de reproductores y juveniles de la especie paiche *Arapaima gigas* que se crían en el Centro de Investigaciones de Quistococha del IIAP.

3.3. REGISTRO DE DATOS

Al inicio del experimento, se registró el peso y la longitud total de cada ejemplar con la ayuda de una balanza de 100 Kg. de capacidad y una wincha de 5 metros, respectivamente (Figura 2). Posteriormente cada pez fue marcado, introduciéndoles un chip electromagnético de identificación (código numérico de 12 dígitos) en la zona dorsal anterior izquierda del cuerpo. La localización y lectura de los chips en cada ejemplar, fue realizada con la ayuda de un lector de uso veterinario modelo EX Pocket Reader de fabricación estadounidense, proveído por el IIAP (Figura 3).



Figura 2. Registro del peso (A) y la longitud total (B) de los ejemplares de paiche, *Arapaima gigas*.



Figura 3. Búsqueda y lectura del chip electromagnético de identificación en un ejemplar adulto de *Arapaima gigas*, utilizando el lector de chips modelo Ex Pocket Reader.

3.4. TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y OBTENCIÓN DEL PLASMA

Se extrajeron de 3 a 4 ml de sangre de la vena caudal de cada pez con una jeringa de 5 ml debidamente heparinizada (para evitar la coagulación de la sangre) (Figura 4). La sangre colectada fue distribuida en dos o más tubos Eppendorff (1.5 ml) debidamente rotulados y luego trasladados al Laboratorio de Bromatología y Limnología del IIAP dentro de un recipiente térmico (*cooler*) con abundante hielo para proceder con la extracción del plasma sanguíneo.

Cerca de 1 ml de plasma se obtuvo por centrifugación de la muestra de sangre de cada pez (5000 rpm x 6 minutos) utilizando una minicentrífuga (modelo Mini spin, marca Cole Parmer) con capacidad para cargar hasta 6 tubos Eppendorf. Luego de la centrifugación se procedió a retirar el plasma (sobrenadante) con una micropipeta (100 - 1000 μ l) cuidando de no extraer hematíes. El plasma colectado era colocado en tubos Eppendorf debidamente rotulados y posteriormente todas las muestras fueron almacenadas en un

congelador, a una temperatura constante de - 20 °C donde permanecieron hasta su análisis.

Este procedimiento (extracción de sangre y plasma) fue realizado por primera vez en el mes de Junio del 2007. Posteriormente fueron realizadas tomas de muestra de sangre mensuales, entre Febrero y Junio del 2008, haciendo un total de cinco muestreos.



Figura 4. Extracción de sangre de la vena caudal del paiche, *Arapaima gigas*. A: extracción de sangre, B: distribución de la sangre en tubos Eppendorf.

3.5. INMUNOENSAYO (EIA) CON VITELOGENINA (Vtg)

El proceso de sexaje de adultos y juveniles mediante la prueba inmunoenzimática para la cuantificación de la vitelogenina (Vtg), lipoproteína específica de la hembra, fue realizado siguiendo el protocolo propuesto por Núñez *et al.* (1989) para el lenguado *Solea vulgaris*, pero en el caso particular de este estudio, utilizando anticuerpos específicos del paiche nominado como Anti Vtg₁,

que fueron obtenidos, purificados y evaluados en un estudio previo realizado por investigadores del IRD y el IIAP (Dugué *et al.*, 2008).

3.5.1. Protocolo del inmunoensayo con Vtg

El protocolo completo del inmunoensayo con Vtg presenta nueve (9) etapas. Los pasos a seguir en cada etapa son los siguientes:

Etapas 1: Coating del antígeno

Consiste en diluir el plasma de los ejemplares en estudio en una solución tampón de carbonato 0.05 M, pH 9.6. La dilución de cada coating, es distribuida en duplicatas de 100 µl, en cada espacio de una placa especial del fabricante Nunc Maxisorp[®] de 12 x 8 espacios (96 pocitos) para posteriormente ser incubadas por 12 horas a 4°C.

Etapas 2: Primer lavado

Consiste en descartar la solución del coating y luego lavar la placa tres veces, adicionando con ayuda de una micropipeta de 8 canales, 100 µl de tampón fosfato salino (TPS) en cada espacio de la placa, por cada lavada.

Etapas 3: Saturación

Con ayuda de una micropipeta de 8 canales se adiciona en cada espacio de la placa, 100 µl de tampón fosfato con suero de cerdo normal (TPS-SCN 10 mM, pH 7.4 – 9‰ NaCl – 0.05% tween-20 – 4% de suero de cerdo normal). Esta nueva solución es incubada en una estufa por 30 min a 37°C.

Etapa 4: Segundo lavado

Consiste en descartar la solución de la saturación y luego lavar la placa tres veces, adicionando con ayuda de una micropipeta de 8 canales, 100 µl de tampón fosfato salino (TPS) en cada espacio de la placa, por cada lavada.

Etapa 5: Dilución e incubación del anticuerpo primario Anti Vtg₁

Con ayuda de una micropipeta de 8 canales, se adiciona en cada espacio de la placa, 100 µl de la dilución del Anticuerpo Anti Vtg₁ en una solución tampón fosfato salino con suero de cerdo normal (TPS-SCN). Esta nueva solución se incuba en una estufa por 120 min a 37 °C.

Etapa 6: Tercer lavado

Consiste en descartar la solución de la incubación con el Anticuerpo Anti Vtg₁ y luego lavar tres veces, adicionando 100 µl de tampón fosfato salino (TPS) en cada espacio de la placa, por cada lavada.

Etapa 7: Incubación del anticuerpo secundario (Ac2) (Peroxidasa - conjugada con la inmunoglobulina de cabra anti inmunoglobulina de conejo, Sigma A6154).

Con ayuda de una micropipeta de 8 canales, se adiciona en cada espacio de la placa 100 µl del Ac2 diluido (1:3000) en la solución tampón TPS-SCN. Esta nueva solución es incubada en la estufa por 60 minutos a 37 °C.

Etapas 8: Cuarto lavado

Consiste en descartar la solución de la incubación con el Anticuerpo secundario (Ac2) y luego lavar tres veces, adicionando 100 µl de tampón fosfato salino (TPS) en cada espacio de la placa, por cada lavada.

Etapas 9: Revelación de la Peroxidasa

La actividad de la peroxidasa es revelada en oscuridad, adicionando en cada espacio de la placa, 100 µl de la solución ortofenil Diamina o-PD (0.05%) en 10 ml de tampón citrato (pH 5) conteniendo 0.05% de H₂O₂. Se deja actuar la peroxidasa por espacio de 30 min. La coloración de la reacción esperada es marrón-anaranjada. Esto significa que el individuo analizado presenta alta concentración de vitelogenina y por lo tanto sería un individuo hembra, en caso contrario sería un individuo macho.

Para la lectura de la placa, se adiciona 50 µl de ácido sulfúrico en cada espacio de la placa. La densidad óptica (D.O) de la placa es medida en un lector TITERTEK MICRO PLATE READER, usando una longitud de onda de 490 nm, recomendada para este caso.

3.5.2 Optimización del protocolo EIA con Vtg

Con la finalidad de optimizar el protocolo del inmunoensayo (EIA) con vitelogenina para el sexaje del paiche, *A. gigas*, se realizaron dos experimentos de optimización del protocolo en las etapas 1 y 5 del inmunoensayo. El material biológico utilizado para realizar estos experimentos, fueron las muestras de plasma de dos (2) individuos de *Arapaima gigas* cuyos sexos fueron reconocidos

(1 ♂ y 1 ♀) por el previo sacrificio de los mismos y observación directa de las gónadas.

3.5.2.1. Experimento 1:

Fue realizado con el objetivo de encontrar una diferencia sexual en esta especie, que se refleje en la coloración obtenida con las muestras en la placa y en los valores correspondientes de densidad óptica (D.O) debidos a la presencia de la vitelogenina.

En la etapa 5 del inmunoensayo, se aplicaron dos tratamientos de incubación (120 min a 37°C) de las muestras. El primero consistió en incubar las muestras de individuos de ambos sexos junto con el plasma diluido (1:3000) de un paiche macho (ICP♂), con la finalidad de eliminar cualquier reacción inespecífica en las muestras debido a inmunoglobulinas dirigidas contra proteínas del plasma que nos dieran falsos resultados. El segundo consistió en incubar las muestras, pero sin el plasma de un paiche macho (ISP♂) (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de incubación con (ICP♂) y sin (ISP♂) plasma de macho diluido (1:3000) aplicados en individuos ♂ y ♀ del paiche, *Arapaima gigas*.

Tratamientos	Sexo	Tipo de incubación
1	♂	Con plasma de macho (ICP♂)
	♀	
2	♂	Sin plasma de macho (ISP♂)
	♀	

El experimento fue realizado paralelamente con las diluciones aplicadas en el Experimento 2. El mejor tratamiento elegido fue el que presentó los valores de

D.O más altos, obtenidos como resultado de la diferencia de los valores de D.O entre los individuos machos (♂) y hembras (♀) del paiche analizados en este estudio.

3.5.2.2. Experimento 2

Fue realizado con el propósito de evaluar la mejor dilución del plasma (Etapa 1) y del Anti Vtg₁ (Etapa 5) para el protocolo de sexaje. Se aplicaron 12 tratamientos con la combinación de 04 diluciones del plasma (1:1,000; 1:10,000; 1:100,000; 1:1'000,000) con 03 diluciones del Anti Vtg₁ (1:40,000; 1:80,000; 1:120,000) (Tabla 2). Como fue mencionado anteriormente, este experimento fue realizado en paralelo con las diluciones aplicadas en el Experimento 1. El mejor tratamiento elegido fue el que presentó el más alto valor de densidad óptica (D.O).

Tabla 2. Tratamientos de la combinación de 04 diluciones del plasma con 03 diluciones del Anti Vtg₁, evaluados para el protocolo del sexaje del paiche, *Arapaima gigas*.

Tratamientos	Dilución del Plasma	Dilución del Anti Vtg ₁
1	1:1,000	1:40,000
2	1:10,000	1:40,000
3	1:100,000	1:40,000
4	1:1'000,000	1:40,000
5	1:1,000	1:80,000
6	1:10,000	1:80,000
7	1:100,000	1:80,000
8	1:1'000,000	1:80,000
9	1:1,000	1:120,000
10	1:10,000	1:120,000
11	1:100,000	1:120,000
12	1:1'000,000	1:120,000

3.5.3 Sexaje del paiche, *Arapaima gigas* utilizando el inmunoensayo (EIA) con Vtg

Fue realizado con los datos de la densidad óptica (D.O), obtenida de las siguientes muestras evaluadas:

- a) 58 muestras de plasma de paiche *Arapaima gigas* (39 adultos de 6 años y 19 juveniles de 3 años) colectados en el mes de Junio el 2007.
- b) Control positivo (+): Plasma de paiche al cual se le administró una dosis de E₂ para inducir la producción de Vtg y su liberación en la sangre.
- c) Control negativo (-): Plasma de un paiche macho conocido.

3.5.4. Cuantificación de la Vitelogenina (Vtg)

Los niveles plasmáticos de Vtg de cada paiche analizado fueron estimados en mg/ml siguiendo los resultados de purificación y cuantificación de la Vtg reportados por Dugué *et al.* (2008), mediante la siguiente ecuación y fórmula:

Ecuación:

20 mg/ml ----- 3 U de D.O

C ----- [U de D.O (muestra 1, 2, 3.... Etc.) – U de D.O inespecífico]

Fórmula:

$$C = \frac{20 \text{ mg/ml} \times [\text{U de D.O (muestra 1, 2, 3.... Etc.)} - \text{U de D.O inespecífico}]}{3 \text{ U de D.O}}$$

Donde:

C: Concentración en mg/ml de cada muestra

U de D.O (muestra 1, 2, 3....etc.): Valor de la densidad óptica de Vtg en cada muestra.

U de D.O inespecífico: Valor de densidad óptica inespecífico (0.25)

3 U de D.O: Corresponde a 3 unidades de densidad óptica de Vtg

3.5.5. Monitoreo mensual de los niveles de Vtg (mg/ml) en el plasma del paiche, *Arapaima gigas*.

Las muestras evaluadas fueron las siguientes:

- a) Muestras de plasma de 12 hembras adultas de paiche colectadas en un periodo de 5 meses (Febrero a Junio del 2008).
- b) Control positivo (+): Plasma de paiche al cual se le administró una dosis de E₂ para inducir la producción de Vtg y su liberación en la sangre.
- c) Control negativo (-): Plasma de un paiche macho conocido.

3.6. INMUNOENSAYO (EIA) CON LOS ESTEROIDES SEXUALES 17β-ESTRADIOL (17β-E₂) Y 11-K TESTOSTERONA (11-KT).

La identificación y cuantificación de los esteroides sexuales 17 β-E₂ y 11-KT presentes en el plasma de los ejemplares de *Arapaima gigas* del estudio, fueron realizados utilizando kits comerciales adquiridos a la empresa CAYMAN CHEMICALS (Ann Harbor, MI, USA). El protocolo laboratorial aplicado para los análisis siguieron los procedimientos recomendados por el fabricante.

3.6.1. Protocolo de los inmunoensayos con 17β-E₂ y 11-KT

Los protocolos de los inmunoensayos con los esteroides sexuales 17β-E₂ y 11-KT son muy similares y presentan cuatro (4) etapas cada uno. Los pasos a seguir en cada etapa son los siguientes:

Etapas 1: Primera incubación

Consiste en adicionar en los espacios de una placa especial (Nunc Maxisorp[®]) que contiene 12x8 espacios (96 pocitos), la combinación de los

siguientes reactivos (Tampón EIA, Estándar, Indicador y Anticuerpos específicos para cada esteroide), los cuales deben estar distribuidos en los siguientes espacios y componentes: 2 espacios vacíos (Blc), 2 espacios de ligación no específica (NSB), 3 espacios de máxima ligazón (B₀), un espacio de total actividad (TA), 8 espacios de una curva estándar (S1-S8) distribuidos en triplicata y 64 espacios para las muestras de plasma a analizar. Las muestras de plasma de los ejemplares en estudio deben estar previamente extraídas (tres veces con (50:50) de Hexano-Acetato Etanol) y secadas, para luego ser resuspendidos con el tampón y anticuerpo apropiado para cada inmunoensayo. La distribución de estos componentes en la placa se observa en el siguiente esquema (Figura 5).

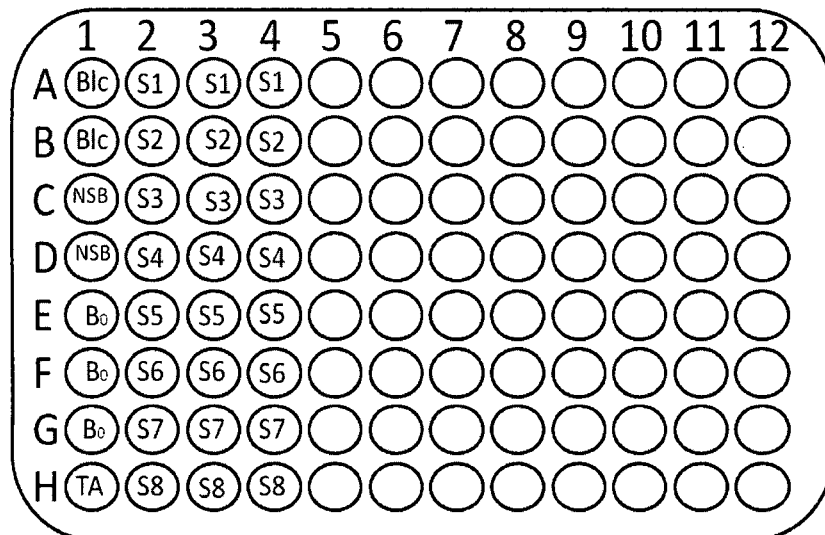


Figura 5. Distribución de los componentes (Blc, NSB, B₀, S1-S8, TA y muestras de plasma) en los espacios de la placa (Nunc Maxisorp[®]) para el inmunoensayo con los esteroides sexuales 11-KT y 17β-E₂.

En las tablas 3 y 4 se muestran la cantidad (μl) y los reactivos que deben presentar cada componente de la placa para el inmunoensayo con 11-KT y 17β-E₂ respectivamente.

Tabla 3. Cantidad (μl) y componentes del Blc, NSB, B₀, S1-S8 y las muestras aplicadas en la etapa 1 (primera incubación) del inmunoensayo con 11-KT.

Espacio	Tampón EIA	11- KT Estándar (1-8)	Plasma de paiche	Indicador 11-KT Acetylcholinesterasa	Antisuero 11-KT
Blc	-	-	-	-	-
NSB	100 μl	-	-	50 μl	-
Bo	50 μl	-	-	50 μl	50 μl
S	-	50 μl	-	50 μl	50 μl
Muestra	-	-	50 μl	50 μl	50 μl

Tabla 4. Cantidad (μl) y componentes del Blc, NSB, B₀, S1-S8 y las muestras aplicadas en la etapa 1 (primera incubación) del inmunoensayo con 17 β -E₂.

Espacio	Tampón EIA	E ₂ Estándar (1-8)	Plasma del paiche	Indicador E ₂ Acetylcholinesterasa	Antisuero E ₂
Blc	-	-	-	-	-
NSB	100 μl	-	-	50 μl	-
Bo	50 μl	-	-	50 μl	50 μl
S	-	50 μl	-	50 μl	50 μl
Muestra	-	-	50 μl	50 μl	50 μl

Posteriormente se cubre la placa con una película plástica, luego se incuba por 18 horas a 4 °C cuando el inmunoensayo es para 11-KT y por 1 hora temperatura ambiente cuando el inmunoensayo es con el 17 β -E₂.

Etapa 2: Lavado

Consiste en descartar la solución de la primera incubación y luego lavar la placa cinco veces, adicionando con ayuda de una micropipeta de 8

canales, 100 µl de tampón de lavado, específicos para cada inmunoensayo (11-KT y 17β-E₂).

Etapas 3: Aplicación del revelador

Con ayuda de una micropipeta de 8 canales, se adiciona en cada espacio de la placa 200 µl de reactivo Ellman's y 5 µl de indicador Acetylcholinesterasa específico para cada esteroide en los espacios de Actividad Total (TA).

Etapas 4: Segunda incubación

Se cubre la placa con película plástica y luego es colocada en una criba vibradora en un cuarto oscuro por un periodo de 60 a 90 min.

Para la lectura de la placa se realiza a una longitud de onda de 405 nm. La placa debe ser leída cuando la absorción de los espacios B₀ estén en el rango de 0.3 – 1.0 de D.O. Si la absorción de esos espacios se excede a 1.5, se lava la placa nuevamente y se agrega el reactivo de Ellman's para una nueva lectura.

3.6.2. Cuantificación de los esteroides sexuales y sexaje del paiche, *Arapaima gigas* utilizando los inmunoensayos (EIA) con 17β-E₂ y 11-KT

La cuantificación de los niveles plasmáticos de 17β-E₂ y 11-KT en pg/ml fueron obtenidos siguiendo el protocolo de análisis de datos del fabricante de los Kits utilizados en estos dos inmunoensayos, a partir de los datos de densidad

óptica (D.O) de las muestras de plasma de paiche, *Arapaima gigas* (39 adultos de 6 años y 19 juveniles de 3 años) colectados en el mes de Junio del 2007.

El sexaje fue determinado a partir de los resultados de las proporciones $17\beta\text{-E}_2/11\text{-KT}$ y $11\text{ KT}/17\beta\text{-E}_2$ expresados en pg/ml.

3.7. CONFIRMACIÓN DEL SEXAJE

Fueron sacrificados un total de 19 individuos de paiche (10 adultos y 9 juveniles) para la observación *in situ* de sus gónadas y así verificar la confiabilidad de las técnicas de sexaje que se evaluaron en el presente estudio.

3.8. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los niveles plasmáticos de vitelogenina, $17\beta\text{-E}_2$ y 11-KT obtenidos en los ejemplares adultos y juveniles fueron procesados mediante estadística descriptiva (promedios, desviación estándar, valores máximos y mínimos) y son presentados a través de gráficos de columnas o barras y gráficos de líneas. Complementariamente se aplicó la prueba de *t* de Student para verificar la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) en las concentraciones plasmáticas de vitelogenina y las hormonas esteroidales ($17\beta\text{-E}_2$ y 11-KT) con respecto a la edad y el sexo de los ejemplares analizados. Adicionalmente, se realizaron gráficos de dispersión, a fin de estimar los coeficientes de correlación lineal de Pearson, entre los niveles plasmáticos de vitelogenina, $17\beta\text{-E}_2$ y 11-KT.

IV. RESULTADOS

4.1. REGISTRO DE DATOS DE LOS PECES

Los peces utilizados en el presente estudio registraron en promedio de peso 62.4 ± 7.0 Kg para los individuos adultos y 6.3 ± 1.3 Kg para los individuos juveniles. En cuanto a la longitud total, los peces adultos presentaron en promedio 184.8 ± 6.1 cm, mientras que los peces juveniles 87.4 ± 5.2 cm (Figuras 6 y 7).

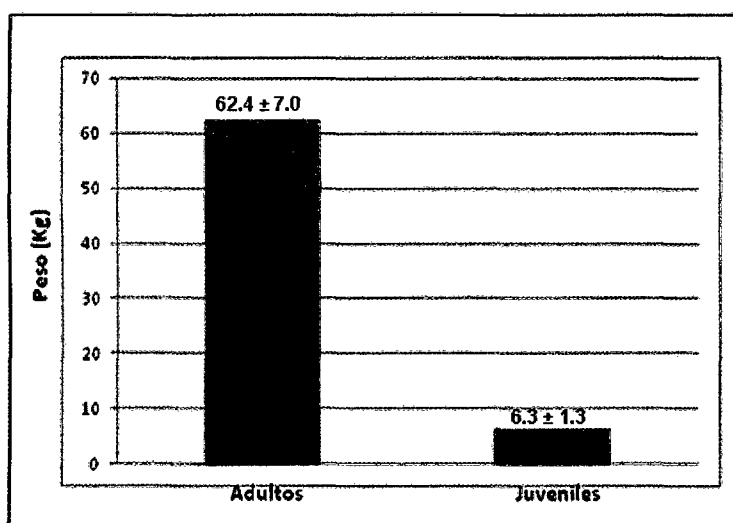


Figura 6. Peso (kg) promedio de 39 individuos adultos y 19 individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas* utilizados en este estudio.

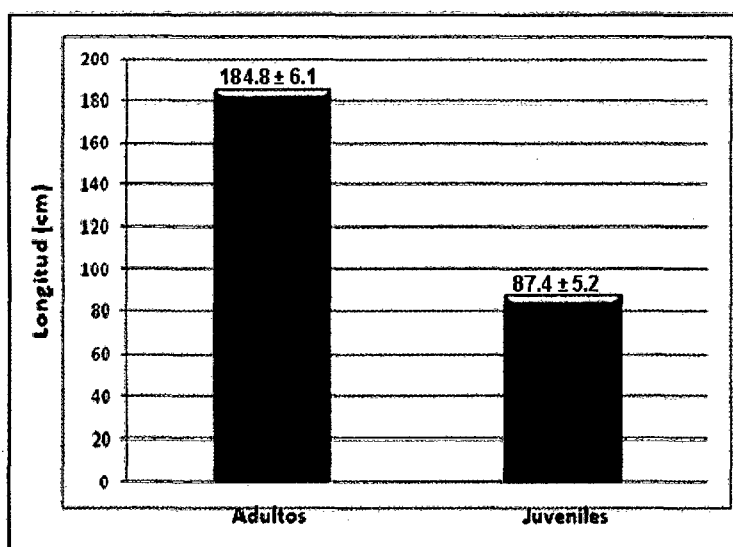


Figura 7. Longitud (cm) promedio de 39 individuos adultos y 19 individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas* utilizados en este estudio.

4.2. INMUNOENSAYO (EIA) CON VITELOGENINA

4.2.1. Optimización del protocolo EIA con Vtg

4.2.1.1. Experimento 1

De acuerdo a los resultados de coloración en la placa y los valores de densidad óptica (D.O), se encontró diferencias entre el tratamiento 1 (individuos (♂ y ♀) que fueron incubados con el plasma de un paiche macho-ICP♂), con el tratamiento 2 (Individuos incubados sin el plasma de un paiche macho-ISP♂).

En el tratamiento 2 se encontró una diferencia sexual menos marcada en cuanto a la coloración en las placas, ambos sexos presentaron una coloración anaranjada, levemente diferenciada; al contrario del tratamiento 1, las hembras presentaron una coloración anaranjada marcada, mientras que los machos se mostraron incoloros (Figura 8).

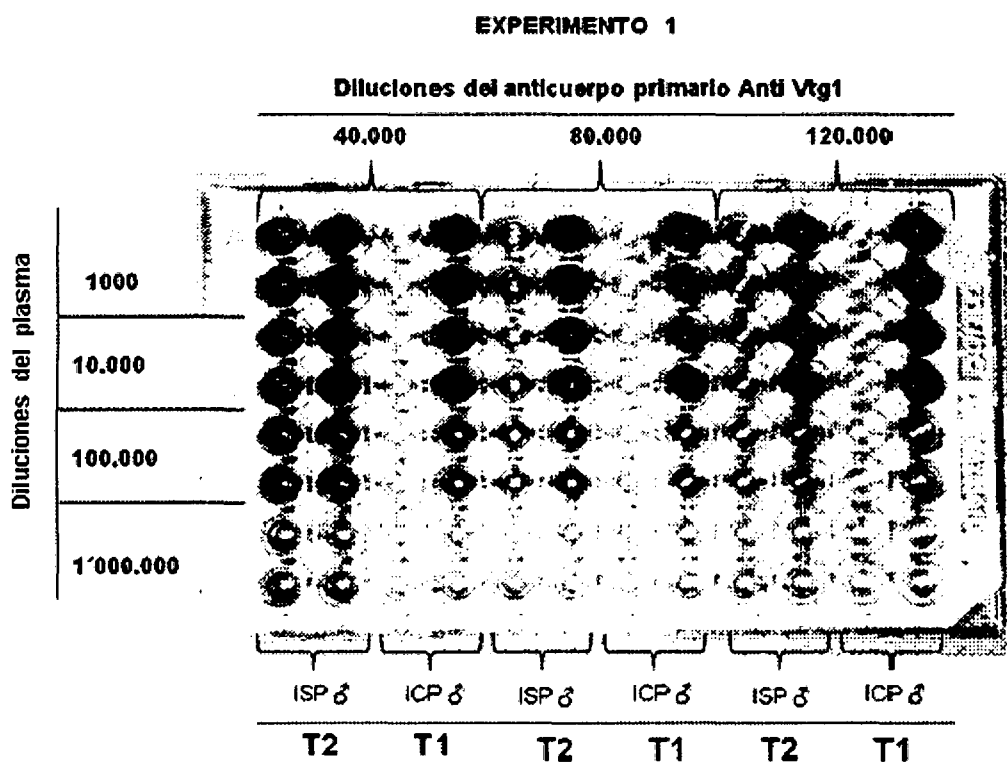


Figura 8. Resultados de coloración en la placa en el experimento 1. Incubación de las muestras con (ICP♂) y sin (ISP♂) el plasma de un paiche macho conocido.

Comparando las diferencias de los valores de D.O entre individuos ♂ y ♀ del paiche, para todas las diluciones del plasma y del Anti Vtg₁ aplicados en este estudio, el tratamiento 1 presentó los más altos valores de estas diferencias con relación al tratamiento 2 (Tabla 5). Este alto valor nos indica que la incubación (ICP♂) es la más apropiada para poder diferenciar el sexo en *Arapaima gigas*.

Tabla 5. Densidad óptica (D.O) promedio de la diferencia entre individuos ♂ y ♀ de *A. gigas* incubados con (ICP♂) y sin (ISP♂) el plasma de un paiche macho, aplicados a la combinación de 4 diluciones del plasma con 3 diluciones del Anti Vtg₁.

Diluciones del Plasma	Promedio de la diferencia de D.O entre ♂ y ♀ del paiche					
	Diluciones del anticuerpo primario Anti Vtg ₁					
	40,000		80,000		120,000	
1,000	1.48	2.67	1.63	1.92	1.24	1.60
10,000	1.48	2.8	1.87	2.09	1.35	1.76
100,000	0.39	1.28	0.33	0.82	0.37	0.59
1'000,000	-0.12	0.22	0.08	0.15	0.05	0.11
Incubación	ISP♂	ICP♂	ISP♂	ICP♂	ISP♂	ICP♂
Tratamientos	T2	T1	T2	T1	T2	T1

4.2.1.2. Experimento 2

Teniendo en cuenta los resultados arriba mencionados, para determinar la dilución del plasma y del anticuerpo primario Anti Vtg 1 más adecuados para el protocolo de sexaje del paiche, solo se trabajó con los datos obtenidos en el tratamiento 1 del experimento 1 (Individuos-ICP♂).

De las cuatro diluciones del plasma (1:1,000; 1:10,000; 1:100,000; 1:1'000,000) y las tres diluciones del anticuerpo primario Anti Vtg 1 (1: 40,000; 1:80,000 y 1:120000) aplicadas en este estudio. Los mejores resultados de

dilución del plasma fueron las diluciones a la 1,000 y 10,000; elegimos la dilución a la 10,000 para limitar un efecto inespecífico ya que ambas diluciones presentan similares resultados de D.O. Los mejores resultados de dilución con el anticuerpo primario Anti Vtg₁ fueron a la 40,000 y 80,000; elegimos la dilución a la 80,000 por ser la nos permitirá usar el Anti Vtg₁ más diluido y así evitar hacer mucho gasto de este anticuerpo en el inmunoensayo (Tabla 5, Figura 9). Por lo tanto, en el experimento 2, el mejor tratamiento elegido para establecer el protocolo de sexaje del paiche fue el tratamiento 6.

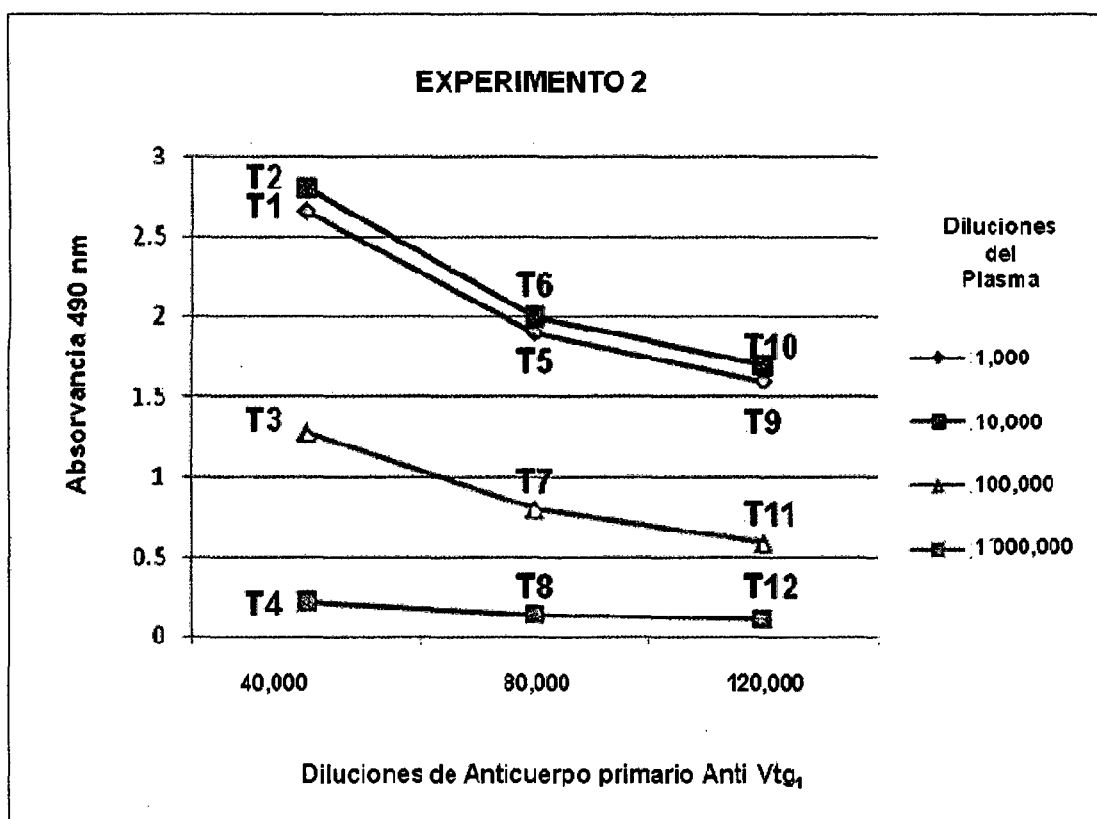


Figura 9. Relación de los valores de densidad óptica (D.O) de la vitelogenina entre las diluciones del plasma y del Anti Vtg₁ aplicados en este estudio a individuos de *Arapaima gigas*.

4.2.2. Sexaje utilizando el EIA con Vtg

4.2.2.1. Sexaje de adultos

Fueron sexados satisfactoriamente 39 individuos adultos del paiche, *Arapaima gigas*. De acuerdo a los resultados de coloración en las placas (Figura 10) y los respectivos valores de D.O. (Figura 11), veinte (20) individuos resultaron machos y diecinueve (19) hembras.

El promedio de valores de D.O. de los machos fue de 0.2 D.O., similar al del control negativo (-), en cuanto los valores de D.O. de las hembras se presentaron entre los rangos de 1.4 a 2.9 (Figura 11).

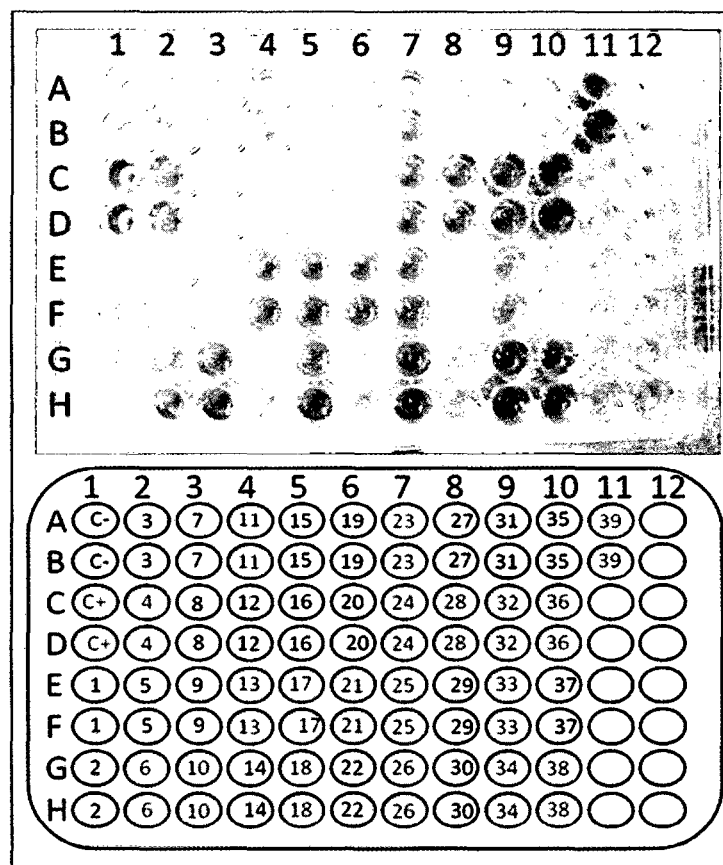


Figura 10. Resultados de coloración en las placas del análisis de sexaje con vitelogenina de 39 individuos adultos de *Arapaima gigas*. C- = Control negativo (plasma de un paiche macho); C+ = Control positivo (plasma de un paiche tratado con E₂); Individuos del paiche = 1 a 39 distribuidos en duplicata. ○ = Individuo hembra; ○ = Individuo macho.

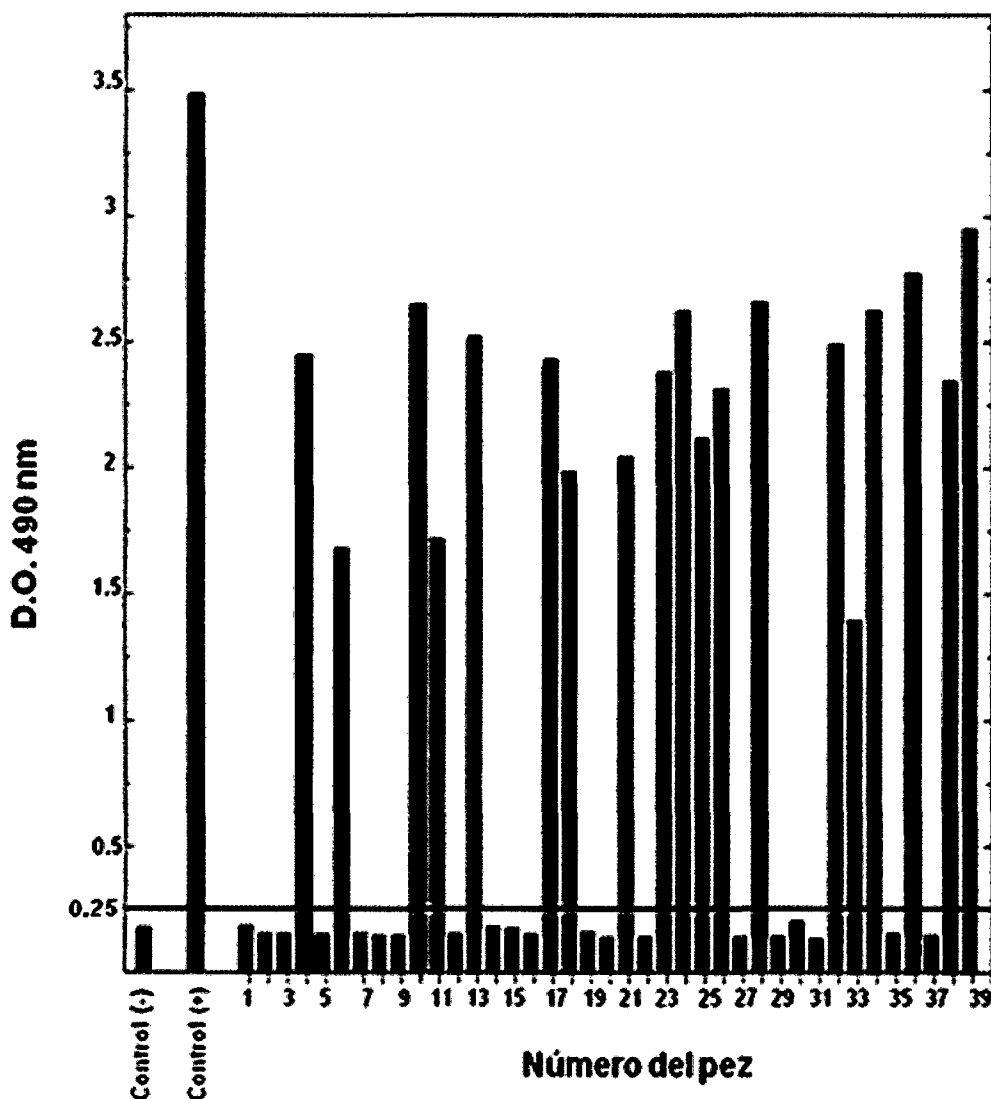


Figura 11. Valores promedio de densidad óptica (D.O) de la Vtg a 490 nm de 39 individuos adultos de *Arapaima gigas*. Las líneas punteadas indican el valor de D.O límite del sexaje (0.25 nm). Individuos con valores de D.O por encima de 0.25 son hembras. Individuos con valores por debajo de 0.25 son machos.

El análisis de cuantificación de los niveles de Vtg en mg/ml, reportó solo en las hembras concentraciones que varían de 7.6 a 18.1 mg/ml. En los machos no se registraron concentraciones de Vtg. En la Figura 12 se muestran los valores promedio de la concentración de Vtg (mg/ml) estimada para los 19 individuos hembras del paiche analizados en este estudio.

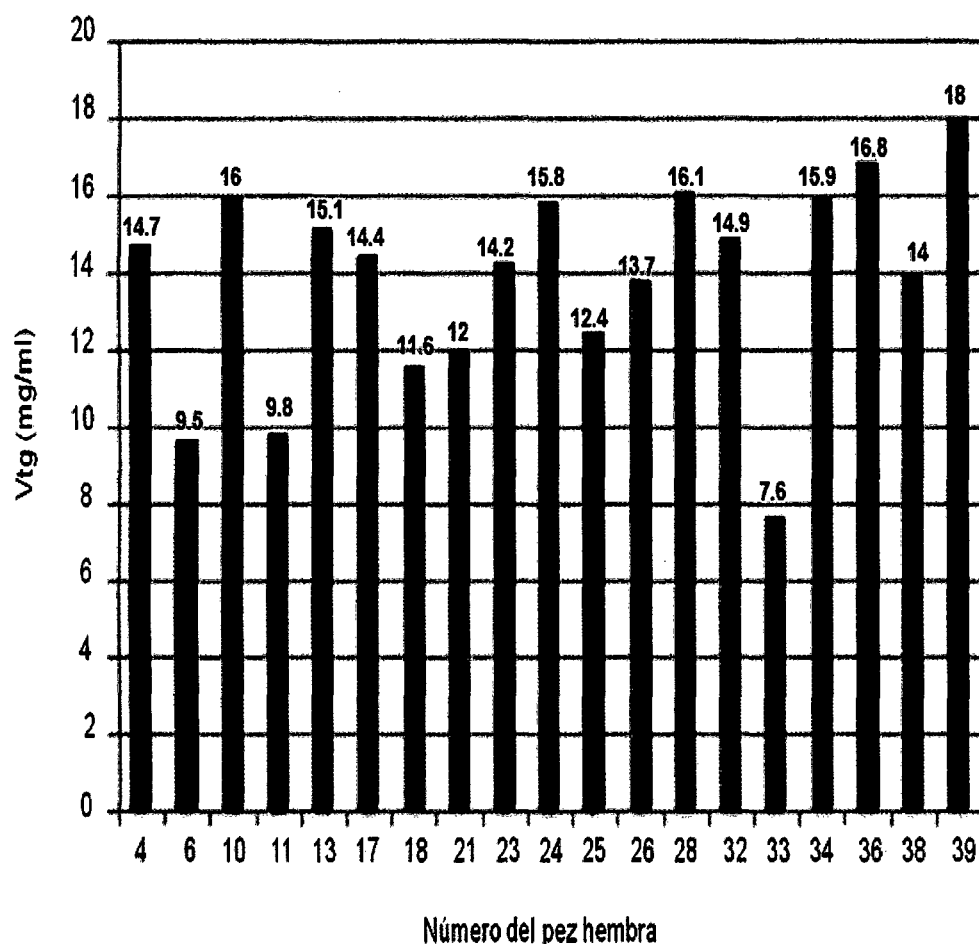


Figura 12. Valores promedios de la concentración de Vtg (mg/ml) en 19 hembras adultas de *Arapaima gigas*.

4.2.2.2. Sexaje de Juveniles

Fueron analizados 19 individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas*. De acuerdo a los resultados de coloración en las placas (Figura 13), los respectivos valores de D.O (Figura 14) y el análisis de estimación de concentración de la Vtg (pg/ml), no se pudo definir el sexo de los individuos analizados.

Los 19 individuos presentaron valores de D.O. similares y por debajo de los valores del control (-), con un promedio de 0.13 (Figura 14). Diferencias entre sexos en la coloración en la placa no se pudo observar. De acuerdo el análisis de estimación de la Vtg en mg/ml, los individuos juveniles analizados no registraron algún tipo de concentración.

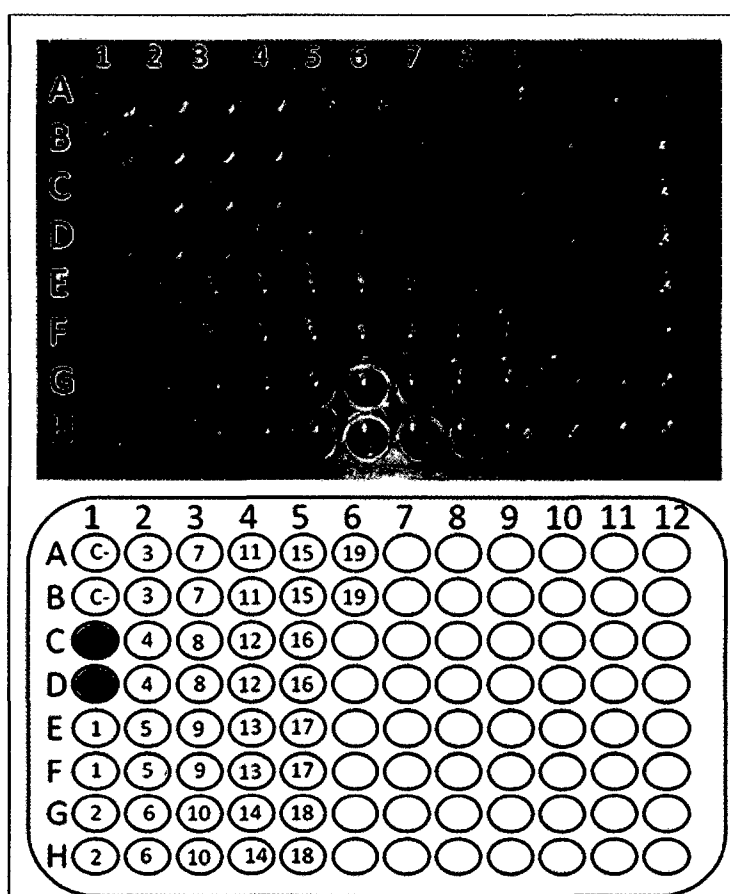


Figura 13. Resultados de coloración en las placas del análisis de sexaje con vitelogenina aplicados a 19 individuos juveniles del paiche *Arapaima gigas*. C-= Control negativo (plasma de un paiche macho); C+= Control positivo (plasma de un paiche tratado con E₂); Individuos del paiche = 1 a 19 distribuidos en duplicata. ● = Indicador de hembra; ○= Indicador de macho.

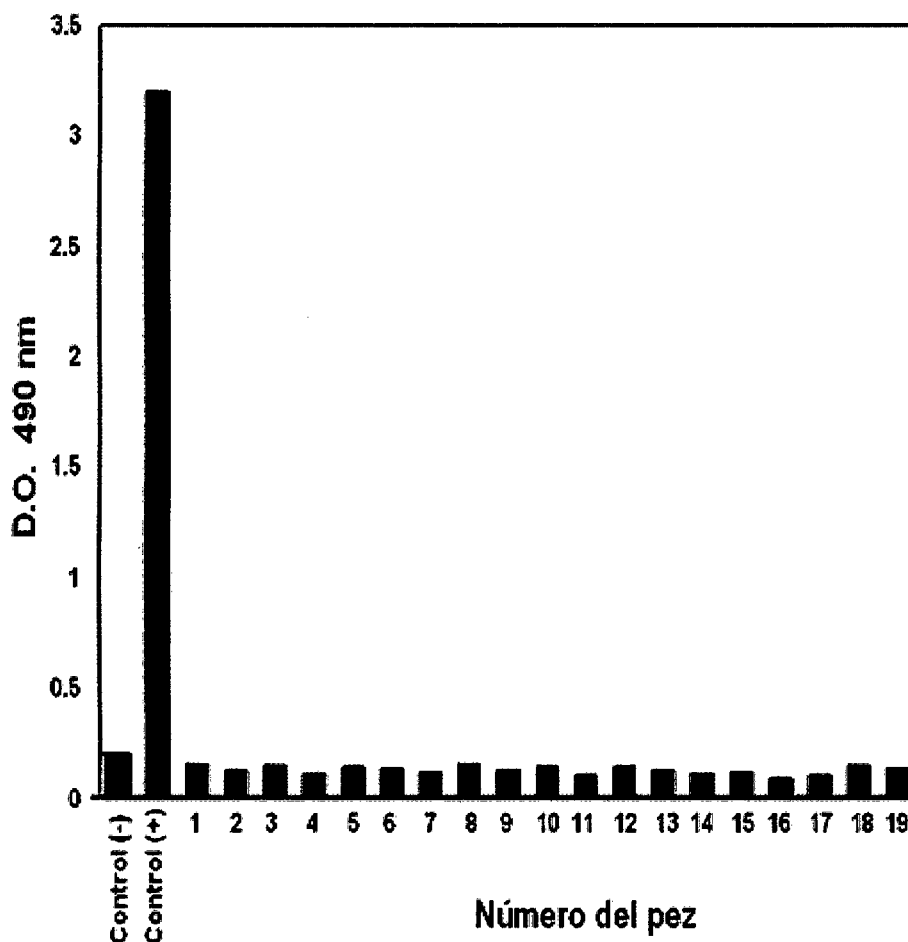


Figura 14. Valores promedios de densidad óptica (D.O) de la Vtg a 490 nm de 19 individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas*.

4.2.3. Monitoreo mensual de la concentración de la Vtg (mg/ml)

El análisis de concentración de la Vtg (mg/ml) realizados en 12 hembras adultas registró que hay presencia de vitelogenina en esta especie durante los meses de Febrero, Marzo, Abril, Mayo y Junio. Los 12 individuos analizados presentaron un patrón de variación similar durante los 5 meses monitoreados (Figura 15). El mes de Abril registró en promedio las concentraciones más bajas (6.1 ± 2.4), mientras que las concentraciones más altas fueron registradas en el mes de Mayo (14.9 ± 4.0) (Figura 16).

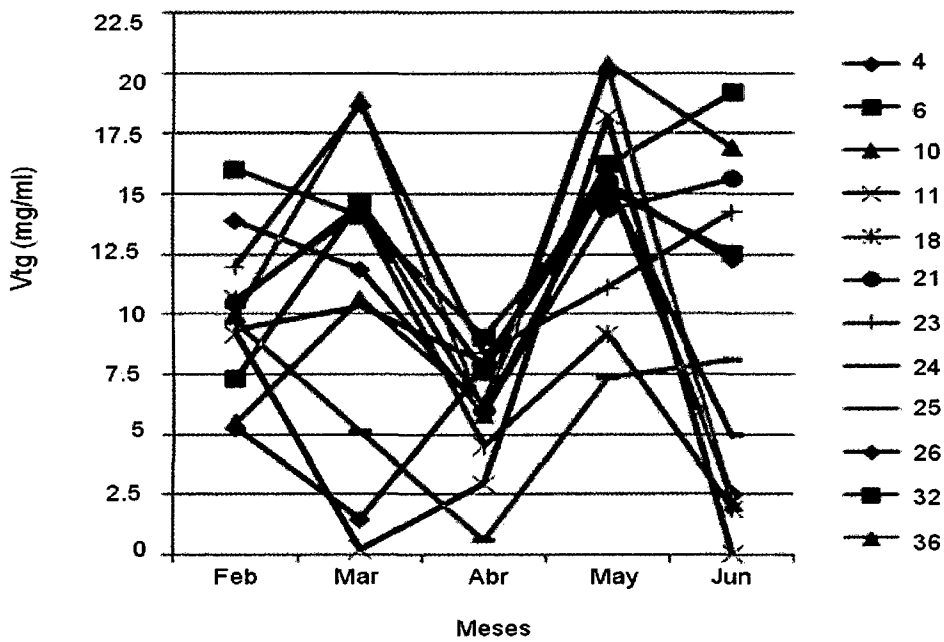


Figura 15. Niveles de Vtg (mg/ml) de 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero-Junio del 2008).

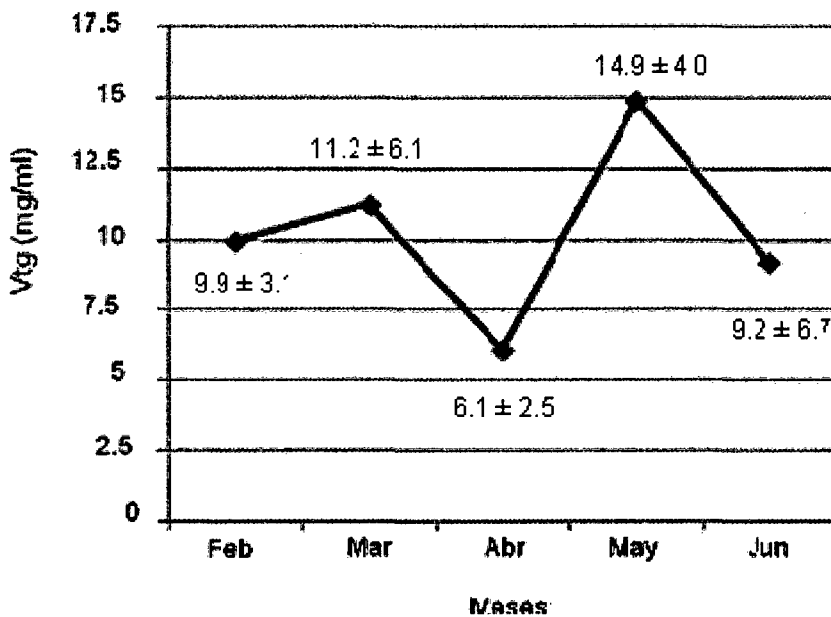


Figura 16. Niveles promedio de la Vtg (mg/ml) de 12 hembras adultas de paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero-Junio del 2008).

4.3. INMUNOENSAYO (EIA) CON 17 β -E₂ y 11-KT

4.3.1. Niveles plasmáticos de 17 β -E₂ y 11-KT (pg/ml)

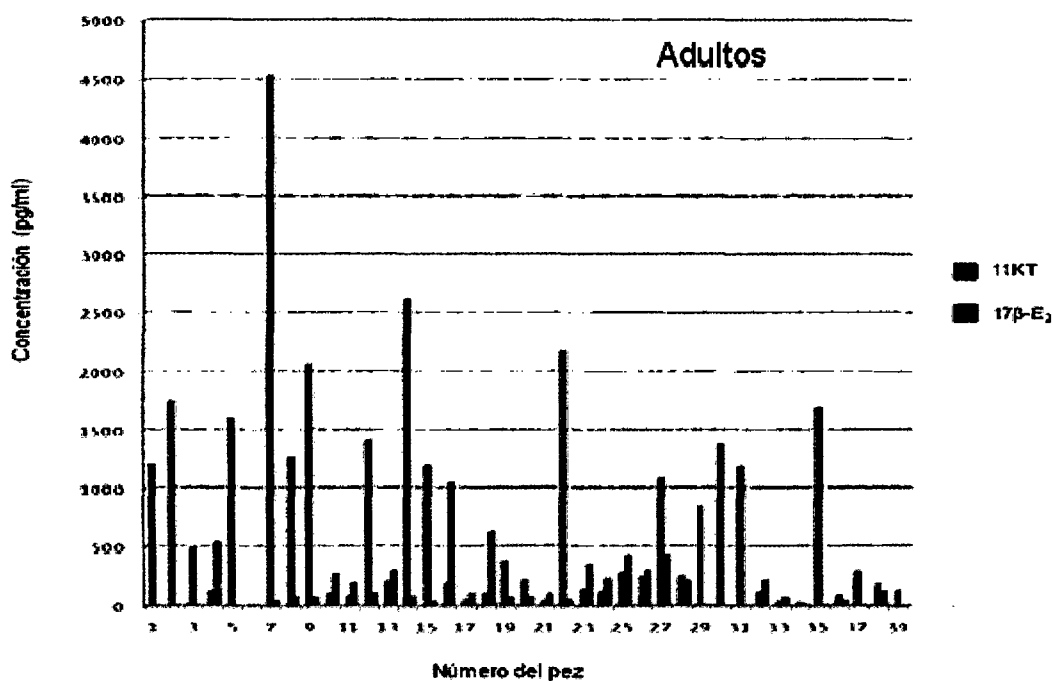


Figura 17. Niveles plasmáticos de 17 β -E₂ y 11-KT (pg/ml) de 39 individuos adultos del paiche, *Arapaima gigas*.

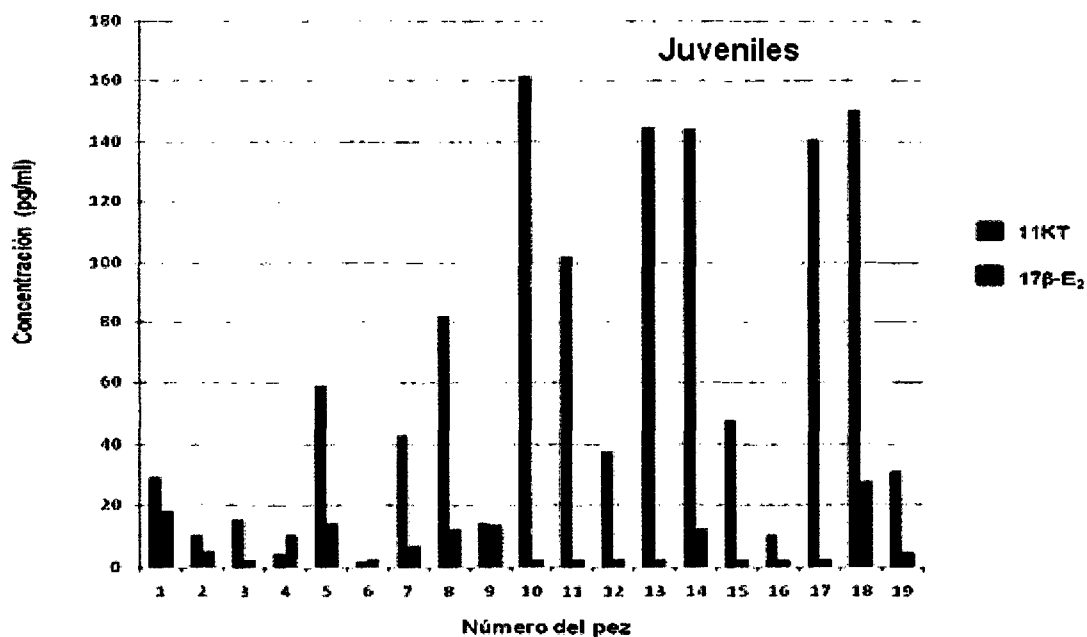


Figura 18. Niveles plasmáticos de 17 β -E₂ y 11KT (pg/ml) de 19 individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas*.

Los niveles plasmáticos de $17\beta\text{-E}_2$ y 11-KT se presentaron en concentraciones muy bajas en los individuos juveniles, cuando comparados con los adultos (Tabla 6). Sin embargo, tanto en adultos como en juveniles del paiche, los niveles plasmáticos de $17\beta\text{-E}_2$ fueron bajos en comparación a los del 11-KT. Los niveles plasmáticos del $17\beta\text{-E}_2$ variaron de una concentración de 2.0 a 637.8 pg/ml en adultos y de 2.4 a 27.7 pg/ml en juveniles, mientras que los del 11-KT variaron de 6.0 a 4,536.9 pg/ml en adultos y de 1.8 a 161.3 pg/ml en juveniles (Figuras 17 y 18).

4.3.2. Sexaje utilizando el EIA con $17\beta\text{-E}_2$ y 11-KT.

4.3.2.1. Sexaje de adultos

Los valores de las proporciones 11-KT/ $17\beta\text{-E}_2$ y $17\beta\text{-E}_2$ /11-KT obtenidos de 39 paiches adultos nos permitió diferenciarlos sexualmente, obteniéndose como resultado 20 individuos machos y 19 hembras (Figura 19).

A partir de la proporción 11-KT/ $17\beta\text{-E}_2$, se consideró hembras a aquellos peces que mostraron un valor por debajo de 2.5, mientras que los individuos que presentaron valores por encima de 2.5 fueron considerados machos. La proporción $17\beta\text{-E}_2$ /11-KT, consideró hembras a aquellos peces que mostraron una relación superior a 0.4 (1/2.5).

4.3.1.2. Sexaje de juveniles

Para diferenciar sexualmente los juveniles de *A. gigas*, fueron tomados los mismos criterios establecidos en las proporciones 11-KT/ $17\beta\text{-E}_2$ y $17\beta\text{-E}_2$ /11-KT para los paiches adultos. De un total de 19 peces, 14 individuos resultaron machos y 5 hembras (Figura 20).

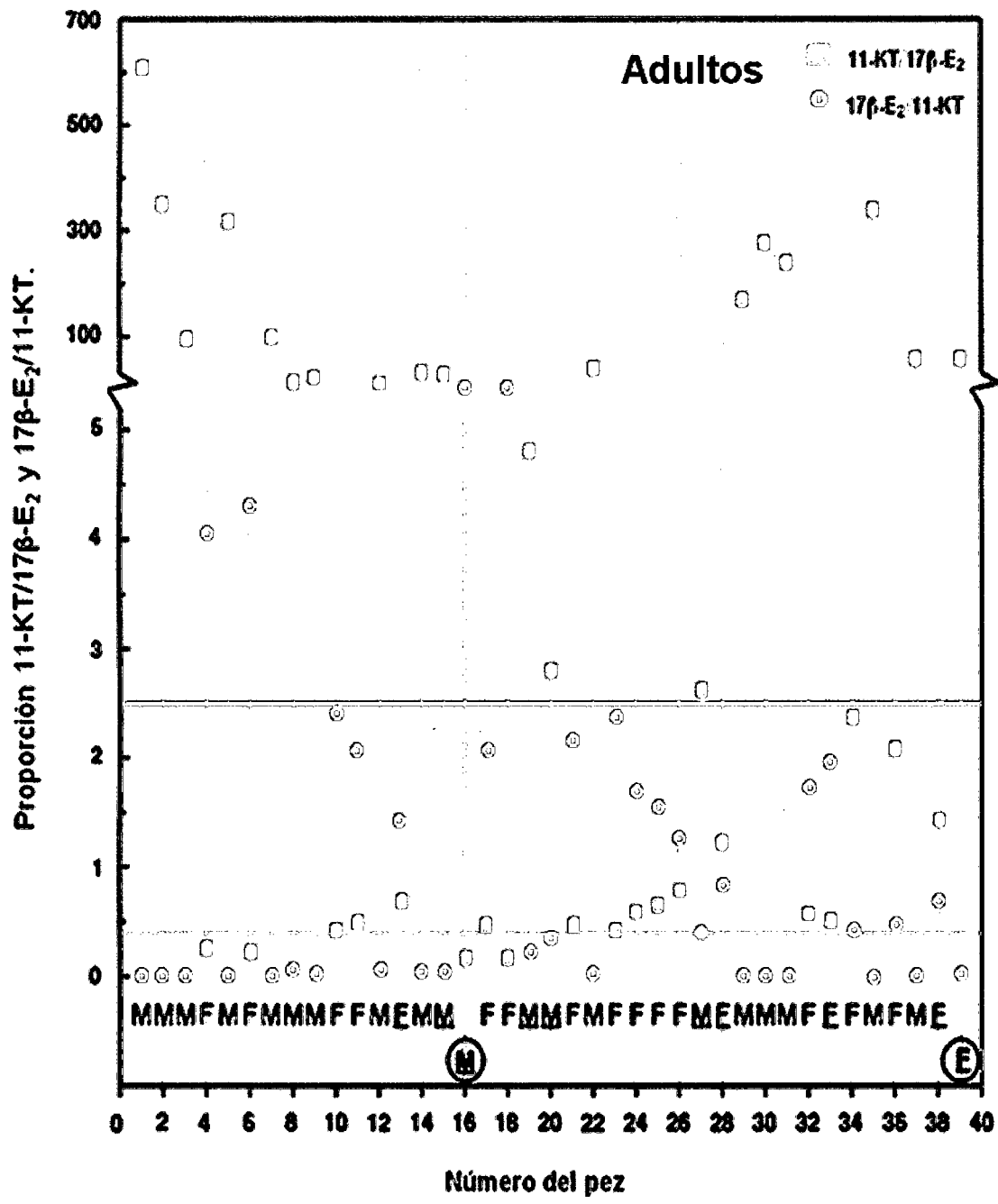


Figura 19. Determinación del sexo en paiches adultos usando las proporciones 11-KT/17β-E₂ y 17β-E₂/11-KT. Letras en negritas y encerradas en círculos indican peces erróneamente sexados (2 de 39). Las letras subrayadas indican el sexo real del pez, observado luego de sacrificar a los animales.

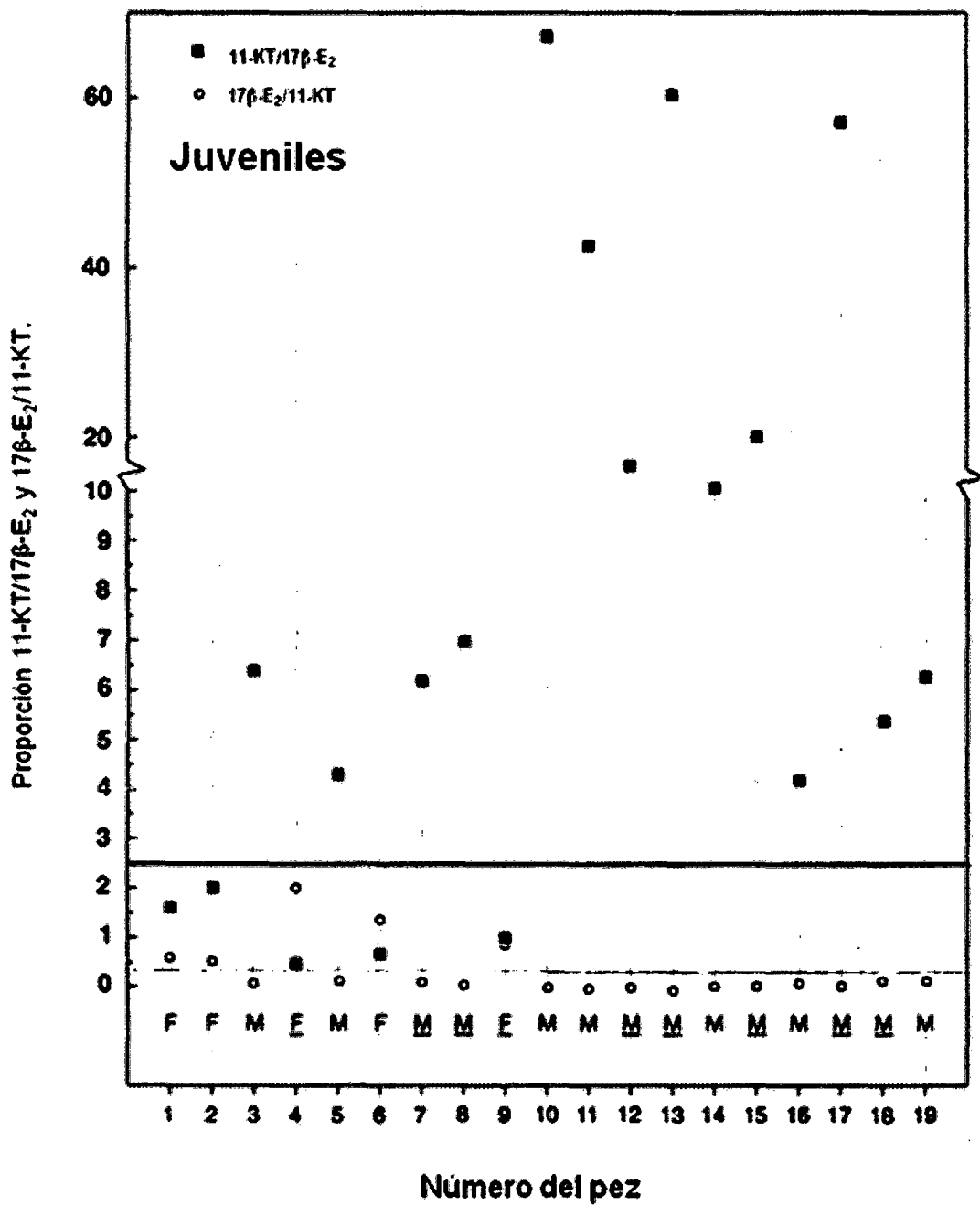


Figura. 20. Determinación del sexo en paiches juveniles usando las proporciones 11-KT/17β-E₂ y 17β-E₂/11-KT. Las letras subrayadas indican el sexo real del pez, observado luego de sacrificar a los animales.

4.4. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE Vtg, 11-KT y 17 β -E₂ CON RESPECTO A LA EDAD Y EL SEXO DEL PAICHE

Las pruebas de *t* de Student aplicadas a las concentraciones de Vtg, 11-KT y 17 β -E₂, demostraron que existen diferencias estadísticas significativas entre animales de distintos sexos ($P < 0.05$). En los individuos adultos, la diferencia estadística fue altamente significativa para la Vtg ($P < 0.0001$), el 17 β -E₂ ($P = 0.0008$) y el 11-KT ($P < 0.0001$) (Tabla 6, Figura 21). En los individuos juveniles, sólo el 11-KT reportó diferencias estadísticas entre sexos ($P = 0.0119$), con el 17 β -E₂ no se encontró diferencias significativas ($P = 0.4401$) y con la Vtg no se pudo aplicar la prueba, pues no se reportaron niveles plasmáticos de la Vtg para los individuos juveniles de este estudio (Tabla 6, Figura 22).

Tabla 6. Media \pm D.S, Valores mínimos-máximos y prueba de *t* de Student de los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) y los esteroides sexuales 17 β -E₂ y 11-KT (pg/ml) entre sexos en individuos adultos y juveniles del paiche, *Arapaima gigas*.

Análisis	Parámetros	Adultos		Juveniles	
		Hembras	Machos	Hembras	Machos
Vtg (mg/ml)	Media \pm D.S	13.82 \pm 2.7	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
	Valor min-max	7.61 – 18.01	0.0 - 0.0	0.0 - 0.0	0.0 - 0.0
	<i>t</i> de Student	< 0.0001		-----	
17 β -E ₂ (pg/ml)	Media \pm D.S	230.5 \pm 176.5	58.98 \pm 97.89	9.76 \pm 6.26	6.85 \pm 7.29
	Valor min-max	9.9 - 637.8	2 - 434.1	2.4 – 18	2.4 - 27.7
	<i>t</i> de Student	0.0008		0.4401	
11-KT (pg/ml)	Media \pm D.S	126.7 \pm 79.6	1457.9 \pm 987.5	11.9 \pm 10.65	83.49 \pm 55.45
	Valor min-max	6.0 - 280.4	218.1 - 4536.9	1.8 - 29.0	10 - 161.3
	<i>t</i> de Student	< 0.0001		0.0119	

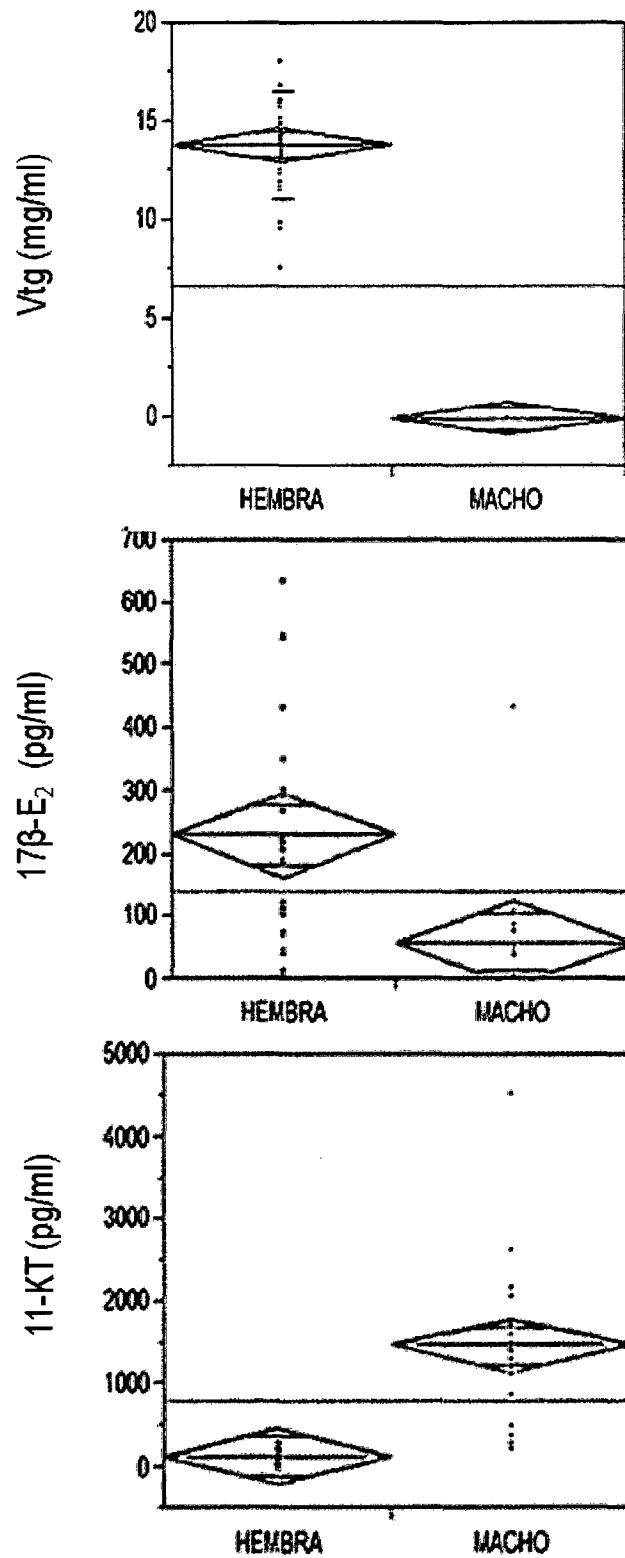


Figura 21. Prueba de *t* de Student de los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) y los esteroides sexuales 17β-E₂ y 11-KT (pg/ml) entre sexos en individuos adultos del paiche, *Arapaima gigas*.

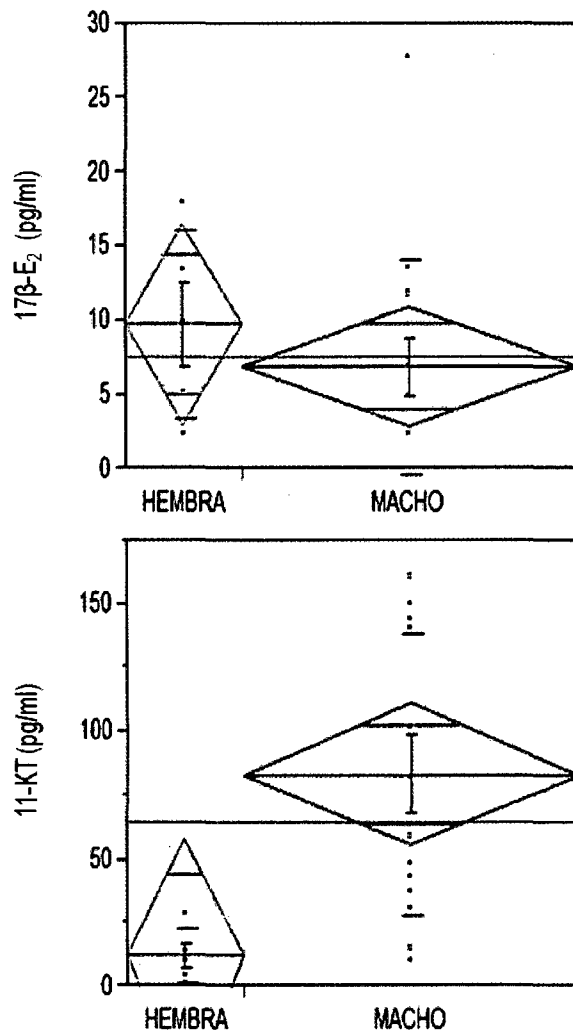


Figura 22. Prueba de *t* de Student de los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales 17β -E₂ y 11-KT (pg/ml) entre sexos en individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas*.

El análisis de correlación de Pearson aplicado a adultos del paiche demostró que los niveles plasmáticos de Vtg están positivamente correlacionados con los niveles plasmáticos del 17β -E₂ ($R = 0.23892$), a diferencia del 11-KT, donde la correlación fue negativa ($R = -0.6391$) (Figura 23).

Tanto en adultos como en juveniles existe una correlación negativa entre los esteroides sexuales 11KT y 17β -E₂, siendo para adultos, $R = -0.3111$ y para los juveniles $R = -0.3265$. (Figuras 23 y 24).

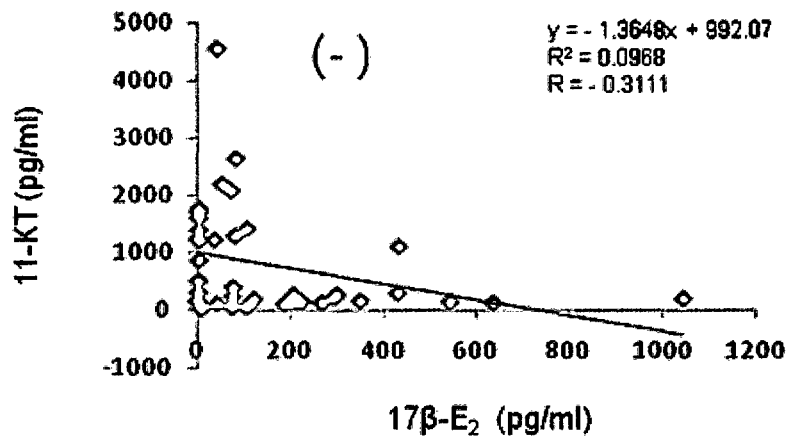
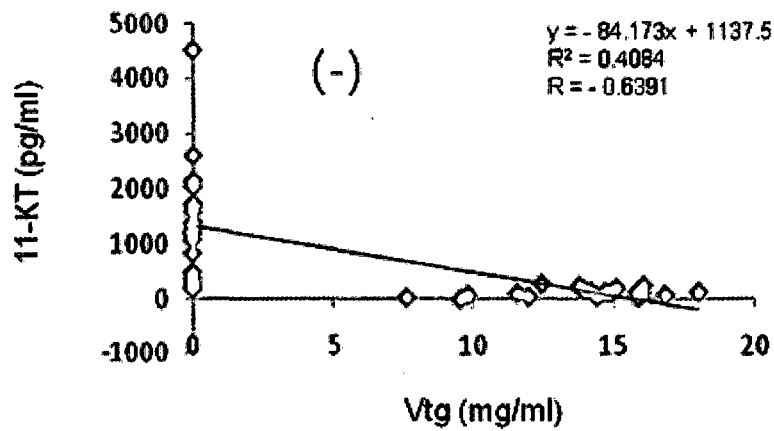
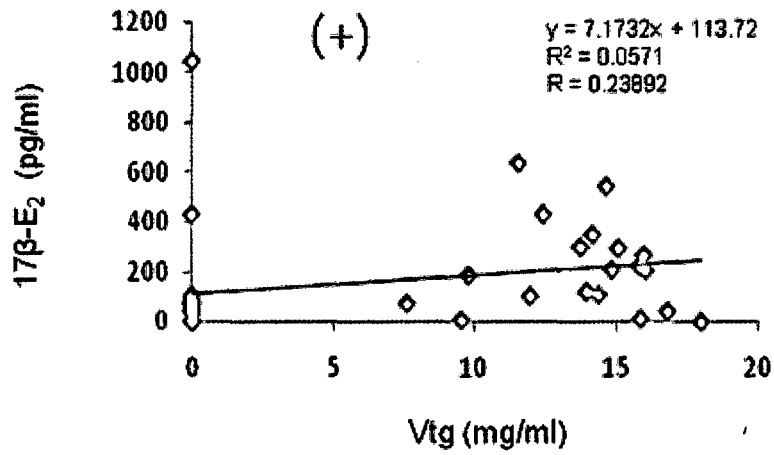


Figura 23. Correlación entre los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) y los esteroides sexuales 17β-E₂ y 11-KT (pg/ml) en individuos adultos del paiche, *Arapaima gigas*.

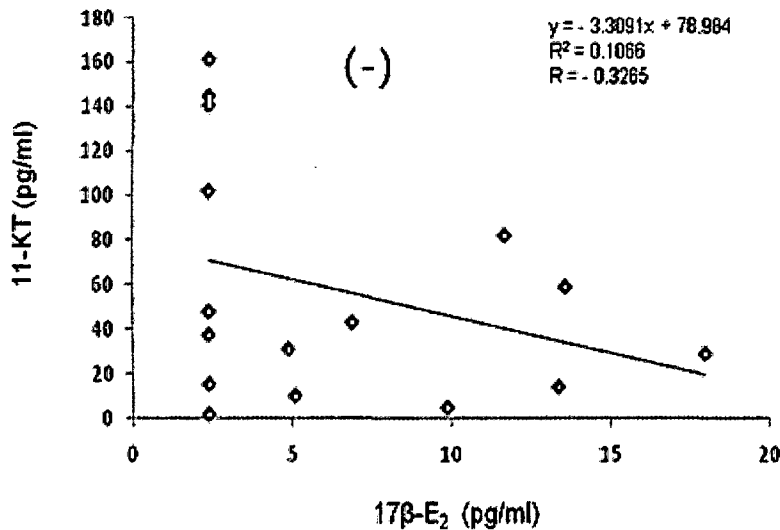


Figura 24. Correlación entre los niveles plasmáticos de 17β-E₂ y 11-KT (pg/ml) en individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas*.

4.5. CONFIRMACIÓN DEL SEXAJE

4.5.1. Confirmación del sexaje de Adultos

De un total de 39 peces, 37 ejemplares (19 machos y 18 hembras) presentaron resultados similares en la identificación de su sexo con los inmunoensayos aplicados (Vtg, 17β-E₂ y 11-KT), por lo tanto atribuimos que fueron correctamente sexados (Tabla 7), a excepción de 2 ejemplares (Números: 16 y 39), cuyo sexo real fue confirmado por observación directa de las gónadas, resultado que sólo coincidió con los resultados de sexaje con Vtg para ambos casos.

La identificación del sexo por observación *in situ* de las gónadas (Figuras 25B y 26B) de 10 ejemplares (5 machos y 5 hembras) sacrificados, confirmaron la eficacia del inmunoensayo con Vtg, el 100% de los ejemplares sacrificados (10 de 10) fueron correctamente sexados por este inmunoensayo. En cuanto a la eficacia de los inmunoensayos con los esteroides sexuales (17β-E₂ y 11-KT), solo el 80% (8 de 10) fueron correctamente sexados (Tabla 7).

Tabla 7. Confirmación del sexaje entre los análisis de Vtg, 11-KT, 17 β -E₂ y la observación *in situ* de las gónadas en individuos adultos del paiche, *Arapaima gigas*.

● = Indicador de hembra (H); ○ = Indicador de macho (M).

Nº	Código (chip)	Sexaje		
		Vtg	11-KT y 17 β -E ₂	Gónadas
1	939-22351	M	M	
2	939-27494	M	M	
3	939-21973	M	M	
4	939-26531	H	H	
5	939-26434	M	M	
6	939-30380	H	H	
7	939-26994	M	M	
8	939-22733	M	M	
9	939-23861	M	M	
10	939-25886	H	H	
11	939-29242	H	H	
12	939-23906	M	M	
13	939-21920	H	H	H
14	939-23531	M	M	
15	939-29036	M	M	M
16	939-21586	M	H	M
17	939-23643	H	H	
18	939-29515	H	H	
19	939-26108	M	M	M
20	939-29830	M	M	M
21	939-25632	H	H	
22	939-31063	M	M	
23	939-24411	H	H	
24	939-23681	H	H	
25	939-23247	H	H	
26	939-21025	H	H	
27	939-25326	M	M	M
28	939-29676	H	H	H
29	939-30539	M	M	
30	939-21647	M	M	
31	939-24775	M	M	
32	939-22123	H	H	
33	939-30415	H	H	H
34	939-27304	H	H	
35	939-28195	M	M	
36	939-23922	H	H	
37	939-21404	M	M	
38	939-22880	H	H	H
39	939-22429	H	M	H

4.5.2. Confirmación del sexaje de Juveniles

La confirmación del sexaje en los juveniles solo pudo ser realizada con los esteroides sexuales (17β -E₂ y 11-KT) y la observación *in situ* de las gónadas (Figuras 25A y 26A). Los resultados del inmunoensayo con Vtg no permitieron definir el sexo en los juveniles. De un total de 19 juveniles, 9 fueron sacrificados para comprobar la efectividad del método mediante la observación directa de sus gónadas. Cabe indicar que el 100% (9 de 9) de los peces sacrificados fueron correctamente sexados con los inmunoensayos de 17β -E₂ y 11-KT (Tabla 8). En el caso de los 10 juveniles no sacrificados, el sexo fue atribuido aplicando directamente la proporción de esteroides sexuales hallados en el plasma.

Tabla 8. Confirmación del sexaje entre los análisis de 11-KT, 17β -E₂ y la observación *in situ* de las gónadas en individuos juveniles del paiche, *Arapaima gigas*.

● = Indicador de hembra (H); ○ = Indicador de macho (M).

Nº	Código (chip)	Sexaje	
		11-KT y 17β -E ₂	Gónadas
1	939-27463	H	
2	939-20944	H	
3	939-27732	M	
4	939-21874	H	H
5	939-30553	M	
6	939-27952	H	
7	939-28207	M	M
8	939-29959	M	M
9	939-29453	H	H
10	939-22090	M	
11	939-25276	M	
12	939-23172	M	M
13	939-23254	M	M
14	939-27829	M	
15	939-21275	M	M
16	939-21539	M	
17	939-27974	M	M
18	939-23794	M	M
19	939-23317	M	

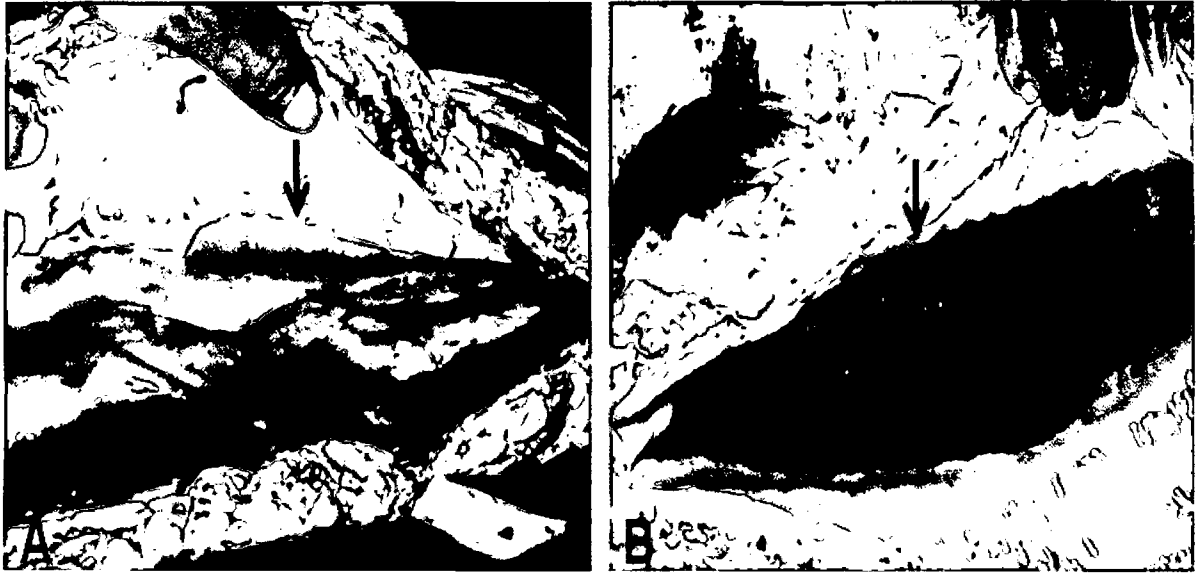


Figura 25. Gónada femenina del paiche, *Arapaima gigas*. A: hembra juvenil, B: hembra adulta.



Figura 26. Gónada masculina del paiche, *Arapaima gigas*. A: macho juvenil, B: macho adulto.

V. DISCUSIÓN

La determinación del sexo en peces que tienen gran potencial para la acuicultura es absolutamente necesaria para obtener una adecuada proporción sexual de los reproductores y así asegurar su reproducción en cautiverio. Sólo garantizando dicho proceso se podrá asegurar una buena producción de larvas y así su cultivo a gran escala.

En el *A. gigas*, la identificación del sexo se ha convertido en uno de los retos más grandes para su adecuado cultivo y reproducción en cautiverio. Algunos investigadores han mencionado varias características, tales como la forma general del cuerpo, el color y la estructura de la papila anal, como potenciales indicadores de diferenciación sexual en esta especie (Imbiriba, 1991; Saavedra-Rojas *et al.*, 2005; Alcántara *et al.*, 2006). Sin embargo, estos caracteres morfológicos secundarios no son considerados lo suficientemente confiables para distinguir el sexo en esta especie, tanto del medio natural como de ambientes controlados (Saavedra-Rojas *et al.*, 2005), lo que limita el éxito reproductivo y su cultivo con miras a una producción en gran escala que responda la demanda del mercado local e internacional de esta especie (Mueller, 2006).

5.1. Determinación del sexo de *Arapaima gigas* utilizando la vitelogenina

La vitelogenina (Vtg) es una glico-lipo-fosfoproteína de alto peso molecular (250 - 600 kDa) presente durante el ciclo reproductivo de hembras de teleósteos y otros vertebrados ovíparos. Esta proteína es sintetizada en el hígado bajo un control estrogénico y transportado hacia los ovarios por el torrente sanguíneo, de donde es progresivamente captada y procesada por los ovocitos en crecimiento durante la etapa conocida como vitelogénesis, hasta constituir la principal reserva

nutricional de los huevos (el vitelo) de todos los animales ovíparos y que son esenciales en el desarrollo del embrión y las larvas (Wallace & Selman, 1981).

Debido a que la Vtg es un indicador del estadio reproductivo de las hembras, su estudio ha representado una invaluable herramienta para la determinación del sexo en peces adultos, como fue reportado en estudios realizados con el atún cola amarilla (Takemura & Oka, 1998), el esturión siberiano (Ceapa *et al.*, 2002), y los salmónidos (Pottinger *et al.*, 2005). En el presente estudio, la identificación del sexo de los paiches adultos (6 años) ha sido alcanzada utilizando un adecuado protocolo de EIA, el cual es más rápido que el clásico análisis de vitelogenina previamente utilizado en el esturión siberiano y en salmónidos (Ceapa *et al.*, 2002; Pottinger *et al.*, 2005), y es más sensible que la técnica de radio-inmuno-difusión (RIA) utilizada para el atún cola amarilla (Takemura & Oka, 1998).

El uso de esta técnica y los resultados obtenidos en el presente estudio, abre las puertas para que en el futuro cercano sea posible la determinación del sexo de otras especies de osteoglosidos, cercanos filogenéticamente al paiche, tales como el pez africano *Heterotis niloticus*, las arahuanas amazónicas (*Osteoglossum bicirrhosum* y *O. ferreirae*) y la arahuana asiática (*Scleropages* spp.).

Teniendo ya establecido el protocolo de sexaje con Vtg para el paiche, el monitoreo de los niveles plasmáticos de Vtg en los planteles de hembras adultas en las estaciones de piscicultura se hace necesario a fin de estudiar sus fluctuaciones mensuales y anuales, datos que puedan ser correlacionados con el comportamiento de los peces, el desarrollo gonadal de los mismos y la ocurrencia/ausencia de eventos reproductivos (desoves) en acuicultura. En el

presente estudio se evaluó mensualmente durante el periodo de cinco meses (Febrero, Marzo, Abril, Mayo y Junio) los valores de la Vtg (D.O) en esta especie. A pesar de que los meses de Abril, Mayo y Junio no corresponden al periodo de máxima intensidad de reproducción reportada para esta especie, el cual es de Setiembre a Marzo (Alcántara *et al.*, 2006; Chu-Koo & Tello, 2010), los resultados señalan que esta especie tiene Vtg en esos meses, indicando que puede reproducirse en esa época del año. Estos datos coinciden con los reportes de desoves del paiche en ambientes controlados, el cual ocurre durante todo el año (Rebaza *et al.*, 2003; Chu-Koo & Tello, 2010).

5.2. Determinación del sexo de *Arapaima gigas* utilizando esteroides sexuales

Los esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos) regulan muchos procesos fisiológicos en los peces, incluyendo la reproducción, el crecimiento y el mecanismo homeostático tal como el balance de agua y energía. Estos esteroides son en particular reguladores integrales del comportamiento reproductivo y la diferenciación gonadal en los vertebrados. Dentro de los andrógenos más estudiados están en particular la Testosterona (T) y el 11-K Testosterona (11-KT); mientras que dentro de los estrógenos está el 17 β -estradiol (17 β -E₂) (Devlin & Nagahama, 2002). En peces, la Testosterona no está directamente implicada en los mecanismos de maduración sexual, pero juega un rol intermediario como precursora del 11-KT y el 17 β -E₂ (Chang *et al.*, 1999). El 11KT estimula el comportamiento sexual y la espermatogénesis en machos (Borg, 1994), mientras que el 17 β -E₂ estimula el comportamiento sexual y la vitelogénesis en hembras (Piferrer, 2001).

Existen muchos estudios utilizando esteroides sexuales como una herramienta en la determinación del sexo en peces. Algunos autores han determinado la presencia del esteroide sexual 11-KT antes de la diferenciación sexual de algunas especies de peces como la tilapia, *Oreochromis niloticus* (Kwon *et al.*, 2001); la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Guiguen *et al.*, 2000) y la lisa, *Mugil cephalus* (Chang *et al.*, 1995) y resaltaron el importante papel de este esteroide en la diferenciación sexual de estas especies. Por el contrario, Webb *et al.*, (2002) estudiando el esturión, *Acipenser transmontanus* señalan que las concentraciones de los esteroides sexuales T, 11-KT, 17β -E₂ son bajas y casi indetectables antes de la diferenciación gonadal de esta especie. Otros autores han correlacionado algunas características morfológicas con los esteroides sexuales, como Malekzadeh *et al.*, (2006) quienes analizando los niveles de esteroides sexuales y los parámetros de longitud furcal del esturión persa, lograron determinar el sexo y los estadios de maduración de esta especie con un 91 % de certeza y Ohta *et al.*, (2007) lograron determinar que el cambio de color en la aleta anal durante la reversión sexual de adultos de *Pseudolabrus sieboldi*, un pez marino hermafrodita, está positivamente correlacionado con los niveles de 11-KT en el plasma, indicando que este andrógeno sexual podría jugar un rol principal en los cambios de coloración de esta especie durante el periodo reproductivo.

En *A. gigas*, el conocimiento empírico de la coloración anaranjada intensa de los machos adultos como una característica sexual secundaria en esta especie, fue positivamente correlacionado con el análisis por radio-inmunoensayo (RIA) de fase sólida de los esteroides sexuales testosterona (T), 17β -estradiol (17β -E₂) y 17alfa-hidroxiprogesterona (17α OHP), validando la utilidad de este

carácter en la identificación del sexo de esta especie (Monteiro, 2005). Sin embargo, esta coloración ocurre tarde en el proceso de desarrollo gonadal y su uso para la determinación del sexo está limitado para los peces adultos y durante el periodo reproductivo.

Por el contrario, en este estudio no se observó una relación sexual entre la coloración del cuerpo y el análisis inmunoenzimático (EIA) de los esteroides sexuales 11KT y 17- β estradiol en los peces estudiados, lo que nos hace suponer que esta coloración no es del todo confiable para definir el sexo en la especie paiche, concordando con Alcántara *et al.*, (2006) quienes señalan que esta pigmentación puede variar de acuerdo al color del agua o a la turbidez del ambiente donde el pez vive.

Los niveles (pg/ml) de los esteroides sexuales 11-KT y 17 β -estradiol varían según la especie, época del año, el sexo y la edad del pez. En el paiche, los niveles de 17 β -estradiol fueron reportados para peces juveniles (2 a 3 años) y adultos (mayores de 4 años de edad). En peces juveniles, García (2008) reportó valores entre 4.74 - 12.19 pg/ml para machos y 2.76 - 13.8 pg/ml para hembras. Monteiro (2005) de 1.83 - 7.07 pg/ml y 8.32 - 1135.43 pg/ml para machos y hembras respectivamente, mientras que en el presente estudio los valores de este esteroide variaron de 2.4 - 27.7 pg/ml para machos y 2.4 - 18 pg/ml para hembras. En peces adultos, este estudio reportó valores de 2 - 434.1 pg/ml y 9.9 - 637.8 pg/ml, García (2008) de 6.68 - 24.03 pg/ml y 109.85 - 223.76 pg/ml y Monteiro (2005) de 1.54 - 6.55 pg/ml y 3.72 - 723.03 pg/ml, para machos y hembras, respectivamente.

Comparando estos reportes se puede notar que conforme aumenta la edad del pez, aumentan los valores de este esteroide, principalmente en las hembras,

haciendo más grande la diferencia entre géneros en esta especie. Similar situación ocurre con los valores de 11-KT reportados en este estudio, donde paiches de 3 años presentaron valores bajos (10 - 161.3 pg/ml para machos y 1.8 - 29 pg/ml para hembras) en comparación con los adultos de 6 años (218.1 - 4,536.9 pg/ml para machos y 6 - 280 pg/ml para hembras). Siendo en este caso los machos quienes presentaron los más altos valores en comparación a las hembras.

Baroiller *et al.*, (1999) y Bogart (1987), señalan que la diferenciación sexual en peces podría depender de las proporciones 11-KT/17 β -E₂ o 17 β -E₂/11-KT, donde, los niveles altos de 11-KT inducen la diferenciación de machos en cuanto el exceso de 17 β -E₂ induce la diferenciación en hembras. El uso de estas relaciones han permitido determinar el sexo de peces como el esturión estelado *Acipenser stellatus* (Ceapa *et al.*, 2002) y la perca europea, *Perca fluviatilis* (Rougeot *et al.*, 2007). De los resultados del presente estudio, podemos concluir que las mediciones de estos dos esteroides son necesarias para determinar el sexo en *A. gigas*. La medición de 11-KT/17 β -E₂ o 17 β -E₂/11-KT funcionan tanto para adultos durante los primeros estadios de vitelogénesis como también en juveniles. Sin embargo, no podemos excluir una posible variación de estas relaciones en diferentes periodos del año. Estas proporciones pueden variar ligeramente durante la vitelogénesis y espermiación tardía desde que los niveles de 11-KT en machos y los niveles de 17 β -E₂ en hembras, alcanzan su máximo valor antes del final de la vitelogénesis y durante la espermatogénesis. (Rinchard *et al.*, 1997; Blazquez *et al.*, 1998; Barannikova *et al.*, 2004; Kokokiris *et al.*, 2006). Existe poca información sobre la fisiología de *A. gigas*, en ese sentido,

futuros estudios serán necesarios para entender completamente las correlaciones entre los perfiles de los esteroides sexuales y los estadios reproductivos.

VI. CONCLUSIONES

- Los experimentos realizados en las etapas 1 y 5 del inmunoensayo con vitelogenina, permitieron optimizar el protocolo de sexaje del paiche, donde la incubación de las muestras con el plasma de un paiche macho (ICP♂), la dilución del coating de 10 000 veces (o 1:10 000) y la dilución del anticuerpo anti-Vtg₁ de 80 000 veces (o 1:80 000), fueron los resultados elegidos para establecer un protocolo de sexaje óptimo.
- El protocolo de la técnica inmuno-enzimática (EIA) específico para la lipoproteína vitelogenina (Vtg), ha sido establecido para un efectivo sexaje de individuos adultos del paiche. Individuos juveniles no pudieron ser sexados mediante este método ya que las hembras aun no sintetizan la Vtg cuando son inmaduras.
- Las hembras adultas del paiche registran concentraciones de Vtg durante los meses de Febrero a Junio. El mes de Abril registra los niveles de Vtg (mg/ml) más bajos (6.1 ± 2.4), mientras que el mes de Mayo, los valores más altos (14.9 ± 4.0).
- Existen diferencias en la producción de los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales (11-KT y 17β -E₂) con relación a la estructura etaria (adultos y juveniles) del paiche. Los individuos juveniles reportan los niveles plasmáticos más bajos en comparación con los individuos adultos.
- Tanto en adultos como en juveniles del paiche, los niveles plasmáticos del 17β -E₂ (de 2.0 a 637.8 pg/ml en adultos y de 2.4 a 27.7 pg/ml en juveniles) se presentan en concentraciones bajas cuando comparados con los niveles del 11-KT (de 6.0 a 4,536.9 pg/ml en adultos y de 1.8 a 161.3 pg/ml en juveniles).

- El uso de las proporciones 11-KT/17 β -E₂ y 17 β -E₂/11-KT (pg/ml), es un eficiente método para diferenciar el sexo en individuos juveniles y adultos del paiche. Con la proporción 11-KT/17 β -E₂, valores superiores e inferiores a 2.5 fueron considerados machos y hembras respectivamente. Con la proporción 17 β -E₂/11-KT, valores superiores e inferiores a 0.4 fueron considerados hembras y machos respectivamente.
- La diferencia sexual obtenida con los análisis de Vtg, 11-KT y 17 β -E₂, es altamente significativa (P<0.05) en los individuos adultos del paiche. En los individuos juveniles sólo el 11-KT reporta diferencias estadísticas entre sexos (P = 0.0119).
- La producción de Vtg del paiche esta correlacionada positivamente con la producción de 17 β -E₂, mientras que con el 11-KT la correlación es negativa. Entre los esteroides sexuales 11KT y 17 β -E₂ la correlación también es negativa.
- La confirmación del sexo del paiche por observación *in situ* de las gónadas permitieron confirmar la eficacia del inmunoensayo con Vtg en adultos (el 100% de los ejemplares sacrificados (10 de 10) fueron correctamente sexados). Con los esteroides 17 β -E₂ y 11-KT, la eficacia fue de 80% para los adultos (solo 8 de 10 ejemplares sacrificados fueron correctamente sexados) y para los juveniles de 100% (9 de 9 ejemplares sacrificados fueron correctamente sexados).

VII. RECOMENDACIONES

- Por su alta eficacia y bajo costo en comparación con los esteroides sexuales, se recomienda aplicar el protocolo EIA de detección y cuantificación de vitelogenina para el sexaje de paiches adultos. Para el sexaje de paiches juveniles, se recomienda el uso de las proporciones 11-KT/17 β -E₂ y 17 β -E₂/11-KT.
- Establecer un programa de sexaje de los planteles de paiches reproductores criados en la Amazonía peruana, que contribuyan a mejorar el manejo de reproductores de paiche en cautiverio e incrementar la producción de semilla de paiche para la producción de carne en el Perú.
- Monitorear los niveles plasmáticos de Vtg y esteroides sexuales en los planteles de reproductores de varias zonas de la Amazonía, a fin de estudiar sus fluctuaciones anuales y correlacionarlos con el comportamiento de los peces, el desarrollo gonadal de los mismos, la ocurrencia/ausencia de eventos reproductivos y su calidad en términos de alevines producidos (desoves) en acuicultura.
- Estudiar la posibilidad de desarrollar un kit de sexaje de aplicación rápida en el campo, a partir de los descubrimientos realizados en el presente trabajo, toda vez que en muchas zonas de la Amazonía donde se cultiva paiche, no cuentan con laboratorios ni energía eléctrica lo que imposibilita el sexaje de sus animales por los métodos establecidos en el presente estudio.

VIII. RESUMEN

El paiche, *Arapaima gigas*, es un pez amazónico con potencial para la acuicultura. Sin embargo, la acertada determinación de su género no es posible por criterios morfológicos, lo que dificulta la producción de alevinos y afecta severamente el desarrollo de su cultivo. Esta situación, nos llevó a desarrollar dos metodologías de sexaje usando el ensayo inmuno-enzimático (EIA), basados en: 1) la detección de la vitelogenina (Vtg) en el plasma, y 2) la determinación de niveles plasmáticos (pg/ml) de 17β -estradiol y 11-ketotestosterona en individuos adultos (6 años) y juveniles (3 años). Un protocolo de inmunoensayo (EIA) específico para la Vtg del paiche fue optimizado, resultando 100% eficaz en el sexaje de los adultos. Los juveniles no pudieron ser sexados mediante este método. La presencia de Vtg en hembras adultas fue registrada durante los meses de Febrero a Junio. En Abril registró en media los niveles de vitelogenina (mg/ml) más bajos (6.1 ± 2.4), mientras que en Mayo, los valores más altos (14.9 ± 4.0). La cuantificación de los niveles plasmáticos de 11-KT y 17β -E₂ (pg/ml) y el uso de las proporciones 11-KT/ 17β -E₂ y 17β -E₂/11-KT también permitieron un adecuado sexaje en adultos (80% eficaz) y en juveniles (100% eficaz). Comparando la producción de los niveles de Vtg, 11-KT y 17β -E₂, se encontró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre sexos para los adultos. En los juveniles, sólo el 11-KT reportó diferencias estadísticas entre sexos. La producción de Vtg del paiche está correlacionada positivamente con la producción de 17β -E₂, mientras que las correlaciones entre la producción de Vtg versus 11-KT y el 11-KT versus 17β -E₂ son negativas. En conclusión, el sexaje de paiche ha sido alcanzado mediante el uso individual y/o combinado de métodos EIA específicos para la Vtg (adultos) y los esteroides sexuales (juveniles y adultos) analizados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara, F.; Wust, W. H.; Tello, S.; Rebaza, M. & Del Castillo, D. 2006. Paiche. El gigante del Amazonas. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú. 69p.
- Barannikova, I.A.; Bayunova, L.V. & Semenkova, T.B. 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and oestradiol-17b in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. *J. Fish Biol.* 64:1330–1338.
- Bard, J. & Imbiriba, E. P. 1986. Piscicultura de pirarucu, *Arapaima gigas*. Belém: EMBRAPA-CPATU. Circular técnica 52. 17p.
- Baroiller, J. F.; Guigen, Y.; Fostier, A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol Life Sci.*, 55: 910-931.
- Blazquez, M.; Bosma, P.T.; Fraser, E.J.; Van Look, K.J.W. & Trudeau, V.L. 1998. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119:345–364.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109C(3):219-245.
- Bogart, M. H. 1987. Sex determination: a Hypothesis based on steroid ratios. *J. Theor. Biol.* 128:349-357.
- Bryan, B. J. L.; Wildhaber, M. L.; Papoulias, D. M.; Delonay, A. J.; Tillitt, D. E. & Annis, M. L. 2007. Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 411-419.

- Ceapa, C.; Williot, P.; Le Menn, F. & Davail-Cuisset, B. 2002. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during spawning migration in the Danube River. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 391-396.
- Chang, C. F.; Lan, S.C. & Chou, H. Y. 1995. Gonadal Histology and plasma sex steroids during sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*, *J. Exp. Zool.*, 272: 395-406.
- Chang, C.F.; Hung, C.Y.; Chiang, M.-C. & Lan, S.C. 1999. The concentrations of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 177: 37-45.
- Chu-Koo, F. & Alcántara, B. F. 2007. De la selva su acuicultura. Sobre los avances en la acuicultura amazónica y las oportunidades de inversión. *Perú Económico*, 30(1):11-12.
- Chu-Koo F. & Alcántara F. 2009. Paiche doméstico en la Amazonía: Perspectivas de una crianza sostenible. *Pesca Responsable*, 32 (marzo-abril): 32-33.
- Chu-Koo, F. & Tello, S. 2010. Producción de semilla de paiche (*Arapaima gigas*) en Loreto, Perú. *Infopesca Internacional*, 42: 33-34.
- Chu-Koo, F.; Valdivieso, M.; Tello, S.; Rebaza, A. M.; Rebaza A. C. & Alcántara, F. 2007. Análisis económico de la crianza del paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*) en jaulas flotantes en un lago amazónico peruano. *Infopesca Internacional*, 30(1): 28-31.
- Cuisset, B.; Pradelles, P.; Kime, D. E.; Kühn, E. R.; Babin, P.; Davail, S. & Le Menn, F. 1994. Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-

- ketotestosterone in plasma of Siberian Sturgeon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C: 229-241.
- Devlin, R. H. & Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364
- Dugué, R.; Chu-Koo, F.; Alcántara, F.; Duponchele, F. & Núñez, J. 2008. Purification and assay of *Arapaima gigas* vitellogenin: potential use for sex determination. *Cybiurn International Journal of Ichthyology*, 32(3):117.
- Fontenele, O. 1952. Hábitos de desova do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) (Pisces: Isospondyli, Arapaimidae), e evolução de sua larva. Fortaleza, DNOCS. 22p. (Publicação n. 153).
- García, J. C. 2008. Determinación de los niveles de estradiol en plasma de "paiche" *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) criado en cautiverio. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana - UNAP. Iquitos, Perú. 53p.
- Gazola, R. & Borella, M.I. 1997. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 1485-1487.
- Guiguen, Y.; Govoroun, M.; D'Cotta, H.; McMeel, O.M. & Fostier, A. 2000. Steroids and gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of fish. Institute of Marine Research, University of Bergen, 241-243pp.

- Hurvitz, A.; Jackson, K.; Degani, G. & Levavi-Sivan, B. 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*, 270: 158-166.
- Imbiriba, E. P. 1991. Produção e manejo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier). Belém: EMBRAPA-CPATU. Circular técnica 57. 19p.
- Kanamori, A.; Kitajima, K.; Inoue, Y.; Inoue, S.; Hoshino, K.; Matsuoka, E.; Sato, A. & Satsumi, K. 1993. Immunochemical method as early diagnosis for distinguishing salmonid fish female and male prior to genital maturation by use of a minute amount of blood collected from a single piece of gill filament. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 593-600.
- Kokokiris, L.; Fostier, A.; Athanassopoulou, F.; Petridis, D. & Kentouri, M. 2006. Gonadal changes and blood sex steroids levels during natural sex inversion in the protogynous Mediterranean red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Gen. Comp. Endocr.*, 149:42–48.
- Kwon, J. Y.; Mc Andrew, B. & Penman, D.J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.*, 59: 359-370.
- Kynard, B. & Kieffer, M. 2002. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. *J. Appl. Ichthyol.*, 18: 505–508.
- Le Bail, P. Y. & Breton, B. 1981. Rapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture*, 22:367-375.

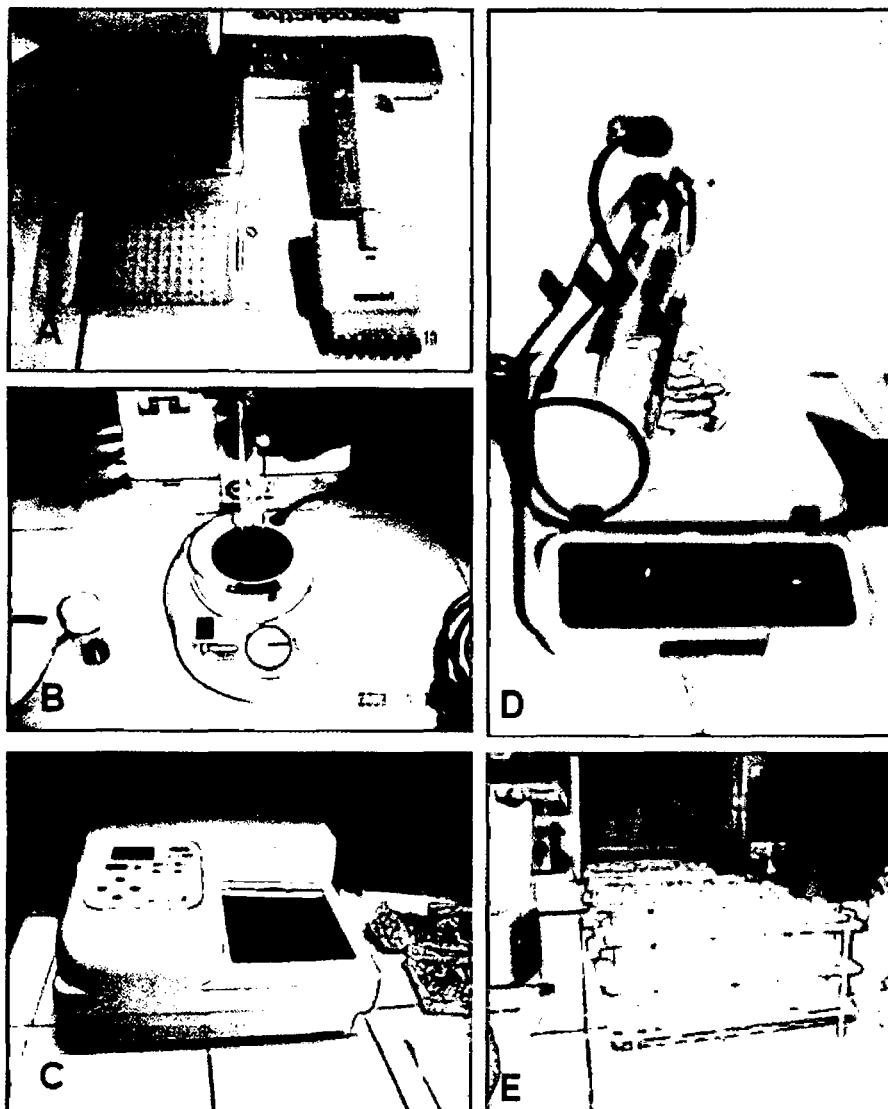
- Matsubara, T. & Sawano, K. 1992. Sex determination of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis* Schmidt) by the immunodot-blotting technique using antiserum against vitellogenin. *Bulletin of the Hokkaido National Fisheries Research Institute*, 56: 17-26.
- Malekzadeh V. R.; Webb, M. A. H.; Hallajian, A.; Kazemi, R. & Pahlavan Yali, M. 2006. Biochemical and morphometric parameters as indicators of sex and gonadal stages in maturing Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *J. Appl. Ichthyol.*, 22: 364-368.
- Monteiro, L. B. B. 2005. Caracterização do crescimento, reprodução e perfil hormonal dos esteróides sexuais do Pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822) em condições de cativeiro. Dissertação para optar o título de Mestre. Programa de Pós-graduação em recursos pesqueros e acuicultura – PPG/RPAQ. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil. 82pp.
- Mueller, O. 2006. Arapaima gigas. Market Study. Current status of Arapaima global trade and perspectives on the Swiss, French and UK markets . United Nations Conference on Trade Development UNCTAD / BioTrade Facilitation Programme. 52 p.
- Nuñez, R. J.; Kah, O.; Geffard, M. & Le Menn, F. 1989. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B: 741-746.
- Ohta, K.; Hirano, M.; Mine, T.; Mizutani, H.; Yamaguchi, A. & Matsuyama, M. 2007. Body color change and serum steroid hormone levels throughout the process of sex change in the adult wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Mar. Biol.*, 153:843–852

- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281
- Pottinger, T. G.; Pulman, K. G. T.; Carrick, T. R. & Scott, A. P. 2005. Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *Journal of Fish Biology*, 67: 1514-1533.
- Rebaza, M.; Rebaza, C. & Deza, S. 2003. Observaciones de la reproducción de paiche *Arapaima gigas* (Cuvier) en ambientes controlados en el IIAP Ucayali. *In: Alcántara, F., Montreuil, V. (eds). Seminario Taller Internacional de Manejo del paiche o pirarucu. 111–123p.*
- Rebaza, M.; Rebaza, C. & Deza, S. 2005. Avances en el cultivo de paiche *Arapaima gigas* en jaulas flotantes en el lago Imiría, Perú. *In: Renno J-F., García-Dávila, C., Duponchelle, F. & Núñez, J. (eds.) Coloquio Internacional: Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. 169- 172p.*
- Richard, J.; Kestemont, P. & Heine, R. 1997. Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. *J. Fish. Biol.*, 50:169–180.
- Rougeot, C.; Krim, A.; Mandiki, S. N. M.; Kestemont, P. & Mélard, C. 2007. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology*, 67: 1046-1052.
- Saavedra-Rojas, E.; Quintero-Pinto, L. & Landines-Parra, M. 2005. Aspectos reproductivos. Biología y cultivo del pirarucú, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae): Aspectos reproductivos. Bases para un aprovechamiento sostenible. INCODER-UNC, Bogotá, Colombia.

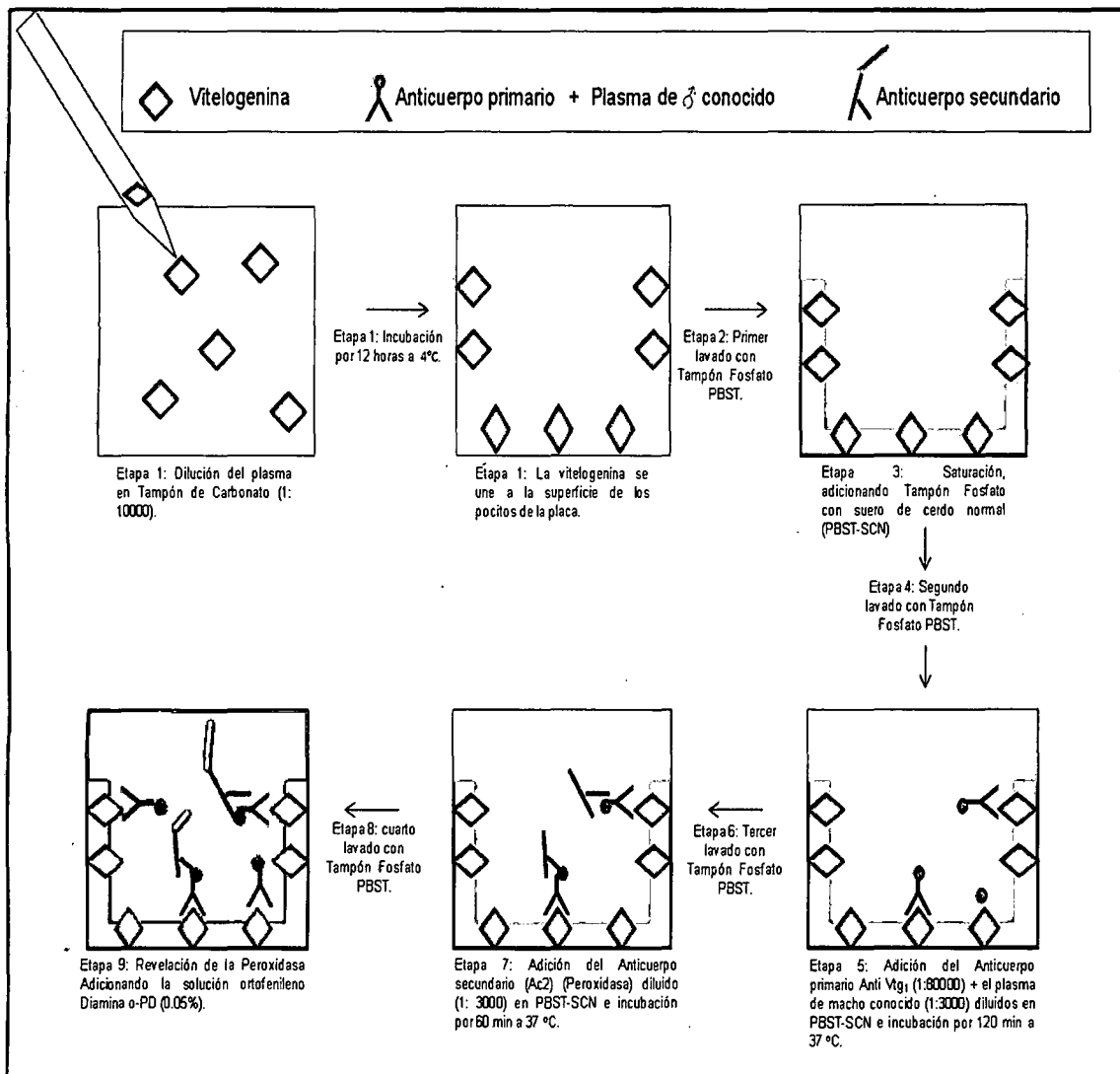
- Swenson, E. A.; Rosenberger, A. E. & Howell, P. J. 2007. Validation of endoscopy for determination of maturity in small Salmonids and sex of mature individuals. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 136: 994-998.
- Takemura, A. & Oka, M. 1998. Immunochemical sexing of living yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin-like protein. *Aquaculture Research*, 29: 245-249.
- UNCTAD / BTFP. 2005. Diagnóstico del Sector Acuicultura para el Desarrollo de Bionegocios en el Perú – Programa BTFP. Grupo de Producto 1: Peces amazónicos: Paiche, gamitana y peces ornamentales. 96p.
- Wallace, R. A. & Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologists*, 21: 325-343.
- Webb, M. A. H.; Feist, G. W.; Foster, E. P.; Schreck, C. B. & Fitzpatrick, M.S. 2002. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild sturgeon using blood plasma indicators. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 131: 132-142.

X. ANEXOS

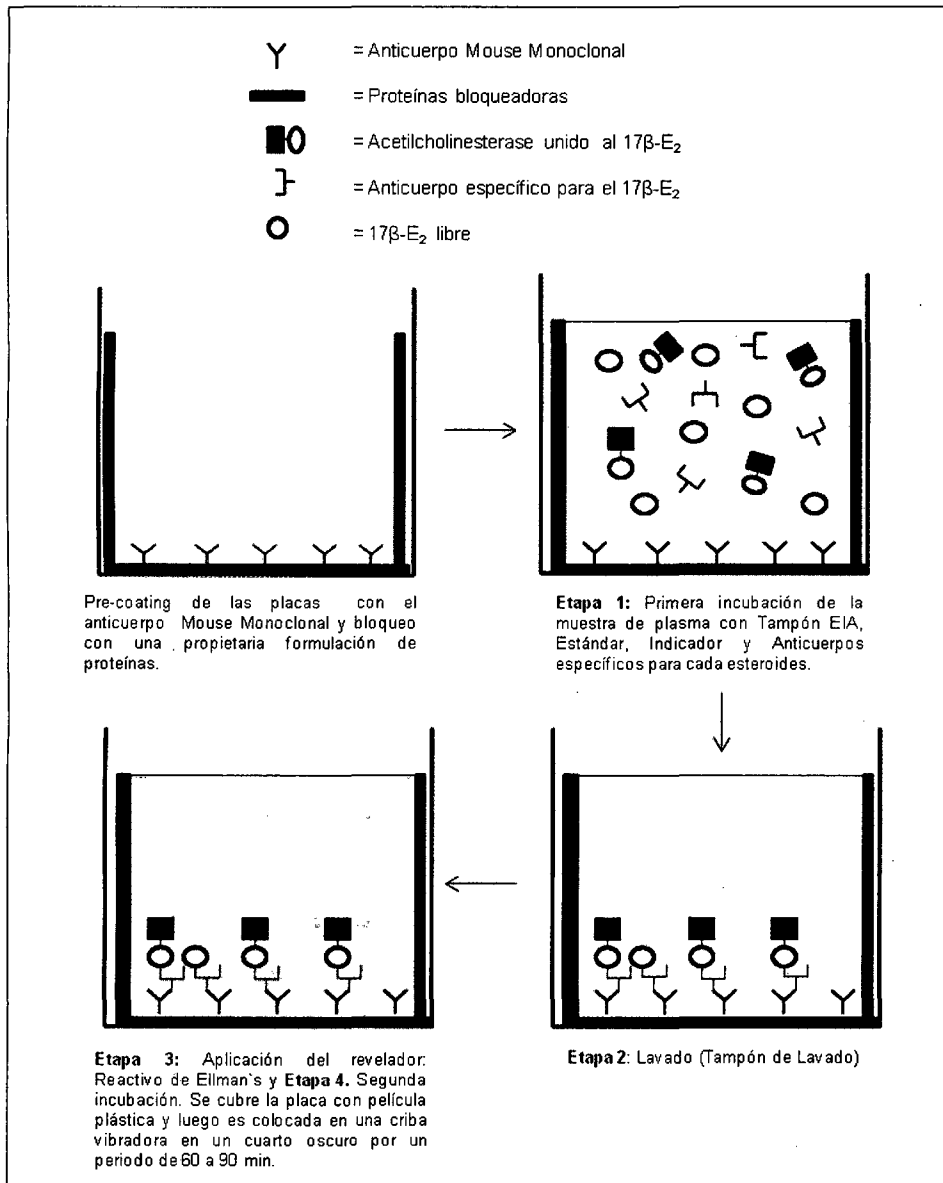
Anexo 1. Materiales y equipos utilizados en el presente estudio. A: puntillas y micropipeta de 8 canales, B: vórtex, C: microplate reader, D: agitador magnético, E: tubos de ensayo de 5 ml.



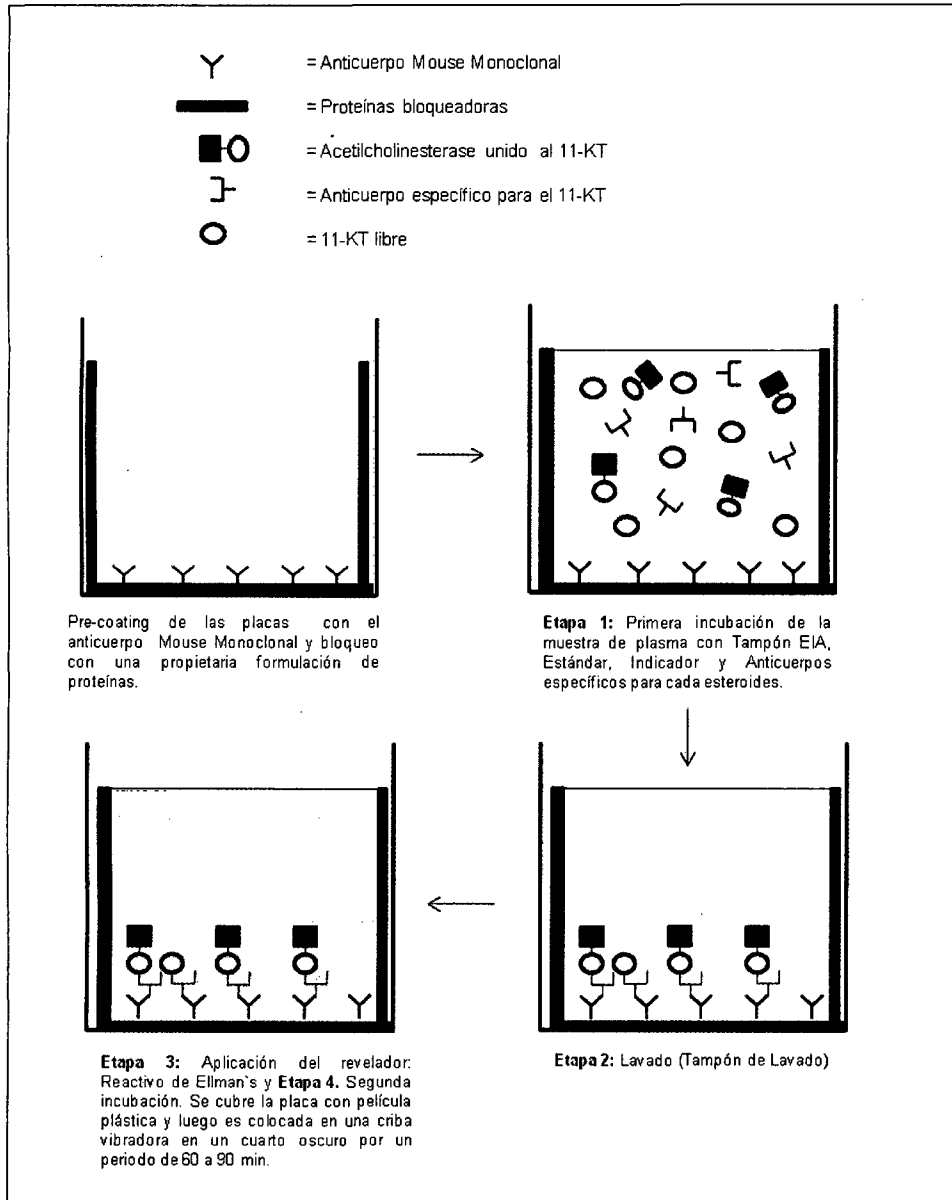
Anexo 2. Esquema de las etapas que componen el protocolo del Inmunoensayo EIA con Vtg para el sexaje del paiche, *Arapaima gigas*.



Anexo 3. Esquema de las etapas que componen el protocolo laboratorial propuesto por CAYMAN CHEMICAL para el Inmunoensayo EIA con $17\beta\text{-E}_2$.



Anexo 4. Esquema de las etapas que componen el protocolo laboratorial propuesto por CAYMAN CHEMICAL para el Inmunoensayo EIA con 11-KT.



Anexo 5. Preparación de soluciones buffer para el inmunoensayo (EIA) con Vtg

SOLUCIONES BUFFER	PROCEDIMIENTO
Solución Madre: pH 7.4	(A) Pesar 1,38 gr. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ completar hasta 100ml de H_2O destilada (B) Pesar 5,68 gr. de Na_2HPO_4 completar hasta 500ml de H_2O destilada. • Mezclar ambas soluciones hasta llegar al pH deseado.
Tampón Fosfato Salino: TPS 0.01M	• Mezclar 100 ml de solución madre + 990 ml de H_2O destilada + 9 gr de NaCl + 500 μl de Tween 20. (polyoxyethylene 20-sorbitan monolaurate $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)
Solución tampón: TPS – SCN	• Mezclar 100 ml de solución tampón TPS + 4 ml de suero de Cerdo.
Tampón Carbonato: pH 9.6 0,05M	(A) Pesar 0,53 gr. de Na_2CO_3 completar hasta 100ml de H_2O destilada. (B) Pesar 0,84 gr. de NaHCO_3 completar hasta 200ml de H_2O destilada. • Mezclar ambas soluciones hasta llegar al pH deseado
Tampón Citrato: pH 5 0,1M	(A) 4,20 gr. de ácido cítrico completar hasta 200ml de H_2O destilada (B) 7,1 gr. de Na_2HPO_4 completar hasta 250ml de H_2O destilada • Mezclar ambas soluciones hasta llegar al pH deseado.
Orto Fenil Diamina OPD	• Mezclar 10 mg de OPD + 20 ml de tampón citrato + 20 μl de H_2O oxigenada al 30% • La mezcla de OPD + el tampón citrato debe ser cubierta con papel aluminio para evitar que reaccione por ser sensible a la luz. • El H_2O oxigenada se agrega a esta solución solo al momento de aplicar a las muestras.

Anexo 6. Preparación de soluciones buffer para el inmunoensayo (EIA) con 11KT y 17 β -E₂.

SOLUCIONES BUFFER	PROCEDIMIENTO
Tampón Enzimainmunoensayo (EIA)	<ul style="list-style-type: none">• Diluir el contenido de un vial de EIA Tampón Concentrado (vial # 4) con 90 ml de Agua Ultra Pura (Milli-q), enjuagando el vial para remover algunas sales que puede tener el precipitado.
Tampón de Lavado	<ul style="list-style-type: none">• Diluir los contenidos del vial (5 ml) del Tampón Concentrado de Lavado (vial # 5) para un volumen total de 2 litros con Agua Ultra Pura y agregar 1 ml del reactivo Tween 20 (vial # 5a).

Nota:

Los Tampones son preparados por separado para cada esteroide de acuerdo al protocolo establecido por Cayman Chemical y almacenados a 4°C durante dos meses.

Anexo 7. Preparación de los reactivos específicos para el inmunoensayo (EIA) con 11-KT y 17β-E₂

REACTIVO	PROCEDIMIENTO
<p>Estándar (11K-Testosterona o 17β-Estradiol)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Equilibrar una pipeta en etanol varias veces. Usando la pipeta equilibrada transferir 100 µl del esteroide (11-KT o 17 β-E₂) Estándar (vial #3) dentro de un tubo limpio de prueba, luego diluir con 900 µl de Agua Ultra Pura. La concentración de esta solución. (de volumen estándar) será 1 ng/ml. Preparar el estándar para el uso del Tampón EIA en 8 tubos de ensayo limpios y numerados del 1 al 8. Tomar una alícuota de 900 µl Tampón EIA en el tubo número 1 y 500 µl Tampón EIA en los tubos del 2 al 8. Luego transferir 100 µl del volumen estándar (1 ng/ml) al tubo #1 y mezclar completamente. Posteriormente diluir seriadamente el estándar para remover 500 µl del tubo 1 y colocar en el tubo 2 mezclando completamente. Luego, remover 500 µl del tubo 2 y pasar al tubo 3;(mezclar completamente). Repetir este proceso de los tubos 4 al 8. Estos estándares diluidos no deben estar almacenados por más de 24 horas.
<p>Indicador (11K-Testosterona Acetylcholinesterasa o 17β-Estradiol Acetylcholinesterasa)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Preparar 100 dtn del Indicador (11-KT o 17 β-E₂) (vial # 2) con 6 ml de Tampón EIA. Almacenar el Indicador preparado a 4°C. (sin congelar), y usar en el plazo de 6 semanas. Para ayudar en la visualización de los pozos conteniendo el indicador, se agregó 60 µl de color a 6 ml del Indicador.
<p>Antisuero (11K-Testosterona o 17β-Estradiol)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Preparar el antisuero del 100 dtn (vial # 1), con 6 ml de Tampón EIA. Almacenar el antisuero (11-KT o 17β-E₂) reconstruido a 4 °C. El reactivo es estable por 6 semanas. Para ayudar en la visualización de los pozos conteniendo el antisuero, se agregó 60 µl de color a 6 ml del antisuero.

Nota:

Los reactivos son preparados por separado para cada esteroide de acuerdo al protocolo establecido por Cayman Chemical

Anexo 8. Códigos de chip, datos de peso y longitud total de 39 individuos adultos (6 años) del paiche *Arapaima gigas*.

Nº	Código(chip)	Peso (kg)	Long. Total (cm)
1	939-22351	58	179
2	939-27494	63	181
3	939-21973	62	182
4	939-26531	58	189
5	939-26434	57	177
6	939-30380	78	201
7	939-26994	80	192
8	939-22733	69	193
9	939-23861	72	194
10	939-25886	56	178
11	939-29242	62	182
12	939-23906	62	184
13	939-21920	60	184
14	939-23531	70	191
15	939-29036	51	179
16	939-21586	67	190
17	939-23643	64	185
18	939-29515	62	184
19	939-26108	62	188
20	939-29830	55	178
21	939-25632	64	187
22	939-31063	72	194
23	939-24411	69	188
24	939-23681	66	183
25	939-23247	63	189
26	939-21025	55	180
27	939-25326	55	180
28	939-29676	65	188
29	939-30539	57	182
30	939-21647	50	171
31	939-24775	59	180
32	939-22123	56	179
33	939-30415	60	182
34	939-27304	72	190
35	939-28195	72	189
36	939-23922	56	179
37	939-21404	59	184
38	939-22880	60	192
39	939-22429	55	180
Promedio ± D.S		62.38 ± 7.02	184.82 ± 6.08

Anexo 9. Códigos de chip, datos de peso y longitud total de 19 individuos adultos (3 años) del paiche *Arapaima gigas*.

Nº	Código(chip)	Peso (kg)	Long. Total (cm)
1	939-27463	3.8	75
2	939-20944	6.8	92
3	939-27732	6	85
4	939-21874	5.6	88
5	939-30553	6.8	90
6	939-27952	5.4	83
7	939-28207	5	82
8	939-29959	5.8	87
9	939-29453	5.8	87
10	939-22090	5.8	87
11	939-25276	7	90
12	939-23172	7.2	89
13	939-23254	8.8	95
14	939-27829	5.6	84
15	939-21275	6.4	86
16	939-21539	9	98
17	939-27974	7.8	93
18	939-23794	6.6	87.5
19	939-23317	5	82
Promedio ± D.S		6.33 ± 1.29	87.39 ± 1.21

Anexo 10. Densidad óptica (D.O) de la Vtg en individuos (♂ y ♀) de *Arapaima gigas* incubados sin (ISP♂) el plasma de un paiche macho, aplicados a la combinación de 04 diluciones del plasma con 03 diluciones del Anti Vtg₁.

Diluciones del plasma	♂		♀		Diluciones del anticuerpo primario Anti Vtg ₁
	Número de replicas		Número de replicas		
	1	2	1	2	
1,000	1.61	1.66	3.14	3.10	40,000
	0.75	1.00	2.53	2.47	80,000
	0.81	0.77	2.07	1.98	120,000
10,000	1.77	1.70	3.21	3.22	40,000
	0.48	0.81	2.56	2.48	80,000
	0.77	0.75	2.13	2.09	120,000
100,000	1.68	1.62	1.97	2.12	40,000
	0.81	0.79	1.06	1.21	80,000
	0.58	0.69	1.05	0.95	120,000
1'000,000	0.77	0.78	0.64	0.69	40,000
	0.17	0.38	0.33	0.38	80,000
	0.22	0.28	0.3	0.29	120,000

Anexo 11. Densidad óptica (D.O) de la Vtg en individuos ♂ y ♀ de *Arapaima gigas* incubados con (ICP♂) el plasma de un paiche macho, aplicados a la combinación de 04 diluciones del plasma con 03 diluciones del Anti Vtg₁.

Diluciones del plasma	♂		♀		Diluciones del anticuerpo primario Anti Vtg ₁
	Número de replicas		Número de replicas		
	1	2	1	2	
1,000	0.17	0.17	2.88	2.80	40,000
	0.17	0.16	2.08	2.09	80,000
	0.15	0.16	1.78	1.74	120,000
10,000	0.15	0.17	2.96	2.96	40,000
	0.14	0.14	2.23	2.23	80,000
	0.15	0.13	1.96	1.83	120,000
100,000	0.15	0.15	1.43	1.42	40,000
	0.14	0.14	0.95	0.97	80,000
	0.13	0.13	0.72	0.72	120,000
1'000,000	0.11	0.11	0.34	0.33	40,000
	0.11	0.10	0.26	0.25	80,000
	0.09	0.10	0.20	0.21	120,000

Anexo 12. Valores promedio de la densidad óptica (D.O.) y niveles de Vtg (mg/ml) de 39 individuos adultos del paiche.

Nº	Código (chip)	Promedio \pm D.S de la D.O de Vtg	Vtg mg/ml
1	939-22351	0.19 \pm 0.02	0
2	939-27494	0.16 \pm 0.02	0
3	939-21973	0.16 \pm 0.01	0
4	939-26531	2.45 \pm 0.03	14.67
5	939-26434	0.16 \pm 0.05	0
6	939-30380	1.68 \pm 0.03	9.53
7	939-26994	0.16 \pm 0.01	0
8	939-22733	0.15 \pm 0.02	0
9	939-23861	0.15 \pm 0.05	0
10	939-25886	2.65 \pm 0.03	16.00
11	939-29242	1.72 \pm 0.03	9.80
12	939-23906	0.16 \pm 0.02	0
13	939-21920	2.52 \pm 0.01	15.10
14	939-23531	0.19 \pm 0.02	0
15	939-29036	0.18 \pm 0.02	0
16	939-21586	0.16 \pm 0.01	0
17	939-23643	2.41 \pm 0.07	14.40
18	939-29515	1.99 \pm 0.02	11.57
19	939-26108	0.16 \pm 0.02	0
20	939-29830	0.14 \pm 0.01	0
21	939-25632	2.05 \pm 0.01	11.97
22	939-31063	0.15 \pm 0.03	0
23	939-24411	2.38 \pm 0.03	14.20
24	939-23681	2.63 \pm 0.02	15.83
25	939-23247	2.12 \pm 0.04	12.43
26	939-21025	2.32 \pm 0.03	13.77
27	939-25326	0.15 \pm 0.03	0
28	939-29676	2.66 \pm 0.02	16.07
29	939-30539	0.15 \pm 0.01	0
30	939-21647	0.21 \pm 0.01	0
31	939-24775	0.14 \pm 0.05	0
32	939-22123	2.48 \pm 0.08	14.87
33	939-30415	1.39 \pm 0.02	7.61
34	939-27304	2.63 \pm 0.02	15.87
35	939-28195	0.16 \pm 0.03	0
36	939-23922	2.78 \pm 0.05	16.83
37	939-21404	0.15 \pm 0.02	0
38	939-22880	2.35 \pm 0.01	13.97
39	939-22429	2.95 \pm 0.03	18.01

Anexo 13. Valores promedios de densidad óptica (D.O.) y niveles de Vtg (mg/ml) de 19 individuos juveniles del paiche.

Nº	Código (chip)	Promedio ± D.S. de la D.O de Vtg	Vtg mg/ml
1	939-21874	0.15 ± 0.01	0.0
2	939-28207	0.13 ± 0.01	0.0
3	939-27952	0.14 ± 0.01	0.0
4	939-23254	0.11 ± 0.02	0.0
5	939-23172	0.14 ± 0.01	0.0
6	939-29453	0.13 ± 0.03	0.0
7	939-21275	0.12 ± 0.02	0.0
8	939-27974	0.15 ± 0.02	0.0
9	939-23794	0.12 ± 0.03	0.0
10	939-27463	0.14 ± 0.04	0.0
11	939-20944	0.10 ± 0.02	0.0
12	939-27732	0.14 ± 0.02	0.0
13	939-30553	0.12 ± 0.03	0.0
14	939-27829	0.11 ± 0.01	0.0
15	939-22090	0.12 ± 0.02	0.0
16	939-25276	0.09 ± 0.01	0.0
17	939-29959	0.10 ± 0.01	0.0
18	939-21539	0.15 ± 0.03	0.0
19	939-23317	0.13 ± 0.01	0.0

Anexo 14. Valores promedios de densidad óptica (D.O.) de la Vtg en 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero, Marzo, Abril Mayo y Junio).

Código (chip)	No. del pez	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
939-26531	4	2.33	2.03	1.13	2.60	0.63
939-30380	6	1.35	2.45	1.40	2.68	3.13
939-25886	10	1.08	1.85	1.19	3.31	2.79
939-29242	11	1.63	0.29	0.69	2.99	0.26
939-29515	18	1.85	2.40	0.93	1.63	0.54
939-25632	21	1.82	2.43	1.15	2.40	2.59
939-24411	23	2.05	3.06	1.51	1.92	2.39
939-23681	24	1.66	1.80	1.46	2.58	0.99
939-23247	25	1.70	1.02	0.34	1.35	1.47
939-21025	26	1.04	0.47	1.43	2.57	2.09
939-22123	32	2.66	2.36	1.61	2.52	2.14
939-23922	36	1.75	3.09	1.12	3.28	0.57
Promedio		1.74	1.94	1.16	2.49	1.63
D.S		± 0.47	± 0.92	± 0.37	± 0.60	± 1.01

Anexo 15. Valores promedios de los niveles plasmáticos de la Vtg (mg/ml) en 12 hembras adultas del paiche, monitoreados durante 5 meses (Febrero, Marzo, Abril, Mayo y Junio).

Código (chip)	No. del pez	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
939-26531	4	13.88	11.85	5.89	15.68	2.51
939-30380	6	7.34	14.68	7.65	16.23	19.21
939-25886	10	5.55	10.66	6.27	20.41	16.96
939-29242	11	9.20	0.24	2.95	18.24	0.07
939-29515	18	10.64	14.30	4.56	9.27	1.93
939-25632	21	10.46	14.53	5.97	14.34	15.61
939-24411	23	11.99	18.71	8.38	11.10	14.26
939-23681	24	9.41	10.33	8.07	15.54	4.95
939-23247	25	9.69	5.13	0.61	7.35	8.13
939-21025	26	5.27	1.49	7.83	15.47	12.27
939-22123	32	16.03	14.10	9.07	15.12	12.57
939-23922	36	10.00	18.90	5.81	20.21	2.12
Promedio		9.96	11.24	6.09	14.91	9.22
D.S		± 3.11	± 6.10	± 2.45	± 4.01	± 6.73

Anexo 16. Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 1:
16 individuos (1-16) de paiches adultos.

PLACA 1 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A	S1	S1	S1		1	1	5	5	9	9	13	13	2
B	S2	S2	S2										10
C	NSB	S3	S3	S3	2	2	6	6	10	10	14	14	2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	3	3	7	7	11	11	15	15	2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	4	4	8	8	12	12	16	16	2
H	S8	S8	S8										10

Valores de D.O. de las muestras a 405 nm

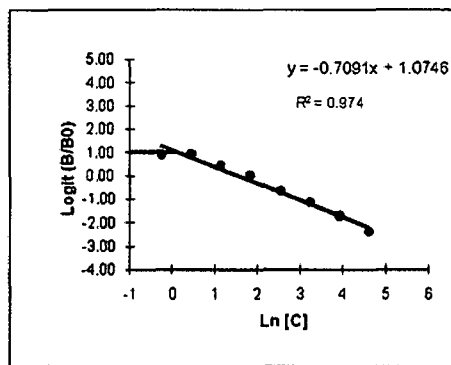
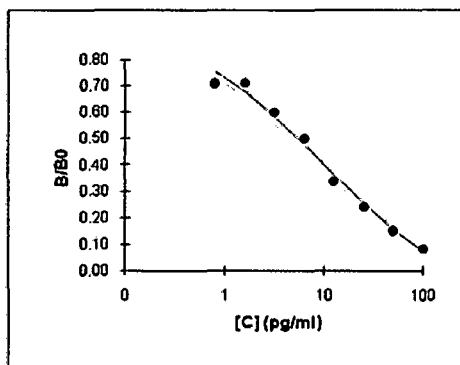
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.29	0.3	0.3	0.187	0.191	0.188	0.185	0.182	0.178	0.318	0.305	2
B		0.4	0.42	0.4	0.447	0.422	0.416	0.411	0.384	0.369	0.916	0.817	10
C		0.15	0.56	0.58	0.6	0.182	0.186	0.406	0.392	0.407	0.387	0.178	2
D		0.15	0.73	0.74	0.7	0.427	0.423	1.046	1.041	1.104	1.028	0.384	10
E		1.77	1.03	1.01	1	0.244	0.23	0.168	0.165	0.45	0.412	198	2
F		1.78	1.19	1.2	1.2	0.681	0.656	0.336	0.341	1.09	1.119	0.554	10
G		1.67	1.36	1.41	1.4	0.366	0.369	0.193	0.193	0.19	0.19	0.319	2
H		1.36	1.4	1.5	1.109	0.994	0.481	0.439	0.502	0.442	0.938	0.478	10

Valores de B/B0 de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución	
A		0.085			0.025			0.023			0.019		0.095	2
B		0.150			0.165			0.153			0.132		0.413	10
C	NSB	0.240			0.022			0.145			0.144		0.017	2
D	NSB	0.336			0.160			0.514			0.527		0.129	10
E	B0	0.501			0.052			0.012			0.163		0.028	2
F	B0	0.599			0.299			0.110			0.549		0.215	10
G	B0	0.709			0.127			0.027			0.025		0.096	2
H		0.708			0.519			0.180			0.187		0.322	10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B0	Logaritmo (B/B0)
S1	100.00	4.605	0.085	-2.379
S2	50.00	3.912	0.15	-1.731
S3	25.00	3.219	0.24	-1.151
S4	12.50	2.526	0.336	-0.682
S5	6.25	1.833	0.501	0.003
S6	3.13	1.139	0.599	0.400
S7	1.56	0.446	0.709	0.891
S8	0.78	-0.247	0.708	0.884



Anexo 17. Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 2:
16 individuos (17-32) de paiches adultos.

PLACA 2

Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		S1	S1	S1	17	17	21	21	25	25	29	29	2
B		S2	S2	S2									10
C	NSB	S3	S3	S3	18	18	22	22	26	26	30	30	2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	19	19	23	23	27	27	31	31	2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	20	20	24	24	28	28	32	32	2
H		S8	S8	S8									10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

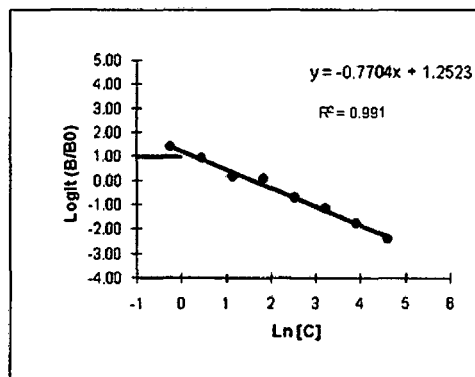
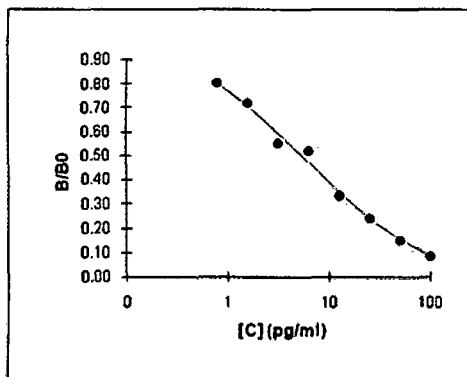
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.28	0.31	0.307	0.557	0.508	0.56	0.555	0.361	0.139	0.188	0.182	2
B		0.39	0.41	0.414	1.237	1.412	1.301	1.265	1.009	0.138	0.419	0.381	10
C	0.147	0.53	0.59	0.57	0.373	0.363	0.164	0.161	0.393	0.134	0.172	0.17	2
D	0.145	0.68	0.77	0.82	1.084	0.984	0.302	0.29	1.006	0.136	0.417	0.376	10
E	1.786	1.01	1.1	1.075	0.229	0.222	0.334	0.317	0.226	0.128	0.18	0.169	2
F	1.519	1.08	1.12	0.995	0.603	0.595	0.877	0.834	0.537	0.132	0.411	0.392	10
G	1.692	1.38	1.41	1.428	0.282	0.268	0.351	0.331	0.393	0.128	0.357	0.353	2
H		1.52	1.57	1.489	0.792	0.756	0.85	0.895	1.065	0.132	1.058	0.951	10

Valores de B/B0 de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.087			0.221		0.236		0.06		0.022		2
B		0.149			0.675		0.651		0.245		0.146		10
C	NSB	0.239			0.127		0.009		0.067		0.014		2
D	NSB	0.35			0.509		0.086		0.244		0.144		10
E	B0	0.524			0.046		0.103		0.018		0.016		2
F	B0	0.528			0.26		0.407		0.108		0.146		10
G	B0	0.723			0.074		0.112		0.066		0.12		2
H		0.792			0.36		0.416		0.259		0.492		10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B0	Logaritmo (B/B0)
S1	100.00	4.605	0.084	-2.390
S2	50.00	3.912	0.147	-1.759
S3	25.00	3.219	0.237	-1.168
S4	12.50	2.526	0.331	-0.702
S5	6.25	1.833	0.520	0.0767
S6	3.13	1.139	0.549	0.195
S7	1.56	0.446	0.717	0.928
S8	0.78	-0.247	0.803	1.403



Anexo 18. Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 3: 7 individuos (33-39) de paiches adultos y 9 individuos (1-9) de paiches juveniles.

PLACA 3 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		S1	S1	S1	33	33	37	37	2 (juv)	2 (juv)	6 (juv)	6 (juv)	2
B		S2	S2	S2									10
C	NSB	S3	S3	S3	34	34	38	38	3 (juv)	3 (juv)	7 (juv)	7 (juv)	2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	35	35	39	39	4 (juv)	4 (juv)	8 (juv)	8 (juv)	2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	36	36	1(juv)	1(juv)	5 (juv)	5 (juv)	9 (juv)	9 (juv)	2
H		S8	S8	S8									10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

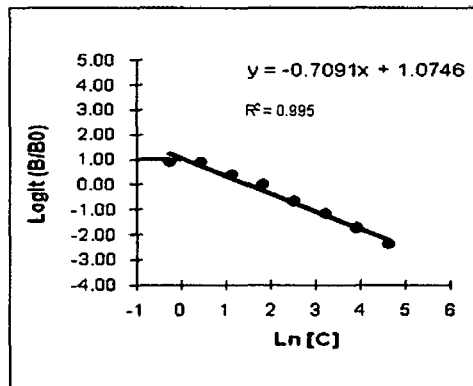
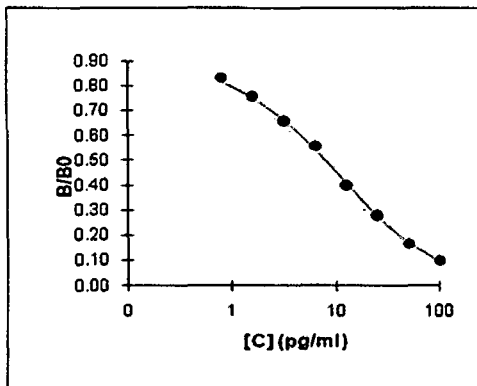
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.31	0.342	0.317	0.557	0.515	0.148	0.171	0.441	0.449	0.995	0.976	2
B		0.411	0.436	0.451	1.228	1.247	0.159	0.309	1.119	1.065	1.699	1.56	10
C	0.154	0.612	0.641	0.65	0.522	0.517	0.143	0.556	0.702	0.686	1.004	1.028	2
D	0.154	0.809	0.868	0.857	1.196	1.381	0.149	1.316	1.4	1.374	1.73	1.582	10
E	1.807	1.134	1.094	1.126	0.19	0.187	0.144	0.596	0.613	0.598	0.818	0.665	2
F	1.814	1.308	1.306	1.271	0.413	0.413	0.141	1.356	1.341	1.298	1.648	1.416	10
G	1.79	1.468	1.459	1.478	0.45	0.484	0.132	0.599	0.402	0.363	1.111	0.997	2
H		1.6	1.496	1.696	1.208	1.197	0.131	1.493	1.033	0.999	1.73	1.618	10

Valores de B/B₀ de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.101			0.223			0.008		0.171		0.481	2
B		0.164			0.625			0.050		0.542		0.850	10
C	NSB	0.280			0.214			0.117		0.314		0.498	2
D	NSB	0.400			0.655			0.336		0.711		0.865	10
E	B0	0.557			0.024			0.128		0.263		0.341	2
F	B0	0.658			0.153			0.345		0.672		0.794	10
G	B0	0.758			0.184			0.128		0.136		0.520	2
H		0.832			0.605			0.362		0.498		0.875	10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B0	Logaritmo (B/B0)
S1	100.00	4.605	0.101	-2.182
S2	50.00	3.912	0.164	-1.627
S3	25.00	3.219	0.280	-0.945
S4	12.50	2.526	0.400	-0.404
S5	6.25	1.833	0.557	0.2286
S6	3.13	1.139	0.658	0.656
S7	1.56	0.446	0.758	1.140
S8	0.78	-0.247	0.832	1.597



Anexo 19. Análisis del esteroide 11-KT para la obtención de la ecuación lineal. Placa 4:
10 individuos (10-19) de paiches juveniles.

PLACA 4 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución	
A		S1	S1	S1	10 (juv)	10 (juv)	14 (juv)	14 (juv)	18 (juv)	18 (juv)				2
B		S2	S2	S2										10
C	NSB	S3	S3	S3	11 (juv)	11 (juv)	15 (juv)	15 (juv)	19 (juv)	19 (juv)				2
D	NSB	S4	S4	S4										10
E	B0	S5	S5	S5	12 (juv)	12 (juv)	16 (juv)	16 (juv)						2
F	B0	S6	S6	S6										10
G	B0	S7	S7	S7	13 (juv)	13 (juv)	17 (juv)	17 (juv)						2
H		S8	S8	S8										10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

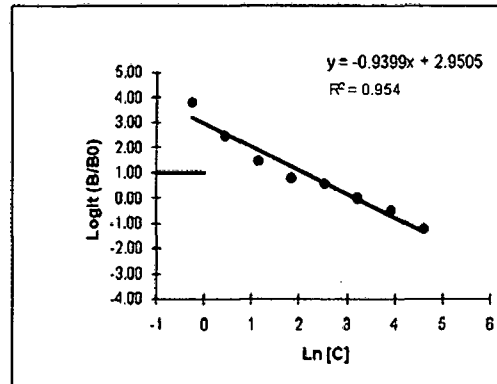
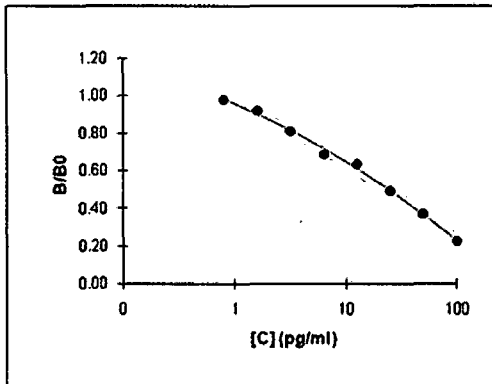
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.55	0.539	0.575	0.658	0.646	0.609	0.6	0.79	1.158			2
B		0.782	0.84	0.821	1.558	1.554	1.521	1.486	1.621	1.875			10
C	0.153	1.06	0.949	1.058	1.208	1.286	0.556	0.538	0.473	1.072			2
D	0.173	1.333	1.214	1.262	1.698	2.012	1.523	1.485	1.369	1.794			10
E	1.926	1.502	1.264	1.309	0.512	0.643	0.593	0.591					2
F	1.911	1.524	1.441	1.754	1.393	1.462	1.486	1.443					10
G	1.837	1.78	1.77	1.759	1.356	1.267	0.492	0.465					2
H		1.87	1.87	1.87	1.954	1.993	1.36	1.319					10

Valores de B/B₀ de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.224			0.280		0.253		0.465				2
B		0.373			0.798		0.768		0.908				10
C	NSB	0.492			0.621		0.220		0.349				2
D	NSB	0.634			0.969		0.768		0.813				10
E	B0	0.685			0.237		0.246						2
F	B0	0.808			0.725		0.746						10
G	B0	0.921			0.658		0.81						2
H		0.978			1.037		0.674						10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B ₀	Logaritmo (B/B ₀)
S1	100.00	4.605	0.224	-1.240
S2	50.00	3.912	0.373	-0.519
S3	25.00	3.219	0.492	-0.031
S4	12.50	2.526	0.634	0.550
S5	6.25	1.833	0.685	0.7763
S6	3.13	1.139	0.808	1.436
S7	1.56	0.446	0.921	2.450
S8	0.78	-0.247	0.978	3.796



NO SALE A DOMICILIO

Anexo 20. Análisis del esteroide 17 β -E₂ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 1: 16 individuos (1-16) de paiches adultos.

PLACA 1 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		S1	S1	S1	1	1	5	5	9	9	13	13	2
B		S2	S2	S2									10
C	NSB	S3	S3	S3	2	2	6	6	10	10	14	14	2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	3	3	7	7	11	11	15	15	2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	4	4	8	8	12	12	16	16	2
H		S8	S8	S8									10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

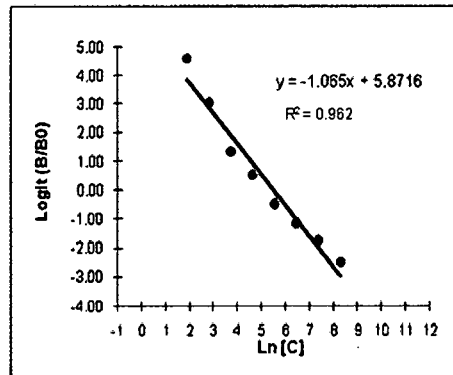
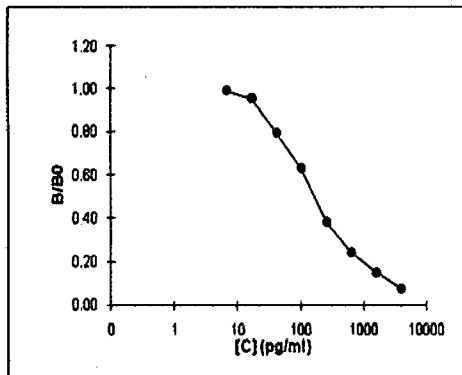
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.162	0.167	0.16	0.618	0.654	0.658	0.619	0.579	0.56	0.451	0.437	2
B		0.202	0.2	0.194	0.702	0.626	0.736	0.731	0.776	0.749	0.725	0.708	10
C	0.128	0.245	0.249	0.264	0.627	0.651	0.387	0.382	0.47	0.442	0.547	0.575	2
D	0.124	0.331	0.302	0.321	0.704	0.66	0.638	0.685	0.637	0.64	0.732	0.667	10
E	0.633	0.419	0.463	0.454	0.636	0.645	0.614	0.57	0.512	0.48	0.603	0.592	2
F	0.618	0.501	0.547	0.502	0.637	0.689	0.685	0.674	0.67	0.656	0.769	0.691	10
G	0.633	0.605	0.605	0.621	0.368	0.361	0.573	0.554	0.551	0.54	0.313	0.295	2
H		0.623	0.623	0.623	0.627	0.663	0.75	0.713	0.755	0.668	0.537	0.543	10

Valores de B/B₀ de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A			0.074		1.016		1.021		0.883		0.633		2
B			0.145		1.072		1.210		1.268		1.176		10
C	NSB		0.252		1.022		0.515		0.657		0.867		2
D	NSB		0.382		1.108		1.067		1.021		1.442		10
E	B0		0.636		1.025		0.928		0.737		0.939		2
F	B0		0.778		1.070		1.103		1.070		1.203		10
G	B0		0.965		0.475		0.872		0.836		0.355		2
H			0.990		1.034		1.206		1.166		0.825		10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B0	Logaritmo (B/B0)
S1	4000.0	8.294	0.074	-2.49
S2	1600.0	7.378	0.145	-1.74
S3	640.0	6.461	0.252	-1.15
S4	256.0	5.545	0.382	-0.49
S5	102.4	4.629	0.636	0.52
S6	41.0	3.713	0.778	1.34
S7	16.4	2.796	0.965	3.04
S8	6.6	1.880	0.990	4.60



Anexo 21. Análisis del esteroide $17\beta\text{-E}_2$ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 2: 16 individuos (17-32) de paiches adultos.

PLACA 2 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		S1	S1	S1	17	17	21	21	25	25	29	29	2
B		S2	S2	S2									10
C	NSB	S3	S3	S3	18	18	22	22	26	26	30	30	2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	19	19	23	23	27	27	31	31	2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	20	20	24	24	28	28	32	32	2
H		S8	S8	S8									10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

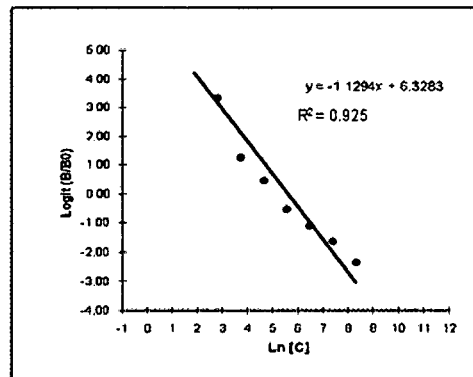
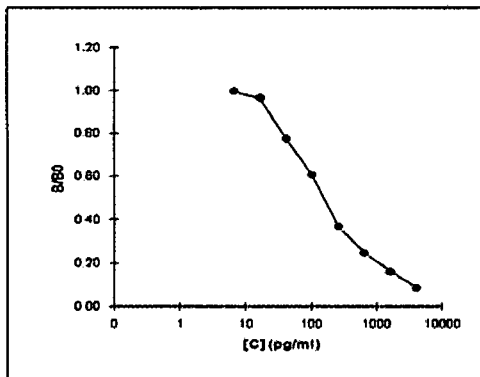
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.18	0.182	0.181	0.591	0.548	0.573	0.573	0.429	0.414	0.659	0.621	2
B		0.212	0.224	0.199	0.706	0.639	0.65	0.769	0.695	0.699	0.809	0.739	10
C	0.14	0.25	0.274	0.248	0.368	0.365	0.608	0.603	0.463	0.477	0.696	0.632	2
D	0.135	0.326	0.32	0.315	0.622	0.621	0.638	0.752	0.714	0.704	0.734	0.693	10
E	0.694	0.463	0.424	0.413	0.601	0.579	0.436	0.464	0.731	0.111	0.682	0.617	2
F	0.621	0.498	0.556	0.48	0.66	0.672	0.656	0.664	0.71	0.715	0.705	0.741	10
G	0.609	0.595	0.652	0.625	0.584	0.598	0.493	0.517	0.533	0.495	0.53	0.495	2
H		0.64	0.638	0.634	0.648	0.621	0.628	0.68	0.67	0.674	0.751	0.753	10

Valores de B/B₀ de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A			0.086			0.857		0.864		0.564		0.997	2
B			0.147			1.062		1.135		1.110		1.263	10
C	NSB		0.238			0.455		0.929		0.660		1.045	2
D	NSB		0.363			0.961		1.107		1.134		1.143	10
E	B0		0.587			0.898		0.620		0.563		1.016	2
F	B0		0.742			1.049		1.037		1.141		1.162	10
G	B0		0.966			0.900		0.729		0.747		0.744	2
H			0.992			0.986		1.025		1.061		1.220	10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B ₀	Logaritmo (B/B ₀)
S1	4000.0	8.294	0.09	-2.359
S2	1600.0	7.378	0.147	-1.660
S3	640.0	6.461	0.238	-1.114
S4	256.0	5.545	0.363	-0.540
S5	102.4	4.629	0.587	0.436
S6	41.0	3.713	0.742	1.226
S7	16.4	2.796	0.966	3.305
S8	6.6	1.880	0.992	5.370



Anexo 22. Análisis del esteroide 17 β -E₂ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 3: 7 individuos (33-39) de paiches adultos y 9 individuos (1-9) de paiches juveniles.

PLACA 3 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		S1	S1	S1	33	33	37	37	2 (μ v)	2 (μ v)	6 (μ v)	6 (μ v)	2
B		S2	S2	S2									10
C	NSB	S3	S3	S3	34	34	38	38	3 (μ v)	3 (μ v)	7 (μ v)	7 (μ v)	2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	35	35	39	39	4 (μ v)	4 (μ v)	8 (μ v)	8 (μ v)	2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	36	36	1(μ v)	1(μ v)	5 (μ v)	5 (μ v)	9 (μ v)	9 (μ v)	2
H		S8	S8	S8									10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

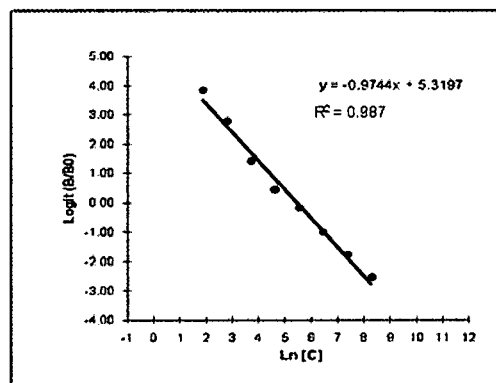
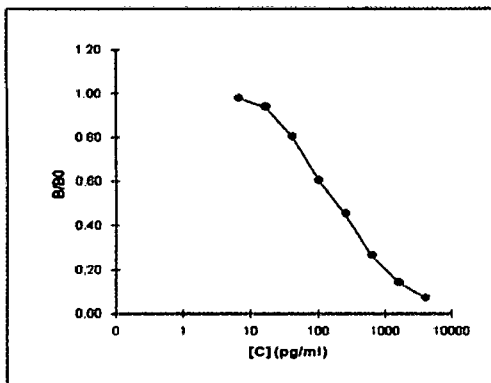
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.187	0.183	0.189	0.606	0.628	0.587	0.669	0.73	0.713	0.745	0.685	2
B		0.214	0.223	0.219	0.805	0.801	0.776	0.831	0.782	0.781	0.785	0.819	10
C	0.141	0.278	0.275	0.282	0.653	0.64	0.561	0.628	0.664	0.709	0.715	0.684	2
D	0.158	0.362	0.371	0.358	0.694	0.693	0.798	0.8	0.807	0.841	0.838	0.793	10
E	0.617	0.446	0.433	0.46	0.643	0.664	0.706	0.727	0.67	0.661	0.697	0.725	2
F	0.626	0.536	0.532	0.566	0.68	0.775	0.732	0.84	0.792	0.823	0.758	0.777	10
G	0.642	0.6	0.6	0.6	0.624	0.641	0.726	0.743	0.658	0.69	0.751	0.711	2
H		0.618	0.618	0.618	0.699	0.739	0.778	0.838	0.765	0.809	0.806	0.807	10

Valores de B/B₀ de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A			0.077		0.976		0.999		1.195		1.181		2
B			0.144		1.365		1.366		1.320		1.363		10
C	NSB		0.269		1.038		0.929		1.121		1.149		2
D	NSB		0.447		1.136		1.356		1.409		1.391		10
E	B0		0.620		1.053		1.184		1.078		1.173		2
F	B0		0.825		1.207		1.329		1.374		1.291		10
G	B0		0.941		1.009		1.222		1.095		1.214		2
H			0.978		1.189		1.375		1.331		1.372		10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B ₀	Logaritmo (B/B ₀)
S1	4000.0	8.294	0.077	-2.525
S2	1600.0	7.378	0.144	-1.782
S3	640.0	6.461	0.269	-1.019
S4	256.0	5.545	0.447	-0.188
S5	102.4	4.629	0.620	0.429
S6	41.0	3.713	0.825	1.405
S7	16.4	2.796	0.941	2.766
S8	6.6	1.880	0.978	3.814



Anexo 23. Análisis del esteroide 17 β -E₂ para la obtención de la ecuación lineal. Placa 4:
10 individuos (10-19) de paiches juveniles.

PLACA 4 Distribución de las muestras en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		S1	S1	S1	10 (μ v)	10 (μ v)	14 (μ v)	14 (μ v)	18 (μ v)	18 (μ v)			2
B		S2	S2	S2									10
C	NSB	S3	S3	S3	11 (μ v)	11 (μ v)	15 (μ v)	15 (μ v)	19 (μ v)	19 (μ v)			2
D	NSB	S4	S4	S4									10
E	B0	S5	S5	S5	12 (μ v)	12 (μ v)	16 (μ v)	16 (μ v)					2
F	B0	S6	S6	S6									10
G	B0	S7	S7	S7	13 (μ v)	13 (μ v)	17 (μ v)	17 (μ v)					2
H		S8	S8	S8									10

Valores de D.O de las muestras a 405 nm

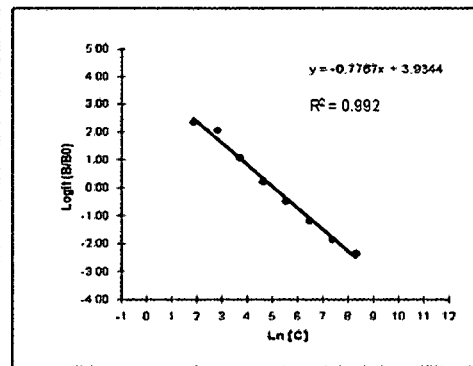
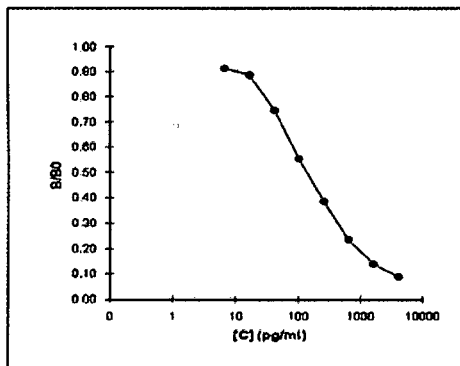
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.181	0.19	0.178	0.688	0.66	0.663	0.627	0.651	0.632			2
B		0.212	0.213	0.209	0.874	0.784	0.8	0.784	0.852	0.831			10
C	0.137	0.263	0.269	0.257	0.755	0.704	0.666	0.65	0.668	0.66			2
D	0.138	0.34	0.356	0.327	0.825	0.72	0.735	0.669	0.786	0.69			10
E	0.688	0.422	0.459	0.428	0.698	0.584	0.618	0.608					2
F	0.668	0.519	0.573	0.559	0.748	0.813	0.719	0.752					10
G	0.698	0.643	0.602	0.668	0.646	0.654	0.645	0.646					2
H		0.648	0.626	0.658	0.756	0.734	0.682	0.74					10

Valores de B/B₀ de los estándares (S1-S8) y las muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución
A		0.083			0.981		0.928		0.921				2
B		0.135			1.264		1.196		1.287				10
C	NSB	0.229			1.082		0.951		0.962				2
D	NSB	0.372			1.161		1.032		1.097				10
E	B0	0.546			0.920		0.869						2
F	B0	0.754			1.175		1.093						10
G	B0	0.914			0.937		0.928						2
H		0.926			1.110		1.048						10

Ajuste de la curva estándar para obtener la ecuación lineal

Estándar	Concentración	Ln [C]	B/B0	Logaritmo (B/B0)
S1	4000.0	8.294	0.083	-2.342
S2	1600.0	7.378	0.135	-1.840
S3	640.0	6.461	0.229	-1.181
S4	256.0	5.545	0.372	-0.470
S5	102.4	4.629	0.546	0.216
S6	41.0	3.713	0.754	1.080
S7	16.4	2.796	0.914	2.054
S8	6.6	1.880	0.926	2.349



Anexo 24. Niveles (pg/ml) de 11KT y 17 β -E₂ y valores de la relación E₂/11KT y 11KT/E₂ de 39 individuos adultos del paiche. Individuos marcados no fueron correctamente sexados.

Nº	Código (chip)	11KT (pg/ml)	17 β -E ₂ (pg/ml)	E ₂ /11KT	11KT/E ₂
1	939-22351	1214.0	2.0	0.0	607.9
2	939-27494	1750.5	5.0	0.0	350.1
3	939-21973	494.7	5.0	0.0	98.9
4	939-26531	134.0	544.7	4.1	0.2
5	939-26434	1593.2	5.0	0.0	318.6
6	939-30380	6.0	9.9	2.1	0.5
7	939-26994	4536.9	44.8	0.0	101.3
8	939-22733	1281.1	82.2	0.1	15.6
9	939-23861	2065.9	74.0	0.0	27.9
10	939-25886	110.5	269.0	2.4	0.4
11	939-29242	90.4	188.4	2.1	0.5
12	939-23906	1410.7	107.7	0.1	13.1
13	939-21920	207.6	296.7	1.4	0.7
14	939-23531	2628.0	85.6	0.0	30.7
15	939-29036	1205.7	37.9	0.0	31.8
16	939-21586	190.0	1046.0	5.5	0.2
17	939-23643	53.6	110.8	2.1	0.5
18	939-29515	112.8	637.7	5.7	0.2
19	939-26108	381.5	79.0	0.2	4.8
20	939-29830	218.1	77.5	0.4	2.8
21	939-25632	48.9	105.3	2.2	0.5
22	939-31063	2174.7	55.8	0.0	39.0
23	939-24411	146.8	351.4	2.4	0.4
24	939-23681	132.6	225.5	1.7	0.6
25	939-23247	280.4	432.5	1.5	0.6
26	939-21025	243.3	301.7	1.2	0.8
27	939-25326	1090.8	434.1	0.4	2.5
28	939-29676	250.8	207.8	0.8	1.2
29	939-30539	846.8	5.0	0.0	169.4
30	939-21647	1381.3	5.0	0.0	276.3
31	939-24775	1196.4	5.0	0.0	239.3
32	939-22123	121.6	210.7	1.7	0.6
33	939-30415	39.0	76.0	1.9	0.5
34	939-27304	33.0	14.0	0.4	2.4
35	939-28195	1693.3	5.0	0.0	338.7
36	939-23922	91.5	44.0	0.5	2.1
37	939-21404	293.0	5.0	0.0	58.6
38	939-22880	177.0	123.0	0.7	1.4
39	939-22429	141.0	2.4	0.0	58.8

Anexo 25. Niveles (pg/ml) de 11KT y 17 β -E₂ y valores de la relación E₂/11KT y 11KT/E₂ de 19 individuos juveniles del paiche.

N°	Código (chip)	11KT (pg/ml)	17 β -E ₂ (pg/ml)	E ₂ /11KT	11KT/E ₂
1	939-21874	29.0	18.0	0.6	1.6
2	939-28207	10.0	5.1	0.5	2.0
3	939-27952	15.3	2.4	0.2	6.4
4	939-23254	4.7	9.9	2.1	0.5
5	939-23172	59.0	13.6	0.2	4.3
6	939-29453	1.8	2.4	1.3	0.8
7	939-21275	43.0	6.9	0.2	6.2
8	939-27974	82.0	11.7	0.1	7.0
9	939-23794	14.0	13.4	0.9	1.0
10	939-27463	161.3	2.4	0.0	67.2
11	939-20944	102.0	2.4	0.0	42.5
12	939-27732	37.5	2.4	0.1	15.6
13	939-30553	144.7	2.4	0.0	60.3
14	939-27829	144.2	11.9	0.1	12.1
15	939-22090	48	2.4	0.1	20.0
16	939-25276	10.0	2.4	0.2	4.2
17	939-29959	140.6	2.4	0.0	58.6
18	939-21539	150.3	27.7	0.2	5.4
19	939-23317	31.0	4.9	0.2	6.3