

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS PECUARIAS



**EFFECTO DE DOS TIPOS DE ALIMENTACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN
DE ARN DE PAICHES JUVENILES (*Arapalma gigas* C.) CRIADOS EN
JAULAS, EN TINGO MARÍA**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

LOZANO SULCA YIMI TOM

PROMOCIÓN 2007 - I

Tingo María - Perú

2009

L02

L91

Lozano Sulca, Yimi T.

Efecto de dos tipos de Alimentación en la Concentración de ARN de Paiches Juveniles (*Arapaima gigas* C.) Criados en Jaulas, en Tingo María. Tingo María, 2009

41 h.; 7 cuadros; 3 fgrs.; 30 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Zootecnista) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Zootecnia.

ARAPAIMA GIGAS C. / ALIMENTACIÓN / CIANZA-CAUTIVERIO /

CONCENTRACIÓN - ARN / METODOLOGÍA / TINGO MARÍA /

RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
Av. Universitaria Km. 2 Teléfono: (062) 561280
TINGO MARÍA

"Año de la Unión Nacional Frente a la Crisis Externa"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 14 de febrero del 2009, a horas 5:00 p.m. para calificar la tesis titulada:

EFFECTO DE DOS TIPOS DE ALIMENTACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE ARN DE PAICHES JUVENILES (*Arapaima gigas* C.) CRIADOS EN JAULAS, EN TINGO MARIA.

Presentada por el bachiller **Yimi Tom LOZANO SULCA**; después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobada con el calificativo de **"MUY BUENO"**

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el **TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título, de conformidad con lo establecido en el Artículo 95, inciso "i" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 14 de febrero del 2009

.....
Dr. WILSON CASTILLO SOTO
Presidente

.....
M.Sc. CESAR LOPEZ LOPEZ
Miembro

(Ausente)

.....
Ing. JORGE JUAREZ MORENO
Miembro



.....
M.Sc. JUAN LAO GONZALES
Miembro - Asesor

DEDICATORIA

Esta página se la dedico a Dios, ya que sin Él nada podemos hacer. Dios es quien nos concede el privilegio de la vida y nos ofrece lo necesario para lograr nuestras metas.
GRACIAS DIOS.

También le dedico esta página a mi madre, porque ella siempre estuvo aquí en las buenas y en las malas; me educa, me aconseja, me imparte valores para conducirme correctamente y me ofrece el sabio consejo en el momento oportuno.

Además dedico esta página a mis hermanos, a mis tíos y primos. Y a todas aquellas personas que me apoyan, que siempre están conmigo en las buenas y en las malas; también para todo aquel que se pueda beneficiar de este trabajo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS creador del universo, que me dió y me seguirá dando fortaleza para seguir adelante todos los días. Agradezco a mi familia que siempre está presente con mis ideas, su apoyo fue de suma importancia especialmente mi madre Sra. Gregoria Sulca Bonifacio, y mi padre Sr. Presiliano Lozano Echevarría, mis hermanos Edinson, Mirtha, Rosmeri, mi tío Sr. Manuel Lozano Echevarría, mis primos Juan, Koki, Cesar, Jhon, Charo y a mi compañero de estudios Durand Chavez Gerson.

A la Facultad de Zootecnia de la Universidad nacional agraria de la selva, a su plantel Docente y Administrativo, por su contribución a mi formación profesional y humana.

A mis asesores: Ing. Juan Iao Gonzales y Dr. Manuel Sandoval chacón., por haberme guiado con sus conocimientos y paciencia para la realización del presente trabajo de investigación.

A la estación piscícola villa hidalgo, representada por el Sr Walter Hidalgo por las instalaciones brindadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Taxonomía del paiche (<i>Arapaima gigas</i>).....	3
2.2. Alimentación en el paiche.....	4
2.3. Nutrición y genes.....	5
2.4. ARN indicador biológico.....	6
2.5. Variación del ARN.....	7
2.6. La molécula del ARN.....	9
2.7. Extracción de ARN.....	10
2.8. Contaminantes y degradativos del ARN.....	11
2.9. Precauciones en la extracción del ARN.....	12
2.10. Métodos de extracción.....	13
2.11. Electroforesis en geles de agarosa.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Lugar y fecha de la investigación.....	16
3.2. Animales.....	16
3.3. Alimentación.....	17
3.4. Instalaciones y equipos.....	18
3.5. Colecta de muestra de tejido de paiche.....	18

3.6 . Extracción de material genómico.....	19
3.6.1 Buffer de extracción de ARN total.....	19
3.6.2. Homogenización.....	20
3.6.3. Proceso de Extracción del ARN.....	20
3.7. Cuantificación del ARN.....	22
3.8. Electroforesis en gel agarosa.....	22
3.8.1. Preparación del gel.....	22
3.8.2. Condiciones de separación.....	24
3.9. Variable Independiente.....	24
3.10. Tratamientos en estudio.....	24
3.11. Análisis estadístico.....	25
3.12. Variables dependientes.....	26
IV. RESULTADOS	27
4.1. Cuantificación de ARN en muestras de tejido de paiche.....	27
4.2. Integridad y pureza del ARN.....	29
V. DISCUSIÓN.....	30
VI. CONCLUSIONES.....	32
VII. RECOMENDACIONES.....	33
VIII. ABSTRAC.....	34
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
X. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición nutricional del alimento pez forraje y dieta balanceada ofrecido a los juveniles de paiche.....	18
2. Valores promedios de la Concentración de ARN ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en tejido de paiche de acuerdo al tipo de dieta suministrada.....	28
3. Ganancia en tamaño de los paiches alimentados con dieta balanceada y pez forraje a los 30 y 45 días.....	42
4. Ganancia en peso de los paiches alimentados con dieta balanceada y pez forraje a los 30 y 45 días.....	42
5. Lectura de las absorvancias en diferentes tejidos de paiche juveniles sujetos a dos sistemas de alimentación	43
6. Pureza obtenida mediante la relación 260 /280 en diferentes tejidos de paiche juveniles sujetos a 2 sistemas de alimentación.....	44
7. Concentración de ARN total en $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtenida en diferentes tejidos de paiche juveniles sujetos a 2 sistemas de alimentación.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Valores medios de la concentración de ARN ($\mu\text{g/ml}$) obtenido de muestras de tejido de paiche	29
2. Análisis de la integridad del ARN total extraído a partir de hígado, intestino, brânquias y músculo (1, 2, 3 y 4) en juveniles de paiches.....	46
3. Muestra de una típica imagen de electroforesis en gel de agarosa no desnaturizante de ARN en muestras de hígado e intestino (1 y 2 respectivamente).....	46

I. INTRODUCCIÓN.

La población mundial está creciendo a un ritmo acelerado, esto conlleva la necesidad de buscar nuevas fuentes de producción de alimentos, debido a ello diversas instituciones y organizaciones han impulsado en los últimos 20 años el desarrollo intensivo de la acuicultura en aguas marinas y continentales (WOYNAROVICH, 1998). Asimismo, en el Perú existe una demanda insatisfecha de recursos hidrobiológicos, por esta razón, la piscicultura amazónica es una de las grandes posibilidades en la Región Huánuco debido a la abundancia de espejos, cursos de agua, y la existencia de las especies nativas promisorias (VOTO, 1998).

El paiche (*Arapaima gigas*) es un recurso pesquero de gran importancia científica, por ello resulta ser la especie más estudiada de la cuenca amazónica. El paiche posee fortalezas que la convierten en una especie promisoriosa para la piscicultura (SÁNCHEZ, 1961). En ese contexto, la alimentación del paiche con raciones mal balanceadas no atienden las exigencias nutricionales de la especie, resultando una deficiencia en la respuesta inmunológica del pez, aumentando la probabilidad de incidencia de enfermedades y parásitos, ocasionando alteraciones fisiológicas. Estos cambios bioquímicos que acontecen en un organismo, proveen una

información importante para estimar las alteraciones fisiológicas que pudieran existir en un animal, las mismas que pueden ser evaluadas mediante moléculas involucradas en el crecimiento como el Acido Ribonucleico (ARN) que puede ser referente para realizar investigaciones en el estado metabólico de los animales mediante índices fisiológicos (MARTI *et al.*, 2005). El conocimiento de la interacción entre los nutrientes y la expresión de genes particulares, permitirá profundizar en el efecto de los nutrientes en la expresión génica de enzimas, receptores, transportadores y hormonas (CAGIGAS *et al.*, 2002). El régimen alimenticio influye en la respuesta fisiológica de los animales domésticos en este contexto se genera la siguiente investigación bajo la inquietud de evaluar el efecto del alimento en la concentración de ARN, en diferentes tejidos del paiche. Los paiches alimentados con dieta balanceada al recibir los nutrientes de la dieta formulada en base a los requerimientos de un pez carnívoro permiten expresar mayor concentración de ARN en los diferentes tejidos orgánicos en relación a los alimentados con pez forraje para demostrar ello nos trazamos como objetivo:

- Determinar la concentración de Acido Ribonucleico (ARN) en muestras de hígado, músculo, intestino y branquias de paiches juveniles, sometidos a dos regímenes alimenticios.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Taxonomía del paiche (*Arapaima gigas* C.)

Según FINK y FINK (1978) el paiche tiene la siguiente ubicación taxonómica: Clase: *Osteichthyes*, Orden: *Ossteoglossiformes*, Familia: *Arapaimida*, Género: *Arapaima* y Especie: *Arapaima Gigas*.

SCHULTZ (1953) indica que el *Arapaima gigas* se le conoce con tres nombres en la amazonia continental, "paiche" en la amazonía peruana, del vocablo indígena "payshi", "pirarucú" en la amazonía brasilera, proveniente del tupi (pira: pez y urucum: rojo). También se conoce como "Arapaima" en Guyana, del nombre guyano original Warapaima (ROMERO, 1960).

CARVALHO (1992) reportó que en la región amazónica, el paiche es probablemente la especie que presenta las mejores perspectivas para la crianza en régimen intensivo. Tiene grandes velocidades de crecimiento, pudiendo alcanzar 10 kg en el primer año de crianza, rusticidad al manipuleo, respiración aérea y facilidad de ser entrenado para aceptar ración extrusada y soporta altas densidades de crianza (CRESCÊNCIO, 2002). La respiración aérea del paiche es una característica fisiológica que facilita su crianza en

tanques, principalmente por la baja demanda de oxígeno en el agua, y que no es común en peces con respiración branquial.

2.2. Alimentación en el paiche

A pesar del gran potencial que tiene el paiche para su explotación comercial, hasta ahora no se tiene mucho conocimiento de los hábitos alimenticios y de sus requerimientos nutricionales. Se conoce que el paiche en ambientes naturales se alimenta de otros peces pequeños como el bujurqui, boquichico, guppi, mojarra, y otros (BARD e IMBIRIBA, 1986) y por ello se le conoce como un predador carnívoro por excelencia, se alimenta de peces a partir del estadio juvenil, al estado alevín se alimenta del plancton existente en el cuerpo del agua (DEL AGUILA, 2002)

REBAZA *et al.*, (1999) recomienda la posibilidad de criar el paiche extensivamente utilizando pez forraje, como se hizo con relativo éxito en la amazonia peruana. Sin embargo, el paiche en condiciones de cautiverio acepta alimentos alternativos, tales como embriones de pollo.

ALDEA *et al.*, (2002) reportó que, los paiches pueden ser criados con alimento comercial balanceado. La aceptación de raciones peletizadas, confirma el excelente potencial que tiene esta especie para su producción intensiva (HONCZARYK y MAEDA, 1998)

Asimismo, se ha reportado que el paiche tiene que ser entrenado desde temprana edad a comer raciones balanceadas, pues en caso contrario el aprovechamiento de la dieta no es eficiente. Se requiere investigar el rol de los ingredientes vegetales en la dieta y la posible suplementación de enzimas, para facilitar el aprovechamiento de estos. Las dietas balanceadas para paiche están formuladas con base a insumos tradicionales tales como la harina de pescado, torta de soya, maíz, polvillo de arroz y afrecho de trigo (SANDOVAL, 2007).

2.3. Nutrición y Genes

La nutrición molecular (Interacciones genes-nutrientes), esta referida una parte, al estudio de la influencia de los nutrientes sobre la expresión de genes (nutrigenómica) y de otra a conocer la influencia de las variaciones genéticas en la respuesta del organismo a los nutrientes (nutrigenética). Los componentes de la dieta directa o indirectamente regulan la expresión de la información genética (MARTI *et al.*, 2005).

Los cambios bioquímicos que acontecen en un organismo ya sea por limitación de alimento interacción de los factores ambientales o contaminación antropogénica, proveen una información importante para estimar las alteraciones fisiológicas que pudieran existir en un animal, estas pueden ser evaluadas mediante moléculas involucradas en el crecimiento como los ácidos nucleicos (ARN y ADN) esto puede ser referente para realizar

investigaciones en el estado metabólico de los animales mediante índices fisiológicos (MARTI *et al.*, 2005).

2.4. ARN indicador biológico

El ácido ribonucleico puede ser utilizado como referente bioquímico del estado fisiológico de los animales, utilizando la relación ARN/ADN que se considera como un índice fisiológico adecuado que refleja la respuesta del estado metabólico que presenta un organismo como producto de perturbación ambiental por contaminación de metales pesados. Como lo reportó Yang y Thompson (1996), citado por ACOSTA *et al.*, (2004) en estudio relacionados con el efecto del cobre en juveniles de bivalvos utilizó esta relación, observando un aumento de la síntesis de proteínas (ARN) la cual existió como respuesta al incremento del metal, como producto del metabolismo para la captación del metal o una posible estrategia de respuesta relativa a la exposición del cobre.

GIL *et al.* (2003) en trabajos realizados en relación al ARN/ADN como índice de condición fisiológica del híbrido de la Cachama (*Colossoma Macropomum*) y el morocoto (*Piaractus brachypomus*) durante el desarrollo embrionario, reportó valores de ARN superiores para el híbrido en relación con los valores obtenidos para la Cachama, lo cual confirma que existe una mayor síntesis de proteínas esto quizás se deba a que éstos son más eficientes para canalizar y utilizar mejor la energía suministrada por el vitelo. Estas diferencias

pueden ser el resultado de la condición conocida como vigor híbrido o heterosis, Esta superioridad puede expresarse en algunos caracteres cuantitativos, tales como crecimiento, fertilidad y supervivencia (PÉREZ, 1996).

Al presentarse un crecimiento más rápido para el híbrido que para la Cachama se infiere que es indicativo de una actividad metabólica mayor. Por consiguiente, debido a que las necesidades fisiológicas involucradas en el crecimiento durante los primeros estadios de desarrollo requieren de una mayor velocidad de biosíntesis de ARN, se explicarían los mayores niveles obtenidos en este organismo (GIL *et al.*, 2003).

Asimismo en este trabajo se reportó que las larvas al estar reabsorbiendo el saco vitelino, hubo una pequeña disminución de la concentración de ARN, esto por el agotamiento progresivo del alimento endógeno proporcionado por el saco vitelino, al parecer, las larvas pasan de un estado de alimentación endógena hacia un alimento exógeno a partir de las 72 horas después de la eclosión (GIL *et al.*, 2003), es quizás por esto que el contenido de ARN disminuyó para esta fase.

2.5. Variación del ARN

La variabilidad del nivel de ARN/ADN puede estar relacionada con la producción de energía que los organismos destinan para su desarrollo. En este sentido, los juveniles canalizan la mayor parte de la energía producida

para el proceso de crecimiento somático, dando origen a mayor síntesis de proteínas como consecuencia de un aumento del ARN (GIL *et al.*, 2003).

Asimismo las concentraciones de ARN varían ampliamente y dependen de la tasa metabólica del tejido y de la condición fisiológica del organismo, el tipo de tejido también está involucrado, ya que se presenta una mayor concentración en tejidos como el hígado e intestino estando en relación al mayor recambio proteico, y a la naturaleza fisiológica de mayor dinamismo metabólico y a la densidad del número de células por gramo de tejido (DUKES y SWENSON, 1981) pudiéndose obtener resultados variables como lo encontrado por ELESURU (2007), quien encontró concentraciones de 1205, 2076, 522 y 235 $\mu\text{g/ml}$ de ARN en hígado e intestino, branquias y músculo de juveniles de paiche respectivamente, asimismo lo obtenido por MAMANI *et al.*, (1999) encontrando valores de 130, 230, 300, 210, 150 y 520 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de tejido húmedo en hígado, riñones, bazo, corazón, testículos y pulmones de cobayos machos adultos respectivamente, dichas cantidades obtenidas son suficientes para estudios moleculares de cuantificación y amplificación del ARN mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Mientras que los niveles de ADN en general son bastante constantes y puede ser usado como índice de número de células, en cada tejido en particular, (Mathers *et al.*, 1994 citado por BALZA *et al.*, 2006), el contenido de ADN, es un factor biológico estable, indicador de actividad mitótica, es decir, crecimiento por proliferación celular, mientras que el nivel de

ARN/ADN, nos indica la actividad metabólica asociada a la síntesis de proteínas, donde esto se refleja en un crecimiento por aumento de volumen (Bulow *et al.*, 1987, citado por BALZA *et al.*, 2006).

2.6. La molécula del ARN

Los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) son polímeros de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa en el ADN y ribosa en el ARN), una base nitrogenada (que puede ser adenina, timina, citosina, guanina o uracilo) y una molécula de fosfato. El ADN es la macromolécula que contiene la información genética de las células procariontes, eucariontes y de los adenovirus. El ARN está involucrado en la síntesis de proteínas y constituye el material genético de los retrovirus (MADIGAN *et al.*, 2000).

La expresión de los genes es la base del metabolismo celular, y por ésta se entiende que el ADN se transcribe en ARN, que a su vez se traduce en proteínas. Esta secuencia ADN-ARN proteínas constituye el dogma central de la biología molecular (CORVALÁN, 2002).

Hay tres tipos de ARN: ARN mensajero (ARNm), que se sintetiza durante la transcripción por la ARN polimerasa, está conformado por codones, que son secuencias de tres pares de bases que codifican un aminoácido en específico. El ARN de transferencia (ARNt) permite el vínculo entre el ARNt y

los aminoácidos, ya que en un extremo cuenta con un aminoácido y en el otro, con una secuencia de tres pares de bases llamada anticodón, a la que se une el codón del ARNm. El ARN ribosomal (ARNr), que constituye la mayor parte del ARN en las células, forma junto con proteínas a los ribosomas, que facilitan el acoplamiento específico entre el ARNm y los ARNt para la traducción, los ribosomas están compuestos por dos subunidades (28S y 18S) con ARNr de diferente tamaño (CORVALÁN, 2002).

2.7. Extracción de ARN

La extracción de ARN se hace generalmente de tejidos, mucosas, pero también de los glóbulos blancos de sangre periférica. Un concepto importante es que el disponer de una muestra de ADN no permite analizar su ARN para ello debe hacerse una nueva extracción y procesar la muestra de manera diferente, También la conservación del ARN debe ser más cuidadosa puesto que se degrada muy fácilmente. Esto hace que el análisis del ARN no se realice de forma rutinaria (TIZZANO, 2006). A diferencia del ADN, el ARN es muy inestable una vez obtenido el tejido, por la presencia de las ARNasas celulares. (HERNÁNDEZ *et al.*, 1994) por ello una vez colectado el material es necesario agregarle una solución que estabilice al ARN lo antes posible, ya que los cambios en el patrón de expresión de los genes debido a la degradación del ARN o a inducciones en la transcripción ocurren inmediatamente (TIZZANO, 2006).

2.8. Contaminantes y degradativos del ARN

Las ribonucleasas son enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica, son marcadamente resistentes al calor, manteniendo incluso una considerable actividad tras un ligero calentamiento, son activas dentro de un amplio rango de pH, usualmente no requieren cofactores para su actividad, algunas, como las ARNasas pancreáticas, se renaturalizan fácilmente después de un tratamiento con agentes desnaturalizantes, por ejemplo la urea (HERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

Debido a su estructura química el ARN es una molécula muy frágil que puede romperse por acción de los grupos 2'-OH (altamente reactivos) adyacentes al esqueleto de ribosa-fosfato. Dado que las ARNasas no van a ser inactivadas en su totalidad en el autoclave, resulta esencial trabajar con material estéril y de preferencia de un solo uso (TIZZANO, 2006). El contenido de ARNasas endógenas varía con el tejido que se estudia: páncreas y bazo son tejidos con altos contenidos de ARNasas, mientras que riñón, hígado e intestino tienen niveles menores, aunque no despreciables (CORVALÁN, 2002).

Un problema adicional es que el contenido de ARNm en cualquier tejido es bajo: una célula típica de mamífero contiene aproximadamente 10-5 ug de ARN total, del que tan sólo 1-5% corresponde a ARNm. Por esta razón, una pequeña contaminación de ARNasas, tanto endógena como exógena,

puede suponer un problema serio, por lo cual se deben tomar algunas precauciones (HERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

2.9. Precauciones en la extracción de ARN

Es necesario limpiar las áreas de trabajo con solventes como el ácido clorhídrico (10 %), sosa (NaOH, 0.5 N) y/o etanol (70 %). Una fuente potencialmente grande de contaminación con ARNasas son las manos del investigador por las células epidérmicas que se liberan continuamente. Es por ello obligado el uso de guantes tanto al realizar la extracción como al preparar las soluciones, de fundamental importancia para una extracción de ARN intacto con éxito es la ejecución de todas las fases tan rápidamente como sea posible, ya que esto elimina riesgos de contaminación, además de trabajar con soluciones libres de ARNasas contaminantes, y esto se consigue tratándolas previamente con DEPC (Dietil pirocarbonato) que reacciona covalentemente y de modo inespecífico con las proteínas, pero es muy reactivo con los sitios activos de las ARNasas, inactivándolas eficaz, aunque no absolutamente. (EGUIARTE, 2007). El DEPC sobrante puede reaccionar con el ARN y es preciso eliminarlo autoclavando las soluciones antes de utilizarlas, así, el DEPC se descompone en etanol y CO₂ que son volátiles (HERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

Una vía para eliminar la degradación de ARN durante la extracción es desnaturalizar todas las proteínas celulares, incluyendo las ARNasas. Se utilizan potentes agentes caotrópicos, como las sales de Guanidinio desde hace

tiempo se sabe que las proteínas se desnaturalizan y por tanto, pierden su actividad a concentraciones 4 molar (M) de cloruro de guanidio, en contraste con la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, que casi no se ve afectada. La eficacia del tiocianato de guanidio (GTC) es aún mayor y su uso es prácticamente universal en todos los métodos de extracción de ARN (Chomczynski y Sacchi, 1987, citado por HERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

Según Chirgwin (1979), citado por HERNÁNDEZ *et al.*, (1994). Un ejemplo, para medir su efectividad es que la vida media de la ARNasa A pancreática es de 3 minutos en 8 moles (M) de urea y de sólo unos 5 segundos en tiocianato de Guanidio 4M. La solución en que el tejido debe ser homogeneizado debe tener 4M GTC, además de detergentes (como el Sodio Dodecyl Sulfate o el sarcosil) que ayudan a romper membranas celulares y desnaturalizar proteínas, y agentes reductores (como el 2 mercapto etanol) que contribuyen también a la desnaturalización proteica mediante la rotura de puentes disulfuro (típicos de las ARNasas). Es importante que luego de la extracción el ARN, este deba ser almacenado hasta su utilización esto se realiza fácilmente almacenándolo en el congelador a menos 70°C donde puede permanecer con una baja tasa de degradación (ELÉSPURU, 2007).

2.10. Métodos de extracción

Ausubel (1987), citado por HERNÁNDEZ *et al.*, (1994) concluyen que la obtención de altas cantidades de ADN y ARN puro es fundamental a la

hora de analizarlo o utilizar a éstos en aplicaciones posteriores. El avance de la ingeniería genética y de las técnicas moleculares ha supuesto un aumento del número y variedad de técnicas de extracción y purificación en ácidos nucleicos.

Tras el homogeneizado del tejido y la desproteinización del ARN con agentes desnaturizantes se debe aislar físicamente el ARN del resto de componentes celulares. Existen dos procedimientos fundamentales para realizar esta separación:

1. Ultracentrifugación en gradiente de densidad: basada en la mayor densidad del ARN respecto al resto de los componentes celulares.
2. Extracción fenólica: basada en la propiedad de los ácidos nucleicos de ser más solubles en soluciones acuosas que en solventes orgánicos.

El principio básico de la extracción fenólica es la desproteinización del homogeneizado celular (solución acuosa que contiene los ácidos nucleicos) y la eliminación de los componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad (HERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

2.11. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método que permite visualizar ARN o fragmentos del mismo, en la cual se separan en función de su

tamaño, y consiste en someter la mezcla de moléculas de ARN embebidas en un gel de agarosa a un campo eléctrico (IPGRI y CORNELL UNIVERSITY, 2003), por ello se le define también como la migración de moléculas cargadas en solución en respuesta de un campo eléctrico, además mientras que las proteínas pueden tener carga neta positiva (cátodo) o negativa (ánodo), Las moléculas de ARN son atraídas al polo positivo debido a la carga neta negativa de su cadena, consecuencia de sus grupos fosfato. (SAMBROOK y RUSSELL, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Lugar y fecha de la investigación

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonia (CIDBAM) de la UNAS; ubicada en la ciudad de Tingo María capital del distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco. Geográficamente se ubica a 660 msnm, 09°17'58" latitud sur y 76°01'07" longitud oeste, con una temperatura promedio de 24.8 °C y humedad relativa de 80%, cuya zona de vida es bosque húmedo pre-montano subtropical.

El trabajo experimental tuvo una duración de 4 meses y se realizó en los meses de febrero y mayo del 2008.

3.2. Animales

En el estudio se utilizó 80 juveniles de *Arapaima gigas*, con pesos entre 290 a 593 g, provenientes de la Estación Piscícola "Villa Hidalgo". Ambos grupos fueron distribuidos en unidades experimentales de 10 juveniles de

paiche y colocadas en jaulas flotantes, de los cuales se tomó al azar un animal por repetición para la toma de muestras de tejidos

3.3. Alimentación

Los alimentos fueron suministrados a una tasa de 5% de la biomasa en donde 40 paiches fueron alimentados con pez forraje y 40 con dieta balanceada. La frecuencia de alimentación fue de dos veces por día (8:00 y 18:00 horas). El alimento en base a pez forraje (PF) consistió en especies de tilapia (*Oreochromis niloticus*), bujurqui (*Cichlassoma amazonarum*), guppy (*Oxyzygonectes divii*) y mojarra (*Amphilophus sp.*) procedentes de quebradas y estanques del perímetro de la Estación Piscícola Villa Hidalgo estos fueron almacenados en tanques para su diaria disponibilidad, se suministró en lo posible peces vivos o en trozos de tamaños adecuados para ser capturados por los paiches. La alimentación en base a pez forraje (PF) y dieta balanceada (DB) se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición nutricional del alimento pez forraje y dieta balanceada ofrecido a los juveniles de paiche.

Nutrientes	PF ¹	DB ²
Proteína bruta (%)	14,87	40,0
Energía digestible (Kcal/kg)	---	3100
Fibra cruda (%)	0,11	---
Extracto etéreo (%)	1,90	---
Ceniza (%)	6,12	---
Calcio (%)	---	1,59
Fósforo (%)	---	1,08
Lisina (%)	---	2,08
Metionina (%)	---	1,05
Materia seca (%)	24,38	---

Nutrientes expresados en base fresca

¹ PF: Pez forraje (Análisis proximal en laboratorio de Nutrición Animal-UNAS)

² DB: Dieta balanceada (Fuente: Planta procesadora de alimento el granjero-UNAS)

3.4. Instalaciones y equipos

Las jaulas fueron de madera con dimensiones: 1,5 m de alto por 0,8 m de ancho y 3 m de largo con tapas y cubiertas con malla anchovetera, los mismos que fueron colocados en un estanque de 3500 m² de tal manera que la profundidad del agua en cada jaula fue de 0,70 m, la densidad de crianza promedio fue de 2,22 paiches/m².

3.5. Colecta de muestras de tejidos de paiche

En el estudio se utilizó ocho juveniles de paiche *Arapaima gigas* escogidos al azar de la población de peces alimentados con pez forraje y dieta

balanceada, los cuales se capturó con mallas, luego fueron trasladados al laboratorio de biotecnología del CIPNA-UNAS para su posterior análisis.

Para la extracción del ARN total se emplearon muestras de hígado, intestino, músculo y branquias de *Arapaima gigas* "paiche". Se colectó aproximadamente 1g de cada tejido, las que fueron remojadas en solución salina (NaCl), para desprender rastros de sangre y mantener la pureza del material colectado, luego se desmenuzó y depositó en tubos de 2mL conteniendo 1mL de GTC buffer que estaban conservados en cubetas que contenían hielo, luego los tubos conteniendo las muestras con GTC fueron guardados en congelador a -70°C .

3.6. Extracción de material genómico

3.6.1. Buffer de Extracción de ARN total

Para la preparación de este buffer primero se preparó la solución desnaturalizadora, luego a esta se le agregó 2-mercaptoethanol para obtener el buffer. La Solución desnaturalizadora consistió en citrato de sodio 25 mM, pH 7,0; guanidinium thiocyanate 4 M, sarcosyl 0,5 %. La solución se esterilizó, filtró (protegió de la luz), esta solución es estable hasta por 3 meses. El GTC buffer se obtuvo al agregar 50 mL de solución desnaturalizadora 0,36 mL de 2-mercaptoethanol. Este buffer es estable hasta 1 mes. Para obtener el acetato de sodio buffer pH 4,0 se concentró el

acetato de sodio a 2 M y se ajustó el pH a 4,0 utilizando ácido acético 2 N y se autoclavó. Asimismo el etanol al 75% (75 mL de 100% ethanol y 25 mL ddH₂O) y el sodium dodecyl sulfate 20% (SDS) se obtuvo disolviéndose 10 g de SDS en 50 mL ddH₂O (agua doblemente destilada). Finalmente el DEPC-H₂O (Diethyl Pirocarbonado): Se disolvió 1 g de DEPC en ddH₂O y autoclavó.

3.6.2. Homogenización

Las muestras colectadas fueron homogenizadas mediante un polytrom homogenizador de tejidos, con la finalidad de romper los tejidos y evitar la degradación del material genómico. Para la homogenización se peso 100 mg del material colectado, se colocó en un microtubo de 2 mL al cual se le agregó 1mL de solución de buffer de extracción. Se trituró homogenizando completamente la muestra en la solución.

3.6.3. Proceso de Extracción del ARN

Se utilizó el método ácido guanidinium thiocyanate – phenol – cloroformo que consiste en poner la muestra de tejido homogenizado en 1 mL de GTC buffer, para luego añadir las siguientes soluciones en el orden en que se indica:

80 μ L de acetato de sodio buffer 2 M; pH 4,0; 800 μ L de phenol H₂O-saturado y 160 μ L de cloroformo. Se mezclaron las muestras durante

15 segundos por inversión y esta mezcla se almacenó en hielo por 15 minutos.

Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos a 4° C. Luego de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase orgánica (inferior), una interfase y una fase acuosa (superior). El ARN se localiza exclusivamente en la fase acuosa. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo limpio (1,5 mL), y se añadió 1000 µL de isopropanol. Seguidamente se mezclaron completamente las muestras durante 15 segundos y se almacenaron a -20°C por un mínimo de 1 hora para precipitar el ARN. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante.

Se resuspendió el pellet de ARN en 300 µL de GTC buffer, se mezcló completamente, mediante agitación (vortex), se le agregó 300 µL de isopropanol y las muestras nuevamente fueron almacenadas a -20°C durante 1 hora. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet de ARN con 1000 µL de etanol frío al 75% y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. Se repitió el paso anterior. Luego se eliminó el etanol de cada muestra invirtiendo los tubos y se dejó secar el pellet de ARN durante 5 minutos. Se resuspendió el ARN en 25 µL de 0,5% SDS a 65° C por 10 minutos. La suspensión de ARN se almacenó a -70° C.

3.7. Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN total animal se procedió utilizando el Método Espectrofotométrico para ello se tomo 10 μL de la muestra de ARN total y 990 μL de agua desionizada y se agregaron a una cubeta de cuarzo.se mezcló y Se escaneó la muestra para evaluar la calidad de la extracción, determinándose la pureza y la concentración del ARN por espectrofotometría midiendo la densidad óptica (OD) a 260 nm y 280 nm. Para luego determinar la relación de OD a 260nm/OD a 280nm. Siendo el rango aceptable de pureza: 1,7 – 2,2 (A_{260}/A_{280}). Se determinó la concentración de ARN multiplicando [$A_{260} \times \text{FD} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$]. Siendo el factor de dilución ($\text{FD}=100$), finalmente La calidad de la extracción del material genómico se verificó por corrida electroforética en gel desnaturalizado de agarosa.

3.8. Electroforesis en gel agarosa

3.8.1. Preparación del gel

La agarosa se adicionó a un matraz erlenmeyer de 500 mL y se disolvió en un microondas hasta fundir la agarosa y observar un aspecto homogéneo (El líquido debe verse totalmente transparente y sin gránulos de agarosa).

A continuación, la solución se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50°C y se añadieron 10 mg/mL de bromuro de etidio al gel de agarosa al 1%, para luego homogenizar la solución. Finalmente, el gel se vertió en la cubeta de electroforesis evitando la formación de burbujas y se introdujo el peine formador de pocillos, se esperó aproximadamente 30 minutos hasta que se enfríe y solidifique (polimerizar).

Una vez polimerizado el gel, el peine se retiró cuidadosamente del gel y se colocó en la cubeta de electroforesis. Los pocillos deben de estar cerca del cátodo, se añadió un volumen de tampón de electroforesis 1X MOPS (MOPS 42 g, Acetato de sodio 4,1 g; 0,5 M EDTA 20 mL y DEPC-H₂O) suficiente para cubrirlo totalmente, quedando así listo para depositar las muestras.

Para la corrida electroforética del gel de verificación se aplicó 5 µg de ARN de cada muestra en microtubos de 500 µL, adicionando 20 µL del buffer de carga (loading buffer), luego se incubó a baño maría a 65 °C por 15 minutos, enfriándolos posteriormente a 4°C por 5 minutos. Se agregó 1 µL de bromuro de etidio (1 mg/mL) a cada microtubo y se centrifugó brevemente. Se utilizaron guantes para la preparación y manipulación del gel porque puede contener intercalantes de bases que son cancerígenos.

3.8.2. Condiciones de separación

Las electroforesis se realizaron manteniendo un voltaje constante (70 V) durante un tiempo de aproximadamente 1 hora. Finalizada la electroforesis, las bandas de ARN se visualizaron en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta. La imagen obtenida se registró mediante una cámara digital, con el propósito de verificar la integridad de las bandas y registrar los resultados.

3.9. Variable Independiente

Tipo de dieta suministrado a los paiches.

3.10. Tratamientos en estudio

Para el presente experimento se tuvo dos tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, tomando como unidad experimental 10 paiches por jaula.

T1 = Dieta Balanceado (DB).

T2 = Pez Forraje (PF)

3.11. Análisis estadístico

Los animales fueron distribuidos al azar en 2 tratamientos con 4 repeticiones por tratamiento, en donde cada unidad experimental estuvo compuesta por 10 ejemplares de paiches juveniles, el modelo aditivo lineal para la distribución de los tratamientos fue:

$$Y_{ij} = u + T_i + e_{ij}, \text{ Donde:}$$

Y_{ij} = j-ésima observación en el i-ésimo tratamiento.

i = 1; 2 tratamientos.

j = 1; 2; 3; 4 repeticiones.

u = Media poblacional

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

e_{ij} = Error experimental.

Para el análisis de los resultados se utilizó una estadística descriptiva básica, prueba de t (comparaciones entre dos grupos experimentales, ejemplo: paiches alimentados con pez forraje vs los alimentados con dieta balanceada) aplicándose el software INSTAT V2.05.

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B - 0}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}}$$

\bar{x}_A = media muestral grupal de las observaciones del factor A.

\bar{x}_B = media muestral grupal de las observaciones del factor B.

S_p^2 = varianza ponderada.

n_A = numero de observaciones del factor A.

n_B = numero de observaciones del factor B.

Los resultados fueron comparados a través de la prueba de T.

3.12. Variables dependientes

Concentración de Acido Ribonucleico en muestras orgánicas de paiche (hígado, intestino, branquias, músculo.)

La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría midiendo la densidad óptica (OD) a 260 nm y 280 nm. Para luego determinar la relación de OD a 260nm/OD a 280 nm. Finalmente se determinó la concentración de ARN multiplicando $[A_{260} \times FD \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{L}]$.

IV. RESULTADOS

4.1. Cuantificación de ARN en muestras de tejido de paiche

Los datos muestran los resultados promedios de concentración de ARN en tejidos de paiches, que fueron sometidos a dos tipos de alimento (DB y PF), para la etapa juvenil; son presentados en el Cuadro 2.

El tipo de alimento no tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$) en la concentración de ARN extraído (Cuadro 2), lo que indica que la concentración de Acido ribonucleico en hígado, intestino, branquias y músculo de paiches juveniles no varía por el sistema de alimentación consistente en dieta a base de pez forraje o ración balanceada, sin embargo se puede apreciar en la Figura 1 diferencias numéricas entre los tratamientos evaluados. Asimismo, una alta concentración de ARN se obtuvo en tejido hepático e intestinal lo que no se observó en la concentración obtenida en tejido muscular y branquial para ambos tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores promedios de la concentración de ARN ($\mu\text{g/mL}$) en tejido de paiche de acuerdo al tipo de dieta suministrada.

Tejido	DB ¹ Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	PF ² Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Valor p
Hígado	934 \pm 158 ^a	1680 \pm 344 ^a	0,0961(NS)
Intestino	957 \pm 120 ^a	1380 \pm 658 ^a	0,5504(NS)
Branquias	234 \pm 75 ^a	519 \pm 134 ^a	0,1139(NS)
Musculo	178 \pm 32 ^a	288 \pm 61 ^a	0,1602(NS)

Valor promedio \pm SEM. Superíndices iguales presentan un efecto No significativo ($P > 0.05$). n=4.

¹DB=Dieta; Balanceada,

²PF=Pez Forraje.

Las variaciones en los promedios de las concentraciones de los diferentes tejidos se pueden evidenciar en la Figura 1.

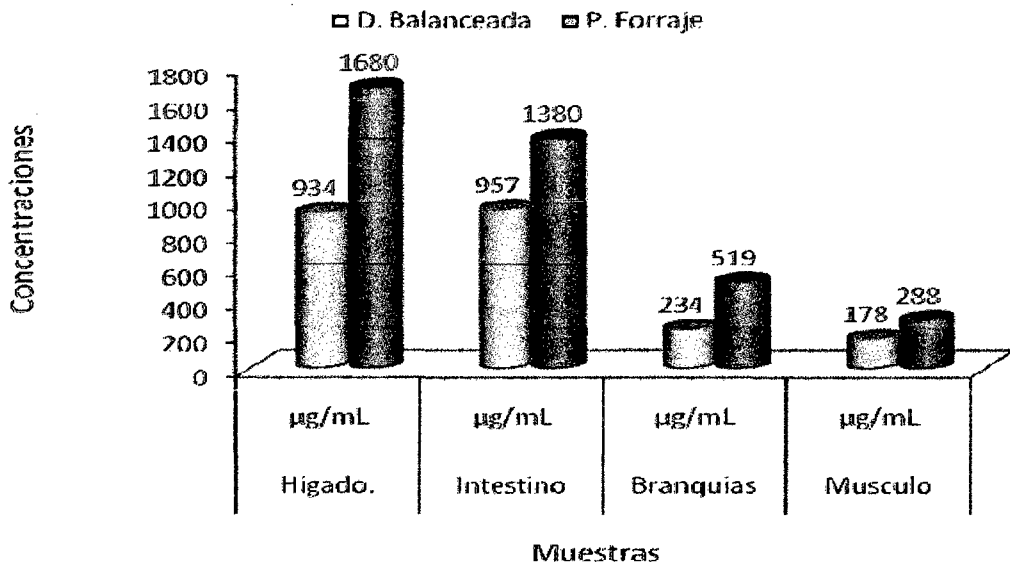


Figura 1. Valores medios de la concentración de ARN ($\mu\text{g/mL}$) obtenidas de muestras de tejido de paiche.

4.2. Integridad y pureza del ARN

Para evaluar las condiciones del ARN total se verificó mediante la pureza que se evidencia mediante las absorvancias obtenidas a 280 y 260 nm (cuadro 5 y 6 del Anexo), y corriendo un gel para observar el estado de purificación y la integridad del ARN observándose las bandas 18S y 28S ribosomales para los tejidos que señalan su integridad sin signos de degradación o fragmentación y con una baja extracción de contaminantes. (Figura 2 y 3 del Anexo),

V. DISCUSIÓN

5.1. Cuantificación de ARN en muestras de tejido de paiche

La cantidad de ARN obtenida de los tejidos se muestra en el Cuadro 2. Es necesario resaltar que la más alta concentración se da en las muestras de hígado e intestino (entre 934 a 1680 $\mu\text{g/ml}$) estando en relación al mayor recambio proteico, y a la naturaleza fisiológica de mayor dinamismo metabólico y a la densidad del número de células por gramo de tejido que presentan en estos tejidos, comparado con las branquias y el músculo 178 a 519 $\mu\text{g/mL}$ (DUKES y SWENSON, 1981); las cantidades obtenidas son consideradas suficientes para estudios moleculares de cuantificación y amplificación del ARN, siendo fácilmente almacenado en el congelador a menos 70°C. (ELÉSPURU, 2007)

De igual manera, se puede observar que existe diferencias numéricas en el contenido de ARN, en función al tipo de alimento brindado, siendo mayor, en todos los tejidos evaluados, en los paiches que recibieron pez forraje, (1680, 1380, 519 y 288 $\mu\text{g/mL}$ para hígado, intestino, branquias y músculo respectivamente) estos resultados no llegan a ser estadísticamente superiores ($P < 0.05$), a los encontrados cuando se suministró dieta balanceada

(934, 957, 234 y 178 µg/mL para hígado, intestino, branquias y músculo respectivamente). Esta variación estaría reflejando la actividad metabólica asociada con la síntesis proteica, en relación a una mayor aceptación del pez forraje como alimento y no así con la dieta balanceada, evidenciándose esto en algunos caracteres cuantitativos, tales como en la ganancia de peso y longitud de los animales (Cuadro 3 y 4 del Anexo), siendo mayor en los paiches alimentados con pez forraje y menor en los alimentados con dieta balanceada esto quizás por la naturaleza física de la dieta y la falta de adaptación de los paiches al consumo de este tipo de ración. (PÉREZ, 1996 y SANDOVAL, 2007)

Al respecto SANDOVAL (2007) afirma que, el paiche tiene que ser entrenado desde temprana edad a comer raciones balanceadas, para un eficiente aprovechamiento de la dieta. Así mismo, la disponibilidad de nutrientes puede afectar la concentración de ARN, como lo indica Contreras (1993), citado por GIL *et al.* (2002), quien al estudiar híbridos de larvas de cachama *Colossoma macropomum* y el morocoto *Piaractus brachypomus* observó que cuando estas reabsorben el saco vitelino y por lo tanto se da un agotamiento progresivo de los nutrientes a partir de las 72 horas, hay una pequeña disminución de la concentración de ARN.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son inferiores a los reportados por ELESURU (2007), quien encontró concentraciones de 2637, 2076, 522 y 235 µg/ml de ARN en hígado e intestino, branquias y músculo respectivamente, de juveniles de de paiche.

VI. CONCLUSIONES

La mayor concentración de ARN se expresa en el hígado e intestino del paiche para ambos regímenes alimenticios, evidenciándose una menor concentración de ARN, en el musculo y branquias.

La concentración de ácido ribonucleico en hígado, intestino, branquias y músculo de paiches juveniles no varía por el sistema de alimentación consistente en dieta a base de pez forraje o ración balanceada.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar con las investigaciones en biología molecular en los cuales se pueda determinar la expresión de genes de importancia en el paiche.

Realizar estudios a nivel molecular que permita demostrar el estado fisiológico y la actividad metabólica en otras especies animales.

VIII. ABSTRACT

TWO TYPES OF FEEDING EFFECT IN THE RNA CONCENTRATION IN YOUTH PAICHE (*Arapaima gigas* C.) REARED IN CAGES, IN TINGO MARIA.

This research work was carried out at the Amazonian Research Center to Biotechnological Development laboratory of the Forest National Agrarian University Tingo Maria city, Huánuco-Peru, with the objective to determine Ribonucleic Acid (RNA) concentration in liver, muscle, intestines and gills samples of young paiches, subjected to two feeding regimes in the High Huallaga valley. From 8 young paiches tissue samples were collected (liver, gills, intestines and muscle), 4 fish were fed with forage fish meal, and the other 4 ones were fed with balanced diet; ARN extraction was carried out by Guanidinium Acid-Tiocionato-Fenol-Cloroformo method ; Larger amounts higher than the average of ARN were liver extracted: 1680 ug/mL and a less amounts were from the muscle: 288 ug/mL from paiches fed with fish forage, ARN volume extracted was something low in paiches fed with balanced diet, getting higher amounts from the intestines: 95 7 ug/mL and less quantity from the muscle :178 ug/mL. Insofar as treatments the results showed that paiches fed with fish forage compared with those fed with balanced diet there were differences in the amount of ARN volume extracted, been higher than the

average in the first ones (1680 ug/mL in liver, 1380 ug/mL in intestines 519 ug/mL in th gills end 288 ug/mL in muscle) and little less in the second ones (934 ug/mL in liver, 957 ug/mL in the intestines, 234 ug/mL in gills and 178 ug/mL in the muscle) however these results were not statistically different ($P < 0.05$). The highest concentration of RNA is expressed in liver and intestine of paiche for both diets showed a lower concentration of RNA in muscle and gills. Also, the concentration of ribonucleic acid in liver, intestine, gills and muscle of juvenile paiche not changed by the power supply system consisting of a basic diet of fish feed or balanced ration.

Keywords: *Arapaima gigas*, RNA concentration, Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, V., LODEIROS, C. 2004. Efecto del cobre en juveniles de bivalvos (*tivela mactroides*) provenientes de ambientes con diferentes niveles de contaminación. Departamento de Biología, Escuela de Ciencias. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente. N° 38. Cumaná Venezuela. 49-50 p.
- ALDEA, M., ALCÁNTARA, F., PADILLA, P. 2002. Cultivo de paiche *Arapaima gigas* con dietas artificiales en jaulas flotantes. Congreso Nacional de Biología. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 10 p.
- BALZA, M., LEMUS, M., MARÍN, B. 2006. Tasa de crecimiento en larvas de *sardinella aurita*. Cumaná, Venezuela. Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente. 333 p.
- BARD, J., IMBIRIBA, E. 1986. Pisciculturas do paiche, *Arapaima gigas*. Belém: Embrapa-CPATU. Circular Técnica, 52. 17p. 15 p.
- CAVERO, B., CRECENCIO, R. 2002. Densidade de estocagem x homogeneidade do lote na criação de juvenis de pirarucu em tanque-rede de pequeno volume no período de pré-engorda. Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura, Goiânia, Brasil. 50 p.
- CARVALHO, L. 1992. Engorda de pirarucu (*Arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -

Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, Belém-PA,
Circular Técnica, 1-21 p.

CAGIGAS, A., FERREIRA, R., TAM, M. 2002. Biología Molecular y Nutrición
Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos revista cubana alimento
nutr; 16(1): 69-76.

CORVALÁN, A. 2002. Biología molecular en Infectología. Parte I: Desarrollo y
metodologías Revista Chilena de Infectologia. 19 (1): 14-24.

DEL AGUILA, J. 2002. Plan de manejo de paiche en las cochas de punga. Ed.
Ceta Iquitos, Perú. 45-49 p.

DUKES, H., SWENSOND, M. 1981. Fisiología de los animales domésticos
función vegetativa. Tomo1. Cornell University. Edición mexicana. 1054 p.

ELÉSPURU, N. 2007. Datos preliminares de los efectos del medio ambiente en
la expresión de genes asociados al estrés, producción y reproducción en
paiches *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), criados en cautiverio. Instituto de
Investigaciones de la Amazonía Peruana, Universidad Nacional de la
Amazonía Peruana. Artículo científico. [En línea]: IIAP,
(<http://www.iiap.org.pe/Articulo>, 2 de oct. 2008).

EGUIARTE, E., SOUZA, V., AGUIRRE, X., 2007. Ecología molecular. Las
herramientas moleculares. Extracción de ácidos nucleicos, quinta parte
Universidad Nacional Autónoma de México.instituto nacional de ecología
501-515 p.

FINK, I., FINK, V. 1978. Amazônia central e seus peixes. Suplemento. Acta
amazônica. 8 (4): 19-42.

- GIL, H., CHUNG, S., LEMUS, D., ALTUVE, D. 2003. Relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica del híbrido de la cachama *Colossoma macropomum* y el morocoto *Piaractus brachypomus* durante el desarrollo embrionario *Rev. Biol. Trop.* 4: 91-96 p.
- HERNANDEZ, A., MARTIN-VASALLO, P., TORRES, A., SALIDO, E. 1994. Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*. Vol. XIV. Num. 2. Universidad de La Laguna 1-8 p.
- HONCZARYCK, A., MAEDA, L. 1998. Crescimento do paiche *Arapaima gigas*, utilizando dietas a base de ensilado biológico de pescado. In: *Anais do Congresso Sul Americano de Aquicultura*. Recife, PE, Brasil. 93 -100 p.
- IPGRI., CORNELL UNIVERSITY. 2003. Tecnologías basadas en el ADN. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas. Módulo de aprendizaje Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). El Instituto para la Diversidad Genómica (IGD) de la Universidad de Cornell. [En línea]: Bioversity, (<http://www.bioversityinternational.org/documents>, documento 28 de Oct. 2008).
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. 2000. *Brock biology of microorganisms*. 4^{ta} edición. Tomo I. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 1054 p.
- MARTI, A., MORENO, M., ZULET, M., MARTÍNEZ, J. 2005. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. Departamento de Fisiología y Nutrición. Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España. *Nutr. Hosp.* 20:157-164.

- MAMANI, A., DE LA CRUZ, C., CARRANZA, A. 1999. Contenido de ADN, ARN y Proteínas en diversos órganos de cobayos oriundos de la altura. Vol. 2. N°2. Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica U.N.M.S.M. [En línea]: SISBIB, (<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas>, revista 30 de Oct. 2008).
- PÉREZ, J. 1996. Mejoramiento genético en acuicultura. Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. 178 p.
- REBAZA, A., ALCÁNTARA, F., VALDIVIESO, M. 1999. Manual de Piscicultura del paiche *Arapaima gigas*, Cuvier. SPT – TCA. IIAP. Edit. Manatí Grafico S.A. Caracas, Venezuela. 247 p.
- ROMERO, J. S. 1960. El paiche, aspectos de su historia natural, ecología y aprovechamiento. Inf. Servicio Pesquerías y Caza. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. 63p.
- SAMBROOK, J; RUSSELL D. 2001 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 60 p.
- SÁNCHEZ, R. 1961. "El paiche" aspectos de su historia natural, ecología y aprovechamiento. Servicio de pesquería. Ministerio de agricultura. 48p.
- SANDOVAL, M. 2007. Aspectos y manejo, reproducción y alimentación del paiche (*Arapaima gigas*), en la amazonía peruana documento técnico N°8. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. IIAP, BIODAMAZ. Documento técnico 8:1-31.
- SCHULTZ, H. 1953. A pesca tradicional do pirarucú entre os índios karajá. Revista do Museu Paulista. (7): 248-255.

- TIZZANO E. 2006. Detección de mutaciones implicadas en enfermedades hematológicas Servicio de Genética. Hospital de Sant Pau. Barcelona edición española 91(Supl 1). 23 p.
- VOTO, B. 1998. Piscicultura Amazónica con especies nativas. Tratado de Cooperación Amazónica, Cultivos y Crianzas. Secretaría Pro Tempore [Enlinea]: Amazonia, (<http://www.siamazonia.org.pe/Publicacione/libros,2> de oct.2008).
- WOYNAROVICH, A. 1998. Reproducción Artificial de las especies *Colossoma* y *Piaractus*: Guía detallada para la producción de alevinos de gamitana, paco y caraña. Fondepes. 66p.

ANEXO

Cuadro 3. Ganancia en tamaño de los paiches alimentados con dieta balanceada y pez forraje a los 30 y 45 días del experimento

Días	DB ¹ Tamaño (cm)	PF ² Tamaño (cm)	Valor p
30 días	1.4 ± 0.71 ^a	5.9 ± 0.51 ^b	0.0020 (MS)
45 días	1.97 ± 0.79 ^a	9.3 ± 0.34 ^b	0.0001 (ES)

Valor promedio ± SEM. Superíndices diferentes presentan un efecto significativo (P < 0.05). n=4.

MS= Muy significativo, ES= Extremadamente significativo.

¹ ganancia de tamaño: centímetros por 30 días.

² ganancia de tamaño: centímetros por 45 días.

Cuadro 4. Ganancia en peso de los paiches alimentados con dieta balanceada y pez forraje a los 30 y 45 días del experimento

Días	DB ¹ Peso (g)	PF ² Peso (g)	Valor p
30 días	73.45 ± 24.2 ^a	106.6 ± 24.1 ^a	0.0015 (MS)
45 días	266.4 ± 25.5 ^b	443.8 ± 35.9 ^b	0.0002 (ES)

Valor promedio ± SEM. Superíndices diferentes presentan un efecto significativo (P < 0,05). n=4.

MS= Muy significativo, ES= Extremadamente significativo.

¹ ganancia de peso: gramos por 30 días.

² ganancia de peso:gramos por 45 días.

Cuadro 5. Lectura de las absorvancias en diferentes tejidos de paiche juveniles sujetos a dos sistemas de alimentación.

Muestra	Dieta.balanceda								Pez forraje							
	Higado		Intestino		Branquias		Musculo		Higado		Intestino		Branquias		Musculo	
Long onda	260	280	260	280	260	280	260	280	260	280	260	280	260	280	260	280
Paiche I	0.239	0.139	0.247	0.130	0.087	0.048	0.031	0.014	0.229	0.129	0.050	0.020	0.213	0.131	0.094	0.063
Paiche II	0.122	0.060	0.181	0.098	0.029	0.014	0.032	0.014	0.419	0.252	0.804	0.478	0.050	0.033	0.072	0.049
Paiche III	0.303	0.176	0.320	0.190	0.095	0.050	0.051	0.020	0.386	0.232	0.345	0.198	0.139	0.090	0.093	0.064
Paiche IV	0.270	0.156	0.209	0.112	0.023	0.014	0.064	0.033	0.646	0.388	0.181	0.105	0.117	0.068	0.029	0.020

Cuadro 6. Pureza obtenida mediante la relación 260 /280 en diferentes tejidos de paiche juveniles sujetos a 2 sistemas de alimentación.

Muestra	Dieta balanceada				Pez forraje			
	Hígado	Intestino	Branquias	Musculo	Hígado	Intestino	Branquias	Musculo
absorvancia	260/280	260/280	260 /280	260/ 280	260/280	260/280	260/280	260/280
paiche I	1,7	1.9	1.8	2.2	1.8	2.5	1.6	1.5
paiche II	2.0	1.8	2.0	2.2	1.7	1.7	1.5	1.5
paiche III	1.7	1.7	1.9	1.9	1.7	1.7	1.5	1.5
paiche IV	1.7	1.9	1.64	1.9	1.7	1.7	1.7	1.5
Promedio total de Pureza	1,759	1,874	1,857	2,198	1,68	1,72	1,61	1,47

Cuadro 7. Concentración de ARN total en $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtenida en diferentes tejidos de paiche juveniles sujetos a 2 sistemas de alimentación.

Muestra	Dieta balanceada				Pez forraje			
	Hig.	Int.	Bran.	Mus.	Hig.	Int.	Bran.	Mus.
Concentración de ARN	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$
paiche I	956	988	348	124	916	200	852	376
paiche II	488	724	116	128	1676	3216	200	288
paiche III	1212	1280	380	204	1544	1380	556	372
paiche IV	1080	836	92	256	2584	724	468	116
concentración total								
promedio	934	957	234	178	1680	1380	519	288

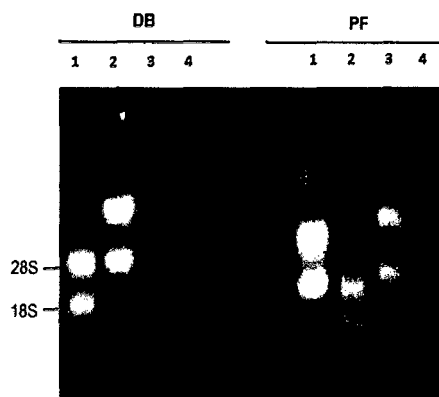


Figura 2. Análisis de la integridad del ARN total extraído a partir de hígado, intestino, brânquias y músculo (1, 2, 3 y 4) en juveniles de paiches.

DB=dieta balanceada, PF= pez forraje, 28S= ARN ribosomal subunidad grande (28),
18S=ARN ribosomal subunidad chica (18)

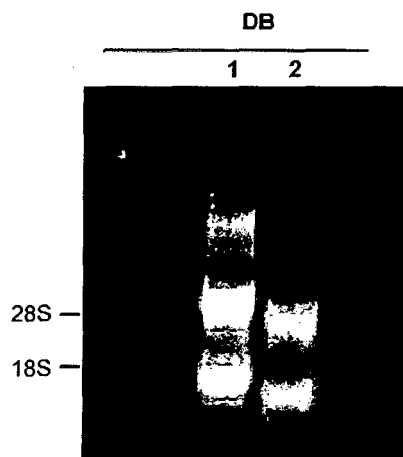


Figura 3. Muestra típica de una imagen obtenida por electrofore agarosa no desnaturizante de ARN en muestras de hígado e intestino (1 y 2 respectivamente).