

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**



**“Descripción histológica de folículos ováricos de Paiche *Arapaima gigas*  
(CUVIER, 1817) de 12, 18 y 24 meses de edad”**

**Tesis para optar el Título Profesional de:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Carlos Armando Yong Rojas**  
**Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**LIMA - PERÚ**

**2018**

*A mi familia, por apoyarme durante el transcurso de mi carrera*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi asesora Mg.Cielo Llerena y a las personas que permitieron el desarrollo de esta tesis de una forma u otra y por último, al equipo del Hatchery Móvil por introducirme a esta área.

## ABSTRACT

The histological description of ovarian follicles in ovaries from paiche of 12, 18 and 24 months of age was made, being in total 9, 13 and 4 ovaries respectively; A follicular classification was developed and is based on this, the ovarian follicular proportion present, follicular diameters and percentages of follicular atresia were determined with the use of the H / E technique using direct observation in 10x magnification. The categories used in the developed classification were the following ones: Perinuclear, Endogenous Vitelogenesis I, Endogenous Vitelogenesis II, and Exogenous Vitelogenesis. The information obtained was analyzed through the use of the Excel statistical program, with the ANOVA test and the differences in means were determined with the Tukey test. Statistical differences were found between the measurements of the follicular diameters and the different follicular types, however, no difference was found in the percentage of atresia. It is concluded that in a period of 24 months of age, females develop characteristics compatible with an ovary in advanced maturation.

*Keywords: Arapaima gigas, ovarian follicle, T*

## RESUMEN

Se realizó la descripción histológica de folículos ováricos de paiches de 12, 18 y 24 meses de edad, siendo en total, 9, 13 y 4 ovarios respectivamente; desarrollándose una clasificación folicular y en base a esta, se determinó la proporción folicular ovárica presente, diámetros foliculares correspondientes y porcentajes de atresia folicular con la utilización de la técnica H/E aplicando observación directa en aumento de 10x. Las categorías usadas en la clasificación desarrollada fueron las siguientes: Perinucleolar, Vitelogénesis endógena I, Vitelogénesis endógena II y Vitelogénesis exógena. La información obtenida se analizó por medio del uso del programa estadístico Excel, con la prueba ANOVA y las diferencias en las medias se determinaron con la prueba de Tukey. Se encontró diferencias estadísticas entre las medidas de los diámetros foliculares y los diferentes tipos foliculares con respecto a la edad, sin embargo, no logró encontrarse diferencia en el porcentaje de atresia. Se concluye que en un período de 24 meses de edad, las hembras desarrollan características compatibles con un ovario en maduración avanzada.

*Palabras clave: Arapaima gigas, folículo ovárico, Tipología*

0

## INTRODUCCIÓN

El paiche (*Arapaima gigas*) es una de las especies de peces más importantes del Perú, debido a su elevado valor comercial y su rol ecológico en el río Amazonas; además, es la especie de pez escamado más grande en el mundo que puede llegar a pesar 200 kg y medir 3 metros de largo (Moreira da Silva., 2016). Se encuentra distribuido en las regiones tropicales de agua dulce de América del sur, dentro de los países de Perú, Bolivia, Guayana y Brasil, particularmente en las cuencas hidrográficas de los ríos Amazonas y Tocantins-Araguaia (Carvajal-Vallejos *et al.*, 2017).

Se reconoce que esta especie tiene un gran potencial para su cultivo, debido a su rusticidad, el alto valor de su carne y sabor, asimismo, puede llegar a pesar 10 kg el primer año de vida, además la reproducción de esta especie ha sido reportada en condiciones controladas, en Brasil y Perú (Rebaza *et al.*, 1999). En estado natural, el paiche se reproduce entre los 4-5 años de edad, cuando alcanza un peso de 40-45 kg y una longitud aproximada de 1.7 metros; sin embargo, se ha reportado que las hembras de 3 años presentan mayores niveles de  $17\beta$ -estradiol en suero sanguíneo (Monteiro *et al.*, 2010), lo que indicaría una actividad reproductiva..

En el cultivo de esta especie con fines económicos, la principal dificultad encontrada en esta especie es la obtención de alevinos (Moreira da Silva., 2016), debido a la falta de un dimorfismo sexual temprano, puesto que los machos logran diferenciarse con una coloración anaranjada en la parte inferior de la

cabeza a partir de la edad reproductiva (García.,2015; Sevilhano., 2015; Ligna., 2017) lo cual impide hacer un manejo adecuado para la reproducción en cautiverio, además de la alta mortalidad de las larvas y el desconocimiento de las condiciones adecuadas de manejo para mantener una producción continua de alevinos en cautiverio. Asimismo, se reporta que la reproducción en cautiverio es inestable porque se puede retrasar la presentación de la madurez sexual bajo condiciones de estrés como es la crianza del ganado en la zona contigua al cultivo de paiches (Rojas., 2011).

En la actualidad, es posible identificar el sexo de los paiches utilizando la técnica de ELISA y cuantificando la concentración de estradiol circulante en la sangre, sin embargo, también se ha reportado que la detección de vitelogenina en peces a partir de los 3 años, aunque también es usado el método de la relación de 11 ketotestosterona/17 $\beta$ -estradiol que permite el sexaje de los peces a partir de los 2.8 años (Chu-Koo *et al.*, 2008). La ultrasonografía, también es usada para el sexaje del paiche, sin embargo, solo es posible usarla con éxito en animales adultos y presenta algunas dificultades en la obtención de imágenes, debido a que las gruesas escamas del paiche y la ubicación de la vejiga natatoria, que está posicionada arriba de la gónada izquierda (Lima, 2015). Además de los métodos ya mencionados para el sexaje, se utiliza la laparoscopia (Nuñez, 2011), sin embargo, debido a las dificultades implicadas en este procedimiento que incluye: anestesia con gas, procedimientos quirúrgicos, sumado a la falta del pared en el ovario en esta especie, hace difícil tomar una muestra de tejido ovárico para realizar el sexaje mediante observación directa de los ovocitos.

En cuanto a la morfología del ovario del paiche, Amaral (2009) macroscópicamente describe que las hembras de paiche poseen un único ovario funcional localizado en el lado izquierdo de la cavidad celómica y además ha

propuesto los estados de maduración fisiológica que consisten en: inmaduro, en reposo, en maduración y maduro. El ovario tiene una forma alargada, pudiendo llegar a medir aproximadamente 50 cm, 12 cm de ancho y pesar de 540 a 1300 gr; además presenta múltiples pliegues transversales, en los cuales se desarrollan los folículos ováricos de forma asincrónica, debido a que el tipo de desove en esta especie es parcial (Moreira da Silva, 2016). El ovario del paiche se clasifica en gimnovario, siendo un ovario desnudo; no posee “pared”, por lo que normalmente, los óvulos que han alcanzado la maduración, son liberados en la cavidad celómica y son posteriormente expulsados al nivel del poro genital en el momento del desove (Nuñez., 2011). Los óvulos poseen una forma esferoidal, y macroscópicamente se observa de color verde oscuro/claro con un diámetro transversal y longitudinal de 4.2 mm y 2.8 mm, respectivamente (Manuel S. 2007).

Los criterios para la caracterización del proceso de oogenesis son tamaño, la cantidad y distribución de varias inclusiones celulares, presencia de gránulos de vitelo y morfología de los cromosomas; y hasta la fecha, usando criterios similares, Godinho *et al.*, (2006), Amaral (2009) y Lopes *et al.*, (2013) han caracterizado el proceso de oogenesis por el que se desarrollan los folículos ováricos del paiche.

La información obtenida a través de la frecuencia del desarrollo de las etapas foliculares en el análisis microscópico del ovario, da una fotografía del potencial del individuo para la desova en el tiempo que es muestreado, así como su potencial para futuros eventos de desova (Armstrong y Witthames, 2012).

Sin embargo a pesar de los estudios ya realizados anteriormente, existen pocos estudios que clasifiquen los folículos ováricos y ayuden a comprender la biología reproductiva del paiche, por lo que se precisa de más investigaciones en este tema, debido a que se necesita conocer el estado de la reserva ovárica en

diferentes edades, ya que nos da información de la fertilidad y permite estimar una edad óptima de reproducción al analizar la cantidad y tipo de folículos que llegarían a alcanzar etapas más avanzadas sin llegar a la atresia.

De lograrse investigaciones que faciliten un mejor manejo de esta especie a edades más tempranas, se fomentará la creación de nuevas piscigranjas de paiche, esto permitirá elevar el nivel de producción actual, y por ende, se logrará satisfacer a la ya existente demanda local e internacional; Además se podrá dar las bases para programas de repoblamiento en zonas donde el paiche se encuentra en situación vulnerable y se pueda reducir la presión de pesca en zonas naturales. El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización de los folículos ováricos de paiche en 12, 18 y 24 meses de edad mediante la determinación del desarrollo folicular de la tipología del paiche con respecto a las edades, el diámetro folicular de los folículos identificados y el porcentaje de atresia presente.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Lugar del estudio:

La recolección de las muestras fue realizada en la piscigranja de la empresa Amazon Harvest en el distrito de San Juan Bautista, ciudad de Maynas, Departamento de Iquitos, Perú. El posterior procesamiento de las muestras fue realizado en el laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## 2. Tipo de estudio:

El estudio fue de carácter observacional y exploratorio, de corte transversal.

## 3. Población Objetivo y tamaño de muestra:

La población objetivo del estudio fueron los ovarios de paiche recolectados en los meses de mayo-junio del año 2018, para el tamaño de muestra obtenido se usó un muestreo por conveniencia debido a que la cantidad de ovarios obtenidos para el estudio, fue por la disponibilidad actual de animales. Siendo en total recolectados 9 ovarios de ejemplares de 12 meses, 13 ovarios de ejemplares de 18 meses y por último 4 ovarios de ejemplares de 24 meses.

## 4. Recolección de muestras

Todos los ovarios usados en el estudio provinieron de ejemplares mantenidos en cautiverio.

Para la eutanasia se realizó la inmersión de los animales en la solución de sobredosis anestésica de 100 mg/kg de Metasulfonato de Tricaina (MS-222) dentro de una artesa de dimensiones de 1m x 1m por al menos 10 minutos y luego de presentarse el indicador de muerte, el cese del movimiento opercular (Håstein., 2005), el pez eutanasiado fue inmediatamente removido de su acuario para que se realice el retiro de los ovarios. Para evitar posibles variaciones en el desarrollo folicular, la toma de las muestras consistió en realizar 3 cortes sagitales de ubicación anterior, medial y distal, con respecto al conducto urogenital (Chellapa *et al.*, 2005), y por último, se preservó las muestras obtenidas en formol al 10%.

Características de los animales muestreados:

Para seleccionar individuos para la toma de muestra, estos debieron mantenerse en un estado de salud adecuado y haber tenido un buen desarrollo, debido a que se buscó encontrar diferencias en el desarrollo gonadal según la edad del individuo. Se brindó a todos los animales la misma dieta, y se les separó por edad.

## 5. Procesamiento de muestras

Las muestras fueron procesadas posteriormente con parafina y fueron cortadas con un micrótopo Leica® a una longitud de 7  $\mu\text{m}$  (Sánchez J., 2013) para el tejido ovárico, y las secciones obtenidas fueron teñidas con H/E.

La lectura para la interpretación de las láminas se realizó con la ayuda de un microscopio compuesto de marca Boeco®, en aumento de 10x, y una cámara incorporada al cabezal del microscopio para tomar las fotos mediante el software llamado ScopeImage 9.0, las fotos se obtuvieron mediante objetivos que fueron calibrados por medio de una lámina a medidas de 50  $\mu\text{m}$ .

Se desarrolló la tipología de los folículos ováricos encontrados basándose en la morfología del ovocito, según los criterios usados en investigaciones previas para esta especie (Amaral 2009; Godinho *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2013) y en peces teleósteos (Rocha 2006).

### Escala de clasificación folicular:

- a) Perinucleolar (PN): El citoplasma está definido y es basófilo.
- b) Vitelogénesis endógena I (VE I): El citoplasma se vuelve completamente acidófilo y empiezan a aparecer vesículas.
- c) Vitelogénesis endógena II (VE II): El citoplasma está completamente lleno de vesículas y el núcleo toma una coloración acidófila.
- d) Vitelogénesis exógena (VEX): Se observa los gránulos de vitelo, y lípidos en el citoplasma. Se consideró que para incluir los folículos en la tipología, se debió observar la totalidad del núcleo, y asimismo que la integridad estructural de la célula no estuviera muy afectada por ondulaciones o disrupciones en la pared celular, así como la presencia de artefactos.
- e) Atrésico: (AT): Se consideró lo expuesto por Valdebenito *et al.*, (2011), en lo siguiente: desintegración y ondulaciones en el corion, hipertrofia de células de la granulosa, migración de células de la granulosa y la teca en el interior del

folículo, reabsorción del contenido ovocitario, aspecto irregular de folículos pequeños, disolución del contenido citoplasmático, degeneración vacuolar del citoplasma, invasión y fagocitosis de las células foliculares.

Se realizó la clasificación de las etapas foliculares de los folículos encontrados en los campos y posteriormente, se obtuvo el diámetro folicular de estos a excepción de los folículos AT.

## **6. Procesamiento de análisis y datos**

Se realizó ANOVA para cada una de las proporciones de las etapas foliculares con respecto a la edad, con los diámetros foliculares con sus respectivas etapas, diámetros foliculares de cada etapa folicular con respecto a la edad y por último las proporciones de atresia con respecto a la edad. Se determinó la diferencia estadística de las medias con la prueba de Tukey.

## **7. Consideraciones éticas**

El personal a cargo, portó la indumentaria necesaria de trabajo como: guantes de nitrilo, botas de hule, gafas de protección, gorro descartable, pijama descartable; para realizar los procedimientos, una vez terminados, se eliminó la indumentaria descartable en recipientes para desechos biológicos y se desinfectó la indumentaria no descartable.

Los paiches se encontraron en estanques pequeños lo que permitió su captura con el uso de redes, luego se realizó la eutanasia según lo indicado en la guía de AVMA de eutanasia para animales (AVMA., 2013), usando el compuesto metasulfonato de triclaína (MS-222) que actúa deprimiendo el sistema Nervioso Central (Coyle *et al.*, 2004, Close *et al.*, 2014) para luego proceder a obtener la muestra para el estudio.

El proyecto fue presentado al Comité de Ética para el Uso de Animales de la UPOCH para su evaluación y se ejecutó una vez obtenida la aprobación del mismo.

## RESULTADOS

Por medio de la observación microscópica y el análisis de esta, se discriminó y clasificó a los diferentes tipos de folículos observados de acuerdo a las características citológicas previamente propuestas.

Para determinar la diferencia estadística en los porcentajes se usó la prueba estadística ANOVA y para determinar diferencias estadísticas entre las medias se realizó la prueba de Tukey.

En el análisis microscópico de los ovarios se registraron porcentajes que se ubican en la tabla 1, donde se encontró una mayor cantidad de folículos perinucleolares con respecto a los demás tipos foliculares en todas las edades encontrándose especialmente una mayor proporción en la edad de 12 meses y en la edad de 24 meses se comienzan a encontrar folículos en fase de vitelogénesis endógena II y vitelogénesis exógena.

En este estudio se diferenciaron y clasificaron los folículos de *A. gigas* en las cuatro categorías descritas en la metodología, basándose en la información descrita para por Amaral (2009), Godinho *et al.*, (2006) y Lopes *et al.*, (2013), además de la información descrita para peces teleósteos por Rocha (2006).

La clasificación folicular se basó en los cambios del ovocito, en donde se observó lo siguiente:

a) Perinucleolar: Se caracteriza por tener una forma ovoide y presentar una intensa basofilia en el citoplasma, tiene un diámetro aproximadamente de  $87.4 \pm 42.2 \mu\text{m}$ , además es posible observar una estructura basofílica, que tendría características compatibles con el cuerpo de Balbiani (fig. 1a). No posee diferencias en el desarrollo en cuanto al diámetro folicular con respecto a la edad (tabla 3), sin embargo se encuentra una mayor proporción en la edad de 12 meses (tabla 1).

b) Vitelogénesis endógena I. Se comienza a apreciar el desplazamiento nuclear hacia el centro. Presenta varios nucléolos adheridos a la superficie interna de la membrana nuclear, y el citoplasma de aspecto granular (fig. 1b). En algunos

casos se observa un halo acidófilo perinuclear. Presenta un diámetro promedio de  $211.8 \pm 98.6 \mu\text{m}$ . Se encontró un mayor porcentaje en la edad de 18 meses (tabla 2). Conforme los folículos avanzaron se empezaron a observar la acumulación de vesículas cerca al núcleo (fig. 1c).

c) Vitelogénesis endogéna II (VE II) Se caracteriza por el completo llenado de vesículas en el citoplasma y se comienza a observar el desarrollo de la zona radiata. Presenta un diámetro promedio de  $448 \pm 154.1 \mu\text{m}$  (fig 1d). Esta etapa y la consiguiente, solo son observables en la edad de 24 meses (tabla 1).

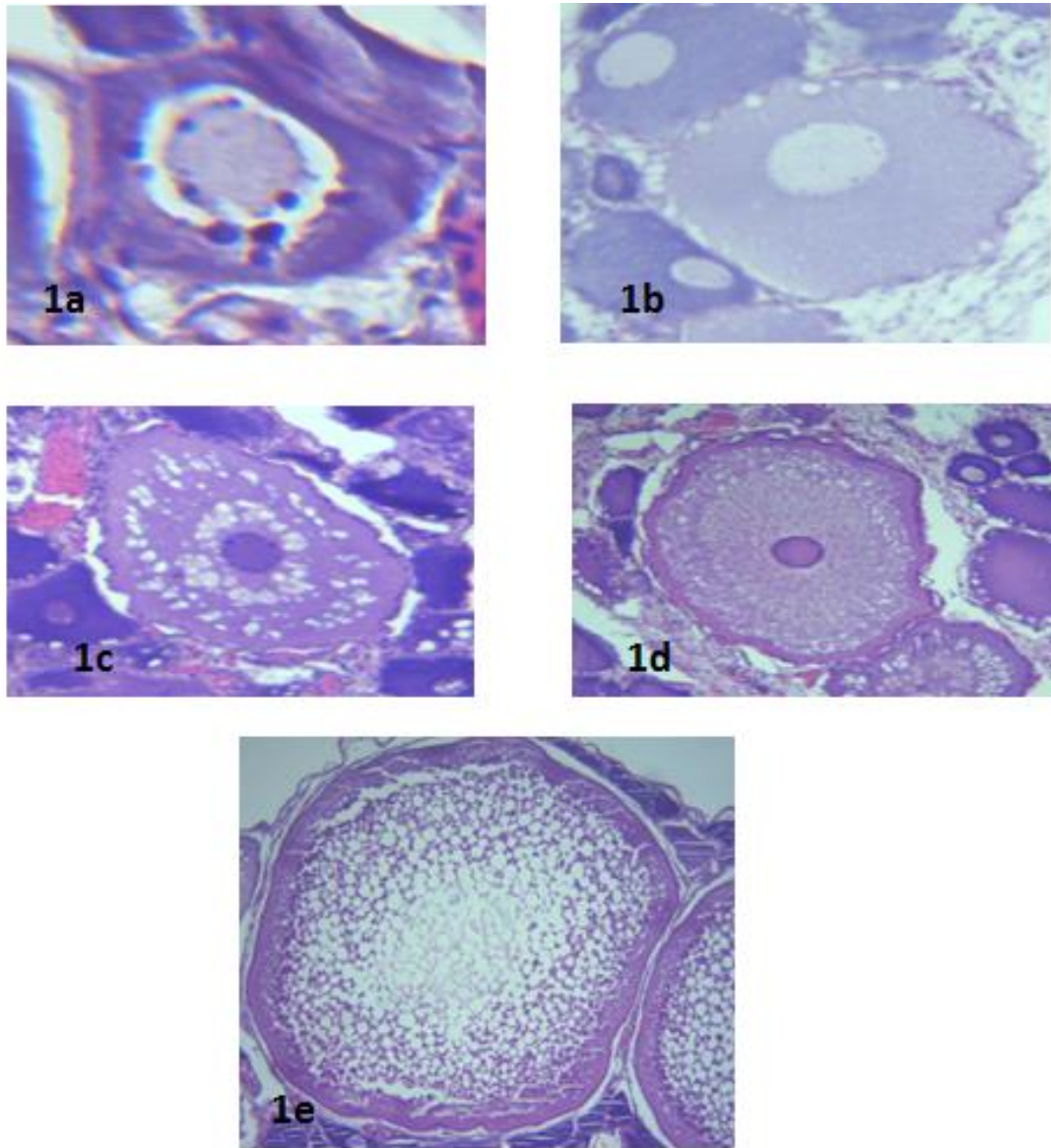
d) Vitelogénesis exogéna (VEX): Se observa un marcado incremento del tamaño, observándose un diámetro promedio de  $770.16 \pm 229.9 \mu\text{m}$ . Los gránulos de vitelo comienzan a observarse en el citoplasma y desplazan a la periferie a las vesículas que llenaban el citoplasma en la VE II, asimismo se aprecia la aparición de vesículas con características lipídicas, y la zona radiata puede observarse con mayor claridad. (fig 1e).

e) Atrésico: Se observó vacuolización, disrupción de la membrana nuclear y citoplasmática, invasión de las paredes foliculares en el citoplasma folicular así como presencia de eritrocitos e infiltrado inflamatorio en el mismo, y engrosamiento de capas foliculares (fig. 3a-e).

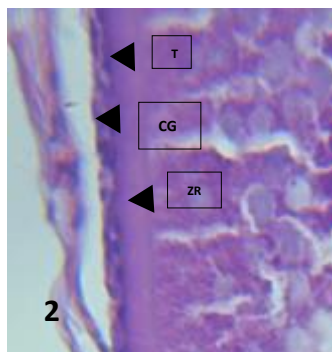
#### Capas foliculares encontradas:

Teca y Capa granulosa: Se observan células con núcleos aplanados que constituyen un epitelio plano, sin embargo las capas no pueden ser distinguibles entre sí (fig. 2).

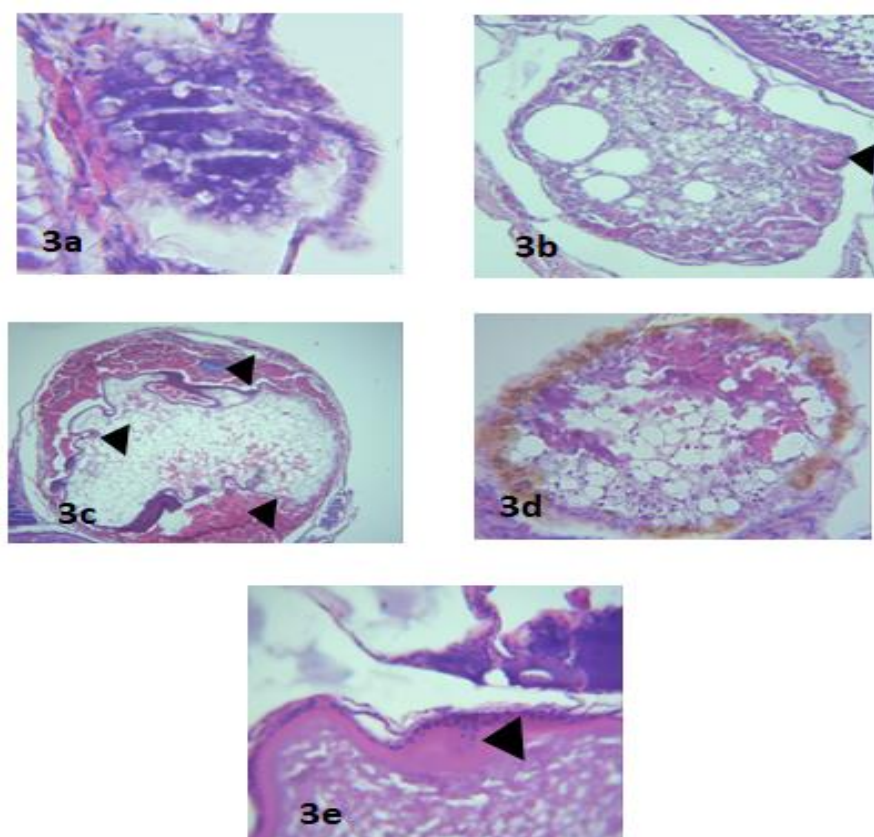
Zona radiata: Se ubica entre la zona del citoplasma y la capa folicular, es una capa compacta y homogénea de coloración acidófila que es visible a partir de la fase de VE II y es claramente visible en el estadio de VEX (fig. 2).



**Figura 1:** Secciones histológicas que muestran las diferentes fases foliculares en el *A. gigas*. a) Perinucleolar. b) y c) Vitelogénesis endogéna I, d) Vitelogénesis endogéna II, e) Vitelogénesis exógena ; Coloración H/E, aumento de 10x.



**Figura 2:** Sección histológica que muestra las diferentes capas foliculares, CG Capa granulosa, T: Teca, ZR: Zona Radiata. Coloración H/E, aumento de 40x.



**Figura 3:** Secciones histológicas que muestran diferentes folículos en estadio de atresia en *A. gigas*: a. a) Vacuolización citoplasmática, aumento de 40x. b) Disrupción de las capas foliculares e invasión de las mismas en el citoplasma, aumento de 10x. c) Infiltrado inflamatorio, eritrocitario y disrupción de las capas foliculares, aumento de 10x, d) Cambios degenerativos de las capas foliculares e intrusión de estas en el citoplasma, aumento de 10x, e) Engrosamiento de la teca, aumento de 40x. Coloración H/E.

**Tabla 1:** Tipo de folículos ováricos (%) en diferentes meses de especímenes de *A. gigas*

Fase folicular	Meses		
	12	18	24
Perinucleolar	77.2 <sup>a</sup>	65.2 <sup>b</sup>	56.3 <sup>c</sup>
Vitelogénesis	4.5 <sup>a</sup>	13.2 <sup>b</sup>	10.2 <sup>c</sup>
Endogéna I			
Vitelogénesis	-	-	2.1
Endogéna II			
Vitelogénesis	-	-	3.3
Exógena			
Atrésico	18.2	21.6	27.5

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes en filas indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**Tabla 2:** Diámetro de diferentes fases foliculares de *Arapaima gigas*( $\mu\text{m}$ )

Fase folicular	N	Media	Intervalo
Perinucleolar	30	88.6 <sup>a</sup> $\pm$ 43.4	45.2-142.9
Vitelogénesis Endógena I	30	211.8 <sup>b</sup> $\pm$ 98.6	113.2 – 388.8
Vitelogénesis Endógena II	30	448 <sup>c</sup> $\pm$ 154.1	239.9 - 693.3
Vitelogénesis Exógena	30	770.16 <sup>d</sup> $\pm$ 229.9	540.3 - 1027.7

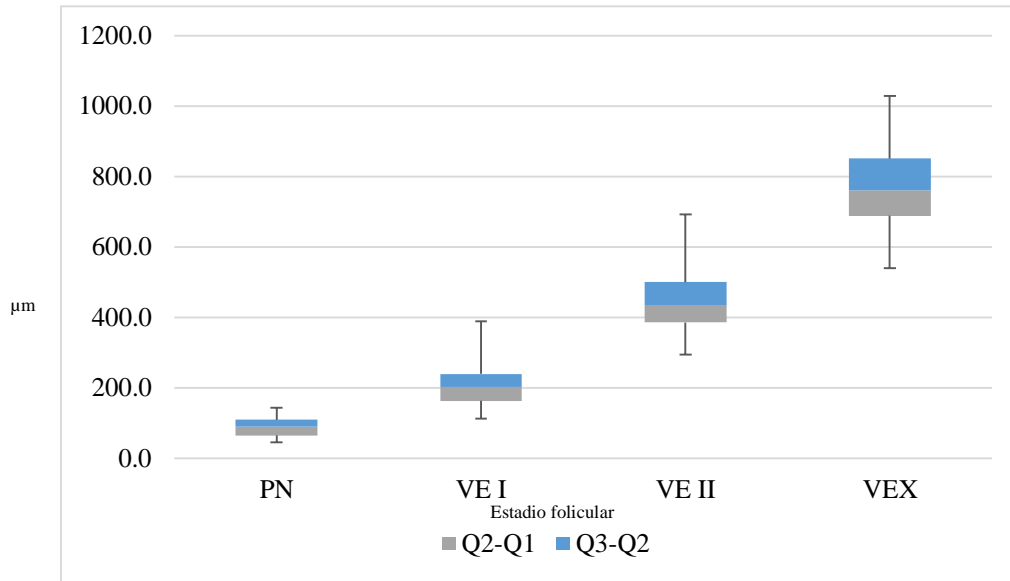
<sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes en columnas indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**Tabla 3:** Diámetro de diferentes fases foliculares de *A. gigas* ( $\mu\text{m}$ ) de acuerdo a la edad.

Fase folicular	Meses		
	12	18	24
Perinucleolar	92.9 $\pm$ 21.4 <sup>a</sup>	85.86 $\pm$ 21.42 <sup>a</sup>	87 $\pm$ 41.8 <sup>a</sup>
Vitelogénesis endógena I	131.9 $\pm$ 18.7 <sup>a</sup>	245.3 $\pm$ 99.7 <sup>b</sup>	210.3 $\pm$ 59.4 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes en filas indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**Gráfico 1:** Diagrama de caja de diámetro de las diferentes fases foliculares de *Arapaima gigas* ( $\mu\text{m}$ ).



La barra de error superior corresponde a los valores comprendidos entre el tercer cuartil y el valor máximo de la distribución, mientras que la barra de error inferior, corresponde a los valores comprendidos entre el primer cuartil y el valor mínimo de la distribución folicular según su estadio.

	PN	VE I	VE II	VEX
Valor mínimo	45.2	113.2	293.9	540.3
Primer Cuartil(Q1)	65.05	163.6	385.925	688
Segundo Cuartil(Q2)	90.75	202.75	434.75	760.7
Tercer Cuartil(Q3)	109.775	239.9	500.75	850.775
Valor máximo	142.9	388.8	693.3	1027.7

## DISCUSIÓN

El estudio realizado se perfila como uno de los primeros en realizar la clasificación folicular de acuerdo a la edad en paiches, por lo que es importante recalcar que debido a los escasos estudios relacionados sobre el tema, se desarrolló una clasificación folicular propia en base a la clasificación hecha por Rocha (2006) en peces teleósteos con base a las investigaciones hechas por Amaral 2009 quien considera 5 estadios foliculares, además de Godinho *et al.*, (2006) y Lopes *et al.*, (2013) quienes consideran 6 estadios foliculares en la especie. Es importante agregar que los últimos estudios hasta la fecha consideran que para que un folículo este dentro de la fase de Vitelogénesis endógena debe encontrarse 3 características, la observación de lípidos, la zona radiata, y la aparición de vesículas corticales, además de lo propuesto por Rocha (2006), quien añade que la coloración citoplasmática comienza a tornarse acidófila. Debido a que en el estudio se encontró folículos que tenían presencia de estructuras esféricas vacías, que coincide con lo observado por West (1990), en donde sustenta que estas estructuras se denominan alvéolos corticales y en tinciones con H/E aparecen vacías; además estos folículos ya contaban con una coloración acidófila y se encontraban en un porcentaje promedio mucho menor (9.2%) que el porcentaje promedio de folículos perinucleolares en todas las edades (66.2%), por lo que se consideró que este cambio era producido por el inicio de la vitelogénesis endógena, de modo que este estadio se denominó vitelogénesis endógena I, y el estadio consecuente, donde los folículos cumplen con las 3 características necesarias para ser considerados dentro de la vitelogénesis temprana según la literatura, se consideró, como vitelogénesis endógena II; Además a diferencia de Lopes *et al.*, (2013) quienes consideran que la etapa folicular más avanzada está representada por el llenado completo de vitelo en el citoplasma, en esta clasificación sólo se consideró el estadio folicular más avanzado cuando se observó la presencia de vesículas lipídicas y vitelo. Por lo que debido a la elaboración de esta clasificación y lo expuesto anteriormente no pudo tomarse como referencia los valores en el diámetro folicular reportados por Godinho *et al.*, (2006) y Lopes *et al.*, (2013). Sin embargo hay que tener en cuenta que la información del estudio contó con un número de muestra inferior comparada con investigaciones anteriores y además los paiches utilizados no alcanzaron la edad reproductiva, por lo que no se logró observar folículos maduros, y consecuentemente no pudieron llegarse a observar algunas características que las investigaciones anteriores discuten. Por estos motivos, se

recomienda aumentar la edad y número de individuos en futuros estudios relacionados, para aumentar la confiabilidad de las observaciones hechas en futuras investigaciones y confirmar los hallazgos realizados por parte de este estudio.

La recolección y análisis de los datos de la investigación, fue hecha con la estereología de los campos obtenidos, no obstante, también puede hacerse uso de software automatizado diseñado especialmente para este tipo de trabajos como herramientas de apoyo, para futuras investigaciones en el tema, como Govocitos (Pintor *et al.*, 2016).

No logró distinguirse por separado las capas foliculares de la granulosa y teca, pero concuerda con lo planteado con Valdebenito *et al.*, (2011), quien afirma que estas sólo son distinguibles con la observación ultraestructural. La composición de la zona radiata fue imprecisa y difícil de observar (fig. 2), pero la coloración acidófila encontrada en esta, presenta características compatibles con un complejo de proteínas, por lo que se recomienda el uso de tinciones específicas en esta, en el estadio de vitelogénesis exógena para definir su composición, adicional a esto, su aparición concuerda con lo propuesto por Varela *et al.*, 2017, quienes exponen que el proceso de zonagénesis, precede al proceso de vitelogénesis exógena, como pudo verse en el estudio, en la que su aparición comenzó en el estadio de vitelogénesis endógena II (fig 1d).

El amplio rango del diámetro de los folículos correspondientes a vitelogénesis endógena II (tabla 2; gráfico 1), revela que la edad no es el único factor que puede influenciar en el desarrollo folicular, por lo que otros factores podrían ser los causantes tales como la alimentación, factores genéticos, entre otros.

Las características microscópicas del ovario en los ejemplares de la de edad de 12 y 18 meses corresponderían con individuos que estarían dentro de la etapa de maduración inicial del ovario según lo reportado por Lopes *et al.*, (2013) e histológicamente por Godinho *et al.*, (2006); además, la evaluación microscópica de los ovarios concuerda con lo propuesto por Blancas *et al.*, (2008) en donde un hallazgo en mayor porcentaje de folículos previtelogénicos en mayor proporción en un ovario, a la edad de 12 meses, indicaría característica de ovario inmaduro. Las características microscópicas del ovario en los ejemplares de la edad de 24 meses podrían encajar con la etapa de ovario en maduración avanzada u ovario maduro según Lopes *et al* (2013) e histológicamente estaría en una etapa de maduración avanzada debido a la presencia de múltiples etapas foliculares y una

tendencia al aumento de las etapas foliculares más avanzadas (Blancas *et al.*, 2008 Godinho *et al.*, 2006). Por lo que la etapa de 24 meses tendría características compatibles con un ovario en maduración avanzada.

Los diferentes tipos foliculares encontrados en los ejemplares de 24 meses expresan un crecimiento folicular asincrónico lo que concuerda con las observaciones hechas hasta el momento sobre la especie (Amaral 2009; Chu-Koo *et al.*, 2008), aunque también este tipo de crecimiento folicular podría explicarse por el tipo de alimentación y ondas foliculares.

Por lo observado anteriormente, se sugiere que a partir de 24 meses, las hembras tendrían la capacidad de desarrollar aparentes características de ovario en maduración avanzada, pero debido que existen ciertos factores externos que pueden afectar el desarrollo folicular, además de la edad entre los que se incluyen: ambientales, genéticos, alimenticios y hormonales. Se infiere que son necesarias más investigaciones al respecto, entre las que se encontrarían, la relación entre el índice gonadosomático y los niveles de 17-beta estradiol en todas las edades con respecto en el desarrollo folicular.

## CONCLUSIONES

Los folículos perinucleolares (PN), se presentan en mayor porcentaje en todas las edades, siendo sus valores 77.2%, 65.2% y 56.3% para las edades de 12, 18 y 24 meses, respectivamente.

El mayor porcentaje de folículos en vitelogénesis endogéna I (VE I) se presentó a los 18 meses (13.2%).

Se encontró un porcentaje estadísticamente similar de folículos en atresia en todas edades de paiche. El porcentaje de atresia para las edades de 12, 18 y 24 meses fue 18.2%, 21.6% y 27.5% respectivamente.

Los folículos en vitelogénesis endogéna II (VE II) y vitelogénesis exogéna (VEX) sólo fueron observados en la edad de 24 meses.

Se encontró diferencia significativa entre los diámetros foliculares en todas las fases, siendo los valores encontrados de 87.4  $\mu\text{m}$ , 211.8  $\mu\text{m}$ , 448  $\mu\text{m}$ , 770.16  $\mu\text{m}$  para PN, VE I, VE II, VEX, respectivamente.

Los folículos perinucleares (PN), mantuvieron el mismo diámetro ( $\mu\text{m}$ ) en todas las edades.

## LITERATURA CITADA

- Amaral, J.S. 2009. Esteroides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reproductivo de *Arapaima gigas* em ambiente natural. Tesis de maestría en ciencias en el área de Fisiología Sao Paulo, Universidad de Sao Paulo
- [AVMA] American Veterinary Medical Association. 2001. Report of the AVMA Panel on Euthanasia, [Acceso 2 Nov. 2017]. Disponible en: [http://www.njfishandwildlife.com/pdf/bear/policy\\_lit/cbbmp\\_euthanasia\\_avma.pdf](http://www.njfishandwildlife.com/pdf/bear/policy_lit/cbbmp_euthanasia_avma.pdf)
- [AVMA] American Veterinary Medical Association. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. [Acceso 2 Nov. 2017]. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
- Armstrong, M. J., & Witthames, P. R. (2012). Developments in understanding of fecundity of fish stocks in relation to egg production methods for estimating spawning stock biomass. *Fisheries Research*, 117, 35–47 p.
- Blancas GA, Barriga I, Morato T., Romero C. y Arredondo JL. (2008). Desarrollo ovárico y su relación con las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol y  $17\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona en hembras de primera maduración de pez blanco, *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Veterinaria México*, 39(1), 67-80 p.
- Chellappa, S., Câmara, M. R., & Verani, J. R. (2005). Ovarian development in the Amazonian red discus, *Symphysodon discus* Heckel (Osteichthyes: Cichlidae). *Brazilian Journal of Biology*, 65(4), 609-616 p.
- Chu-Koo F., Dugue R. Alva A., Daza C, Alcantara B., 2008, Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin,  $17\beta$ -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. Disponible en <http://www.riiaamazonia.org/PUBS/T18.pdf>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E., Bromage N., Buyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth H., Morton D. & Warwick C. 2014. Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 2. [acceso 2 de noviembre 2017]. Disponible en <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/11/Eutanasia2.pdf>
- Coyle, S.D., Durborow, R.M. & Tidwel, J.H. Aquaculture Center. Anesthetics in Aquaculture. November 2004. SRAC Publication No. 3900. Disponible en <http://www.aces.edu/dept/fisheries/aquaculture/documents/5864154-3900fs.pdf>

- [FAO]. 1999. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura 1999. [acceso 20 de mayo 2018]. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-ak492s.pdf>
- Rojas, H.H. 2011 Evaluación de la densidad y alimentación en el desempeño reproductivo del pirarucu *Arapaima gigas* en cautiverio. [acceso 20 de mayo 2017]. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/12870/1/hugohernanfrancorojas.2011.pdf>
- Garcia, J. 2015, Caracterización histopatológica de lesiones en alevines de paiche (*Arapaima gigas*) en una piscigranja de la región UCAYALI-PERÚ”, Tesis de Título Profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Godinho, H. P., Santos, J. E., Formagio, P. S. and Guimarães-Cruz, R. J. 2005, Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). Acta Zoologica, 86: 289–294. doi:10.1111/j.1463-6395.2005.00213.x
- Håstein T., A.D. Scarfe y Lund, V.L. 2005, Science-based assessment of welfare: aquatic animals Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 24, 529-547 p
- Ligña L., 2017 Determinación de los valores hematológicos de paiches juveniles *Arapaima gigas* mantenidos en condiciones de cautiverio en la amazonía ecuatoriana. Trabajo de grado presentado como requisito para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Quito: Universidad Central del Ecuador. 75 p.
- Lima, A. F.; Varela, E. S.; Maciel, P. O; Alves, A. L.; Rodrigues, A. P. O; Torati, L. S.; Mataveli, M.; Bezerra, T. A. 2015 Manejo de plantel de reproductores de Pirarucu, Brasília, 65-67 p.
- Lopes, K., Rocha, R., Ferreira, A. M., Helder Q.L. 2013. Notas sobre a biologia reprodutiva do Pirarucu (*Arapaima gigas*) Schinz 1822 Biologia, conservação e manejo participativo de pirarucus na Pan-Amazônia :43-57 p.
- Moreira da Silva A., Paxiuba, W.L. 2016. Aspectos biológicos, ecologia e fisiologia do pirarucu (*Arapaima gigas*): uma revisão da literatura, Disponible en <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/10/v5-n3-31-46-2016.pdf>
- Pintor J.M., Carrión P., Cernadas E., González-Rufino E., Formella A., Fernández-Delgado M., Domínguez-Petit R., Rábade-Uberos S., 2016. Govocitos: A software tool for estimating fish fecundity based on digital analysis of histological images, Computers and Electronics in Agriculture, Volume 125, 89-98 p.
- Rebaza, M., Alcántara, F. y Valdivieso, M., 1999. Manual de Piscicultura del Paiche (*Arapaima gigas*, CLUVIER). Secretaría Pro Tempore del Tratado de Cooperación Amazónica (TCA) – IIAP – FAO. 35 p.

- Rocha M.J. and Rocha E. 2006. Morphofunctional Aspects of Reproduction from Synchronous to Asynchronous Fishes - An Overview. Reinecke, M. Zaccone, G. and Kapoor B.G. Fish Endocrinology Enfield, New Hampshire, Science Publishers 571-625 pp.
- Sánchez, J. (2013). Escala de madurez gonadal del jurel *Trachurus murphyi* Nichols 1920. Revista Peruana de Biología, 20(1), 35-44 pp.
- Sevilhano, T. C. A. 2015. Clonagem, caracterização e análise filogenética das subunidades alfa e beta do hormônio luteinizante de pirarucu (*Arapaima gigas*). Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.85.2015.tde-22062015-143247.
- Valdebenito, I, Paiva, L, & Berland, M. (2011). Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. Archivos de medicina veterinaria, 43(1), 11-25 p. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000100003>
- Varela, M.L., Ferreira, M.F., Da Cuña, R., Lo Nostro, F. L., Genovese, G, Mejjide, F., 2017. Dynamics of ovarian maturation throughout the reproductive cycle of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Can. J. Zool. In press.
- West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 41:199– 222 p.

## ANEXOS

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.140671766	2	0.070335883	4.874287622	0.017185311	3.422132208
Dentro de los grupos	0.331889589	23	0.014429982			
Total	0.472561355	25				

Tabla 4: Prueba de ANOVA, para determinar diferencias estadísticas en la proporción folicular de la etapa perinucleolar según la edad

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.038721893	2	0.01936095	3.85227839	0.036060981	3.422132208
Dentro de los grupos	0.11559439	23	0.00502584			
Total	0.154316283	25				

Tabla 5: Prueba de ANOVA, para determinar diferencias estadísticas en la proporción folicular de la etapa de vitelogénesis endógena I, según la edad.