

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA
PERUANA**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL EN PLASMA DE
"paiche" *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) CRIADO EN CAUTIVERIO.**

Bachiller

Juan Carlos García Dávila

Tesis para optar título profesional de Biólogo

Iquitos – Perú

2008

DEDICATORIA:

*A mis padres y hermanos,
por el amor, comprensión y el
apoyo brindado en mi formación
personal y profesional.*

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana a través del Proyecto Biodamaz, Programa de Ecosistemas Acuáticos, Programa de Biodiversidad – Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología – LBMB por las facilidades en la ejecución de este estudio.

Al Ph.D., Manuel Sandoval Chacón, consultor externo de BIODAMAZ, por la orientación brindada durante la ejecución de este Trabajo.

Al Dr. Fernando Alcántara Bocanegra, por su constante apoyo en la ejecución del presente trabajo.

Al Ing. Zootecnista en peces para la Acuicultura Remi Duge, por su desinteresado, valioso y fundamental aporte al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Fred Chu responsable de ACUIPRO y al M.Sc. Salvador Tello Director del Programa de Ecosistemas Acuáticos - PEA, por la amistad y el apoyo brindado.

A la Dra. Carmen García, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología – LBMB del IIAP, por todo el apoyo brindado en este estudio.

Al Ph. D, Dennis del Castillo Torres por la amistad y el constante apoyo moral para desarrollar este trabajo y por el incentivo para seguir creciendo profesionalmente.

A los Blgos. M. Sc. Palmira Padilla y Carlos Chávez por el apoyo brindado.

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, a través de la Facultad de Ciencias Biológicas por la orientación y formación profesional.

A los compañeros de laboratorio: Werner Chota, José Yuto, Diana Castro, Ericka Dávila, Grace Montalbán, Adela Ruíz, Adriana Iglesias, Nydia Eléspuru, Erland Ahuite, Javier Rodríguez, Carlos Del Águila, Cristiham Silva, Liliana Silva, Gabriel Rodríguez, Martín Rodríguez, por el continuo e invaluable apoyo brindado durante la ejecución de los trabajos en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros: Domingo García, Martín Rodríguez, Julio Ruíz, Lamberto Arévalo, Mercedes Torres, Italo Orbe, Juan López, Sixto Valderrama, Edwin Agurto, Cherry Yahuarcani, Asunción Apuela, Hugo Marichin, Medardo Montoya, Julio Ahuite, Luis Zafra, Arturo Flores, Luis Amias, Magno Oroche, William Amia, Elmer vela, Juan Ruiz, Dustin Silva, por la amistad y apoyo incondicional en el trabajo de campo.

A todos y cada uno de los que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR



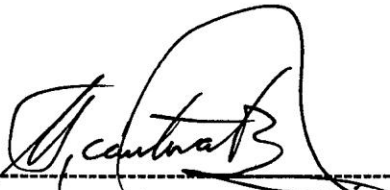
Dra. BLANCA DÍAZ BARDALES
Presidente



Blgo M.Sc. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ
Miembro



Blgo. M.Sc. LUIS CAMPOS BACA, Dr
Miembro



Dr. FERNANDO ALCÁNTARA BOCANEGRA
Asesor

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLA Y FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	07
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	09
II.1. Los estrógenos esteroides, estradiol y metabolismo.....	09
II.2. Posición sistemática y descripción morfológica.....	13
II.3. Hábitat y distribución geográfica.....	14
II.4. Biología y ecología.....	15
II.5. Potencialidades en la piscicultura.....	16
II.6. Genética poblacional del paiche.....	17
II.7. Investigación hormonal en peces.....	17
III. MÉTODOLOGÍA.....	20
III.1. Lugar de ejecución.....	20
III.2. Los paiches.....	20
III.3. Grupos experimentales.....	20
III.4. Manejo.....	20
III.5. Colección de sangre	21
III.6. Cuantificación de Estradiol.....	21
III.6.1. Preparación de reactivos.....	22
III.6.2. Preparación de los estándares.....	22
III.6.3. Armado de la placa.....	22
III.6.4. Lectura de la placa.....	23
III.7. Estimación de la concentración de Estradiol.....	24
III.8. Análisis de datos.....	25
IV. RESULTADOS.....	26
V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
VII. RESUMEN.....	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	40

INDICE DE TABLA Y FIGURAS

Tabla 01.-	Reactivos y cantidades aplicadas en las mezclas utilizadas para cuantificar estradiol en suero sanguíneo de paiche.	23
Tabla 02.-	Análisis estadístico descriptivo	27
Figura 01.-	Estrógenos más importantes.	11
Figura 02.-	Biosíntesis de estrógenos.	12
Figura 03.-	Ejemplares adultos de paiche <i>Arapaima gigas</i> (Cuvier, 1829) mostrando dicromatismo sexual en la época de reproducción: macho con zona abdominal rojiza y hembra con zona abdominal blanca.	14
Figura 04.-	Curva Estándar Estradiol	26
Figura 05.-	Concentraciones de estradiol en las muestras de plasma en ejemplares de ambos sexos de dos y de cinco años en paiche <i>Arapaima gigas</i> .	28
Figura 06.-	Test. de T de Student, en ejemplares de ambos sexos de 05 años en paiche <i>Arapaima gigas</i> .	29
Figura 07.-	Test. de T de Student, en ejemplares de ambos sexos de 05 años en paiche <i>Arapaima gigas</i> .	29
Figura 08.-	Relación de concentración de estradiol con longitud total en paiches machos <i>Arapaima gigas</i> .	30
Figura 09.-	Relación de concentración de estradiol con longitud total en hembras de paiches <i>Arapaima gigas</i> .	31
Figura 10.-	Paiche <i>Arapaima gigas</i> juveniles en estanques de concreto.	51
Figura 11.-	Captura de un paiche <i>Arapaima gigas</i> adulto del estanque de tierra.	51
Figura 12.-	Monitoreo de microchip en Paiche <i>Arapaima gigas</i> .	52
Figura 13.-	Extracción de muestra de sangre de la arteria caudal en <i>Arapaima gigas</i> .	52
Figura 14.-	Centrifugación y obtención del plasma de <i>Arapaima gigas</i> .	53
Figura 15.-	Aplicación de los reactivos y lectura de muestras.	53

I. INTRODUCCIÓN

El paiche, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), es una de las especies más representativas de la ictiofauna amazónica, tanto por el interés científico como por su valor económico, ambiental y cultural. A pesar de la importancia de este recurso para la humanidad, además de los conocimientos sobre su biología, ecología y aspectos zootécnicos. Es limitado los estudios en cuanto a perfiles hormonales, inmunológicos y bioquímicas, disminuyendo sus potencialidades para el cultivo en ambientes controlados (Sanabria *et al.*, 2005).

El conocimiento de las características reproductivas de una especie es una herramienta importante para el establecimiento de planes sostenidos de cultivo en cautiverio. En ese contexto es importante entender que existen diferentes parámetros reproductivos (tasa de reproducción, fecundidad, edad de la primera reproducción y dimorfismo sexual secundario, entre otros) que derivan de la interacción del genotipo con el ambiente. El entendimiento de estas características es punto de partida para la comprensión de otros aspectos asociados a la reproducción que servirán como herramientas fundamentales cuando se desee reproducir la especie en cautiverio.

Reportes de la literatura registran posiciones contrarias en cuanto a la presencia de caracteres sexuales secundarios en el paiche. Algunos autores manifiestan que esta especie presenta dicromatismo sexual transitorio durante el periodo reproductivo, tomando los machos una coloración más oscura (cabeza y ribetes de escamas del dorso y aleta dorsal, con una coloración roja más intensa), permitiendo supuestamente la diferenciación entre macho y hembra (Imbiriba, 1991 y Lourenço *et al.*, 1993). Sin embargo, Queiroz, 2002,

manifiesta que estas características no ofrecen seguridad absoluta en la diferenciación sexual del paiche y que la coloración no es una característica muy confiable en el momento de la formación de pares reproductores, indicando además que en ocasiones los machos presentan mayor longitud, mientras que las hembras presentan un cuerpo más corto y grueso. Por su parte Monteiro *et al* 2005, reportaron la presencia de una mancha anaranjada en la parte inferior de la cabeza de los machos.

El paiche por su excelente calidad de carne (ausencia de espinas intramusculares, bajo contenido de grasas y sabor muy particular), fácil adaptabilidad al cultivo en cautiverio y aceptación de comida artificial; es una especie con potencialidades para el cultivo intensivo. La principal dificultad para el desarrollo intensivo de esta actividad, es la deficiencia en la disponibilidad de alevinos, los cuales hasta el momento provienen principalmente del medio natural. Para el inicio de un plan de producción intensiva y sostenida de alevinos en cautiverio, es necesario establecer pares reproductores mediante la aplicación de técnicas para identificar el sexo a una temprana edad en esta especie. Los niveles hormonales fueron ya usados en el sexado de peces por varios autores tales como Barnett & Pankhurst (2003) en el pez *Rhombosolea tapirini*; Barannikova *et al.*, 2003 en tres especies de esturión y otros.

En este sentido el presente estudio tuvo como objetivo investigar los niveles de la hormona Estradiol en plasma de paiche con la finalidad de producir información que sirva como herramienta para la diferenciación sexual natural de esta especie.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II. 1. Los estrógenos esteroides, estradiol y metabolismo.

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17 β -estradiol, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico "A" (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo "D". El anillo fenólico "A" es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos.

Los estrógenos esteroides se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos. La reacción comprende aromatización del anillo "A", y ésta es catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monoxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como cosustratos.

La actividad de la aromatasa reside dentro de una glucoproteína transmembrana (familia P450 de monooxigenasas); también es esencial una flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa. Ambas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico de células de la granulosa ovárica, células de Sertoli y de Leydig testiculares, células del estroma de tejido adiposo, sincitiotrofoblastos placentarios, blastocisto previo a la implantación y diversas regiones del cerebro. (Idler 1972).

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en premenopáusicas. El principal producto secretor es el estradiol, sintetizado por células de la granulosa a partir de precursores androgénicos proporcionados por células de la teca. La actividad de aromatasa es inducida por gonadotropinas, que actúan por medio de receptores de membrana plasmática para incrementar las concentraciones intracelulares de adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico (AMP-cíclico, AMPc). Las gonadotropinas y el AMPc también incrementan la actividad de la enzima de desintegración de la cadena lateral del colesterol y facilitan el transporte del colesterol (el precursor de todos los esteroides) hacia las mitocondrias de células que sintetizan esteroides. El estradiol secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol. Esas transformaciones ocurren principalmente en hígado. Los tres estrógenos se excretan en la orina junto con glucurónidos y conjugados fosfato. En varones y en posmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de deshidroepiandrosterona, secretada por la corteza suprarrenal. De este modo, la concentración de estrógenos está regulada en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

Los estrógenos se sintetizan sobre todo en el ovario, concretamente en los folículos y el cuerpo lúteo del ovario, y en la placenta, aunque también son secretados en pequeñas proporciones por los testículos. Dicho proceso tiene lugar durante el segundo y tercer trimestre del embarazo en grandes cantidades. El ovario secreta el estradiol que es el que se produce en mayor

proporción y el estrógeno de mayor actividad biológica, así como estrona. La placenta por su parte produce a su vez estos mismos esteroides, pero además secreta el estriol, estrógeno que se produce más abundantemente durante la gestación. Los estrógenos: estrona, estradiol y estriol, son de estructura esteroide, con la característica de que tienen el anillo A derivado del benceno.

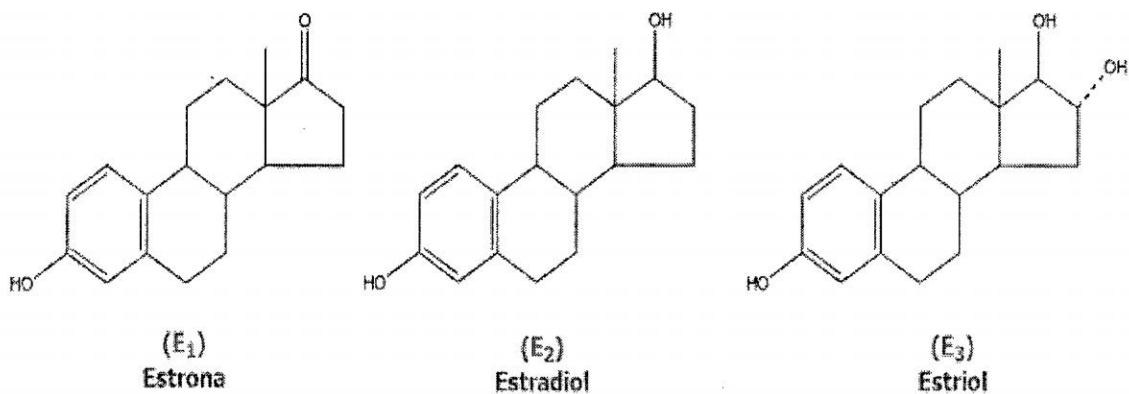


Figura 01.- Estrógenos más importantes.

Para la síntesis del estradiol, es necesaria la acción combinada de las gonadotropinas (LH), que van a estimular las células intersticiales del estroma y el cuerpo lúteo del ovario y las gonadotropinas (FSH) que fijarán su acción sobre las células granulosas del folículo de Graaf.

El estradiol se fija a la globulina fijadora de 17 β estradiol en el plasma circulante, no siendo así en el caso de la estrona y el estriol que sólo se fijan débilmente. Así mismo el estradiol experimenta un complejo metabolismo en los tejidos periféricos y en el hígado que comprende una oxidación reversible a estrona y una hidroxilación irreversible en C-2 y C-16. (Ruta 17).

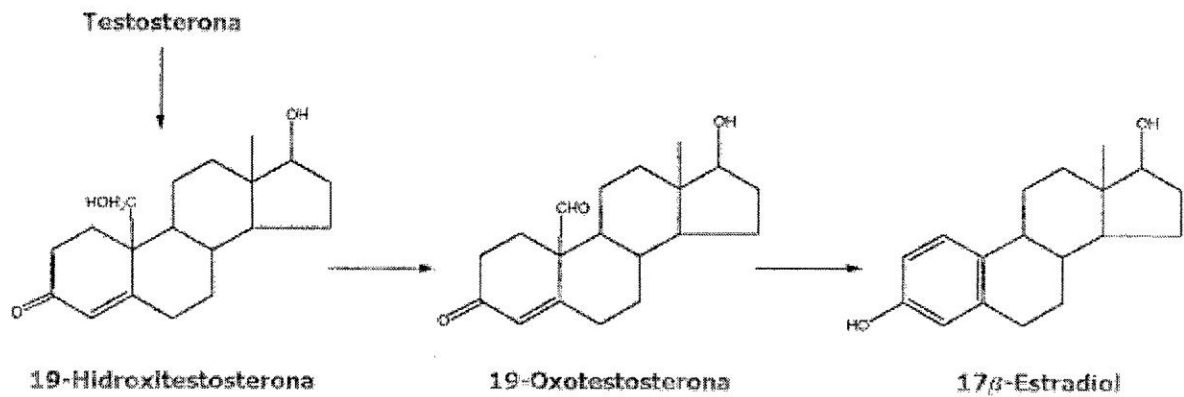


Figura 02.- Biosíntesis de estrógenos.

Los metabolitos se conjugan con ácido sulfúrico o glucurónico y se excretan vía la orina, vía bilis. La determinación cuantitativa de estos catabolitos en orina es importante porque permite estimar la velocidad de recambio de las hormonas esteroides, con su consiguiente utilidad en el diagnóstico de determinadas patologías. Los metabolitos biliares pueden sufrir más transformaciones metabólicas por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación portal. (Idler 1972).

Entre los metabolitos del estradiol estaría el derivado 2-hidroxílico, derivados que en conjunto reciben el nombre de catecol-estrógenos. La conversión en catecol-estrógenos tiene lugar en diferentes tejidos, entre ellos el cerebro.

El estradiol es una hormona que se secreta mayoritariamente en el ovario durante el embarazo y hay más secreción de la sustancia en la placenta. La formación del estriol placentario depende de la formación de un precursor enzimático que se crea en las glándulas suprarrenales y que es modificado estructuralmente en el hígado fetal que al pasar a la placenta promueve la formación de estriol.

II. 2. Posición sistemática y descripción morfológica

El paiche, de acuerdo con la clasificación de Lundenberg & Chernoff, 1992, presenta la siguiente posición sistemática:

Orden	:	Osteoglossiformes
Sub-orden	:	Osteoglossoidei
Súper familia	:	Osteoglossidae
Familia	:	Arapaimidae
Género	:	<i>Arapaima</i>
Especie	:	<i>Arapaima gigas</i> (Cuvier, 1829)

El paiche es uno de los mayores peces de agua dulce. Puede alcanzar una longitud de tres metros y más de 200kg de peso (Rebaza *et al.*, 1999). Tiene un cuerpo cilíndrico y alargado que se comprime en forma progresiva hacia la aleta caudal (Ferreira *et al.*, 1998). Las aletas están provistas de radios blandos que les proporcionan mayor flexibilidad; las aletas dorsal y anal están próximas a la parte caudal que es redondeada; las aletas pectorales y pélvicas tienen una posición ventral y en adultos presentan manchas negras y amarillas dispuestas en ondas irregulares. El cuerpo está revestido por grandes y gruesas escamas cicloides, estriadas, granuladas y ásperas que alcanzan hasta 6 cm. de longitud (Salinas & Agudelo, 2000). Ver figura 03.

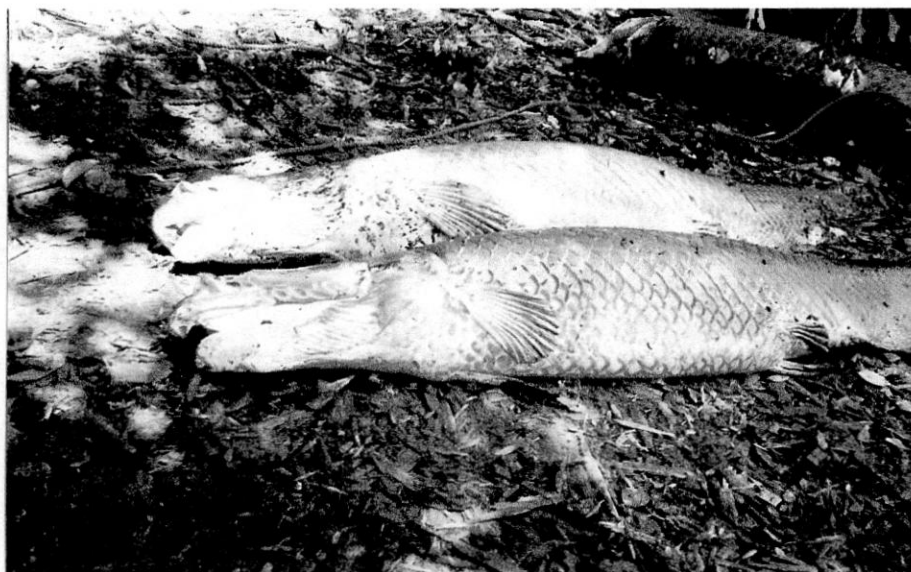


Figura 03.- Ejemplares adultos de paiche *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) mostrando dicromatismo sexual en la época de reproducción: macho con zona abdominal rojiza y hembra con zona abdominal blanca.

II. 3. Hábitat y distribución geográfica

Según Lundenberg & Chernoff, 1992 esta especie se distribuye naturalmente en la Amazonía continental desde el Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Brasil, hasta la Guyana inglesa y Suriname. El paiche habita en aguas con temperaturas de 24°C a 31°C de diversos ríos y lagos Amazónicos, de preferencia, en cuerpos de aguas lénticas (Pereira, 1954). Según Sánchez, 1961, en la amazonía peruana el paiche habita en los ríos con corriente muy lenta, particularmente en aquellos de agua negra. Prefiere los lagos, conocidos como “cochas”, que son abundantes en los sistemas hidrográficos amazónicos, que se caracterizan por poseer aguas con pH ácido, baja mineralización, alta transparencia, baja turbidez y bajos niveles de sólidos en suspensión, al igual que escasa biomasa fitoplanctónica (Rebaza *et al.*, 1999; Araujo & Goulding, 1997; IGAAC, 1997; Torres, 1975).

II. 4. Biología y ecología

Según Alcántara et al. (2006), la pareja dominante establece su territorio y lo defiende activamente de otros individuos de su especie o de otras especies, incluyendo el hombre. Este comportamiento se mantiene durante la construcción del nido, el desove, la fase larval y el período de alevinaje. La pareja elige su área de nidificación en la zona litoral, con una profundidad menor a un metro, de preferencia en áreas de suelo firme, sin vegetación y sin fango. El nido tiene una profundidad de 20 cm y un diámetro de 60 cm aproximadamente. Una vez que se realiza la puesta y fecundación en el nido, la pareja cuida los huevos durante cinco días, mientras se cumple el desarrollo del embrión. Al término de este período se produce la eclosión o salida de las larvas, con una longitud de 11,6 mm. Tanto la hembra como el macho proporcionan protección a su prole desde el momento de la puesta. El macho es directamente responsable de la protección del cardumen de larvas y pequeños alevinos, mientras que la hembra permanece cuidando el territorio, nadando en círculos y siempre en torno al paiche macho y sus crías. En condiciones de cultivo se pueden dar intentos de ataque a los humanos por parte de la hembra, que llega a elevarse sobre la superficie del agua produciendo un sonido intenso. Los alevinos poseen numerosas branquictenias (branquiespinas), largas y tupidas. Esta característica les da grandes posibilidades de filtración de los organismos presentes entre la vegetación acuática flotante de la zona litoral de los ambientes acuáticos.

Se ha demostrado que esta especie como muchos otros peces amazónicos, se ve influenciada por los cambios en los niveles del río y los

periodos de lluvia; es así como a comienzos del periodo de las aguas ascendentes, los paiches se agrupan para dar inicio al periodo reproductivo. La época de desove del paiche coincide generalmente con el periodo lluvioso que normalmente para la amazonía va desde octubre a junio, por lo que en el Perú se estableció este periodo como época de veda (01 de octubre hasta el 28 de febrero del año siguiente), quedando totalmente prohibida su extracción durante ese periodo (R. M. N° 215-2001-PE). Los adultos buscan reproducirse durante la época de aguas altas, debido a que el área de inundación se amplía grandemente y los pares reproductores pueden tener acceso a diferentes habitats (bosques inundados de aguas blancas y negras) que proveen alimentos y protección a su prole (Imbiriba *et al.*, 1991, 1993, 1994).

II. 5. Potencialidades en la piscicultura

El paiche es un recurso pesquero de alta potencialidad en la Amazonía peruana, debido a que presenta resistencia al manipuleo, se adapta fácilmente a la crianza en cautiverio, tiene rápido crecimiento, respira aire de la atmosfera o "boquea" al menos una vez por hora. Esto le ayuda a respirar ya que la mucosa de su boca es muy rica en vasos sanguíneos, por donde realiza el intercambio de aire, posee una excelente calidad de carne (sin espinas intramusculares), con un rendimiento de filete de alrededor del 51% y con amplia aceptación comercial en toda la cuenca Amazónica; características que lo convierten en una especie promisoría para la piscicultura (Sánchez, 1961).

En condiciones de cultivo se ha registrado un crecimiento de mas de 10 Kg. por año en base a la alimentación con peces vivos denominados "forraje"

como *Oreochromis niloticus* "tilapia", *Cichlassoma bimaculata* "bujurqui", *Moenkhausia* sp. "mojarras", pero también admiten otros peces muertos, enteros o en trozos, por lo que su manejo resulta relativamente fácil. La producción de paiche mediante la aplicación de tecnologías apropiadas de cultivo en ambientes controlados para la producción de crías con fines de exportación como peces ornamentales, así como para producción de carne, se presenta como una opción ecológica económica y socialmente viable debido a que su crianza disminuiría la presión de pesca sobre las poblaciones naturales y contribuirá a satisfacer las necesidades alimenticias de la población local, regional y nacional, Rebaza *et al.*, 2003.

II. 6. Genética poblacional del paiche

Pires *et al* (2003), estudió poblaciones de paiche *Arapaima gigas*, a través de marcadores microsatélites, indicando que las poblaciones de esta especie no son totalmente homogéneas a lo largo del río Amazonas y que, más bien presentan una estructuración geográfica debido al aislamiento; con poblaciones que presentan baja variabilidad genética debido a que sufrieron recientemente una reducción en el tamaño poblacional (efecto "cuello de botella" - bottleneck) causado probablemente por la sobre pesca que esta especie viene sufriendo por más de un siglo.

II. 7. Investigación hormonal en peces

Estudios hormonales fueron realizados con éxito en varios grupos de peces marinos, así como continentales de climas templados, entre los que mencionamos los realizados por Barnett & Pankhurst (2003), que estudiaron

los perfiles hormonales del pez *Rhombosolea tapirini* mostrando la producción de elevaciones múltiples de testosterona y estradiol a principios de la maduración ovocitaria; asimismo encontraron que a finales de la maduración ovocitaria el estradiol se eleva considerablemente, en asociación con la maduración del oocito en hembras; mientras que en la espermatogénesis, los machos presentan concentraciones elevadas de Testosterona. En tanto que Barannikova y colaboradores en el 2003 encontraron niveles bajos de estradiol en individuos machos y elevados niveles de estradiol en individuos hembras de tres especies de esturión estudiados.

En el “pez dama espinoso” *Acanthochromis polyacanthus*, los estudios de los procesos endocrinos productores de presión e inhibición en poblaciones naturales, mostraron que la variación hormonal no era una función de perturbación antes de la captura y que peces confinados por 2 o 6 h después de la captura presentan aumentos significativos en concentraciones de cortisol en plasma, y depresión de Estradiol - 2 en plasma en las hembras en verano pero no en invierno, no existiendo ninguna correlación entre las concentraciones del cortisol y esteroides del sexo en plasma a la captura. Por otra parte, la incubación in vitro de folículos ováricos de estos peces mostró que el tejido de la gónada todavía era esteroideo genéticamente activo. Este estudio sugiere que la inhibición de reproducción por tensión en el “pez dama espinoso” está por encima del nivel de biosíntesis del esteroide (Pankhurst, 2004). Entretanto D’Cotta *et al.*, 2001 menciona que la aromatasa juega un papel importante en la diferenciación sexual, que puede ser inducido por la temperatura como ocurre en tilapia *Oreochromis niloticus*. Los machos funcionales se pueden inducir con altas temperaturas, en este caso, el

estrógeno juega un papel importante en la determinación de hembras. La Aromatasa trabaja en estado normal para producir hembras, cuando se quiere producir machos se tiene que inducir a una represión de la aromatasa en las gónadas y quizás en el cerebro para la diferenciación hacia el desarrollo de los testículos.

En paiche existen pocos estudios de perfiles hormonales. En el 2005 Monteiro *et al.*, estudiaron las características de reproducción y perfil hormonales de *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), para validar la presencia de una mancha anaranjada en los machos como característica de dimorfismo sexual secundario. Para este estudio se midieron los perfiles de las hormonas testosterona (T), 17 beta - estradiol (E2) y 17 alfa - hidroxiprogesterona ($17\alpha\text{OHP}$) a través de radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida. Los resultados indican que los machos de 4 y 5 años que presentan la mancha anaranjada en la región inferior de la cabeza presentan mayores concentraciones de testosterona y estradiol al inicio del periodo lluvioso, en tanto que la hormona $17\alpha\text{OHP}$ tuvo oscilaciones constantes y pequeños picos en el final del periodo lluvioso, esto indicaría que los animales que tengan esta mancha serian machos.

III. METODOLOGÍA

III. 1. Lugar de ejecución

El presente estudio fue ejecutado en el centro de Investigaciones acuícolas de Quistococha y en el Laboratorio de Biotecnología del IIAP, situado en el km 4.5 de la carretera Iquitos Nauta.

III. 2. Los paiches

Los especímenes del estudio forman parte del stock experimental de paiche criado en cautiverio en el Centro de Investigaciones de Quistococha del IIAP, Iquitos. Los ocho ejemplares utilizados fueron clasificados en dos grupos experimentales compuestos de cuatro especímenes cada uno. Los individuos utilizados en este trabajo fueron ejecutados para la realización de otras investigaciones lo que fue aprovechado para la comprobación del sexo de cada individuo estudiado.

III. 3. Grupos experimentales

- I. Juveniles (2 años).
- II. Adultos (5 años).

III. 4. Manejo

Los juveniles fueron mantenidos en estanques de cemento y los adultos en estanques de tierra, estos animales fueron alimentados con peces forraje. La identificación de los individuos se realizó mediante la implantación de un microchip en la región dorsal posterior del cuerpo del pez.

III. 5. Colección de sangre

Se colectó la sangre de cada espécimen de la arteria caudal utilizando una jeringa de plástico conteniendo heparina (anticoagulante). La sangre fue colectada por dos veces en todo el período de estudio (en un intervalo de dos meses) primera colecta mes de Agosto, segunda colecta mes de octubre. La sangre colectada fue centrifugada a 5000 rpm/5 min a 4°C y el plasma obtenido fue almacenado a -80 °C hasta el momento del análisis.



III. 6. Cuantificación de Estradiol

Las concentraciones de Estradiol fueron medidas usando la técnica de Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) según los métodos recomendados por el fabricante del kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

Este ensayo es basado en la competición entre Estradiol libre y un trazador Estradiol (Estradiol conectado a una molécula de acetil colinestterasa (ACHE)) para un numero limitado de antisuero de conejo que liga sitios de estradiol-especifico. La concentración del trazador Estradiol es constantemente ayudado en el momento de la concentración por el Estradiol libre (Standard o muestra), varía la cantidad de trazador Estradiol que puede ligar al antisuero del conejo será inversamente proporcional a la concentración de Estradiol libre en el pozo.

El producto de esta reacción enzimática tiene un color amarillo distinto y absorbe fuertemente a 412 nm.

III. 6. 1.- Preparación de reactivos

Los estándares, tampones (de lavado y Enzimoimmunoensayo - EIA), reactivos específicos (Antisuero Estradiol, Indicador de Estradiol Acetilcolinesterasa, Estradiol estándar) y muestras de plasma fueron procesados siguiendo el protocolo modificado recomendado por el fabricante del kit, Cayman Chemical, (Ann Arbor, MI, USA) y almacenados a 4°C (ver protocolos en anexo 01).

III. 6. 2.- Preparación de los estándares

Los estándares o diluciones fueron preparados utilizando el estradiol estándar y el tampón EIA; en 8 tubos de ensayo limpios y numerados del 1 al 8. Se tomó una alícuota de 900 µl de tampón EIA para agregarlos en el tubo estándar 1 (S1) y 500 µl tampón EIA en los tubos del estándar 2 (S2) al estándar 8 (S8). Luego se transfirió 100 µl del volumen estándar (10 ng/ml) al tubo S1 y se mezcló completamente. Posteriormente se diluyó seriadamente el estándar para remover 500 µl del tubo S1, colocando en el tubo S2 y mezclando completamente. Se removió 500 µl del tubo S2 transfiriéndolo al tubo S3; mezclándolo completamente. Este proceso se repitió de los tubos S4 al S8. Estos estándares diluidos no deben estar almacenados por más de 24 horas. Obteniéndose las siguientes concentraciones en las diluciones: S1= 1000 pg/ml, S2 = 500 pg/ml, S3 = 250 pg/ml, S4 = 125 pg/ml, S5 = 62.5 pg/ml, S6 = 31.25 pg/ml, S7 = 15.625 pg/ml, S8 = 7.812 pg/ml.

III. 6. 3.- Armado de la placa

Cada placa contiene 96 pozos distribuidos en 12 bandas de ocho pozos cada una. En la cuantificación de Estradiol para cada ensayo se dejó dos pozos vacíos o blanco (BLK), dos pozos de ligazón no específica (NSB), tres pozos de ligazón máxima (Bo), un pozo de actividad total (TA), ocho pozos de estándares o diluciones (para levantar la curva estándar de ocho puntos y 16 pozos para las muestras del plasma puro) (tabla. 01).

La placa fue cubierta con película plástica, incubando por una hora a temperatura ambiente sobre una criba vibradora orbital. Pasado el tiempo programado se procedió a vaciar la placa y lavar por cinco veces con el tampón de lavado.

Tabla 01.- Reactivos y cantidades aplicados en las mezclas utilizadas para cuantificar Estradiol en suero sanguíneo de paiche.

Pozo	Tampón EIA	Std/Muestra	Indicador E	Antisuero
Blanco	-	-	-	-
TA	-	-	5µl (at devl step)	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
Bo	50 µl	-	50 µl	50 µl
Std/Muestra	-	50 µl	50 µl	50 µl

III. 6. 4.- Lectura de la placa

Para la lectura de la placa fue necesario preparar primero el reactivo de Ellman (reactivo revelador preparado el mismo día del ensayo con agua milli - q y protegido de la luz debido a su fotosensibilidad). En todos los pozos se aplicó 200 µl del reactivo de Ellman. En el pozo de actividad total además del reactivo de Ellman se aplicó 5 µl del indicador de estradiol. Luego se cubrió la placa con

película plástica, y se montó sobre en una criba vibradora orbital en completa oscuridad durante 60 -90 min. La lectura de la placa se efectuó a una longitud de onda de 415 nm en un lector ELISA Microplate Reader, Model 680 Bio RAD.

La lectura de la placa fue verificada periódicamente hasta que los pozos de ligazón máxima (Bo) ascendieron un mínimo de 0.3 de absorbancia. Cuando la absorción de los pozos sobrepasa 1.5 de absorbancia, se lava la placa, se agrega de nuevo 200 µl de reactivo de Ellman y se repite todo el proceso de lectura.

En la cuantificación del estradiol en total se realizó tres ensayos: a) ensayo de estandarización, en el que se usó cuatro bandas; b) primer ensayo de cuantificación, con el uso de cuatro bandas; y c) segundo ensayo de cuantificación, realizado a los dos meses del primero, con el uso de las últimas cuatro bandas.

III. 7. Estimación de la concentración de Estradiol

La estimación de la concentración de Estradiol se efectuó siguiendo el siguiente procedimiento:

Promediar las lecturas de absorción: pozos NSB, y de los pozos Bo.

Sustraer el promedio NSB del promedio Bo, para obtener el Bo corregido.

Calcular el porcentaje B/Bo (porcentaje de muestreo), para los pozos restantes, mediante la formula:

$$\%B/Bo = \frac{\text{Absorción del estándar 1} - \text{Promedio absorción NSB}}{\text{Bo corregido} \times 100}$$

Se repitió este procedimiento para el estándar 2 hasta el estándar 8 y todos los pozos de muestras.

Para obtener la curva estándar se ploteó las concentraciones de los estándares versus los % B/Bo de estos. Luego se aplicó logaritmo de base 10 a las concentraciones de los estándares; y se realizó el ploteo entre el % B/Bo versus las concentraciones obteniéndose una curva con una ecuación lineal.

Para determinar las concentraciones de estradiol en las muestras, se utilizó la ecuación lineal y posteriormente se aplicó el equivalente de transformación de las unidades picogramos por mililitro (pg/ml) que es igual a 10^{\wedge} (Resultado de la ecuación lineal).

III.8. Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva (gráficos de columnas o barras, media, desviación estándar, número máximo, número mínimo, coeficiente de variación, = C:V, Test de T student) y estadística inferencial (regresión lineal: ANOVA y grafico de dispersión).

IV. RESULTADOS

En la figura 04 se realizó el plotaje de las concentraciones de los estándares versus los % B/Bo de estos que nos permitió obtener la curva estándar, para hacer una primera estimación de la concentración del estradiol en machos y hembras de paiche, además nos permitió obtener la ecuación logarítmica de estos datos.

En esta primera estimación ya podemos apreciar la diferencia en concentración de estradiol entre paiches de 05 años de ambos sexos, las hembras presentan más estradiol que los machos.

Después sobre los datos de las concentraciones de los estándares se aplicó logaritmo base 10 para obtener una ecuación lineal. La cual fue utilizada para determinar las concentraciones de estradiol en las muestras, aplicando el equivalente de transformación de las unidades picogramos por mililitro (pg/ml).

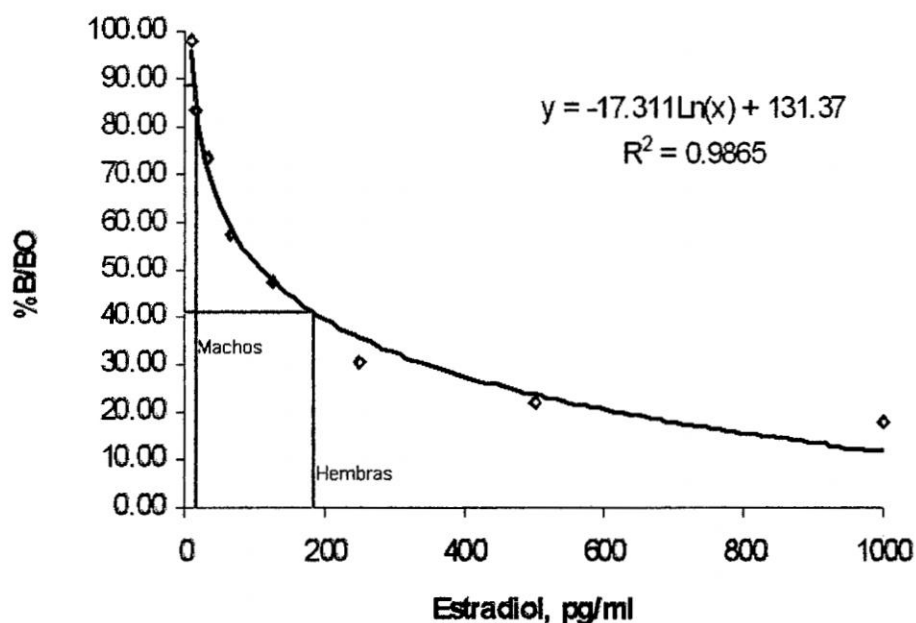


Figura 04.- Curva Estándar Estradiol

En los paiches estudiados, los ejemplares de dos años, no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de estradiol obtenidas para ambos sexos, los machos (C.V. = 40.33%) presentaron valores entre 4.74 y 12.19 pg/ml de estradiol (media de 7.91, desviación estándar de 3.19); las hembras (C.V. = 76.15%) presentaron valores entre 2.76 y 13.81 pg/ml de estradiol (media de 6.54, desviación estándar de 4.98).

Sin embargo los ejemplares de cinco años presentaron diferencias significativas; siendo que los machos (C.V. = 59.55%), presentaron valores entre 6.68 y 24.03 pg/ml de estradiol (media de 15.65, desviación estándar de 9.32); en tanto que los niveles de estradiol de las hembras (C.V. = 30.03%) variaron entre 109.85 y 223.76 pg/ml de estradiol (media de 160.16, desviación estándar 48.09). Estas diferencias pueden ser mejor visualizadas en la tabla 02 y figura 05 en la que se observa claras diferencias en la concentración de estradiol en ejemplares de paiche de cinco años.

Edad	Parámetros	Hembras	Machos
2 años	Media	6.54 pg/ml	7.91 pg/ml
	DesvEst	± 4.98	± 3.19
	Nº mínimo	2.76 pg/ml	4.74 pg/ml
	Nº máximo	13.81 pg/ml	12.19 pg/ml
	C.V.	76.15%	40.33%
	T de Student	0.659	
5 años	Media	160.16 pg/ml	15.65 pg/ml
	DesvEst	± 48.09	± 9.32
	Nº mínimo	109.85 pg/ml	6.68 pg/ml
	Nº máximo	223.76 pg/ml	24.03 pg/ml
	C.V.	30.03%	59.55%
	T de Student	0.001	

Tabla 02.- Análisis estadístico descriptivo

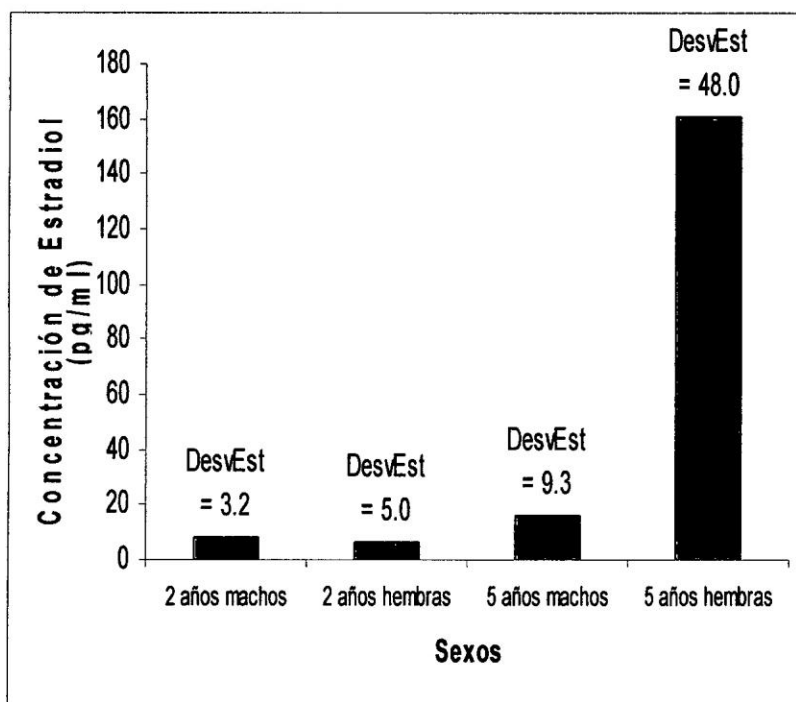


Figura 05.- Concentraciones de estradiol en las muestras de plasma en ejemplares de ambos sexos de dos y de cinco años en paiche *Arapaima gigas*

En ambos grupos experimentales se aplicó también el test T de Student para verificar la significancia estadística de los datos, en el caso de los animales de dos años las diferencias no son significativas (Figura 06), en cuanto que la concentración de estradiol entre ambos sexos de especímenes de 05 años fue altamente significativa estadísticamente (Figura 07).

Esto lo podemos ver más claramente en estos gráficos del test de T de Student, en individuos de 02 años se observa una sobre posición entre los datos analizados que son medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación demostrando que las pequeñas diferencias encontradas no son significativas estadísticamente (Figura 06). En individuos de 05 años no se

observa sobreposiciones de los parámetros en estudio, lo cual nos indica que estas diferencias reportadas son altamente significantes (Figura 07).

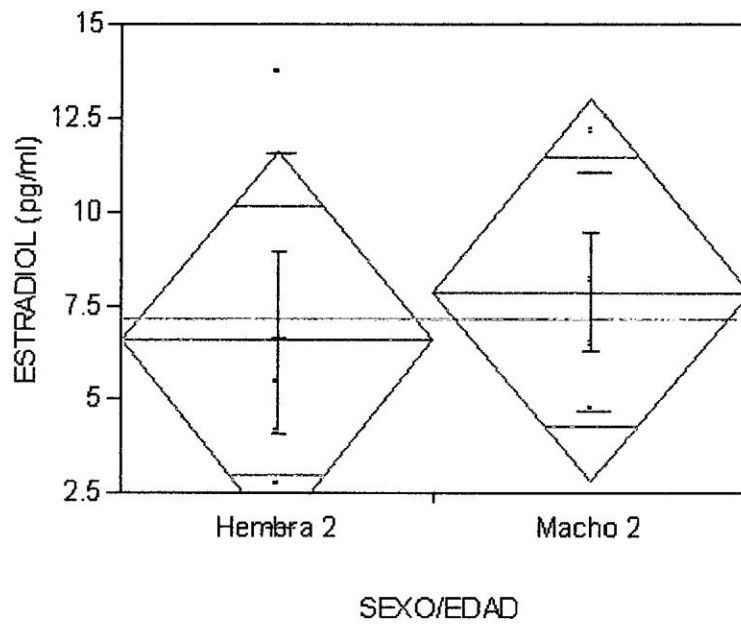


Figura 06.- Test. de T de Student, en ejemplares de ambos sexos de 05 años en paiche *Arapaima gigas*.

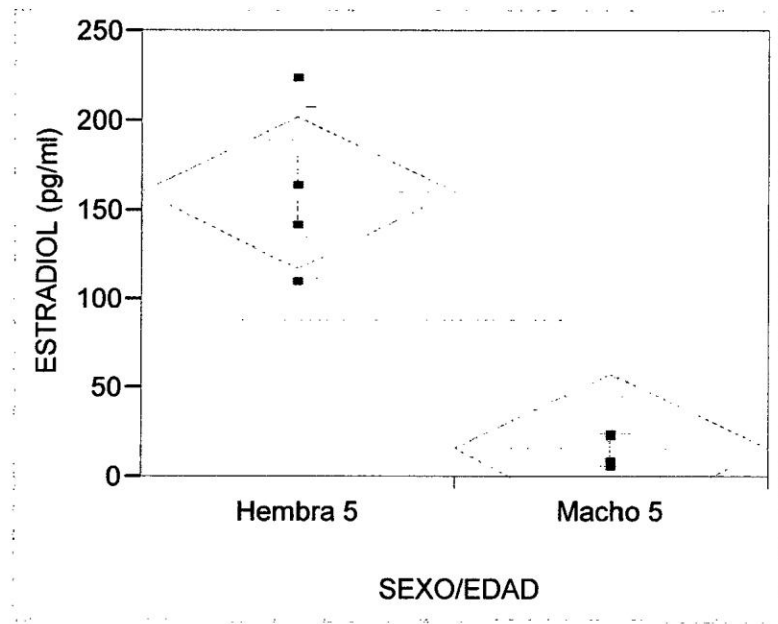


Figura 07.- Test. de T de Student, en ejemplares de ambos sexos de 05 años en paiche *Arapaima gigas*.

En las figuras 08 y 09 observamos la relación existente entre la longitud total del paiche y la concentración estradiol en el plasma sanguíneo de ejemplares machos y hembras de paiche; pudiéndose observar (Fig. 08) que en los machos la concentración del estradiol en plasma no acompaña el aumento de tamaño de los especímenes ($r^2 = 0.31$; $F = 2.68$). En tanto que en las hembras (Fig. 09) a medida que aumenta la longitud de los ejemplares aumenta la concentración de la hormona, mostrando de esta manera una fuerte relación entre estos dos parámetros ($r^2 = 0.89$; $F = 50.34$).

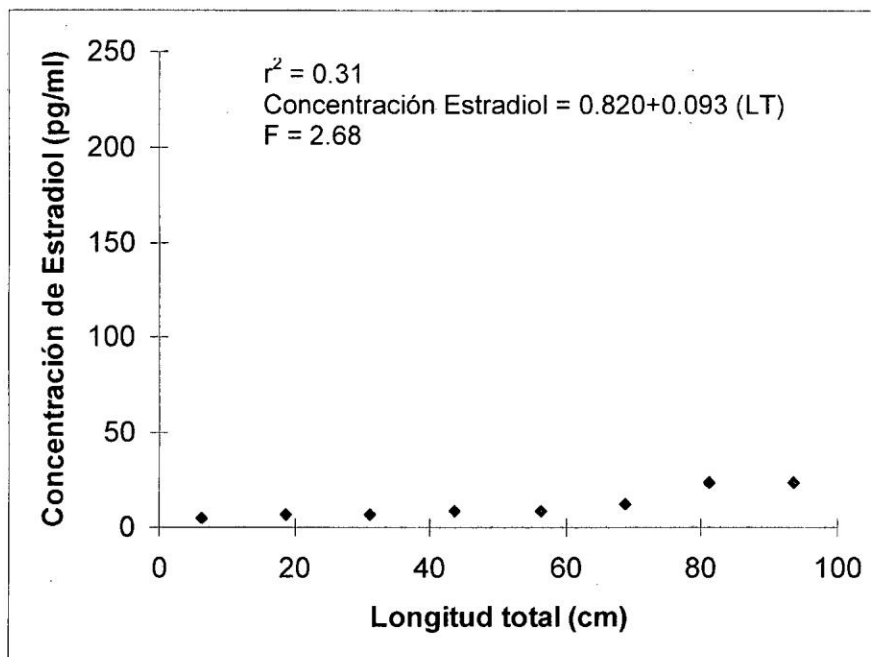


Figura 08.- Relación de concentración de estradiol con longitud total en paiches machos *Arapaima gigas*.

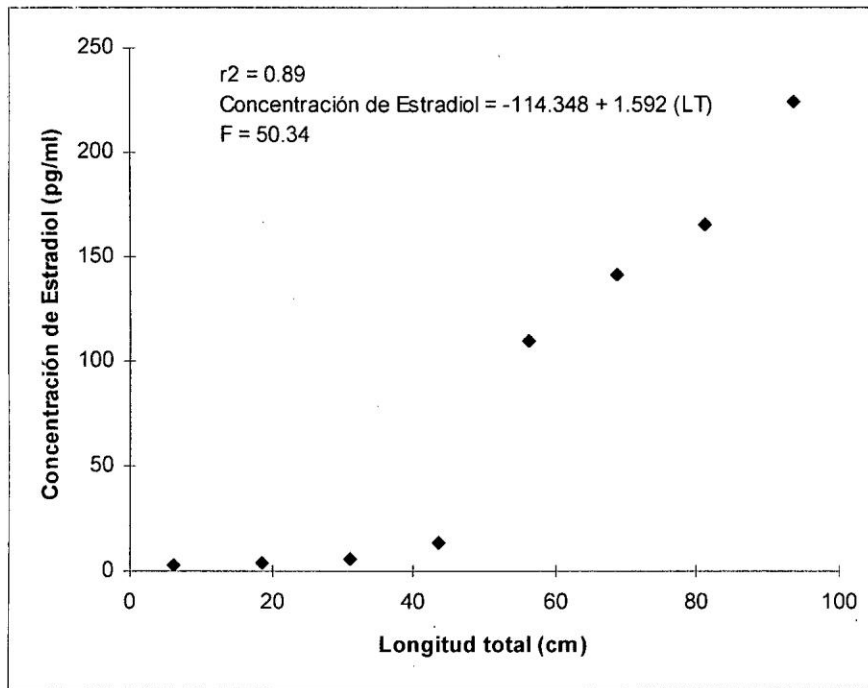


Figura 09.- Relación de concentración de estradiol con longitud total en hembras de paiches *Arapaima gigas*.

V. DISCUSIÓN

En ambos ensayos de estradiol para los individuos de dos años se puede observar que las concentraciones son muy bajas entre 2.76 y 13.81 pg/ml para ambos sexos, esto puede deberse a que estos individuos están en fase de crecimiento corporal, estando todavía relativamente lejana su primera maduración sexual, por lo cual es difícil establecer alguna diferencia hormonal clara a esta edad. Sin embargo, las concentraciones de estradiol cambian totalmente en individuos de cinco años, ya que los machos presentaron concentraciones de estradiol muy bajas (entre 6.67 y 24.03 pg/ml), en contraste a los elevados valores registrados en las hembras (entre 109.85 y 223.76 pg/ml), observándose claramente a esta edad una diferenciación hormonal

entre ambos sexos, que puede deberse a que estos individuos están entrando a la etapa reproductiva preparándose para su primera maduración sexual. Estos resultados corroboran los reportados por Monteiro *et al.* (2005) que estudiando el perfil hormonal de *Arapaima gigas* mediante la técnica de Radioinmunoensayo de fase sólida, encontraron que los individuos de 2 años presentaron un promedio de 15.08 pg/ml, mientras que en especímenes de tres años los machos presentaron 15 pg/ml y las hembras 138.33 pg/ml; diferenciación que va acentuándose cada vez más en los ejemplares de cuatro años, cuyos machos presentaron bajas concentraciones de estradiol (10 pg/ml) en comparación con los elevados valores de las hembras (65.42 pg/ml). Por otra parte, los valores obtenidos en nuestro estudio para individuos de cinco años complementan estos resultados observando que las diferencias entre ambos sexos se incrementan a medida que aumenta la edad. Estos resultados posiblemente se deban a que los especímenes mayores derivan gran parte de su energía a la fijación de diferencias sexuales entre ambos sexos, incrementándose la producción de esta hormona a medida que las hembras entran a la etapa de reproducción debido principalmente a que esta hormona promueve el desarrollo y maduración de los ovarios (Idler 1972).

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las concentraciones de estradiol en individuos machos y hembras de dos años son muy bajas debido a que se encuentra lejana la etapa de madurar sexualmente.

Las concentraciones de estradiol en individuos de cinco años presentan diferencias ligadas al sexo. En tanto que los machos presentan concentraciones bajas, las hembras presentan concentraciones relativamente elevadas.

Es posible determinar el sexo del paiche cuantificando la concentración de estradiol en plasma sanguíneo en individuos de cinco años.

No se recomienda la cuantificación de estradiol en plasma sanguíneo en individuos de dos años.

Se recomienda realizar estudios de cuantificación de estradiol en individuos de edades intermedias a la del presente estudio (tres y cuatro años).

Se recomienda también continuar con el estudio de la concentración de otras hormonas en el plasma del paiche para acortar la edad de diferenciación sexual a edades mucho más tempranas.

VII. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el nivel de estradiol y testosterona en el plasma sanguíneo del paiche *Arapaima gigas* a diferentes edades. Fueron utilizados ocho individuos perfectamente identificados, los que fueron agrupados en juveniles (dos años) y adultos (cinco años). Para obtener el plasma, se colectó 2 ml de sangre dos veces durante el periodo de estudio. La cuantificación de la hormona estradiol fue realizada en un espectrofotómetro (Microplate Reader) a 415 nm. Los resultados indican que la concentración de estradiol puede ser utilizada para la diferenciación sexual de individuos de cinco años de edad, no siendo eficiente para la diferenciación sexual en individuos de dos años de edad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- ALCÁNTARA, B.; WUST, H.; TELLO, M.; REBAZA, A. & DEL CASTILLO, T. 2006. Paiche. El gigante del Amazonas. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 70 p.
- ARAUJO, C. & GOULDING, M. 1997. So fruit a fhis, Ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's Tambaqui. Ed, Casebound editions of Columbia University, Columbia, Estados Unidos.
- BARNETT, C. W & PANKHURST, N. W. 2003. Reproductive biology and endocrinology of greenback flounder *Rhombosolea tapirini* (Gunther 1862). Marine and freshwater Researche 50 (1) 35 – 42.
- BARANNIKOVA, I. A.; BAYUNOVA, L. V. & SEMENKOVA, T. B. 2003. Serum levels of testosterone, 11 – ketotestosterone and estradiol - 17 β in tree species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. Journal of biology. Volumes 64 Issue 5 Pages 1330 – May 2004. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00395.x.
- D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M. & BAROILLER, JF. 2001. Aromatase Plays a key Role During Normal and Temperature – induced Sex Differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. Mol. Reprod. Dev. 59:265 – 276, 2001. © 2001 Wiley – Liss, Inc.

FERREIRA, E.; J. ZUANON & G. MENDES. 1998. Peixes Comerciales do meio Amazonas. Região de Santarém- PA. MMA-IBAMA. Brasília, Brasil. 120p.

IDLER, D. 1972. Steroids in nonmammalian vertebrates. Academia Press. New York. 504 p.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTIN CODAZZI (IGAC). 1997. Zonificación Ambiental para el plan modelo colombo brasileiro (eje Apaporis-Tabatinga). Ed. Linotipia Bolivar. Bogota, Colombia.

IMBIRIBA, E. P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. Acta Amazónica 31(2): 299 – 316 pp.

IMBIRIBA, E. 1994. Reprodução, larva e alevinagem do pirarucu, *Arapaima gigas*. Recomendações básicas. Ed. EMBRAPA, CPATU. Brasil. Circular técnica, N° 26, 4p.

IMBIRIBA, E.; J. LOURENÇO & B. BARTEN. 1993. Bioecologia e manejo sustentado do pirarucu (*Arapaima gigas*) na bacia Amazónica. EMBRAPA. Brasil.

- IMBIRIBA, E. P. 1991. Produção e manejo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier).: EMBRAPA – CPATU. Belém, Brasil. EMBRAPA – CPATU, Circular Técnica, N° 57.19p.
- LORENÇO, J.; E. IMBIRIBA & B. BARTEN, 1993. Bioecología e manejo sustentado do pirarucu (*Arapaima gigas*) na bacia da amazonia. EMBRAPA.
- LUNDERBERG, J. G. & CHERNOFF, B. 1992. Amiocene fossil of the Amazonian fish arapaima (teleostei - Arapaimidae) from the Magdalena river region of Colombia. Chicago – USA. Biotropica 24(1): 2 – 14 .
- MOJICA, J.; CASTELLANOS, C.; USMA, J. & ÁLVAREZ, R. 2002. Libro rojo de peces dulce acuícola de Colombia. La serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, Colombia. 288 pp.
- MONTEIRO, L. B. B.; SOARES, M. DO C. F.; CATANHO, M. T. J. & HONCZARYK, A. 2005. Aspectos Reprodutivos e Perfil Hormonal dos Esteróides Sexuais do Pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ,1822), em Condições de Cativeiro. Aqüicultura . Manaus – Brasil.

- PANKHURST, N. W. 2004. Stress inhibition of reductive endocrine processes in a natural population of the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *Marine and freshwater Research* 52(5) 753 – 761.
- PEREIRA, N. 1954. O Pirarucu (*Arapaima gigas*). Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e pesca. Rio de Janeiro/ BR. 23p.
- FARIAS, I. 2003. Avaliação da variabilidade genética das populações de *Arapaima gigas* (Pirarucu) da bacia Amazônica a través de genes do DNA mitocondrial e marcadores moleculares de microsátélites. Seminario taller internacional de manejo de Paiche o Pirarucu. Iquitos Perú. Pág. (149 – 154).
- QUEIROZ, H. L. 2002. A Pesca artesanal de pirarucus na Estação Ecológica Mamirauá. En: Padock, C.; M. Pinedo; A. Anderson y M. Aires (Eds). *Conservação e Uso de Recursos nas Matas Alagadas da Amazônia*. SCM/CNPq/New York Botanical Garden.
- REBAZA, M.; REBAZA, C. & DEZA, S. 2003. Observaciones de la reproducción del paiche, *Arapaima gigas* (Cuvier) en ambientes controlados en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP UCAYALI). Seminario taller internacional de manejo de paiche o pirarucu. Iquitos, Perú. P.111-123.
- RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 215-2001-PE. Lima. 2001.

REBAZA, M.; F. ALCANTARA & M, VALDIVIESO. 1999. Manual de piscicultura del Paiche (*Arapaima gigas*). Ed. Manatí gráfico S. A., Caracas, Venezuela.

SALINAS, Y. & E. AGUDELO. 2000. Peces de importancia económica en la cuenca amazónica colombiana. Ed. Scripto Ltda. Bogotá, Colombia. 140p.

SANABRIA, O. A.; BELTRÁN, G. I. & VICTORIA, D. P. 2005. Biología y cultivo del pirarucú *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae). Bases para un aprovechamiento sostenible. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural (INCODER), Universidad Nacional de Colombia. Imprenta Nacional de Colombia. Bogota, D. C. – Colombia. 109p.

SÁNCHEZ, R. J. 1961. "El paiche" Aspectos de su historia natural, ecología y aprovechamiento. Servicio de pesquería. Ministerio de Agricultura. 48p.

TORRES. D. 1975. El pirarucú, *Arapaima gigas* (curso de vertebrados Universidad de los Andes. Bogotá, D. E. Colombia).

Anexo

Anexo N° 01

Protocolo de cuantificación de Estradiol

Preparación y almacenamiento de tampones. Los tampones fueron preparados de acuerdo al protocolo establecido por Cayman Chemical y almacenado a 4°C.

Preparación del tampón Enzimoinmunoensayo (EIA):

Se diluyó 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 tiene el precipitado.

Preparación tampón de lavado:

Se diluyó 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 se agregó 1 ml del reactivo Tween 20 (vial # 5a).

Preparación de reactivos específicos de ensayo

Estradiol estándar.

Se equilibró una pipeta en etanol varias veces. Usando la pipeta equilibrada, se transfirió 100 µl. del Estradiol estándar (vial #3) dentro de un tubo limpio de prueba, luego se diluyó con 900 µl de agua ultra pura. La concentración de esta solución (de volumen estándar) fue 10 ng/ml.

Se preparó el estándar para el uso del tampón EIA; en 8 tubos de ensayo limpios y numerados del 1 al 8. Se tomó una alícuota de 900 µl tampón EIA en el tubo número 1 y 500 µl tampón EIA en los tubos 2 al 8. Luego se transfirió 100 µl. del volumen estándar (10 ng/ml) al tubo #1 y se mezcló completamente. Posteriormente se diluyó seriadamente el estándar para remover 500 µl del

tubo 1, colocando en el tubo 2 y mezclando completamente. Aproximadamente, se removió 500 µl del tubo 2 transfiriéndolo al tubo 3; para mezclar completamente. Este proceso se repitió de los tubos 4 al 8. Estos estándares diluidos no deben estar almacenados por más de 24 horas.

Preparación del Indicador de Estradiol Acetilcolinesterasa.

Se preparó 100 dtn del indicador Estradiol (vial # 2) con 6 ml del tampón EIA, almacenando el indicador reconstruido de Estradiol a 4°C. (sin congelar), siendo usado en el plazo de 2 semanas. Para ayudar en la visualización de los pozos conteniendo el indicador, se agregó 60 µl de color a 6 ml del indicador.

Antisuero Estradiol.

Se preparó el antisuero del Estradiol 100 dtm (vial # 1) con 6 ml de tampón EIA almacenando el Antisuero (E) reconstruido a 4°C. El reactivo fue estable por 4 semanas. Para ayudar en la visualización de los pozos conteniendo el antisuero, se agregó 60 ml de color a 6 ml del antisuero.

Ejecución del ensayo.

Armado de la placa.

Cada placa contiene 96 pozos distribuidos en bandas de ocho pozos cada una. Las bandas o grupo de bandas deben contener un mínimo de 2 pozos vacíos (Blk), 2 pocitos de ligazón no específica (NSB), 2 pozos de ligazón máxima. (Bo) y una curva estándar de 8 puntos.

En esta placa se añadió 100 µl. del tampón EIA a los pozos de ligazón no específica (NSB). Se agregó 50 µl. EIA a los pozos de ligazón máxima (Bo).

Estradiol estándar:

Se agregó 50 µl. del tubo # 8 al pozo de estándar (S8). Agregando 50 µl. del tubo # 7 al pozo 2 estándar (S7) continuando con este procedimiento hasta que todos los estándares estuvieron en alícuotas. La misma pipeta fue usada para todas las alícuotas de los estándares.

Muestras

Se agregó 50 µl. por pozo.

Indicador Estradiol acetilcolinesterasa.

Se añadió 50 µl para cada pozo excepto a actividad total (TA) y los pozos vacíos (Blk).

Antisuero Estradiol.

Se agregó 50 µl para cada pozo excepto la actividad total (TA) y (NSB) y los pozos vacíos (BLK).

Pozo	Tampón EIA	Std/Muestra	Indicador E	Anticuerpo
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5µl (at devl step)	-
NSB	100 µl.	-	50 µl.	-
Bo	50 µl.	-	50 µl.	50 µl.
Std/Muestra	-	50 µl.	50 µl.	50 µl.

Anexo 02. Resumen de Pipeteo (rápida referencia.)**Incubado de la placa.**

Se cubrió la placa con película plástica (item # 7) incubándolo por una hora a temperatura ambiente sobre una criba vibradora orbital.

Desarrollo de la placa.

Se reconstituyó un frasco de reactivo de Ellman de 100 dtn (Vial # 8) con 20 ml de agua ultra pura. El reactivo de Ellman reconstituido es inestable y se usó el mismo día que se preparó; protegiéndolo de la luz cuando no se usó.

Luego se vació la placa y se lavó 5 veces con el tampón de lavado. Posteriormente se agregó 200 μ l. de reactivo de Ellman a cada pozo y 5 μ l de indicador para el pozo de actividad total, luego se cubrió la placa con película plástica.

Para el desarrollo óptimo se usó una criba vibradora orbital equipada con una escala, se cubrió el piso para permitir que la placa se desarrolle en oscuridad. Este ensayo típico se desarrolló (por ejemplo Bo positos iguales 0.3 A. U.)(sustrato vacío) de 60 -90 min.

Lectura de la placa.

Se leyó la placa a una longitud de onda de 415 nm. Antes de leer la placa, se secó la parte de abajo de la placa con un papel toalla limpio para remover huellas digitales, suciedad, etc, así como manchas en la parte de abajo de la placa cubierta para prevenir la interferencia de residuos de reactivos que puede afectar las lecturas de absorción.

La placa fue verificada periódicamente hasta los pozos Bo a ascendido un mínimo de 0.3 A.V. (sustrato vacío). La placa debe ser leída cuando la absorción de los pozos Bo está en el rango de 0.3 - 0.8 AV (sustrato vacío). Cuando la absorción de los pozos excedió a 1.5, se lavó la placa, agregando el reactivo fresco de Ellman y dejando desarrollar de nuevo.

CUANTIFICACIÓN DE ESTRADIOL

Estradiol Ensayo I.

Anexo N° 03. Resultados de las absorbancias obtenidas para los Indicadores, Estándares y cálculo del porcentaje de muestreo (% B/Bo).

	Absorbancia 415nm	Promedio	estándares	Absorbancia 415nm	Porcentaje de muestreo (%B/Bo)
BLK	-0.587		S1	-0.485	17.94
BLK	-0.743		S2	-0.3465	27.80
NSB	-0.742		S3	-0.2925	31.64
NSB	-0.732	-0.737	S4	-0.131	43.14
Bo	0.67		S5	0.102	59.73
Bo	0.659		S6	0.3015	73.93
Bo	0.674	0.667667	S7	0.450	84.50
TA	0.797		S8	0.6235	96.86

Corregido Bo: 1.404667

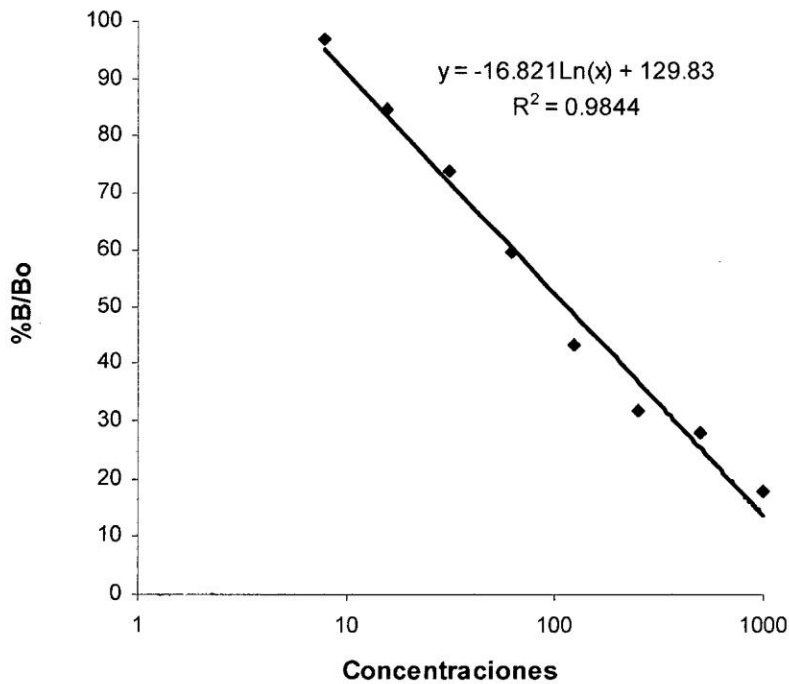
TA: 1.76

Anexo N° 04. Resultados de las absorbancias obtenidas para las muestras de plasma puro y cálculo del porcentaje de muestreo (%B/Bo).

Muestra	Edad / Sexo	Absorbancia 415nm	Porcentaje de muestreo (%B/Bo)
1	2H	0.765	106.93
2	2H	0.474	86.21
3	2M	0.731	104.51
4	2M	0.504	88.35
5	5M	0.341	76.74
6	5M	0.348	77.24
7	5H	-0.024	50.76
8	5H	-0.122	43.78

Anexo N° 05. Concentraciones de Estradiol de los estándares y sus porcentajes de muestreos utilizados en el Ensayo I

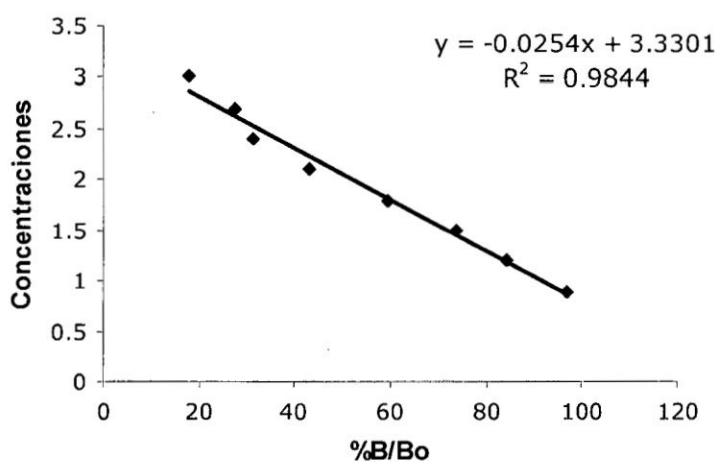
Estándares	Estradiol pg/ml	porcentaje de muestreo (% B/Bo)
S1	1000	17.94
S2	500	27.80
S3	250	31.64
S4	125	43.14
S5	62.5	59.73
S6	31.25	73.93
S7	15.625	84.50
S8	7.812	96.86



Anexo N° 06. Curva estándar logarítmica obtenida para el ensayo I.

Anexo N° 07. Datos para obtener la curva y la ecuación lineal aplicando logaritmo a las concentraciones de estradiol de los estándares.

Estándares	Porcentaje de muestreo (% B/Bo)	Logaritmo base 10 de la Concentración estradiol
S1	17.94	3.00000
S2	27.80	2.69897
S3	31.64	2.39794
S4	43.14	2.09691
S5	59.73	1.79588
S6	73.93	1.49485
S7	84.50	1.19382
S8	96.86	0.8927622



Anexo N° 08. Curva estándar para obtener la ecuación lineal utilizada en el ensayo I.

Estradiol Ensayo II.

Anexo N° 09. Resultados de las absorbancias obtenidas para los Indicadores, Estándares, y cálculo del porcentaje de muestreo (%B/Bo).

	Absorbancia 415nm	Promedio	Estándares	Absorbancia 415nm	Porcentaje de muestreo (%B/Bo)
BLK	-0.527		S1	-0.329	17.90
BLK	-0.532		S2	-0.284	21.78
NSB	-0.535		S3	-0.183	30.49
NSB	-0.538	-0.5365	S4	0.017	47.74
Bo	0.601		S5	0.129	57.40
Bo	0.645		S6	0.315	73.44
Bo	0.623	0.623	S7	0.433	83.61
TA	1.213		S8	0.599	97.93

Corregido Bo: 1.1595

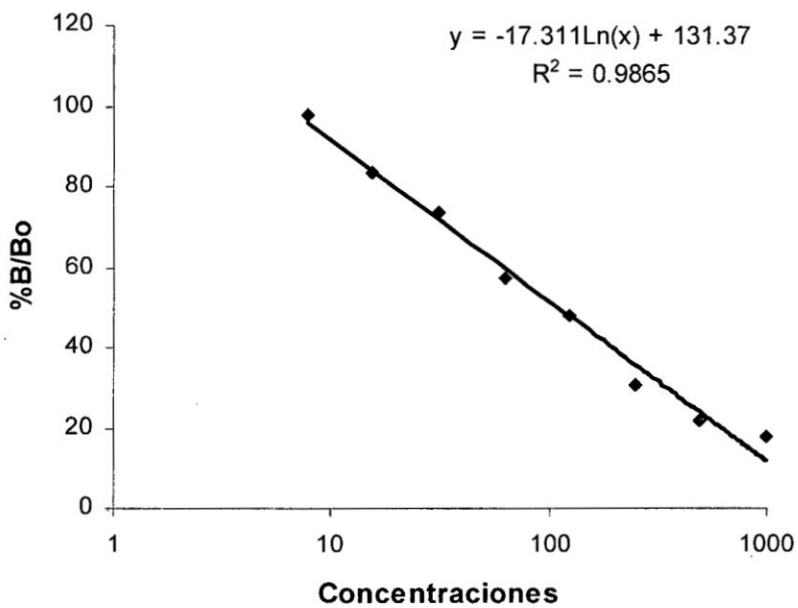
TA: 0.96

Anexo N° 10. Resultados de las absorbancias obtenidas para las muestras de plasma puro y cálculo del porcentaje de muestreo (%B/Bo).

Muestra	Edad / sexo	Absorbancia 415nm	porcentaje de muestreo (%B/Bo)
1	2H	0.795	114.83
2	2H	0.656	102.85
3	2M	0.573	95.69
4	2M	0.621	99.83
5	5M	0.615	99.31
6	5M	0.565	95.00
7	5H	-0.008	45.58
8	5H	-0.101	37.56

Anexo N° 11. Concentraciones de Estradiol de los estándares y sus porcentajes de muestreos utilizados en el Ensayo II

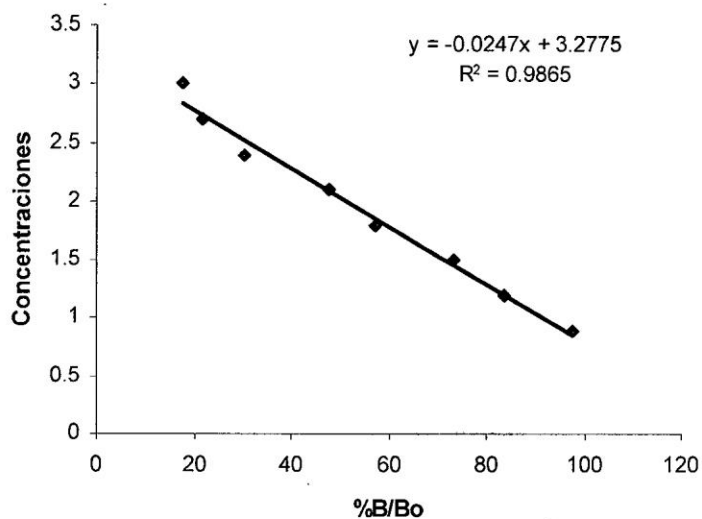
Estándares	Estradiol pg/ml	Porcentaje de muestreo %B/Bo
S1	1000	17.90
S2	500	21.78
S3	250	30.49
S4	125	47.74
S5	62.5	57.40
S6	31.25	73.44
S7	15.625	83.61
S8	7.812	97.93



Anexo N° 12. Curva estándar logarítmica obtenida para el ensayo II.

Anexo N° 13. Datos para obtener la curva y la ecuación lineal aplicando logaritmo a las concentraciones de estradiol de los estándares.

Estándares	Porcentaje de muestreo (%B/Bo)	Logaritmo base 10 de la concentración estradiol
S1	17.90	3.00000
S2	21.78	2.69897
S3	30.49	2.39794
S4	47.74	2.09691
S5	57.40	1.79588
S6	73.44	1.49485
S7	83.61	1.19382
S8	97.93	0.8927622



Anexo N° 14. Curva estándar para obtener la ecuación lineal utilizada en el ensayo II.

Anexo N° 15



Figura 10.- Paiche *Arapaima gigas* juveniles en estanques de concreto.



Figura 11.- Captura de un paiche *Arapaima gigas* adulto del estanque de tierra.

Anexo N° 16



Figura 12. - Monitoreo de microchip en Paiche *Arapaima gigas*.



Figura 13.- Extracción de muestra de sangre de la arteria caudal en *Arapaima gigas*.

Anexo N° 17

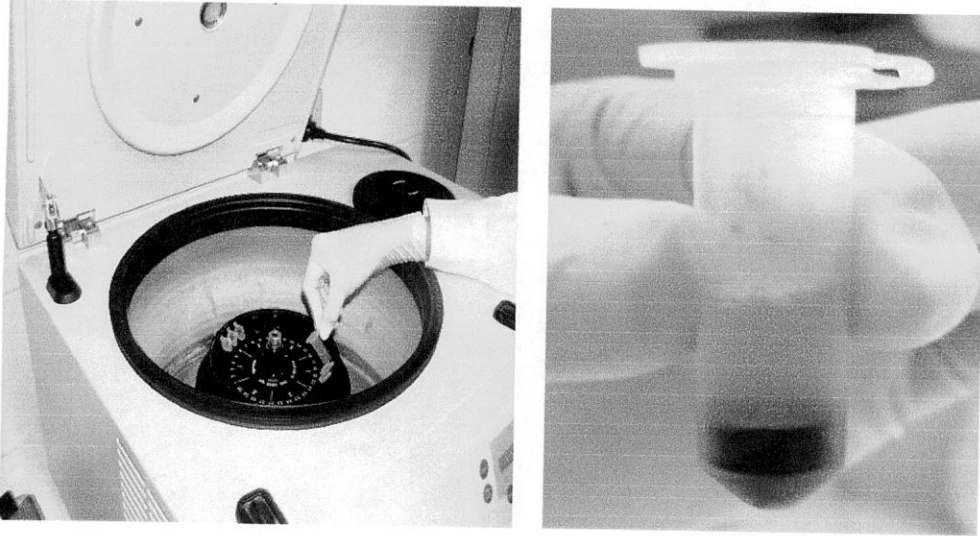


Figura 14.- Centrifugación y obtención del plasma de *Arapaima gigas*.

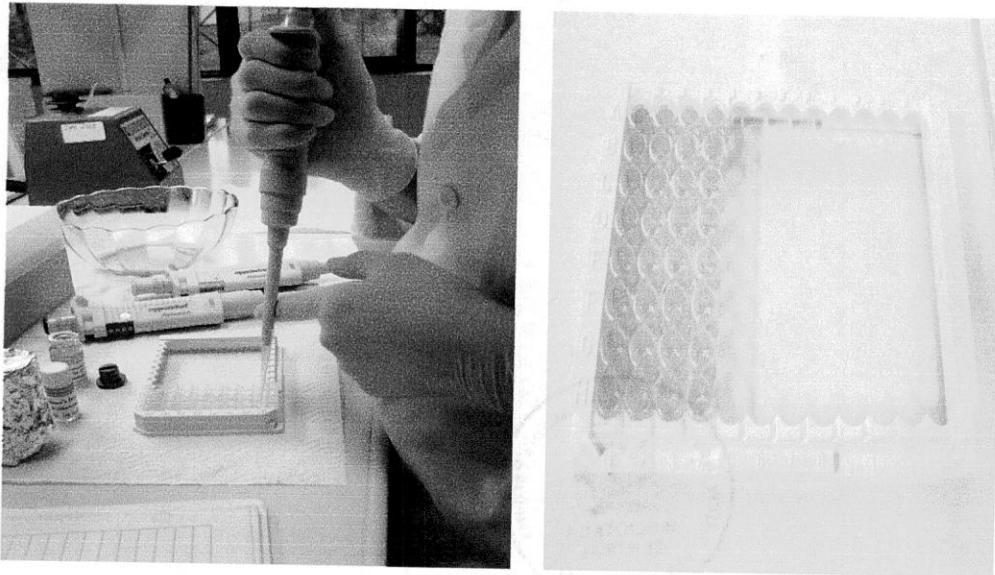


Figura 15. Aplicación de los reactivos y lectura de muestras.