

Caracterización histológica de folículos ováricos de *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817) de 12, 18 y 24 meses de edad

Histological characterization of ovarian follicles of *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817) of 12, 18 and 24 months of age

Carlos Yong Rojas^{1,4}, Cielo Llerena Zavala², Galy Mendoza Torres³,
Luisa Echevarría Cureé¹

RESUMEN

Se realizó la descripción histológica de los folículos ováricos de paiche de 12, 18 y 24 meses de edad de una piscifactoría en Iquitos en mayo de 2018, con base a un muestreo de conveniencia. Se trabajó con 9, 13 y 4 ovarios de paiches de 12, 18 y 24 meses, respectivamente. Se desarrolló una clasificación folicular con base a las características foliculares y con base a esto, se determinó la proporción folicular ovárica, los diámetros foliculares y el porcentaje de atresia folicular. Se consideraron las siguientes fases: Perinucleolar (PN), Vitelogénesis I endógena (VE1), Vitelogénesis endógena II (VE2) y Vitelogénesis exógena (VEX). La mayor frecuencia de folículos PN se presentó a la edad de 12 meses ($p < 0.05$), no habiendo diferencias significativas en la frecuencia de folículos VE1 a los 18 y 24 meses. Las etapas VE2 y VEX solo se observaron a los 24 meses. No se encontró diferencia significativa en el porcentaje de atresia entre edades. Los resultados obtenidos sugieren que las hembras tienen características aparentes compatibles con el inicio de un ovario en maduración avanzada a partir de los 24 meses de edad.

Palabras clave: folículos ováricos, histología, paiche, atresia folicular

¹ Laboratorio de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Laboratorio de Histología y Patología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Laboratorio de Anatomía Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁴ E-mail: carlos.yong.r@upch.pe

Recibido: 17 de diciembre de 2019

Aceptado para publicación: 29 de agosto de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

ABSTRACT

The histological description of ovarian follicles of the 12, 18 and 24-month-old paiche (*Arapaima gigas*) from a fish farm in Iquitos in May 2018 was performed using a convenience sampling. Nine, 13 and 4 fish ovaries of 12, 18 and 24 months, respectively were used. A follicular classification was developed based on the follicular characteristics and based on this, the ovarian follicular ratio, follicular diameters, and the percentage of follicular atresia were determined. The following phases are considered: Perinucleolar (PN), Endogenous vitellogenesis I (VE1), Endogenous vitellogenesis II (VE2) and exogenous vitellogenesis (VEX). The highest frequency of PN follicles was presented at the age of 12 months ($p < 0.05$), with no significant differences in the frequency of VE1 follicles at 18 and 24 months. VE2 and VEX stages were only observed at 24 months of age. No significant difference was found in the percentage of atresia between ages. The results obtained suggest that the females have apparent characteristics compatible with the onset of an advanced maturation of the ovary from 24 months of age.

Key words: ovarian follicles, histology, paiche, follicular atresia

INTRODUCCIÓN

El paiche (*Arapaima gigas*) pertenece a la familia Arapaimidae. Es una de las especies de peces de agua dulce de mayor importancia económica en el Perú debido al potencial mercado que representa en la Unión Europea, Estados Unidos y Japón. Se encuentra distribuido en las regiones tropicales de agua dulce de América del sur, especialmente en Perú, Bolivia, Guayana y Brasil, particularmente en las cuencas hidrográficas de los ríos Amazonas y Tocantins-Araguaia (Carvajal-Vallejos *et al.*, 2017). Puede llegar a pesar 10 kg el primer año de vida y alcanza la edad reproductiva a los 4 años (Da Silva y Duncan, 2016).

Los datos poblacionales de esta especie son desconocidos según la IUCN (Kirsten *et al.*, 2018). No obstante, su población ha sufrido una drástica disminución según datos de desembarques, toda vez que la captura de paiche representó el 6% de la captura total de peces amazónicos en 1984 y en 2016 solo representó el 0.5% del desembarque total de

la región amazónica (García-Dávila *et al.*, 2018). Por ese motivo, en 1996, el INRENA impulsó programas de protección contra la pesca ilegal a la especie en la Reserva Nacional Pacaya Samiria (Adler *et al.*, 2003). Años después, se observó que estos programas dieron buenos resultados, porque entre 2010-2018 hubo una tendencia a la recuperación de la población silvestre de paiche (PRODUCE, 2018).

Se han llevado a cabo diversos trabajos de investigación en el ámbito reproductivo a fin de obtener un mayor entendimiento de su biología reproductiva (Godinho *et al.*, 2005; Amaral 2009; Lopes *et al.*, 2013). Morfológicamente, se ha descrito que el paiche posee un único ovario funcional, localizado en el lado izquierdo de la cavidad celómica, además de presentar 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 (Amaral, 2009). Histológicamente, el proceso de ovogénesis ha sido caracterizado según ciertos criterios de clasificación de peces teleósteos: tamaño,

cantidad y distribución de varias inclusiones celulares, presencia de gránulos de vitelo y morfología de los cromosomas (Rocha M y Rocha E, 2006). Sin embargo, no existe información sobre el desarrollo folicular en el crecimiento, tal y como se conoce en otras especies de teleósteos (Rocha M y Rocha E, 2006). La insuficiente información disponible acerca de la biología reproductiva de la especie trae como consecuencia un manejo inadecuado de programas de reproducción según la edad del pez, dificultando la obtención de alevinos (Monteiro *et al.*, 2010).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el desarrollo de las diferentes fases foliculares del paiche con respecto a la edad de los individuos, basado en un análisis microscópico y la determinación de la frecuencia de folículos vitelogénicos. Esto permitirá determinar la edad en que comienzan a desarrollar aparentes características compatibles con un ovario maduro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones Éticas

El manejo y eutanasia de los paiches se realizaron según lo indicado en la guía de la American Veterinary Medical Association de eutanasia para animales (AVMA, 2013), usando el compuesto metasulfonato de triclaína (MS-222). El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Población Objetivo

La población objetivo del estudio fueron los ovarios de paiche recolectados en los meses de mayo-junio de 2018 en la piscigranja Amazon Harvest, distrito de San Juan Bautista, ciudad de Maynas, departamento de Iquitos, Perú. Se usó un muestreo por conveniencia debido a que la cantidad de ovarios estuvo limitada por la disponibilidad actual de

los animales. Se recolectaron 9 ovarios de ejemplares de 12 meses, 13 ovarios de ejemplares de 18 meses y 4 ovarios de ejemplares de 24 meses.

Para evitar posibles variaciones en el desarrollo folicular, la toma de las muestras consistió en realizar tres cortes sagitales de ubicación anterior, medial y distal, con respecto al conducto urogenital (Chellappa *et al.*, 2005). Las muestras fueron preservadas en formol al 10% y procesadas en parafina. Los cortes histológicos se hicieron a una longitud de 7 μm con un micrótomo Leica® (Sánchez, 2013) y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E). La lectura para la interpretación de las láminas se realizó con un microscopio compuesto Boeco®, a 10x, y una cámara fotográfica incorporada al cabezal del microscopio con apoyo del software ScopeImage 9.0. Esto permitió realizar la medición de los folículos mediante objetivos que fueron calibrados por medio de una lámina a medidas de 50 μm . A fin de obtener una distribución normal del diámetro de los folículos, basándose en un valor de intervalo de confianza del 95%, se registraron las mediciones de al menos 30 folículos por fase folicular y por edad.

Análisis Estadístico

Se utilizó el análisis de varianza para cada una de las proporciones de las etapas foliculares con respecto a la edad, 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.

RESULTADOS

En este estudio se diferenciaron y clasificaron cuatro fases foliculares en *A. gigas*, basándose en la información descrita para esta especie por Amaral (2009), Godinho *et*

Cuadro 1. Clasificación de los folículos ováricos de *Arapaima gigas* según sus características

Fase	Características foliculares
Perinucleolar (PN)	Forma ovoide y con intensa basofilia en el citoplasma, el cual posee una apariencia compacta. El nucleoplasma posee una tinción ligeramente acidófila. Suele observarse de 2 a 5 nucléolos. A veces se observa una estructura basofílica con características compatibles con el cuerpo de Balbiani (Figura 1a), rodeada de un epitelio plano simple.
Vitelogénesis endógena I (VE1)	Forma ovoide, con tinción acidófila en el citoplasma, el cual posee una apariencia granular. El nucleoplasma posee una tinción ligeramente acidófila. Se aprecia aumento constante de la proporción citoplasma con respecto al núcleo. Entre 11 a 14 nucléolos distribuidos en la periferie del núcleo. A veces hay halo acidófilo perinuclear, así como vesículas cerca del núcleo. Se observan estructuras esféricas vacías en la periferia de la célula compatibles con los alveolos corticales (Figura 1b).
Vitelogénesis endógena II (VE2)	Completo llenado de alveolos corticales en el citoplasma e inicio del desarrollo de la zona radiata (Figura 1c,d). Nucleoplasma con coloración ligeramente basófila. Gran diferencia en el ratio núcleo- citoplasma.
Vitelogénesis exógena (VEX)	Acumulación de sustancias en el citoplasma de naturaleza lipídica y proteica, que desplazan a los alveolos corticales que llenaban el citoplasma en la VE II. Esto causa aumento del volumen folicular (Cuadro 3). El desarrollo de la zona radiata es más definido, diferenciándose una parte interna “Z1” y una externa “Z2”. El núcleo es difícilmente observable y se encuentra hacia la periferia de la membrana nuclear, rodeado por vesículas de vitelo (Figura 1e). El epitelio compuesto por teca y capa granulosa, aunque no pueden ser fácilmente diferenciadas (Figura 2).

al. (2005) y Lopes *et al.* (2013), además de la información descrita para peces teleósteos por Rocha M y Rocha E (2006) (Cuadro 1, Figura 1).

Se observó un mayor porcentaje de folículos en fase Perinucleolar (PN) en la edad de 12 meses, seguido de la edad de 18-24 meses (Cuadro 2). De otra parte, a la edad

Cuadro 2. Fases de folículos ováricos en especímenes de *Arapaima gigas* de tres edades

Fase ¹ folicular	12 meses (n=9)		18 meses (n=13)		24 meses (n=4)	
	%	n	%	n	%	n
PN	77.20±0.73 ^a	992±152	65.20±2.16 ^b	1248±187	56.34±0.49 ^c	575±76
VE I	4.47±0.02 ^a	59±8	12.99±0.91 ^b	220±33	10.2±0.16 ^c	94±11
VE II	-	-	-	-	2.1±1.76	76±9
VEX	-	-	-	-	3.3±2.97	82±14
ATR	18.2±0.57	240±40	21.6±1.02	350±43	27.5±0.46	248±35

¹ PN: Perinucleolar; VE1: Vitelogénesis endógena 1; VE2: Vitelogénesis endógena 2; VEX: Vitelogénesis exógena; ATR: Atrésico

a,b,c Letras diferentes dentro de filas indican diferencia significativa (p<0.05)

Cuadro 3: Diámetro de folículos ováricos de *Arapaima gigas* (µm), según la fase folicular

Fase folicular	n	Media	Rango
Perinucleolar	30	88.6 ^a	45.2-142.9
Vitelogénesis endógena I	30	211.8 ^b	113.2 – 388.8
Vitelogénesis endógena II	30	448 ^c	239.9 - 693.3
Vitelogénesis exógena	30	770.1 ^d	540.3 - 1027.7

a,b,c,d Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa (p<0.05)

de 18 meses se encontró la mayor cantidad de folículos en fase de vitelogénesis endógena 1 (VE1), y a la edad de 24 meses se encontraron diferencias significativas en diámetros foliculares (Cuadro 3).

Los diámetros foliculares encontrados en la fase folicular VE1, en las edades de 18 y 24 meses, no presentaron diferencia significativa entre sí, pero a la edad de 12 meses se pudo observar diferencia significativa (Cuadro 4).

Se observaron folículos que fallaron en alcanzar la madurez completa, clasificándose su atresia en tipo α , pudiéndose observar que las paredes foliculares invaden el citoplasma (Figura 3b,c), atresia tipo β , donde se observa el engrosamiento de las capas foliculares (Figura 3e) y vacuolización intracelular (Figura 3a); así como atresia de tipo δ , donde se observa una pigmentación marrón en el folículo (Figura 3d).

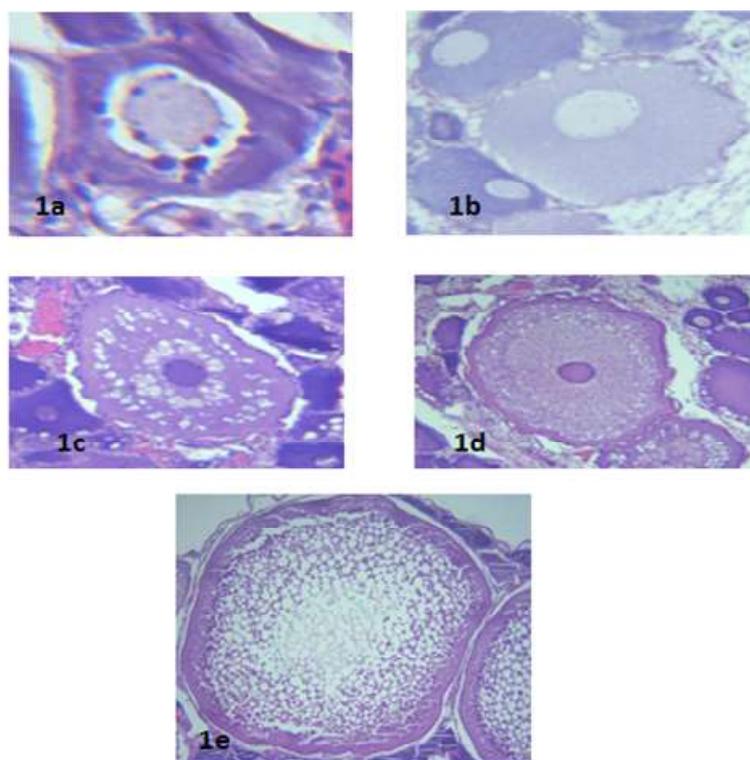


Figura 1. Cortes histológicos mostrando las fases foliculares en *Arapaima gigas*. a) Perinucleolar. b) y c) Vitelogénesis endógena I, d) Vitelogénesis endógena II, e) Vitelogénesis exógena. Coloración H-E. 10x

Cuadro 4. Diámetro de folículos ováricos (μm) de *Arapaima gigas* de acuerdo con la edad de los especímenes (n=30 folículos por grupo)

Fase folicular	12 meses (n=9)	18 meses (n=13)	24 meses (n=4)
Perinucleolar	92.9 ^a ± 21.4	85.86 ^a ± 21.42	87 ^a ± 41.8
Vitelogénesis endógena I	131.9 ^a ± 18.7	245.3 ^b ± 99.7	210.3 ^b ± 59.4

^{a,b} Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

El crecimiento primario o en el desarrollo de los folículos en fase perinucleolar (PN) se encuentra una transcripción constante por el núcleo, conllevando a una tinción basófila del citoplasma y el progresivo aumento del

folículo, debido a la acumulación de RNA (Spadella *et al.*, 2005), lo cual estaría vinculado a las características encontradas en esta fase folicular (Figura 1a).

El inicio del crecimiento folicular secundario en el paiche ha sido denominado últimamente como alvéolos corticales (Amaral

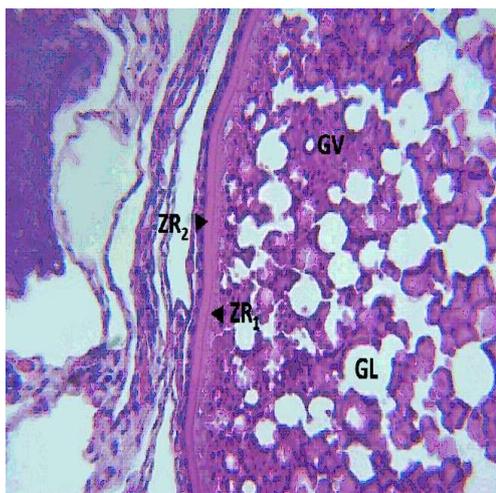


Figura 2. Corte histológico que muestra las capas de un folículo ovárico en Fse de vitelogénesis exógena de *Arapaima gigas*. CF: Capa granulosa y Teca; ZR₁: Zona radiata externa; ZR₂: Zona radiata interna; GV: Glóbulos de vitelo; GA: Glóbulos lipídicos. Coloración H-E. 40x

et al., 2019). En otros estudios histológicos en diversas especies (Parenti *et al.*, 2015; Moslemi-Aqdam *et al.*, 2016; Jan y Ahmed, 2019) comparten asimismo esta denominación. En el estudio se encontraron folículos con presencia de estructuras esféricas vacías (Figura 1b), coincidentes con lo observado por West (1990), quien 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, de modo que se consideró que este cambio era producido por el inicio del crecimiento folicular secundario. Es por esto que se consideró que esta fase debería denominarse vitelogénesis endógena I (VE1), mientras que el estadio consecuente, donde los folículos cumplen con las tres características necesarias (Figura 1c) para ser considerados dentro de la vitelogénesis temprana indicada en la literatura (Moslemi-Aqdam *et al.*, 2016; Jan y Ahmed, 2019;

Araújo *et al.*, 2019), se le denominó vitelogénesis endógena II (VE2). Este tipo de clasificación también puede verse en especies como *Salminus hilarii* (Honji *et al.*, 2008), *Acipenser baerii* (Le *et al.*, 2018) y *Merluccius merluccius* (Treasurer, 2017).

El inicio del crecimiento folicular secundario, o el pase de la fase folicular PN a VE1, está fuertemente ligado a la secreción de niveles elevados de FSHr por la hipófisis (Kwok *et al.*, 2005). Esta secreción estimula la aromatización de la testosterona por las células de la granulosa, favoreciendo la producción de 17 α -estradiol (E2) (Valdebenito *et al.*, 2011). El E2 está vinculado a la activación de procesos dentro del folículo o procesos endógenos, que estimularían a la formación de alvéolos corticales a través del cuerpo de Balbiani (Domínguez Castanedo y Uribe, 2019). Así también, la secreción de E2 está relacionada al crecimiento de los folículos ováricos dentro de la fase VE1 en salmónidos (Forsgren y Young, 2012) y soleidos (Solé *et al.*, 2016). Por lo tanto, los ejemplares en este estudio podrían estar afectados por una secreción elevada de FSHr y E2 a partir de la edad de 18 meses. Esto explicaría el menor tamaño encontrado en los folículos en fase VE1 a los 12 meses con respecto a los de 18 y 24 meses, a pesar de encontrarse en la misma fase folicular (Cuadro 4) y la mayor proporción folicular en la fase PN a los 12 meses (Cuadro 2), debido a una menor activación. Asimismo, también es posible ver una disminución gradual en el total de folículos ováricos en la fase PN, lo que plantearía la interrogante de determinar la edad en que las hembras de paiche cuenten aún con una reserva folicular para un desove.

Consecuentemente con la maduración folicular o el pase de la VE2 a la VEX, se encuentra principalmente involucrado el E2, que estimula al hígado para la producción de vitelogenina, siendo transportada por el flujo sanguíneo para finalmente ser endocitada y procesada por los folículos ováricos (Hiramatsu *et al.*, 2015).

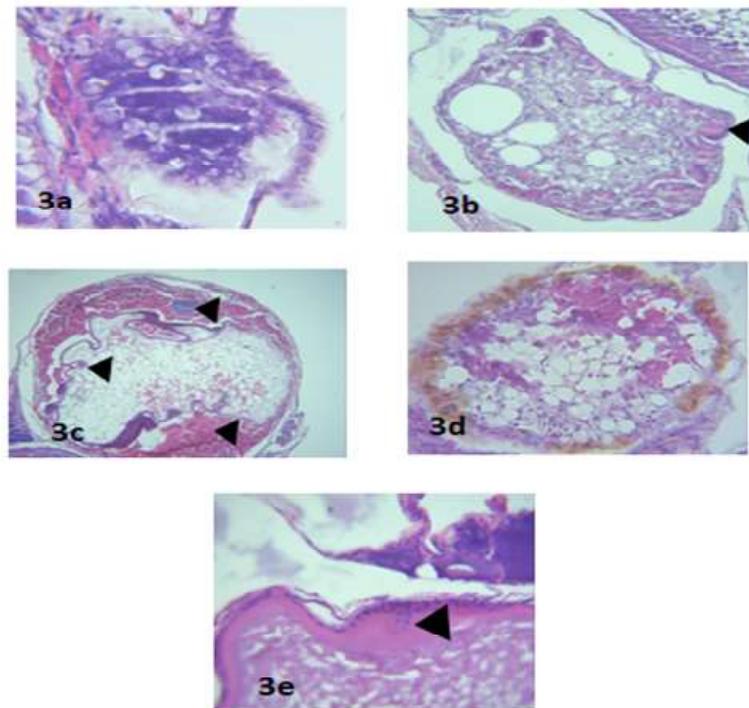


Figura 3: Cortes histológicos que muestran folículos en estadio de atresia en *Arapaima gigas*. a) Vacuolización citoplasmática. 40x; b) Disrupción de las capas foliculares e invasión en el citoplasma. 10x; c) Infiltrado inflamatorio, eritrocitario y disrupción de las capas foliculares. 10x; d) Cambios degenerativos de las capas foliculares e intrusión en el citoplasma. 10x; e) Engrosamiento de la teca. 40x. Coloración H-E

No se logró distinguir las capas foliculares de la granulosa y de la teca, pero los resultados concuerdan con lo planteado por Valdebenito *et al.* (2011), quienes indican que solo son distinguibles con la observación ultraestructural. La composición de la zona radiata fue imprecisa y difícil de observar y su coloración acidófila (Figura 2) presenta características compatibles con un complejo de proteínas, por lo que se tendría que utilizar tinciones específicas en el estadio de VEX para definir su composición. Por otra parte, su aparición se relaciona con los cíclidos (Varela *et al.*, 2017), ciprínidos (Jan y Ahmed, 2019) y carácidos (Honji *et al.*, 2009) debido a que el proceso de zonagénesis precede al proceso de vitelogénesis exógena, tal y como se observó en el presente estudio en que su aparición comenzó en el estadio de vitelogénesis endógena II (Figura 1d).

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 solo se consideró la presencia de glóbulos lipídicos y vitelo en la fase VEX. Debido a los cambios introducidos en la clasificación, no pudo tomarse como referencia los valores del diámetro folicular reportados por Godinho *et al.* (2005) y Lopes *et al.* (2013). Sin embargo, se debe mencionar que el presente estudio contó con un número de muestra inferior a la utilizada en las otras investigaciones y que los paiches utilizados no habían alcanzado 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.

Según Hunter y Macewicz (1985), se distinguieron tres tipos de estadios de atresia en este estudio: tipo α (Figura 3b,c), tipo β (Figura 3e) y tipo δ (Figura 3d). De estos, el más importante es el estadio α en folículos vitelogénicos, dado que un análisis de la proporción de estos en animales maduros podría indicar una temporada de desove próxima o la edad de reproducción.

Las características microscópicas del ovario en los ejemplares 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.* (2005). Por otro lado, concuerda con lo propuesto por Blancas *et al.* (2008) en *Chirostoma humboldtianum*, quienes hallan un mayor porcentaje de folículos previtelogénicos a la edad de 12 meses, característica de ovario inmaduro.

Las características del ovario en los ejemplares de 24 meses indican que podrían encontrarse en la etapa de ovario en maduración avanzada según Lopes *et al.* (2013). En forma similar, desde el punto de vista histológico debido a la presencia de múltiples etapas foliculares y una tendencia al aumento de las etapas foliculares más avanzadas (Godinho *et al.*, 2005; Blancas *et al.*, 2008). Las diferentes fases foliculares encontradas en los ejemplares de 24 meses expresan, asimismo, un crecimiento folicular asincrónico, que concuerda con las observaciones hechas hasta el momento sobre la especie (Chu-Koo *et al.*, 2008; Amaral, 2009), aunque también este tipo de crecimiento folicular también podría explicarse por el tipo de alimentación y por la presencia de ondas foliculares (Durham y Wilde 2008; Rideout y Tomkiewicz, 2011).

En resumen, el análisis en conjunto del desarrollo histológico folicular junto a un estudio de niveles hormonales de E2 y FSHr en hembras de paiche y el análisis de la proporción de folículos atrésicos vitelogénicos en

esta especie podrían ser herramientas clave para la mejora del manejo reproductivo en esta especie.

CONCLUSIONES

- El diámetro folicular para la fase perinucleolar fue similar entre los ejemplares de distintas edades del paiche *Arapaima gigas*.
- Se encontró un porcentaje similar de folículos en atresia en especímenes de tres edades (12, 18 y 24 meses)
- Las etapas foliculares más avanzadas son observables a partir de los 24 meses de edad

LITERATURA CITADA

1. **Adler V, Fabiola D, Diandra T, Hernán F, Víctor M. 2003.** Estudio piloto para la recuperación de las poblaciones de paiche *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817), en el sector inferior de la cuenca Pacaya, de la Reserva Nacional Pacaya-Samiria. En: Seminario Taller Internacional de Manejo de paiche o Pirarucu. Iquitos, Perú.
2. **Amaral JS. 2009.** Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reproductivo de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em ambiente natural. Tesis de Mestrado. Sao Paulo, Brasil: Universidad de Sao Paulo. 40 p.
3. **Amaral JS, Venturieri RL, Moreira RG 2019.** Gonadal steroids and energy availability during ovarian maturation stages of the Amazonian pirarucu *Arapaima gigas* (Teleostei: Osteoglossidae) in the wild. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 230: 106-114. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.01.008
4. **Araújo FG, Nascimento AA, Gomes ID, Sales A, Oliveira BA. 2019.** Gonadal development and reproductive period of the characin *Astyanax* aff.

- bimaculatus* (Characiformes: Characidae) in a tropical reservoir in southeastern Brazil. *Zoologia (Curitiba)* 36: e30610. doi: 10.3897/zoologia.36.e30610
5. [AVMA] **American Veterinary Medical Association. 2013.** AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013. Illinois: AVMA. 32 p.
 6. **Blancas GA, Barriga I, Morato T, Romero C, Arredondo JL. 2008.** Desarrollo ovárico y su relación con las concentraciones séricas de 17 α -estradiol y 17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona en hembras de primera maduración de pez blanco, *Chirostoma humboldtianum* (Atherini-formes: Atherinopsidae). *Vet México* 39(Suppl 1): 67-80.
 7. **Carvajal-Vallejos FM, Montellano SV, Lizarro D, Villafán S, Zeballos AJ, Van Damme PA. 2017.** Introducción: el paiche en la Cuenca Amazónica boliviana. En: Bases técnicas para el manejo y aprovechamiento del paiche (*Arapaima gigas*) en la cuenca amazónica boliviana. Bolivia: INIAF. p 3-6.
 8. **Chellappa S, Câmara MR, Verani JR. 2005.** Ovarian development in the Amazonian red discus, *Symphysodon discus* Heckel (Osteichthyes: Cichlidae). *Braz J Biol* 65: 609-616. doi: 10.1590/s1519-69842005000400007
 9. **Chu-Koo F, Dugué R, Alván Aguilar M, Casanova Daza A, Alcántara Bocanegra F, Chávez Veintemilla C, Duponchelle F, et al. 2009.** Gender determination in the paiche or pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiol Biochem* 35:125-36. doi: 10.1007/s10695-008-9211-8
 10. **Da Silva AM, Duncan WL. 2016.** Aspectos biológicos, ecología e fisiologia do pirarucu (*Arapaima gigas*): uma revisão da literatura. *Scientia Amazonia* 5: 31-46.
 11. **Domínguez Castanedo O, Uribe MC. 2019.** Ovarian structure, folliculogenesis and oogenesis of the annual killifish *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cynolebiidae). *J Morphol* 280: 316-328. doi: 10.1002/jmor.20945
 12. **Durham BW, Wilde GR. 2008.** Asynchronous and synchronous spawning by smalleye shiner *Notropis buccula* from the Brazos River, Texas. *Ecol Freshw Fish* 17: 528-541. doi: 10.1111/j.1600-0633.2008.00303.x
 13. **Forsgren KL, Young G. 2012.** Stage-specific effects of androgens and estradiol-17 β on the development of late primary and early secondary ovarian follicles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *in vitro*. *Biol Reprod* 87: 1-14. doi: 10.1095/biolreprod.111.098772
 14. **García-Dávila CR, Sánchez H, Flores M, Mejía J, Angulo C, Castro-Ruiz D, Estivals G, et al. 2018.** Peces de consumo de la Amazonía peruana. Iquitos, Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 218 p.
 15. **Godinho HP, Santos, JE, Formagio PS, Guimarães Cruz RJ. 2005.** Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zool-Stockholm* 86: 289-294. doi: 10.1111/j.1463-6395.2005.00213.x
 16. **Hiramatsu N, Todo T, Sullivan CV, Schilling J, Reading BJ, Matsubara T, et al. 2015.** Ovarian yolk formation in fishes: molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. *Gen Comp Endocrinol* 221: 9-15. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.01.025
 17. **Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG. 2009.** Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiol Biochem* 35: 109-123.
 18. **Hunter JR, Macewicz BJ. 1985.** Rates of atresia in the ovary of captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish Bull* 83: 119-136.
 19. **Jan M, Ahmed I. 2019.** Reproductive biology and histological studies of ovarian development of *Schizothorax plagiotomus* in river Lidder from Kashmir Himalaya. *J Appl Ichthyol* 35: 512-519. doi: 10.1111/jai.13858

20. **Kirsten IF, Puerta LR., de Fatima Mateus LA, Catella, AC, Lima IS. 2018.** A pesca do pirarucu (*Arapaima* sp) na bacia do Rio Araguaia em Mato Grosso-Brasil. Bol Instituto Pesca 38: 131-144.
21. **Kwok HF, So WK, Wang Y, Ge W. 2005.** Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors - evidence for their distinct functions in follicle development. Biol Reprod 72: 1370-1381. doi: 10.1095/biolreprod.-104.038190
22. **Le MF, Benneteau-Pelissero C, Le MR. 2018.** An updated version of histological and ultrastructural studies of oogenesis in the Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. In: The Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 1-Biology. Springer. p 279-305.
23. **Lopes K, Rocha R, Ferreira AM, Helder QL. 2013.** Notas sobre a biologia reprodutiva do Pirarucu (*Arapaima gigas*) Schinz 1822. En: Figuerido ESA (ed). Biologia, conservação e manejo participativo de pirarucus na Pan-Amazônia. 43-57 p.
24. **Monteiro LB, Soares MD, Catanho MT, Honczaryk A. 2010.** Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro. Acta Amazônica 40: 435-449.
25. **Moslemi-Aqdam M, Imanpour NJ, Sattari M, Abdolmalaki S, Bani A, Rochowski BE. 2016.** Reproductive characteristics of Northern Pike, *Esox Lucius* (Actinopterygii: Esociformes: Esocidae), in the Anzali Wetland, Southwest Caspian Sea. Acta Ichthyol Piscat 46: 313-323. doi: 10.3750/AIP2016.46.4.05
26. **Parenti LR, Grier HJ, Uribe M. 2015.** Reproductive biology of *Chlorophthalmus agassizi* Bonaparte, 1840 (Teleostei: Aulopiformes: Chlorophthalmidae) as revealed through histology of archival museum specimens. Copeia 103: 821-837. doi: 10.1643/CG-15-256
27. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2018.** PRODUCE: Proyecto de modernización del DPA «La Punchana» en Iquitos se iniciará el próximo año. [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/produce/noticias/18216-produce-proyecto-de-modernizacion-del-dpa-la-punchana-en-iquitos-se-iniciara-el-proximo-ano>
28. **Rocha M, Rocha E. 2006.** Morpho-functional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes - an overview. In: Fish Endocrinology Enfield. UK: Science Publishers. 571-625 p.
29. **Rideout RM, Tomkiewicz J. 2011.** Skipped spawning in fishes: more common than you might think. Mar Coast Fish 3: 176-189. doi: 10.1080/19425120-2011.556943
30. **Sánchez J. 2013.** Escala de madurez gonadal del jurel *Trachurus murphyi* Nichols 1920. Rev Peru Biol 20: 35-44. doi: 10.15381/rpb.v20i1.2617
31. **Solé M, Mañanós E, Blázquez M. 2016.** Vitellogenin, sex steroid levels and gonadal biomarkers in wild *Solea solea* and *Solea senegalensis* from NW Mediterranean fishing grounds. Mar Environ Res 117: 63-74. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.03.010
32. **Spadella MA, de Castilho-Almeida RB, Quagio-Grassiotto I, Cesario MD. 2005.** Follicular diameter range based on morphological features in *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei, Synbranchiformes, Synbranchidae) from the South-central region of Brazil. Tissue Cell 37: 91-100. doi: 10.1016/j.tice.2004.10.006
33. **Treasurer J. 2017.** Ovary development and annual egg production of hake, *M. merluccius*: a promising aquaculture species. Aquac Int 25: 1747-1759. doi: 10.1007/s10499-017-0146-x

34. **Valdebenito I, Paiva L, Berland M. 2011.** Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. Arch Med Vet 43: 11-25. doi: 10.4067/S0301-732X2011-000100003
35. **Varela ML, Ferreira MF, Da Cuña RH, Lo Nostro FL, Genovese G, Meijide F, 2017.** Dynamics of ovarian maturation throughout the reproductive cycle of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Can J Zool 95: 485-498. doi: 10.1139/cjz-2016-0198
36. **West, G 1990.** Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aust J Mar Fresh Res 41: 199-222. doi: 10.1071/MF9900199