



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ACUICULTURA

TESIS

**EFECTO DE DOS INDUCTORES HORMONALES EN LA
REPRODUCCIÓN DE *OSTEOGLOSSUM BICIRRHOSUM*
VANDELLI, 1829 “ARAHUANA” EN AMBIENTES CONTROLADOS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN ACUICULTURA**

AUTOR : PEDRO RAMÍREZ ARRARTE

**ASESORES: Dr. JESUS NUÑEZ RODRIGUEZ
Dr. FRED WILLIAM CHU KOO**

IQUITOS – PERÚ

2018



UNAP

Escuela de Post Grado
Oficina de Asuntos Académicos

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Con **Resolución Directoral N° 0097-2010-EPG-UNAP** de fecha 17 de febrero de 2010, la Escuela de Postgrado designa como Jurado Evaluador y Dictaminador de Sustentación de Proyecto de Tesis a los señores que a continuación se indica:

Dr. Lorgio Verdi Olivares	Presidente
MSc. Palmira Padilla Pérez	Miembro
MSc. Marina Claudiana del Aguila Pizarro	Miembro

Y, en el distrito de San Juan Bautista a los quince días del mes de Noviembre de 2013 a horas 04:00 p.m., en el Auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, se constituyó el Jurado, para escuchar la sustentación de la tesis titulada: **"EFECTO DE DOS INDUCTORES HORMONALES EN LA REPRODUCCIÓN DE *Osteoglossum bicirrhosum Vandelli*, 1829 "arahuana" EN AMBIENTES CONTROLADOS"**, presentado por el egresado **PEDRO RAMÍREZ ARRARTE**, como requisito para optar el grado de **MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ACUICULTURA**, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria y el Estatuto General de la UNAP.

Después de haber escuchado con atención la sustentación y luego de formuladas las preguntas las que,

..... fueron absueltas satisfactoriamente

El Jurado, después de la deliberación correspondiente en privado, llegó a las siguientes conclusiones:

1. La Sustentación es: **APROBADA POR UNANIMIDAD**
2. Observaciones : **están efectuadas en los ejemplares de la tesis**

En fe de lo actuado los miembros del Jurado suscriben la presente acta por cuadruplicado. Seguidamente, el Presidente de Jurado dio por concluida la sustentación, siendo las 17 p.m.

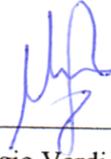
Con lo cual, se le declara al sustentante **APTO** para recibir el Grado Académico de Magíster en Ciencias con Mención en Acuicultura.


Dr. Lorgio Verdi Olivares
Presidente


MSc. Palmira Padilla Pérez
Miembro


MSc. Marina Claudiana del Aguila Pizarro
Miembro

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



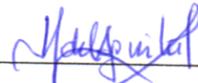
Dr. Lorgio Verdi Olivares

Presidente



M. Sc. Palmira Padilla Pérez

Miembro



M. Sc. Marina Claudiana Del Aguila Pizarro

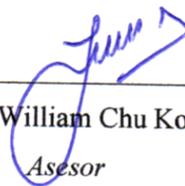
Miembro

ASESORES



Dr. Jesús Núñez Rodríguez (IRD)

Asesor



Dr. Fred William Chu Koo (UNIA)

Asesor

DEDICATORIA

A Dios, el dueño de la Sabiduría

*A Martha Yolanda, mi amada esposa por su amor y
a nuestra pequeña Débora Anaís, una preciosa Gracia de Dios.*

A mi querida Mamá, Jacobita por su eterno cariño.

*A mis hermanos Gilseia, James, Iliandya, Delia y Vanessa,
porque gracias a todos ustedes no hubiese sido posible este reto.*

A la memoria de José Víctor y Celina, mis entrañables abuelitos

*A mis queridos tíos Víctor Almir y Erdulfo y de todos mis seres
queridos que descansaron en el Señor Jesucristo,*

¡Él, los tenga en su Reino!!!

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por su inmenso amor y misericordia, gestor primario de esta enriquecedora bendición, permitiéndome conocer a maravillosas personas durante este camino.

A la Presidencia del **Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica**. Al **Proyecto Cátedra CONCYTEC/Acuicultura**. Al Dr. Lorgio Verdi Olivares su Coordinador. Por el apoyo financiero brindado para la realización del presente estudio. Al **Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana** y al **Proyecto Innovación y Competitividad para el Agro Peruano**, por el apoyo logístico y financiero brindado en la realización del presente proyecto de tesis, y con énfasis a la Dirección del Programa AQUARED, liderado por el **Ing. MSc. Salvador Tello Martín**.

A mis asesores, **Jesús Nuñez Rodríguez (IRD), Dr.** Por su amistad, orientación, disposición y consejos durante la realización de esta investigación. A **Fred W. Chu Koo (IIAP), Dr.** Amigo y consejero incondicional en esta y en otras muchas circunstancias.

A **Fernando Alcántara Bocanegra, Dr.** Por ser el Mentor de toda esta experiencia profesional. Quien me enseñó muchas cosas técnicas, personales y profesionales muy importantes, gracias Doc. A **Carmen Rosa García (IIAP), Dra.** Por sus consejos, amistad, y al apoyo logístico brindado. A **Eliseo Zapata Vásquez, Dr.** Por su amistad y sus acertados aportes estadísticos.

Al equipo técnico y administrativo del Centro de Investigaciones Fernando Adán Alcántara Bocanegra (CIFAAB) del Programa de Investigación para el uso del agua y sus recursos (AQUAREC) del IIAP, A mis buenos amigos: **Lamberto Arévalo, Luciano Rodríguez, Christian Fernández, Olaff Ribeyro[†], Edwin Agurto, Hugo Marichin, Cherry Yahuarcani, Italo Orbe, Eder Montoya, Asunción Apuela, Arturo Flores, Shiro y Domingo García**. A todos mis amigos y compañeros de la maestría. Gracias por su amistad, Dios les bendiga.

Finalmente, a todas las personas, que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo y culminación de este trabajo. Eternas Gracias.

EFFECTO DE DOS INDUCTORES HORMONALES EN LA REPRODUCCIÓN DE *OSTEOGLOSSUM BICIRRHOSUM* VANDELLI, 1829 “ARAHUANA” EN AMBIENTES CONTROLADOS.

RESUMEN

Pedro Ramírez Arrarte

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de dos inductores hormonales en la reproducción de arahuanas adultas en ambientes controlados, y fue desarrollado íntegramente en el Centro de Investigaciones “Fernando Alcántara Bocanegra” del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Para ello, se determinó el género de los reproductores mediante una técnica inmuno enzimática desarrollada para la especie en estudio, y se seleccionadas las parejas. Se evaluaron dos tratamientos: Uno con extracto de hipófisis de carpa (6.0 mg/kg) y otro con Ovaprim® (0.5 ml/kg). Ambos aplicados, con un intervalo entre las dosis de doce horas. Doce horas post inducción, se procedió a liberar a las parejas al no presentar indicios de desove. Sin embargo, veinticuatro horas después de su liberación, todas las hembras murieron y se practicó una necropsia para evaluar el estado de maduración de los ovocitos. Evidenciando que una de las hembras tratadas con Ovaprim® presentó una ovulación parcial, que nos indicaría que existe la posibilidad de respuesta ante este inductor. Siendo adelantado concluir que esta especie no responde a la inducción de la puesta con éstas inductores, ya que otras opciones no han sido evaluadas en este estudio.

Palabras clave: Extracto de hipófisis de carpa, Ovaprim®, reproducción inducida, *Osteoglossum bicirrhosum*.

EFFECT OF TWO HORMONAL INDUCES IN THE REPRODUCTION OF *OSTEOGLOSSUM BICIRRHOSUM* VANDELLI, 1829 "ARAHUANA" IN CONTROLLED ENVIRONMENTS.

ABSTRACT

Pedro Ramírez Arrarte

The purpose of this study was to determine the effect of two hormonal inducers in the adult arahuana reproduction in controlled environments, it was developed entirely in the "Fernando Alcantara Bocanegra". Research Center of the Research Institute of the Peruvian Amazon. For this purpose, we determined the gender of players by enzyme immunoassays technique developed for the species in study, and couples selected. Two treatments were evaluated: one with carp pituitary extract (6.0 mg/kg) and the other with Ovaprim® (0.5 ml/kg), both applied with an interval between doses of twelve hours. Ten hours post induction; we produced to liberate couples not to present evidence of spawning. However, twenty four hours after to release, all females were killed and necropsy was performed to assess the state of maturation of the ovocytes. Showing that one Ovaprim® treated females showed partial ovulation, this would indicate that there is a possibility in answer to this inductor. Being overtaken to conclude that this species does not respond to the induction of spawning with these hormones, since other options have not been evaluated in this study.

Keywords: Carp pituitary extract, Ovaprim®, induced reproduction, *Osteoglossum bicirrhosum*.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Página de Jurado y Asesor	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de Contenido	vi
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Índice de Anexos	x
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II: ANTECEDENTES	3
CAPITULO III: METODOLOGIA	7
3.1.1. Área de estudio	7
3.1.2. Tipo de Investigación	8
3.1.3. Diseño de Investigación	8
3.1.4. Población y Muestra	9
3.2. Procedimientos, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	10
3.2.1. Formación del Plantel de Reproductores	10
3.2.1.1. Sexaje de Reproductores	10
3.2.1.2. Manejo de Reproductores	14
3.2.2. Reproducción Inducida	15
3.2.2.1. Selección de Reproductores	15
3.2.2.2. Tratamiento Hormonal	16

3.2.3. Desempeño Reproductivo	17
3.2.3.1. Horas/Grado	17
3.3. Análisis Estadístico	18
CAPITULO IV: RESULTADOS	20
4.1.1. Formación del Plantel de Reproductores	20
4.1.1.1. Sexaje de Reproductores	20
4.1.1.2. Manejo de reproductores	23
4.1.2. Tratamiento Hormonal	27
4.1.3. Desempeño Reproductivo	28
CAPITULO V: DISCUSION	32
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	37
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES	38
CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPITULO IX: ANEXO	49

INDICE DE TABLAS

N°	Título	Página
01	Estímulos y concentraciones a aplicarse en la reproducción de arahuana.	8
02	Tratamientos hormonales aplicados a las hembras de arahuana.	17
03	Desempeño reproductivo de las hembras de arahuana tratadas hormonalmente.	29

INDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Página
01	Imagen satelital del área de estudio. La región amarilla indica la ubicación de los estanques utilizados	7
02	Lugares de procedencia de los ejemplares de arahuana.	9
03	Muestras listas para ser centrifugar (izquierda) y plasma extraído (derecha)	10
04	Microplaca antes de incubación	11
05	Adición del primer anticuerpo	12
06	Lectora de microplacas	13
07	Estanque en preparación (izquierda) y en funcionamiento (derecha)	14
08	Evaluación biométrica de reproductores de arahuana	15
09	Identificación de reproductor (izquierda) y abdomen abultado de hembra (derecha)	16
10	Punción intramuscular de hembras de arahuana	17
11	Sexaje de arahuanas adultas en placa.	20
12	Determinación del sexo mediante la presencia de vitelogenina en arahuanas adultas.	21
13	Comparación de medias de las densidades ópticas entre de los reproductores de arahuana.	22
14	Macho incubante (izquierda) y crías en diferentes estadios (derecha)	22
15	Distribución del peso total de hembras de arahuana.	23
16	Distribución del peso total de machos de arahuana.	24
17	Distribución de longitudes totales de hembras de arahuana.	24
18	Distribución de longitudes totales de machos de arahuana.	25
19	Relación peso y longitud total de los reproductores de arahuana.	25
20	Relación peso y longitud total de las hembras reproductoras de arahuana.	26
21	Relación peso y longitud total de los machos reproductores de arahuana.	26
22	Longitud total según el sexo de reproductores de arahuana	27
23	Efecto del tratamiento hormonal en el diámetro del abdomen de hembras de arahuana.	28
24	Ovocito próximo a ser expulsado de la cavidad abdominal (arriba) y ovocitos desprendidos de los folículos (abajo).	30
25	Distribución de frecuencia de diámetro de ovocitos después de ser tratadas con Ovaprim y EHC.	31

INDICE DE ANEXOS

N°	Título	Página
01	Parámetros físico y químicos de los estanques de arahuana <i>Osteoglossum bicirrhosum</i> , durante el periodo de enero a diciembre de 2011.	49
02	Reproductores de arahuana marcados e identificados según sexo	50

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCION

El cultivo a gran escala de cualquier organismo con potencial para la acuicultura, debe ser lo suficientemente renovable para garantizar su éxito. Existen de las que se reproducen y de las que no se reproducen en cautiverio. Entre las que se reproducen en cautiverio, la época de desove está limitada a cierto periodo del año y la supervivencia de los alevinos en condiciones normales es baja, por lo que demanda aprender a inducirlos artificialmente ⁽¹⁾, una de estas especies, la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum*, presenta baja fecundidad, su estacionalidad reproductiva y su conservación implica graves riesgos ambientales, pues la extracción de larvas compromete especialmente a los machos ⁽²⁾, lo que dificulta la producción sostenida de ésta especie con enormes posibilidades de biocomercio internacional de peces ornamentales ⁽³⁻⁵⁾.

Ante este problema, una posible solución es la inducción al desove mediante estímulos hormonales, de gran éxito en los últimos años ^(6, 7), aplicados por inyección, individualmente o combinados, ya sea en forma de extracto de hipófisis de carpa “EHC” o análogos de la Gonadotropina, compuestas con inhibidores de la dopamina “Ovaprim®” ^(8, 9) o mediante implantes de liberación lenta ^(10, 11) todos tienen por finalidad la aportación de cantidades comerciales de huevos viables ⁽¹²⁾. Sin embargo, para llegar a esto, es importante predecir el tiempo de latencia y estimar el momento exacto de la ovulación ⁽¹³⁾, lo que produciría el mayor número de larvas y alevinos de buena calidad ^(14, 12).

Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en *Osteoglossum bicirrhosum* se han enfocado en aspectos bioecológicos, fecundidad, época de desove, hábitos alimenticios, parasitismo, filogenéticos, embriológicos, cultivo en estanques, entre otros ⁽¹⁵⁻²¹⁾. Ningún estudio sobre su posible reproducción bajo control hormonal ha sido efectuado. En este sentido, el desarrollo de una técnica de reproducción inducida resulta una excelente oportunidad comercial para los productores implicados y una alternativa más de conservación de la especie.

En este contexto, en la presente investigación se planteó evaluar el efecto de dos inductores hormonales en la reproducción de *Osteoglossum bicirrhosum* “arahuana” en ambientes controlados.

CAPÍTULO 2

2.1. ANTECEDENTES

Para estimar el momento de la ovulación de cualquier especie, es importante el monitoreo de la temperatura del agua, a través de una unidad denominada horas grado o tiempo de latencia y que consiste en medir cada hora la temperatura del agua después de la última inyección, hasta la completa ovulación. Estas temperaturas se van sumando hasta llegar a un valor propio de cada especie ⁽¹³⁾.

Una de las dificultades para trabajar con especies con alto potencial para la acuicultura, es obtener cantidades comerciales de huevos viables y predecir con cierto grado de exactitud el tiempo de latencia. Las variables para medir el desempeño reproductivo frente a la administración de las hormonas son especialmente la maduración progresiva del ovocito, la ovulación y el desove, tiempo de latencia, el número y tamaño de los ovocitos pre y post desove, el porcentaje de fertilización, la sobrevivencia embrionaria y larval y finalmente el número de alevinos obtenidos ⁽¹²⁾.

Por ejemplo, para que los programas de poblamiento y repoblamiento de *Brycon insignis* “piabanha”, y tengan resultado, fue fundamental conocer la estrategia reproductiva de esta especie, identificando el momento preciso para la utilización de las hormonas inductoras, definiendo las dosis exactas y el periodo de latencia, y así, obtener un mayor número de larvas y alevinos de buena calidad ⁽¹⁴⁾. De lo contrario, al desconocerse dichos parámetros, los ovocitos ovulados pueden

sobremadurar, disminuyendo drásticamente la calidad de los desoves, los porcentajes de eclosión y de fertilización ⁽²²⁾.

Por otro lado, la tasa de fecundación y la supervivencia de los óvulos no parece depender del tipo de tratamiento hormonal ⁽²³⁾. Así *Brycon amazonicus* “yamú” presentó una tasa de fecundación de 55.3% y un 51% de supervivencia embrionaria ⁽²⁴⁾ y *Pseudoplatystoma fasciatum* “doncella” mostró una tasa de fecundación entre 53.4 – 56.08% usando extracto de hipófisis de carpa y Gonadotropina coriónica humana respectivamente ⁽²⁵⁾.

La utilización del extracto de hipófisis de carpa es una técnica simple y muy utilizada en la reproducción de peces, con varios protocolos en función al desconocimiento de las características cuantitativas y cualitativas de origen ⁽⁷⁾. Mediante una dosis previa, la cantidad y calidad de los gametos mejoran significativamente frente a los tratamientos de una sola dosis ⁽²⁶⁾. En este sentido, después de aplicar la segunda dosis, el desove en, *Brycon moorei sinuensis* “dorada”, *Brycon siebenthalae* “yamú” y *Prochilodus magdalenae* “bocachico”, ocurre entre 5 – 6 horas y entre 6 – 7 horas en *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* “cachamas” y en *Sorubim cuspicaudus* y *Pseudoplatystoma fasciatum* “bagres”, todos entre 27 – 29 °C ⁽⁶⁾, a las 11.3 horas en *Curimatella lepidura* a 25,5 °C ⁽²⁷⁾, a las 21 horas en *Leporinus piau* “lisa”, entre 23 – 24 °C ⁽²⁸⁾, entre 20,9 - 21,2 horas a 24 °C en *Rhamdia hilarii* y *Pseudopimelodus charus* “bagres” ⁽²⁹⁾.

El uso de 6 mg/kg de extracto de hipófisis de carpa, causó una mejor tasa de fecundación en *Prochilodus magdalenae* “bocachico”, frente a 0,7 ml/kg de Ovaprim⁽³⁰⁾. En *Colossoma macropomum* “gamitana”, mejoró además de la tasa de fecundación, la tasa de eclosión que en aquellas tratadas con Ovaprim. Aunque, ambas tienen un similar efecto en la producción y concentración del semen en machos, de la misma especie⁽³¹⁾.

El uso de Ovaprim, se sustenta por su aplicación en más de 15 especies de peces en los últimos 20 años^(11, 32). Es más económico, de fácil manejo y brinda una mejor supervivencia a las crías de *Heterobranchus bidorsalis* “African clariid catfish”⁽³³⁾; bien conformadas y sin ningún tipo de anomalías morfológicas fuera de temporada de reproducción de *Ctenopharyngodon Idella* “carpa herbívora”⁽³⁴⁾.

Las arahuanas en el medio natural, comienzan a prepararse para reproducirse a partir de octubre, durante el descenso de las aguas, para que dos a tres meses después ocurra la reproducción, llegando a su máximo pico de abundancia a mediados de febrero. El número de larvas varía entre 4 y 144 por macho incubante con tallas y pesos totales entre 72.5 – 78.5 cm y 2750 – 3950 g respectivamente. Alcanzan la madurez sexual a partir del segundo año de vida. Las hembras a partir de los 65 cm ya se encuentran aptas para la reproducción, siendo su tamaño medio de 75 cm y a un peso aproximado de 1 kg^(35, 36).

La diferenciación sexual de arahuanas adultas, no es marcada, sólo es posible cuando la especie está en época de reproducción y está basada en métodos

empíricos tales como; si uno de los reproductores está llevando las crías en la boca, se dice que es el macho, esto se evidencia por la amplitud que hay entre la boca y el opérculo y la capacidad expansiva de su mandíbula; las hembras son más redondas y los machos más alargados e incluso se dice que los machos son de color amarillo y las hembras son más oscuras ^(36, 37). Sin embargo, existe una forma más precisa de determinar los géneros, y es mediante la evaluación de los niveles de concentración de esteroides como el estradiol y la vitelogenina en el torrente sanguíneo. A través de la vitelogenina, se determinó los géneros del atún amarillo ⁽³⁸⁾, del abadejo ⁽³⁹⁾, del salmón y la trucha marina ⁽⁴⁰⁾, y recientemente del paiche ⁽⁴¹⁾. La vitelogenina es sintetizada en el hígado de las hembras, para la consiguiente maduración de las gónadas, que conlleva a la incorporación selectiva de este esteroide a los ovocitos mediante un proceso llamado vitelogénesis ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

CAPÍTULO 3

3.1. METODOLOGIA

3.1.1. Área de estudio

El presente trabajo se realizó en dos estanques de tierra de aproximadamente 600 m², dentro las instalaciones del Centro de Investigaciones Fernando Adán Alcántara Bocanegra (CIFAAB) del Programa de Investigación para el uso del agua y sus recursos (AQUAREC) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Ubicado a la margen derecha del Km. 4.5 de la Carretera Iquitos Nauta, al sur oeste de la ciudad de Iquitos. Políticamente pertenece al distrito de San Juan, provincia de Maynas, departamento de Loreto. Geográficamente se encuentra entre las coordenadas: 18M, 686452 E y 9577874 S, a 112 msnm (Figura 01), Imagen Satelital cortesía de Google Earth ver. 6.1.0.5001.



Figura 01. Imagen satelital del área de estudio. La región amarilla indica la ubicación de los estanques utilizados.

3.1.2. Tipo de investigación.

El presente trabajo fue una investigación descriptiva y experimental, que consistió en aplicar un estímulo (hormonas) a la unidad de análisis (arahuanas adultas) y luego determinar el grado en que se manifestó el estímulo.

3.1.3. Diseño de la investigación.

La evaluación de los aspectos reproductivos se realizó mediante un diseño experimental. El estímulo 1 (E_1 = extracto de hipófisis de carpa “EHC”) y el estímulo 2 (E_2 = “Ovaprim®”), tuvieron una concentración de ($C_1 = 6.0$ mg/kg) y ($C_2 = 0.5$ ml/kg), respectivamente (Tabla 01).

Tabla 01. Estímulos y concentraciones aplicadas en la reproducción de arahuana.

Estímulo*\Concentración*	C_1	C_2	Repeticiones	
E_1	E_1C_1		E_1C_1	E_1C_1
E_2		E_2C_2	E_2C_2	E_2C_2

*($C_1 = 6.0$ mg/kg; $C_2 = 0.5$ ml/kg; $E_1 =$ EHC (mg/kg) y $E_2 =$ Ovaprim ® (ml/kg))

Variable independiente (x): Estímulo y Concentración.

Variable dependiente (y): Desempeño reproductivo.

3.2. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.2.1. Formación del plantel de reproductores

3.2.1.1. Sexaje de reproductores

Como no hay caracteres que nos permitan diferenciar el género de los reproductores, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos a fin de identificar el número de machos y hembras en la muestra seleccionada. Para ello se adaptó la metodología utilizada por ^(41, 45).

Que consistió en extraer 1 ml de sangre de la vena caudal de las arahuanas adultas. La sangre fue colectada en jeringas heparinizadas y trasladada en tubos Eppendorf® también heparinizados y debidamente codificados; luego fueron transportados al laboratorio para ser centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos con la ayuda de una centrífuga (Tomos 2 – 16A) y extraer así el plasma libre de hematíes, con la ayuda de una micropipeta (Boeco 100 – 1000 ul) el cual fue nuevamente colocado en tubos Eppendorf® codificados y almacenados a -20 °C, para su posterior análisis (Figura 03).



Figura 03. Muestras listas para centrifugar (izquierda) y plasma extraído (derecha).

Para los trabajos de laboratorio, se utilizó el plasma de machos probados (con huevos incubados en la boca) como control negativo y el plasma de machos inducidos con estradiol, para producir en ellos vitelogenina y que sería utilizado como control positivo ⁽⁴⁶⁾.

Esta metodología cuenta con los siguientes pasos:

1. ***Fijación del anticuerpo.***

Se diluyó el antígeno (plasma de arahuana) a 1:2000 en buffer carbonato 0.01 M, pH 9.6, y con la ayuda de una micropipeta (Eppendorf® 200 µl) se distribuyó 100 µl en cada pocito por duplicado de la microplaca (Nunc F Polysorp) (Figura 04), e incubadas a 4 °C durante 12 horas.



Figura 04. Microplaca antes de la incubación.

2. ***Lavados.***

Luego entre cada paso, con la ayuda de una micropipeta de ocho canales (Biogit m300), se realizaron tres lavados con 100 µl de Buffer Fosfato 0.01 M

a pH 7.4 y NaCl al 5% + Tween 20 al 5% o tampón fosfato salino (TPS). Con la finalidad de eliminar el exceso de proteínas no fijadas a la placa entre los pasos.

3. ***Saturación.***

Se saturó con 100 µl de (SCN) o Suero Normal de cerdo al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05% en cada espacio utilizado e incubado en estufa a 37 °C por 30 minutos. Con la finalidad de cubrir los sitios inespecíficos libres de cada pocito.

4. ***Incubación del 1° anticuerpo específico.***

Con la ayuda de una micropipeta de ocho canales (Biogit m300), se adicionó 100 µl de una dilución del primer anticuerpo (1:2000) en una solución de tampón fosfato salino con suero de cerdo normal (TPS-SCN), (Figura 05) y se incubó a 37 °C en una estufa por dos horas.



Figura 05. Adición del primer anticuerpo.

5. Incubación del 2° anticuerpo.

Con la ayuda de una micropipeta de ocho canales, se adicionó 100 µl de una dilución del segundo anticuerpo (1:2000) en una solución de tampón fosfato salino con suero de cerdo normal (TPS-SCN) y se incubó a 37 °C en una estufa por una hora.

6. Revelación del complejo anticuerpo – antígeno.

Seguidamente, con la ayuda de una micropipeta de ocho canales, se adicionó 100 µl de una dilución de orto-Fenilene-Diamina (oPD) en 10 ml de Buffer citrato pH 5.0 y H₂O₂, dejándolo actuar por 30 minutos y así revelar la coloración en aquellas muestras que contuvieron una concentración de vitelogenina detectable.

Finalmente, se adicionó 50 µl de ácido sulfúrico 1 M en cada pocito y se realizó la lectura a 490 nm en un lector de prueba de ELISA (Microplate reader: 680 BIO RAD), (Figura 06).



Figura 06. Lectora de microplacas.

3.2.1.2. Manejo de Reproductores

Se prepararon dos estanques de 600 m² de espejo de agua, con una profundidad máxima de 1.5 m. Para ello, se secaron y se eliminaron todos los desechos orgánicos y peces indeseables. Suministrándose posteriormente, 30 kg de cal apagada (1000 kg/ha); 30 kg de gallinaza (1000 kg/ha) y 45 kg (1500 kg/ha) de vegetación herbácea recién cortada en cada uno. Por aquellos días se presentó un periodo de sequía, que tomó tres meses para llenar los estanques (Figura 07).



Figura 07. Estanque en preparación (izquierda) y en funcionamiento (derecha)

Una vez completos los niveles de agua, se sembraron 24 reproductores en cada estanque, con un promedio de 1.1 ± 0.37 kg y 55.4 ± 0.78 cm, de peso y longitud, respectivamente. A una densidad de siembra de 1:2 (hembra:macho). Alimentados con alimento natural (insectos, atraídos con iluminación artificial, peces forraje: mojarras y bujurquis) y alimento estrusado al 26% PB, seis veces a la semana, dos veces al día y una tasa de alimentación del 3%. Excepto algunas semanas que sólo dependían del alimento natural, todo por un espacio de 12 meses

previos a los ensayos de reproducción (Figura 08). Durante este periodo, se realizaron mediciones de temperatura, oxígeno disuelto y pH (Anexo 1).



Figura 08. Evaluación biométrica de reproductores de arahuana.

3.2.2. Reproducción Inducida

3.2.2.1. Selección de Reproductores

Se seleccionaron hembras por sus características externas como vientre abultado, papila genital ligeramente enrojecida y prominente (Figura 09). Se realizó biopsia ovárica, sin éxito. Debido al gran tamaño de los ovocitos. Las primeras tres hembras fueron seleccionadas del estanque 7 y fueron tratadas con Ovaprim® y las otras tres hembras, del estanque 8 tratadas con EHC. Los machos, fueron elegidos por sus antecedentes incubantes de ambos estanques. Todos fueron identificados por un chip implantado en el músculo durante el acopio poblacional. Los reproductores fueron trasladados inmediatamente al laboratorio y colocados en parejas en tanques de cemento de 1.0 m³ de capacidad, recubiertos con mayólicas, con recambio permanente de agua derivada desde un estanque (reservorio).



Figura 09. Identificación de reproductor (izquierda) y abdomen abultado de hembra de arahuana (derecha).

3.2.2.2. Tratamiento Hormonal

El trabajo de reproducción consistió en el empleo de dos tratamientos: Tratamiento 1: Extracto de hipófisis de carpa (EHC). Para ello se utilizó una balanza analítica (Qhaus Adventurer), con una sensibilidad de 0.0001 g, para pesar las cantidades necesarias de la hormona en estado liofilizado y luego diluirla en 2 ml de suero fisiológico y concentrado en un tubo de Eppendorf® hasta su utilización. La primera dosis fue de 0.6 mg/kg y la segunda de 5.4 mg/kg del peso corporal del pez. El tratamiento 2: Ovaprim ®, fue extraído directamente de su frasco. La primera dosis fue de 0.05 ml/kg y la segunda de 0.45 ml/kg del peso corporal del pez. En ambos tratamientos, el intervalo entre las dosis fue de doce horas (6, 12, 24, 26, 31, 47-49).

Tabla 2. Tratamientos hormonales aplicados a las hembras de arahuana.

Hormona	Dosis Total	Dosis	
		1° (0h)	2° (12h)
EHC (mg/kg)	6.0	0.6	5.4
Ovaprim (ml/kg)	0.5	0.05	0.45

Sólo fueron tratadas las hembras. Las dosis hormonales fueron inyectadas en el dorso del cuerpo del pez (Figura 10).



Figura 10. Punción intramuscular de hembras de arahuana.

3.2.3. Desempeño Reproductivo

3.2.3.1. Horas – Grado

Después de la segunda dosis, se registró la temperatura y oxígeno disuelto en los tanques de tratamiento, con la ayuda de un oxímetro digital YSI modelo 55 C-12FT. Esto con el objetivo de determinar el tiempo en que se completa la ovulación antes del desove. Adicionalmente se observó la ocurrencia o no de cortejo.

Diez horas después de la segunda dosis, se procedió a observar algún signo que nos indicaría el inicio de la maduración ovocitaria, se levantó a las hembras y se realizó una suave presión en la parte abdominal sin deslizamiento de los dedos (stripping), y ver la existencia de expulsión de los ovocitos. Para reforzar el efecto de los inductores, antes de la primera y después de la segunda dosis, fue medido el diámetro del abdomen de las hembras, para evidenciar algún signo de maduración (Figura 22). Al percatarse la falta de respuesta de las hembras, fueron liberadas dos horas más tarde, junto a los machos en sus estanques de procedencia.

Al descubrir la muerte de las hembras, se procedió a realizar un análisis del estado de madurez de los ovocitos. Para ello se determinó el diámetro de los mismos, tomando una fotografía digital y luego fueron analizados con la ayuda del programa de procesamiento digital (ImageJ ver. 1.46). Disponible en: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>

3.3. Análisis Estadísticos.

Los datos de manejo, sexaje y tratamiento hormonal de las arahuanas adultas fueron descritos estadísticamente y expresados como media \pm desviación estándar, valores mínimos y máximos de acuerdo a los casos. Las variables de peso y longitud total fueron sometidas a una regresión potencial y un análisis de varianza de una vía (Anova) y al presentarse diferencias significativas, se compararon con la prueba de Kruskal – Wallis. Los valores de densidades ópticas de vitelogenina en ambos sexos, se sometieron a una prueba t de Student linealizada mediante una

transformación logarítmica y, un análisis de varianza de una vía (Anova), para el incremento del diámetro del abdomen antes y después del tratamiento. Para todos los análisis se empleó el programa estadístico SPSS 18.0 para Windows.

CAPÍTULO 4

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Formación del plantel de reproductores

4.1.1.1. Sexaje de Reproductores

Los resultados revelaron que de los 48 ejemplares adultos de arahuana, sometidos a los análisis inmunoenzimáticos, quince (15) resultaron ser hembras (coloración amarillo oscuro) y treintaitrés (33) fueron machos (incolores) (Figura 11).



Figura 11. Sexaje de arahuanas adultas en placa. C=Plasma

inducido con Estradiol; m=macho incubante; b=blanco;

♂=macho y ♀=hembra

La densidad óptica (D.O.) de las hembras varió entre (0.127 – 0.560) y de (0.010 a 0.096) en los machos. Se estimó en 0.100 el valor límite de D.O. que separa a los machos de las hembras (Figura 12).

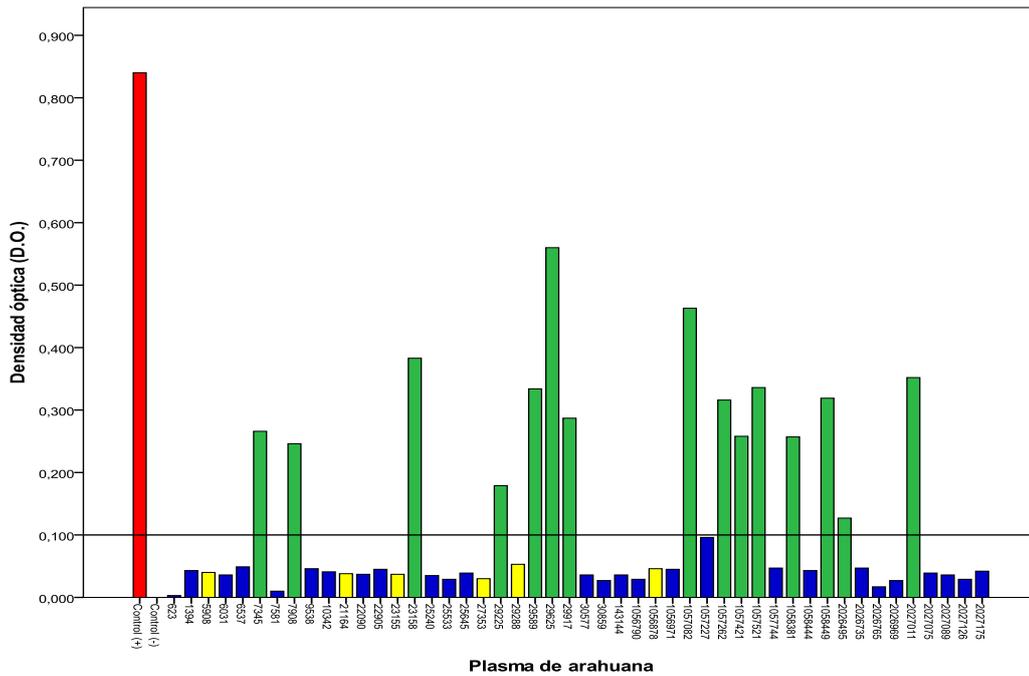


Figura 12. Determinación del sexo mediante la presencia de vitelogenina en arahuanas adultas. Barra roja=control positivo; Barras verdes=hembras; Barras azules=machos y Barras amarillas= machos encontrados incubando.

Los valores de densidad óptica variaron con una media y desviación estándar de 0.312 ± 0.11 para las hembras y 0.039 ± 0.01 para los machos. El t de Student demostró diferencias significativas entre las densidades ópticas de ambos sexos ($p < 0.05$). Asumiéndose que las medias de las densidades ópticas son diferentes (Figura 13).

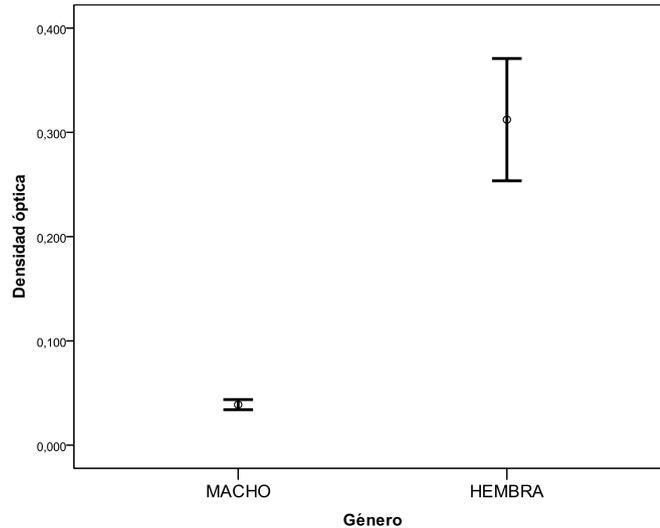


Figura 13. Comparación de medias de las densidades ópticas de los reproductores de arahuana.

Los resultados de sexaje fueron corroborados cuando en la toma de muestras posterior al sexaje que permitió la formación de parejas, se encontraron seis ejemplares que mantenían incubando bucalmente a crías en diferentes estadios de desarrollo (Figuras 12 y 14). La longitud total de los machos que fueron encontrados incubando estuvo entre 52 – 67 cm y un peso total entre 0.85 y 2.35 kg, encontrándose que el 50% de ellos, tuvieron longitudes mayores a 63 cm y pesos superiores a 1.65 kg respectivamente.

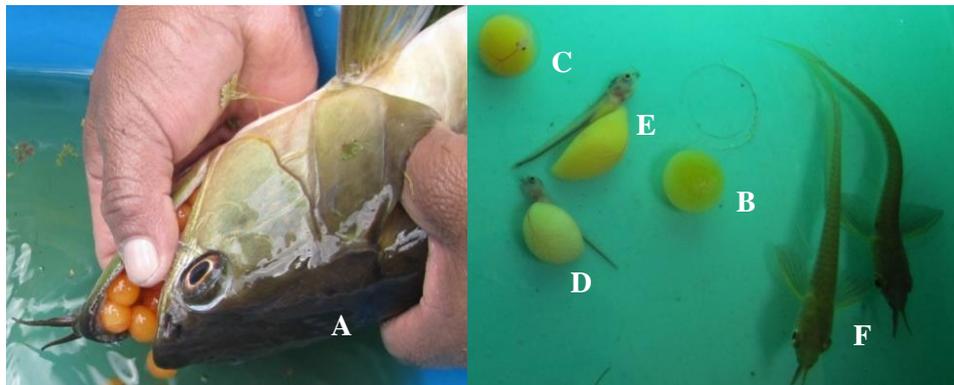


Figura 14. Macho incubante (izquierda) y crías en diferentes estadios (derecha)

A=Macho adulto; B: Huevo viable; C: Embrión 1; D: Larva 2; E: Larva 3 y F: Alevinos.

El promedio de huevos en la cavidad bucal de los seis machos incubantes fue de 65 huevos. Encontrándose, que no existe relación aparente entre el número de huevos en incubación frente a la longitud total de los machos ($r=0.285$; $p=0,814>0.05$). De similar característica, entre el número de huevos en incubación frente al peso total de los machos ($r=0.180$; $p=885>0.05$). Este resultado, posiblemente ha ocurrido por la falta de entrenamiento en la captura que ocasionó la pérdida de huevos y larvas al momento de encontrarlos incubando.

4.1.1.2. Manejo de Reproductores

Los valores de peso de las hembras variaron con una media y desviación estándar de 1.53 ± 0.28 , con rangos mínimos y máximos entre 0.5 – 2.0 kg y en los machos, 1.59 ± 0.48 y 0.55 – 2.6 kg respectivamente (Figuras 15 y 16).

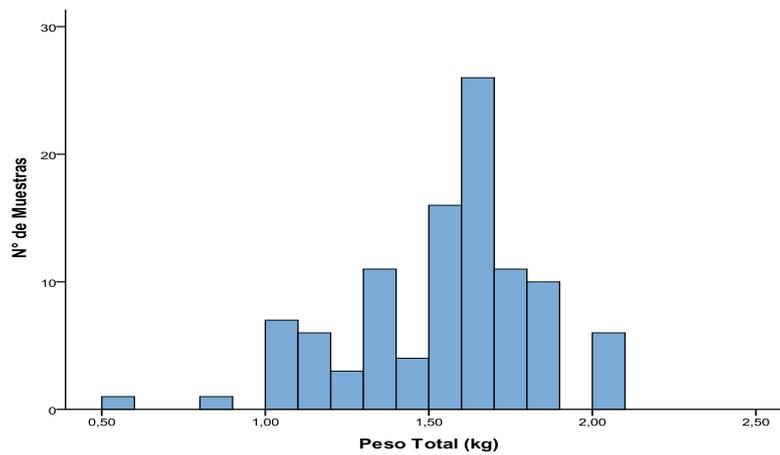


Figura 15. Distribución del peso total de hembras de arahuana.

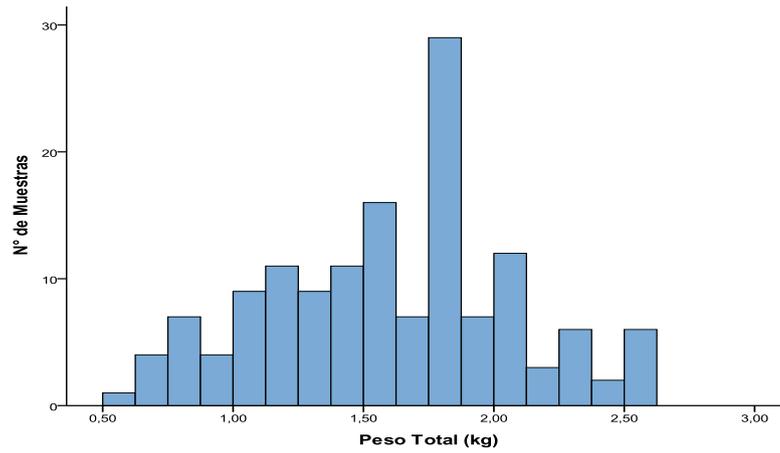


Figura 16. Distribución del peso total de machos de arahuana.

Los valores de longitud de las hembras variaron con una media y desviación estándar de 60 ± 3.7 , con rangos mínimos y máximos entre 48 – 68 cm y en los machos 62.6 ± 5.6 y entre 42 – 75 cm respectivamente (Figuras 17 y 18).

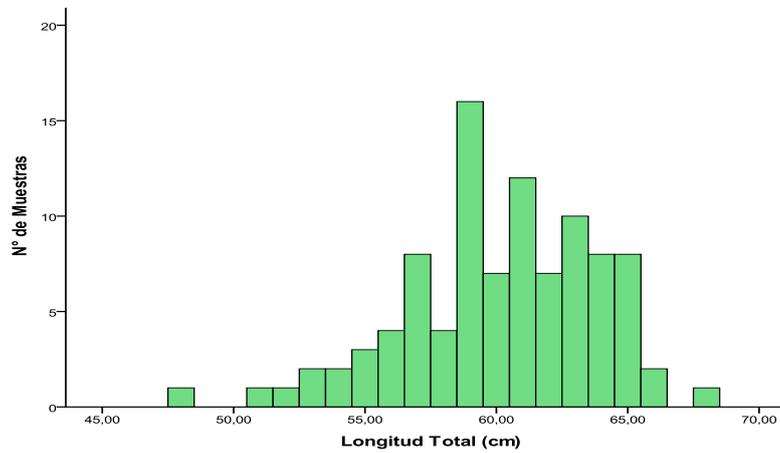


Figura 17. Distribución de longitudes totales de hembras de arahuana.

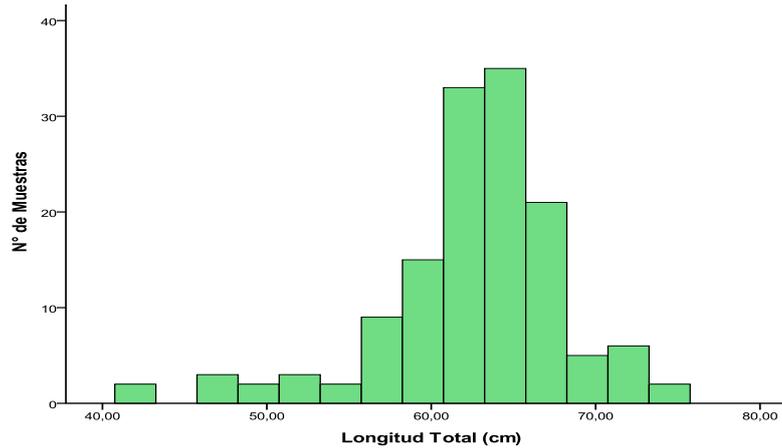


Figura 18. Distribución de longitudes totales de machos de arahuana.

En cuanto a la relación peso-longitud para ambos sexos, se observó que el coeficiente de regresión fue de $b=2.715$ ($t < 0.05$) (Figura 19). El coeficiente de determinación R^2 fue alto ($R^2=0.909$), mostrando que los datos si se ajustaron al modelo potencial. Similares resultados fueron encontrados en sexos separados (Figuras 20 y 21). Es decir, que, en promedio, el incremento del peso de reproductores en esta especie, es más lento al incremento de su longitud. Lo que nos indicarían un tipo de crecimiento alométrico negativo en esta etapa de vida.

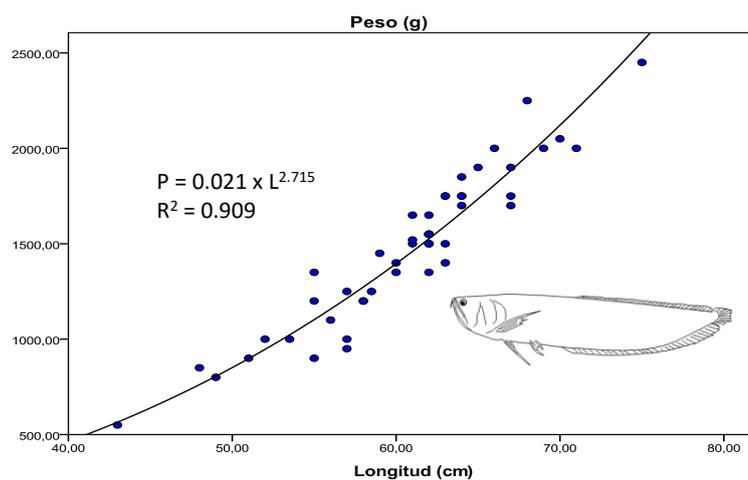


Figura 19. Relación peso y longitud total de los reproductores de arahuana.

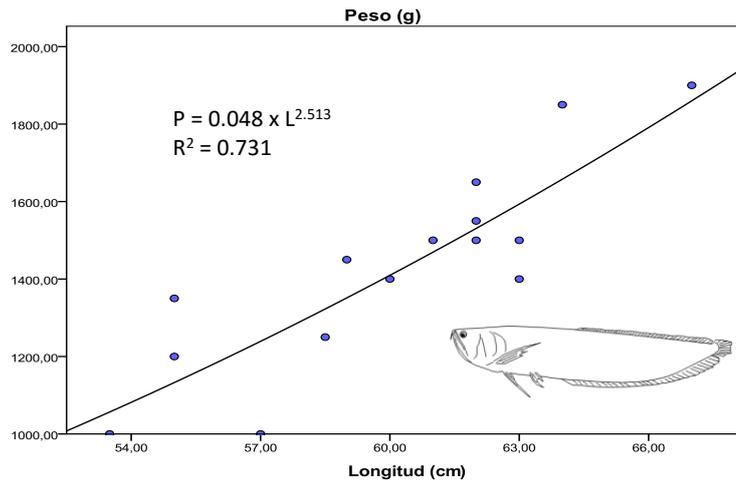


Figura 20. Relación peso y longitud total de las hembras reproductoras de arahuana.

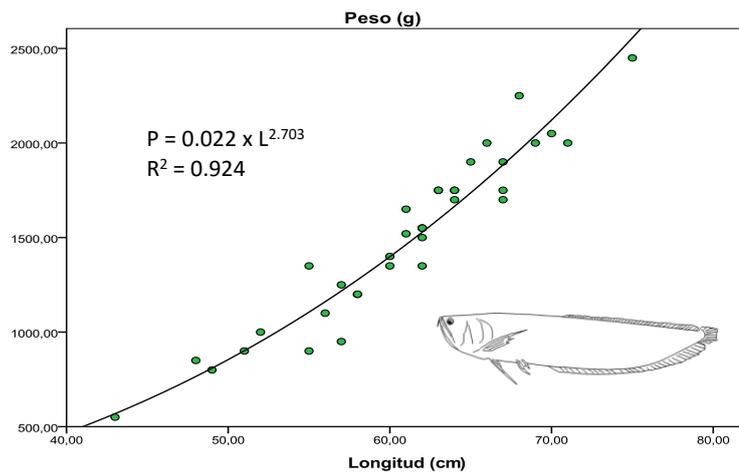


Figura 21. Relación peso y longitud total de los machos reproductores de arahuana.

A través de la prueba de Kruskal-Wallis, se compararon los pesos y longitudes de los reproductores, y se encontró diferencias significativas sólo en la longitud ($P=0.006 < 0.05$). Evidenciando que los machos fueron de mayor longitud que las hembras (Figura 22).

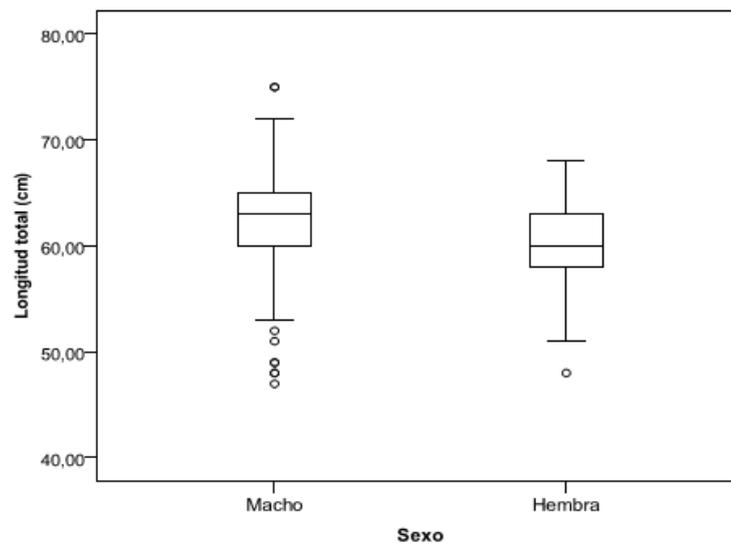


Figura 22. Longitud total según el sexo de reproductores de arahuana.

4.1.2. Tratamiento Hormonal

Durante el ensayo, el monitoreo del agua de los tanques, presentó valores medios de temperatura y oxígeno disuelto de: 28.2 ± 0.24 °C y 4.28 ± 0.4 mg/l., respectivamente. Estos valores estuvieron dentro de los considerados normales para el cultivo de peces amazónicos.

Después de la aplicación de la segunda dosis, se observó que las parejas comenzaron a realizar movimientos circulares que simulaban un cortejo. Sin embargo, al transcurrir el tiempo este movimiento fue remplazado por desplazamientos más lentos en el fondo del tanque.

4.1.3. Desempeño Reproductivo

Luego de 340 ± 0.84 grados-hora, se evaluaron las hembras en la búsqueda de signos de desove (stripping) y al no encontrar indicios del mismo, se procedió a liberarlas a sus estanques de procedencia. La aplicación de Ovaprim y EHC, no ocasionó un incremento significativo ($p=0.948>0.05$) en el diámetro del abdomen de las hembras de arahuana (Figura 23).

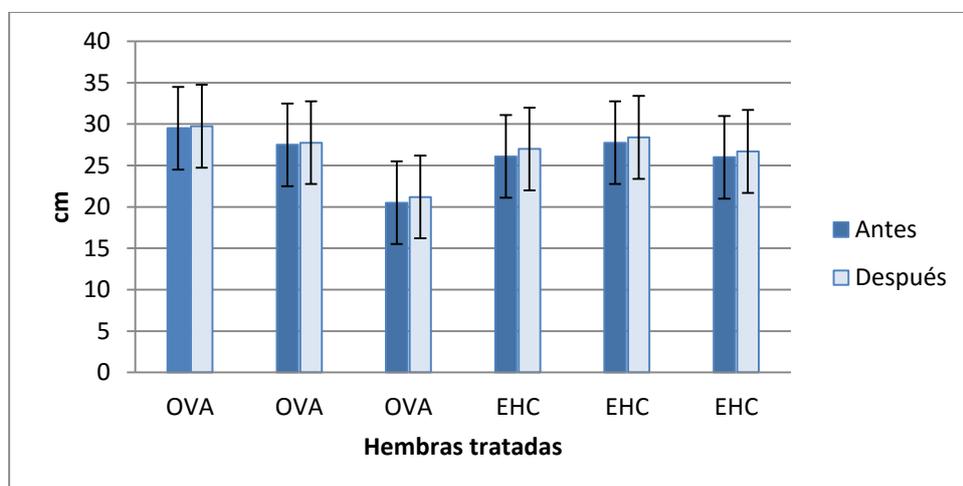


Figura 23. Efecto del tratamiento hormonal en el diámetro del abdomen de hembras de arahuana. OVA: Ovaprim; EHC: Extracto de hipófisis de carpa

El uso de Ovaprim, aparentemente ocasionó hemorragias a la altura del abdomen y los ojos se tornaron blanquecinos, los machos, sólo con las barbillas blanquecinas.

Luego de 24 horas de su liberación, todas las hembras murieron, y fueron retirados de los estanques. Lo que ocasionó que se realizara un análisis interno a dichas hembras, revelando que los ovocitos se encontraron aún en maduración,

verificado con el diámetro de los mismos (Figura 25). Las hembras 3 y 5, fueron encontradas en alto estado de descomposición, dificultando su evaluación.

Tabla 3. Desempeño reproductivo de las hembras de arahuana tratadas hormonalmente.

Hormona	Hembra	Peso * (kg)	Dosis Total	Comentario	Peso de ovario (g)	Nº de ovocitos (unidad)
Ovaprim (ml/kg)	1	1.5 ± 0.07	0.75	Sin respuesta	152.7	258
	2	1.55 ± 0.07	0.78	Ovulación Parcial	148.6	309
	3	1.65 ± 0.07	0.83	Sin respuesta	—————	—————
EHC (mg/kg)	4	1.0 ± 0.06	6	Sin respuesta	101.87	302
	5	1.1 ± 0.06	6.6	Sin respuesta	—————	—————
	6	1.0 ± 0.06	6	Sin respuesta	102.93	307

* Los datos son presentados como promedios ± DS.

En la hembra 1, el diámetro de los ovocitos, se presentó con una distribución de frecuencia polimodal (0.3; 0.4 y 0.7 mm, con una media de 8.7 ± 4.04 mm). La hembra 2, presentó dos modas de 7.73 y 8.0 mm y una media de 9.34 ± 2.43 mm. Esta hembra presentó un caso particular, pues reveló una ovulación parcial, algunos ovocitos se encontraron desprendidos del folículo y alojados en la cavidad abdominal, con apariencia de estar próximos a ser expulsados, pero como ya mencionamos anteriormente, fue encontrada muerta (Figura 24). Ambas hembras, presentaron los ovocitos de mayor diámetro (13.16 y 13.86 mm respectivamente). El 80% presentó un rango de diámetro de ovocitos entre 11.38 y 12.12 mm.

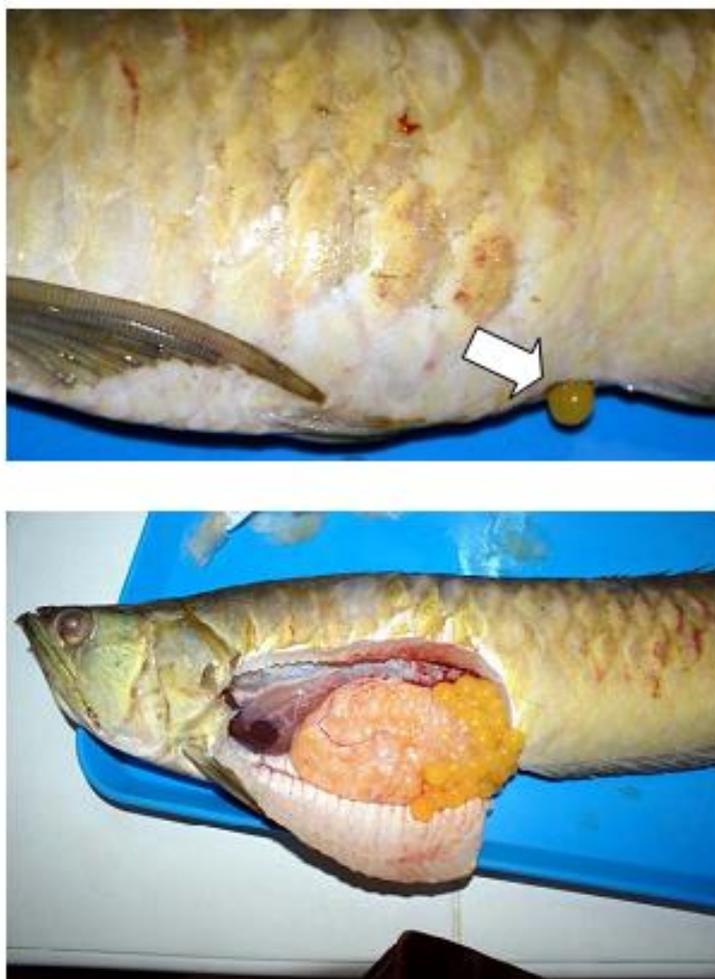


Figura 24. Ovocito próximo a ser expulsado de la cavidad abdominal (arriba) y ovocitos desprendidos de los folículos (abajo).

Por su parte, la hembra 4, presentó una moda de 9.89 mm y una media de 9.26 ± 1.35 mm, mientras que la hembra 6, presentó una distribución polimodal (0.87; 1.02 y 1.05 mm, con una media de 7.92 ± 4.51 mm). Sin embargo, el 80% presentó un diámetro entre 10.06 y 11.54 mm (Figura 25).

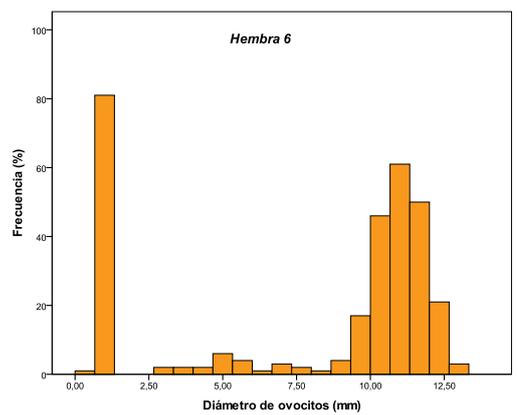
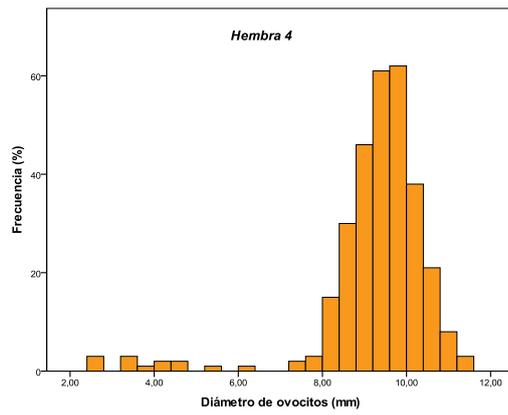
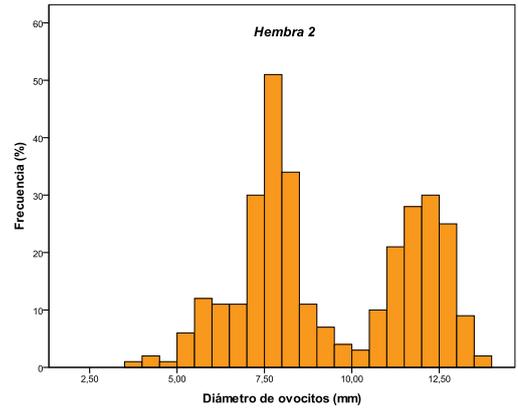
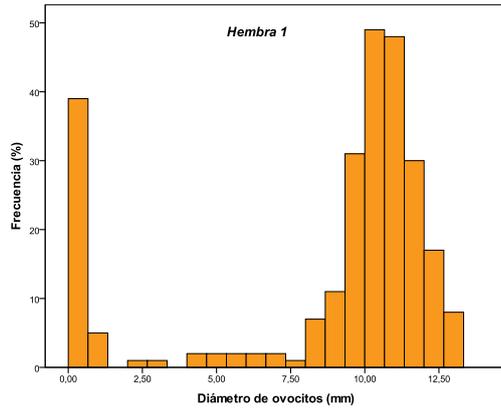


Figura 24. Distribución de frecuencia de diámetros de ovocitos después de ser tratados con Ovaprim y EHC.

CAPÍTULO 5

5.1. DISCUSION

5.1.1. Sexaje de Reproductores

Según algunos autores, los machos de esta especie son más grandes y experimentados y son los que pueden albergar más ovocitos y larvas en el interior de sus bocas ^(2, 37, 50-55). La incubación de parte de los machos fue convalidada con la técnica inmuno enzimática desarrollada en este estudio, y confirmada al observar que los machos más grandes participaban más veces en los eventos reproductivos que los machos más pequeños. Técnica que puede ser utilizada en posteriores estudios poblacionales con fines de manejo.

5.1.2. Manejo de Reproductores

Los valores biométricos durante el manejo, nos indicaron que existe un crecimiento alométrico negativo con el peso total, es decir, que los especímenes más grandes en longitud, aumentaron lentamente en peso ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Precisamente, son los especímenes más grandes los que tienen mejores respuestas reproductivas y son más capaces de sobrevivir ante las variaciones ambientales ⁽⁵⁹⁾. Nuestros resultados son relativamente similares a los registrados por ^(51, 55) en arahuas del medio natural y ⁽³⁵⁾ en condiciones controladas. Demostrando, que el cautiverio no interfirió en el desarrollo normal de los ejemplares en estudio.

Por otro lado, al proceder de dos cuencas diferentes y distantes, se podría inferir que existe una variabilidad genética marcada entre ambas poblaciones

definidas por sus ubicaciones geográficas ⁽⁶⁰⁾. Sin embargo, no impidió que los especímenes maduren y se reproduzcan.

Los machos alcanzaron tallas más grandes que las hembras. Coincidiendo con ^(53, 55), quienes, a su vez, refieren que las hembras seleccionan a los machos más grandes y pesados para la procreación, pues un macho con éstas características está más adaptado para cuidar a un mayor número de crías. Sin embargo, en este estudio, no fue posible capturar a las parejas reproductoras y así corroborar dicha afirmación.

5.1.3. Selección de Reproductores

La mayor dificultad que presenta el proceso de reproducción inducida es la selección de las hembras. Por ejemplo para *Brycon henni*, el éxito residió en la determinación del punto óptimo de madurez de las hembras, ya que por su pequeño tamaño resulta difícil observar el abultamiento abdominal producido por el crecimiento de ovocitos en el saco ovárico ⁽¹²⁾. En este sentido, aún no resulta concluyente seleccionar a hembras de arahuana para fines de inducción, sólo con características externas, pues se carece a datos más precisos de abultamiento abdominal. Es preciso contar con otro método auxiliar que nos ayude a determinar la madurez de esta especie. Uno de ellos podría ser el uso del factor de condición, ya que valores por encima de 1, nos indicarían que el estado de madurez de las hembras garantiza un buen proceso reproductivo ^(14, 61).

5.1.4. Tratamiento Hormonal

Ninguna de las hembras tratadas desovó. Como se trata de la primera vez en inducir artificialmente a esta especie, aún su domesticación y posterior manejo en condiciones de laboratorio, resultaría estresante para ella (ojos y barbillas blanquecinas). Precisamente, el estrés influye directamente en el proceso reproductivo, desencadenando la liberación de cortisol, principal causante de la inhibición de la síntesis de vitelogenina y las interacciones hormonales que ocurren durante este periodo, perjudicando la calidad de los gametos ^(62, 63) e impidiendo una estimulación eficiente de la maduración ovocitaria. Coincidiendo con lo reportado por ⁽³⁷⁾, quienes refieren que las arahuanas son de un temperamento nervioso en estructuras menores a un estanque de 250 m². Similares resultados son reportados por ⁽⁶⁴⁾, para *Brycon amazonicus*, al manifestar que esta especie es muy susceptible al estrés causado por la captura y posterior manipulación con fines reproductivos hasta el punto de llevarla a la muerte a casi el 80% de los casos. En nuestro caso, la mortandad de las hembras fue del 100%.

La falta de respuesta en la mayoría de los tratamientos, posiblemente deba a: (1), las dosis empleadas. Pues según ⁽⁶⁵⁾, el uso de Ovaprim en *Brycon cephalus*, resulta efectivo al doble de la recomendada por el fabricante (0.5 ml/kg). Cabe señalar que los ovocitos de arahuana tienen un diámetro 10 veces superior al de la mayoría de los peces amazónicos. Esta característica única de la arahuana podría explicar también la casi ausencia de respuesta a un tratamiento ovulatorio convencional; (2), la compatibilidad inter específica del sGnRH α , presente en el Ovaprim ®, es generalmente buena para muchas especies, aunque otras formas de GnRH estén presentes en varios peces. Por ejemplo, en *Piaractus mesopotamicus*

“pacu” se encontró GnRH de tipo *Sparus aurata* “dorada” “sbGnRH” ⁽⁶⁶⁾. En ese sentido, el cerebro de arahuana posee GnRH de tipo pollo (cGnRH-II) y de salmón (sGnRH) ⁽⁶⁷⁾. Permittiéndonos deducir que el SGnRHa debería tener un efecto estimulante en arahuana.

El uso de extracto de hipófisis de carpa, que permite una inducción directa sin hacer intervenir el circuito hipofisario, tampoco dio mejor resultado. Llevándonos a sugerir métodos o protocolos distintos de inducción para futuros trabajos y (3), si consideramos a la falta de madurez de las hembras, ésta podría ser descartada, pues nuestros resultados revelaron ovocitos con diámetros muy similares, a los reportados en la etapa final de maduración en condiciones naturales para esta especie ^(2, 51, 53-55, 68). Esto nos permite concluir que probablemente el protocolo utilizado con éxito en otras especies amazónicas no conviene para la arahuana.

5.1.5. Desempeño Reproductivo

El desarrollo asincrónico de los ovocitos caracterizan a un desovador múltiple ⁽⁵²⁾. En ese sentido, y asumiendo que esta especie presentó por lo menos dos modas marcadas de ovocitos en las cercanías al periodo reproductivo, estaríamos frente a una especie de desove múltiple, coincidiendo con ^(69, 68). Característica que condicionaría la liberación en primera instancia, los huevos más desarrollados y los menos avanzados en el proceso de vitelogénesis, retenidos hasta estar listos para el próximo evento reproductivo. Contrario a ⁽⁵³⁾, quien refiere que esta especie es un

desovador total, pues según este autor, la arahuana blanca, libera todos los ovocitos maduros disponibles en un único evento.

Los diámetros de los ovocitos encontrados, demuestran que las hembras estuvieron en diferentes estadios de maduración y aquellas con distribuciones polimodales, son las que no responden de manera eficiente a los tratamientos hormonales ⁽⁷⁰⁾. De acuerdo a nuestros resultados, la ovulación parcial de una de las hembras, tratada con Ovaprim, estaría asociada a una distribución bimodal del diámetro de los ovocitos y a un estado de madurez avanzado. Similares resultados de distribución bimodal del diámetro de los ovocitos fueron reportados por ^(12, 70) para *Brycon cephalus* y *Brycon hennik* respectivamente, pero con resultados positivos de reproducción. En nuestro caso, la ovulación parcial, ocurrió en el estanque, desconociendo el momento promedio en que se inició y, en el caso de haber rescatado dicho desove, habría generado una baja o nula fertilización, pues la hembra ya se encontraba muerta.

CAPÍTULO 6

VI. CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo inmuno enzimático no invasivo, para el sexaje de *Osteoglossum bicirrhosum* “arahuanas” adultas. El mismo que puede utilizarse también para estudios de variaciones de perfiles de vitelogenina con fines de manejo.
- Los machos más grandes de esta especie participan más en los eventos reproductivos que aquellos más pequeños. Así mismo, los machos alcanzan tallas más grandes que las hembras.
- La selección de hembras mediante la observación directa (características externas) aún no es determinante para fines reproductivos.
- Esta especie aún no se encuentra lo suficientemente domesticada para efectuar trabajos de inducción hormonal.
- Es prematuro concluir que la arahuana no responde satisfactoriamente a la inducción de la puesta, ya que otras opciones no han sido evaluadas en este estudio.

CAPÍTULO 7

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros métodos que permitan determinar la madurez sexual de esta especie.
- Continuar con los ensayos hormonales hasta encontrar la dosificación mínima y necesaria para inducir al desove controlado de esta especie.
- Disminuir los procesos causantes de estrés mediante técnicas de manejo adecuados. Podrían incluirse al protocolo de reproducción, el uso de anestésicos.

CAPÍTULO 8

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Harvey B, Hoar W.** Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Canadá; 1980.
2. **Argumedo E.** Arahua Azul. Manual para manejo de reproductores en cautiverio. Servicio Nacional de Aprendizaje, editor. Asociación de Acuicultores del Caquetá: Produmedios; 2009.
3. **Argumedo E, López J, Sánchez C.** Sistemas de producción de arawanas sudamericanas, una alternativa de aprovechamiento sostenible de la biodiversidad ictica y de fortalecimiento de la acuicultura amazónica. Rev. Elect. Ingeniería en Producción Acuícola. 2007; 2: 99 - 100.
4. **Mancera-Rodríguez N, Álvarez-León R.** Comercio de peces ornamentales en Colombia. Rev. Acta biol. Colomb. 2008; 13 (1): 23 - 52.
5. **Ortiz N, Iannacone J.** Estado actual de los peces ornamentales Amazónicos del Perú que presentan mayor Demanda de exportación. J. Biologist. 2008; 6 (1): 54 - 67.
6. **Atencio V.** Producción de alevinos de especies nativas. Rev. MVZ-Cordova. 2001; 6 (1): 9 - 14.
7. **Streit D, Moraes G, Ribeiro R, Cardozo R, Moreira H.** As Tendencias da Utilização do Extrato de Hipofise na Reprodução de Peixes. Rev. Cien. Vet. Zool. UNIPAR. 2002; 5 (2): 231 - 238.

8. **Crepaldi D, Faria P, Teixeira E, Ribeiro L, Costa A, Melo D, et al.** Utilização de hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma sp*). Rev. Bras. Reprod. Anim. 2006; 30 (4): 168 - 173.
9. **Mira T, Medina M, Cruz P.** Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. Rev. MZV-Córdoba. 2010; 15 (2): 2070 - 2077.
10. **Mylonas C, Papandroulakis N, Smboukis A, Papadaki M, Divanach P.** Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRH α implants. Aquaculture. 2004; 237: 141 - 154.
11. **Phelps R.** Recent advances in fish hatchery management. Rev. Bras. Zootec. 2010; 39: 95 - 101.
12. **Lenis G, Restrepo L, Cruz-Casallas P.** Evaluación de tres procolos de tratamiento hormonal sobre el diámetro de ovocitos de sabaleta *Brycon henni*. Rev. Col. Ciencias Pecuarias. 2009; 22 (1): 131 - 142.
13. **Landines M, Mojica H.** Manejo y Reproducción de Carácidos. En: Victoria P, Landines M, Sanabria A. Reproducción de los peces en el trópico. Universidad Nacional de Colombia, editor. Bogotá; 2005. 91 - 104.
14. **Andrade-Talmelli E, Kavamoto E, Narahara M, Fenerich-Verani N.** Reprodução induzida da Piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em Cativeiro. Rev. Bras. Zootec. 2002; 31 (2): 803 - 811.
15. **Alcántara F, Chu F, Chávez C, Tello S, Bances K, Torrejón M, et al.** La pesquería de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossidae) en Loreto, Perú y posibilidades de su cultivo. Folia Amazónica. 2007; 16 (1-2): 55 - 61.
16. **Peligrini L, Gomes A, Malta J.** Descriptores Cuantitativos das Infracomunidades

Parasitas do Trato Digestório de *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) da Amazônia Central (Brasil). *Comunicación Científica - CIVA*. 2006: 640 - 646.

17. **Lowry D, Wintzer A, Matott M, Whitenack L, Huber D, Dean M, et al.** Aerial and aquatic feeding in the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum*. *Environmental Biology of Fishes*. 2005; 73: 453 - 462.
18. **Agudelo-Zamora H, López-Macías J, Sánchez-Paez C.** Hábitos alimentarios de la arowana (*Osteoglossum bicirrhosum* Vandelli, 1829) (Pisces: Osteoglossidae) en el alto río Putumayo, área del Parque Nacional Natural La Paya, Putumayo, Colombia. *Acta Biológica. Par.* 2007; 36 (1-2): 91 - 101.
19. **Lavoué S, Sullivan J.** Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *J. Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 33: 171 - 185.
20. **Da Silva D, Hrbeck T, Farias I.** Microsatellite markers for the silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*, Osteoglossidae, Osteoglossiformes). *J. Molecular Ecology Resources*. 2009; 9 (3): 1019 - 1022.
21. **Jaroszewska M, Dabrowski K.** The nature of exocytosis in the yolk trophoblastic layer of silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*) juvenile, the representative of ancient teleost fishes. *J. The Anatomical Record*. 2009; 292 (11): 1745 - 1755.
22. **Ortega A, Rodríguez C.** Evaluación comparativa del efecto del extracto pituitario de Carpa (epc) y gonadotropina criónica humana (hcg) en la Reproducción inducida del bagre del patia (*Rhamdia quelen*) en condiciones de cautiverio. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuarias - Universidad de Nariño, Pasto; 2004.
23. **Legendre M, Slembrouck J, Subagja J, Kistano A.** Ovulation rate, latency period and ova viability after GnRH- or hCG-induced breeding in the Asian catfish *Pangasius*

- hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae). J. Aquat. Living Resour. 2000; 13: 145 - 151.
24. **Pardo-Carrasco S, Arias-Castellanos J, Suárez-Mahecha H, Cruz-Casallas P, Vásquez-Torres W, Atencio-García V, et al.** Inducción a la maduración final y ovulación del yamú *Brycon amazonicus* con EPC y mGnRH-a. Rev. Colom. Cienc. Pecuaria. 2006; 19 (2): 160 - 166.
25. **Gervásio L.** Indução à Maturação Final, Ovulação e Fertilização do Cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, em Cativeiro. Dissertação Mestre em Aqüicultura. São Paulo – Brasil: Área de Concentração em Aqüicultura em Águas Continentais. Universidade Estadual Paulista. 2003.
26. **Woyanovich E, Horvat L.** A propagação artificial de peixes de águas tropicais. Manual de extensão. Roma: FAO - Documento técnico sobre pesca N° 201; 1983.
27. **Sampaio E, Sato Y.** Desova induzida e aspectos reprodutivos de *Curimatella lepidura* (Eig. & Eig., 1889) (Osteichthyes, Characiformes), espécie endêmica da bacia do rio São Francisco. Rev. Brasileira de Zootecias. 2007; 9 (2): 137 - 144.
28. **Sampaio E, Sato Y.** Aspectos Reprodutivos de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Osteichthyes, Anostomidae) da Bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. Rev. Ciência Animal Brasileira. 2009; 10 (1): 157 - 165.
29. **Sampaio E, Sato Y.** Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. Acta Sci. Biol. Sci. Maringá. 2006; 28 (3): 263 - 268.
30. **Cordero A, Pertuz V, Solano J.** Reproducción inducida de bocachico (*Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1878) con Ovaprim®. Rev. MVZ-Córdoba. 2003; 8 (2): 335.

31. **Arias J, Hernández J.** Efecto del extracto hipofisiario de carpa común y el análogo de la Ngr. Sobre la maduración final del oocito y el desove de la cachama negra *Colossoma macropomum*. Rev. FCV-LUZ. 2009; 19 (5): 486 - 494.
32. **Hill J, Heym K, Poudier J, Powell J, Watson W, Yanong R.** Survey of Ovaprim Use as a Spawning Aid in Ornamental Fishes in the United States. North American Journal of Aquaculture. 2009; 71: 206 - 209.
33. **Ononuju C, Afuluenu L, Effiong P.** Induced propagation of African clariid catfish, *Heterobranchus bidorsalis* (Geoffrey Saint Hillarie, 1809) using synthetic and homoplastic hormones. African Journal of Biotechnology. 2007; 6 (23): 2687 - 2693.
34. **Villanueva M, De la Motta A.** Maduración Sexual de la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* fuera de temporada de reproducción natural. Rev. Multequina. 1998; 7: 61 - 68.
35. **Argumedo E.** Arahuanas. Manual para la cría comercial en cautiverio. Manejo de Reproductores, procedimientos de extracción, incubación y levante de alevinos. Asociación de Acuicultores del Caquetá, editor. Colombia: Produmedios; 2005.
36. **Rodríguez C.** La pesca de arawana *Osteoglossum bicirrhosum* en el área de frontera Brasil – Colombia – Perú y evaluación de un sistema de manejo en cautiverio bajo condiciones de la Amazonía Colombiana. Tesis de Maestría. Leticia - Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2007.
37. **Landines M, Sanabria A, Victoria P.** Producción de peces ornamentales en Colombia Instituto Colombiano de desarrollo rural. Bogotá: Produmedios; 2007.

38. **Takemura A, Oka M.** Immunochemical sexing of living yellow fin tuna, *Thunnus albacares* (Bonaterre), using a vitellogenin-like protein. *Aquaculture Research*. 1998; 29: 245 - 249.
39. **Heppell S, Sullivan C.** Gag *Mycteroperca microlepis* vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. *J. Fish Physiology and Biochemistry*. 1999; 20 (4): 361 - 374.
40. **Pottinger T, Pulman T, Carrick R, Scott P.** Evaluation of biochemical methods for the non destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *J. Fish Biol.* 2005; 67: 1514 - 1533.
41. **Chu-Koo F, Dugué F, Alván M, Casanova A, Alcántara F, Chávez C, et al.** Gender determination in the Paiche or Pirarucu *Arapaima gigas* using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *J. Fish Physiology and Biochemistry*. 2008; 35 (1): 125 - 136.
42. **Tresierra A, Chuquilcón Z, Veneros B.** *Biología reproductiva en peces*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, editor. Trujillo: Editora Nuevo Norte S.A.; 2002.
43. **Sullivan C, Hiramatsu A, Kennedy A, Clark R, Weber G, Matsubara T, et al.** Induced maturation and spawning: opportunities and applications for research on oogenesis. *J. Fish Physiology and Biochemistry*. 2003; 28: 481 - 486.
44. **Muñoz-Cueto J.** Control hormonal de la reproducción en peces. En Silva A. *Cultivo de peces marinos*. Coquimbo; 2005. 101 - 158.
45. **Nuñez J, Kah O, Geffard M, Le Menn F.** Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for sole *Solea vulgaris* vitellogenin. *Comp. Biochem Physiol.* 1989; 92B: 741 - 746.

46. **Nagler J, Davis T, Modi N, Vijayan M, Schultz I.** Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. *J. General and Comparative Endocrinology*. 2010; 167: 326 - 330.
47. **Arguello L, Gonzales H, Atencio V.** Reproducción inducida de la liseta *Leporinus muyscorum* (Steindachner, 1902). Con extracto pituitario de carpa. *Rev. MVZ-Córdoba*. 2001; 6 (2): 97 - 101.
48. **Díaz-Olarte J, Marciales-Caro L, Cristancho V, Cruz-Casallas P.** Comparación del Desarrollo Embrionario de *Piaractus brachypomus* (Serrasalminidae) y *Pseudoplatystoma sp.* (Pimelodidae). *Int. J. Morphol.* 2010; 28 (4): 1193 - 1204.
49. **Aya E, Arias J.** Reproducción inducida de *Pimelodus pictus* con extracto de hipófisis de carpa (EHC) y Ovaprim®. *Rev. MVZ Córdoba*. 2011; 16 (1): 2317 - 2323.
50. **Goulding M.** The Fishes and The Forest. Explorations in the Amazonian. Natural History. University of California Press, editor. Los Ángeles: Berkeley; 1980.
51. **Aragão L.** Contribuição ao estudo da biología do aruanã, *Osteoglossum bicirrhosum*, Vandelli 1829, do lado Janauaca – Estado do Amazonas – Brasil. III – Reprodução e relações biométricas (Osteichthyes – Osteoclossiformes). *Ciência Agron.* 1989; 20(1/2): 59 - 72.
52. **Lamas I.** Análise de características reproductivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase no local de desova. Dissertação Mestre. Ecología, Conservação e Manejo de Vida Silvestre. Dissertação Mestre.. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais - Ecología; 1993.
53. **Queiroz H.** Investimento Parental e Reprodução do Aruanã Branco, *Osteoglossum bicirrhosum*, na Reserva Mamirauá. In Mamirauá. Em Queiroz, editor. Biología, conservação e manejo dos Aruanãs na Amazônia Brasileira. Tefé, Brasil; 2008. p.

152.

54. **Tang M, Gómez J.** Biología y aprovechamiento del arahuana, *Osteoglossum bicirrhosum* en la microcuenca de la cocha el dorado: Reserva Nacional Pacaya Samiria.. Tesis de Pregrado. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Loreto; 2005.
55. **Cavalcante D.** Crescimento e Maturação Sexual de Aruanãs Brancos *Osteoglossum bicirrhosum* em Mamirauá. En Queiroz H, Camargo M. Biologia, conservação e manejo dos Aruanãs na Amazônia Brasileira. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, editor. Tefé, Brasil; 2008.
56. **Gayón J.** History of the Concep of Allometry. J. American Zoologists. 2000; 40: 748 - 758.
57. **Levinton J.** Genetics, Paleontology and Macroevolution. Second edition. United States of America: University of Cambridge; 2001.
58. **Araújo C, Flynn M, Pereira W, Luiz R.** Indicadores de qualidade da água e biodiversidade do Rio Jaguari-Mirim no trecho entre as pequenas centrais hidrelétricas de São José e São Joaquim, São João da Boa Vista, São Paulo. RevInter Revista Intertox de Toxicología. 2011; 4 (3): 51 - 64.
59. **Berkeley S, Hixon M, Larson R, Love M.** Fisheries sustainability via protection of age structure and spatial distribution of fish populations. J. Fisheries management. 2004; 29 (8): 23 - 32.
60. **Chota W.** Variabilidad genética de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) en la región Loreto usando marcadores satelitales. Tesis de postgrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas; 2012.

61. **Arias J, Zaniboni E, Vásquez W, Atencio V.** Selección de hembras de yamú *Brycon siebenthalae*, para reproducción inducida mediante el factor de conversión relativo (Kn). Rev. Orinoquía. 2004; 8 (2): 49 - 55.
62. **Auró Ocampo A, Ocampo L.** Diagnóstico del estrés en peces. Veterinaria México. 1999; 30 (4): 337 - 344.
63. **Flores C.** Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. Rev. de Ictiología. 2002; 10 (1/2): 57 - 78.
64. **Arias J.** Estado actual del conocimiento sobre el yamú *Brycon amazonicus*. Rev. Col. Cienc. Pec. 2006; 19 (2): 125 - 133.
65. **Ramos S.** Efeito de análogos de LHRH em combinação com receptores antagonistas de dopamina na indução ã pulação do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo; 2000.
66. **Powell J, Standen E, Carolsfeld J, Borella M, Gazola R, Fischer W, et al.** Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. J. Regulatory Peptides. 1997; 68: 189 - 195.
67. **O'Neill D, Powell J, Standen E, Youson J, Warby C, Sherwood N.** Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Ancient Teleosts, the Bonytongue Fishes: Putative Origin of Salmon GnRH.. General and Comparative Endocrinology. 1998; 112: 415 - 425.
68. **Ruiz A.** Historia e vida de la “arahuana” *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) en tres cuencas de la Amazonía Peruana. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.

69. **Tello S, Montreuil V, Maco J, Ismiño R, Sánchez H.** Bioecología de peces de importancia económica de la parte inferior de los ríos Ucayali y Marañón - Perú. *Folia Amazónica*. 1992; 42 (2): 87 - 107.
70. **Romagosa E, Narahara M, Borella M, Fenerich-Verani N.** Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*. *Boletim de Pesca*. 2001; 27 (2): 139 - 147.

CAPÍTULO 9

IX. ANEXOS

Anexo 01. Parámetros físico y químicos de los estanques de arahuana, *Osteoglossum bicirrhosum*, durante el periodo de enero a diciembre de 2011.

Parámetro	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Promedio
Estanque 7													
Temperatura (°C)	27.8	27.9	28.4	27.8	27.6	28.7	27.8	27.9	27.8	28.1	27.9	27.8	27.9±0.31
Oxígeno disuelto (mg/l)	3.81	3.90	3.84	3.83	3.76	3.54	3.69	3.60	3.57	3.70	3.65	3.73	3.72±0.11
pH	5.77	5.64	6.02	5.88	5.97	6.23	6.22	5.82	5.93	5.73	5.82	5.62	5.89±0.20
Estanque 8													
Temperatura (°C)	27.5	26.9	28.1	27.5	27.3	28.2	27.7	28.3	27.6	27.9	27.8	28.0	27.7±0.4
Oxígeno disuelto (mg/l)	3.60	3.77	3.64	3.23	3.43	3.15	3.83	3.96	3.69	3.59	3.49	3.6	3.58±0.23
pH	6.25	6.3	5.9	5.79	5.85	5.93	6.13	5.96	5.76	5.98	5.99	5.87	5.98±0.17

Anexo 02. Reproductores de arahuana marcados e identificados según sexo.

N°	CHIP	Sexo	
		Macho	Hembra
1	623	X	
2	1394	X	
3	5908	X	
4	6031	X	
5	6537	X	
6	7345		X
7	7581	X	
8	7908		X
9	9538	X	
10	10342	X	
11	21164	X	
12	22090	X	
13	22905	X	
14	23155	X	
15	23158		X
16	25240	X	
17	25533	X	
18	25645	X	
19	27011		X
20	27353	X	
21	29225		X
22	29288	X	
23	29589		X
24	29625		X

N°	CHIP	Sexo	
		Macho	Hembra
25	29917		X
26	30577	X	
27	30859	X	
28	1056790	X	
29	1056878	X	
30	1056971	X	
31	1057082		X
32	1057227	X	
33	1057262		X
34	1057421		X
35	1057521		X
36	1057744	X	
37	1058381		X
38	1058444	X	
39	1058449		X
40	2026495		X
41	2026735	X	
42	2026765	X	
43	2026969	X	
44	2027075	X	
45	2027089	X	
46	2027126	X	
47	2027175	X	
48	7F7F143144	X	