



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Análisis de los cambios histológicos en las branquias y
hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* expuestos a un estrés
crónico de alta alcalinidad.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

Dayanna Andrea Vera Delgado

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, septiembre 2024

Resumen

Investigaciones recientes han revelado diversos efectos adversos en camarones a altas concentraciones de alcalinidad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios histológicos en branquias y hepatopáncreas de juveniles de *Penaeus vannamei* debido al estrés crónico causado por altas concentraciones de alcalinidad. Para ello, se realizó un experimento con una duración de 30 días en el cual se utilizaron cuatro grupos experimentales con tres réplicas cada uno: T120 (control), T200, T300 Y T400 donde se mantuvo la alcalinidad a 120, 200, 300 Y 400 mg de CaCO_3/L , respectivamente. Los tratamientos T200, T300 y T400 se mantuvieron con adición de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), mientras el control fue mantenido a la concentración natural del agua de mar. Juveniles ($n= 336$; 1.5 ± 0.8 g) *P. vannamei* fueron sembrados a una densidad de 28 camarones/ m^2 en tanques de 60 L con agua de mar filtrada. Los tanques mantuvieron aireación constante y temperatura de 27 ± 1 °C. Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial al 35% de proteína cruda, cuatro veces al día (10:00 ,14:00, 18:00 y 22:00 h). Biometrías fueron realizadas el día 0 y cada siete días, el día 30 los camarones se cuantificaron y pesaron para determinar los siguientes parámetros: sobrevivencia, peso promedio final, ganancia de peso, crecimiento semanal, tasa de crecimiento específico, productividad, factor de conversión alimenticia y alimento consumido. Las muestras para histología se tomaron el día 0, 14 y 30. Las altas concentraciones de alcalinidad no afectaron el crecimiento ni la sobrevivencia de los juveniles. Sin embargo, los camarones del tratamiento T300 presentaron cambios en la morfología de las branquias para compensar el estrés, los cuales pudieron revertirse gradualmente en un periodo de 30 días. Los camarones del tratamiento T400 mostraron daños severos en branquias y hepatopáncreas, que sólo pudieron revertirse en el hepatopáncreas después

de 30 días. En conclusión, el estrés por altas concentraciones de alcalinidad indujo cambios histológicos en branquias y hepatopáncreas debido al estrés alcalino. Sin embargo, el camarón fue capaz de revertir estos cambios tras una exposición crónica (30 días), destacando la importancia de mantener una concentración menor a 300 mg/L para el cultivo de juveniles de camarón.

Palabras clave: Peneido, calidad de agua, alcalinidad de carbonatos, morfología, histología.

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**Análisis de los cambios histológicos en las branquias y
hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* expuestos a un estrés
crónico de alta alcalinidad.**

T E S I S

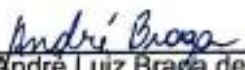
**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

DAYANNA ANDREA VERA DELGADO

Aprobada por:



Dr. André Luiz Braga de Souza
Director de tesis



Dra. Laura Liliana López Galindo
Co-directora de tesis



Dr. Misael Rosales Leija
Sinodal



Dra. Adriana Ferreira da Silva
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard;

Me dirijo a usted en mi calidad de Director de tesis encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante Dayanna Andrea Vera Delgado como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi Voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

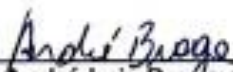
ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN LAS BRANQUIAS Y HEPATOPANCREAS DE *Penaeus vannamei* EXPUESTOS A UN ESTRÉS CRÓNICO DE ALTA ALCALINIDAD

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 2 de octubre de 2024

Atentamente,


Dr. André Luiz Braga de Souza
Director de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de Co-Directora de tesis encargada de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante Dayanna Andrea Vera Delgado como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi Voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN LAS BRANQUIAS Y HEPATOPANCREAS
DE *Penaeus vannamei* EXPUESTOS A UN ESTRÉS CRÓNICO DE ALTA ALCALINIDAD

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 2 de octubre de 2024

Atentamente,



Dra. Laura Uliana López Galindo
Co-Directora de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante Dayanna Andrea Vera Delgado como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi Voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

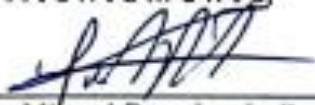
ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN LAS BRANQUIAS Y HEPATOPANCREAS DE *Penaeus vannamei* EXPUESTOS A UN ESTRÉS CRÓNICO DE ALTA ALCALINIDAD

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 2 de octubre de 2024

Atentamente,


Dr. Misael Rosales Leija
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante Dayanna Andrea Vera Delgado como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi Voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

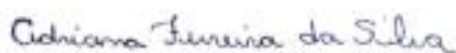
ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN BRANQUIAS Y HEPATOPANCREAS DE *Penaeus vannamei* EXPUESTOS A UN ESTRÉS CRÓNICO DE ALTA ALCALINIDAD

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 2 de octubre de 2024

Atentamente,



Dra. Adriana Ferreira da Silva
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Dedicatoria

A mi mamá, por creer siempre en mí

Agradecimientos

A México y a su gente por abrirme las puertas de su país y hacerme sentir como en el mío.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por haberme otorgado la beca para mis estudios de maestría.

A la universidad Autónoma de Baja California (UABC), al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), a el Laboratorio de Producción de Camarón.

A mi familia, mi mama Gloria, mi papa Charles y mis hermanos Elian y José Daniel que aun desde lejos, los sentía junto a mí.

A Gustavo y a su familia por haberme hecho sentir parte de la suya durante mi estancia en México, siempre los tendré en mi corazón.

A la comunidad de Akash por brindarme un espacio de paz.

A mi mejor amiga, Stefy, por sus conversaciones interminables llenas de risas y preocupaciones

A mi tía Lula por su apoyo incondicional.

A Isa y Thomas, por ser los mejores roomies del mundo.

A mis directores de tesis, Dr. André Braga y la Dra. Laura López por ayudarme a crecer en el ámbito académico.

A mis sinodales, Dr. Misael Rosales y Dra. Adriana Ferreira por sus valiosas aportaciones en mi formación.

Quiero agradecer a cada una de las personas que de alguna manera hicieron que mi estancia haya sido una de las mejores experiencias que he tenido hasta hoy.

Índice

Resumen	ii
Dedicatoria	ix
Agradecimientos	x
Lista de Figuras	xii
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1: Introducción general	1
1.1 Características Generales de <i>Penaeus vannamei</i>	1
1.2 Branquias	3
1.3 Hepatopáncreas	5
1.4 Camaronicultura	6
1.5 Calidad del agua	7
1.6 Alcalinidad	8
1.7 Histología	10
Capítulo 2: Análisis de los cambios histológicos en las branquias y hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> expuestos a un estrés crónico de alta alcalinidad.....	12
2.1 Introducción	12
2.2 Antecedentes.....	13
2.3 Justificación	16
2.4 Hipótesis.....	17
2.5 Objetivos.....	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	17
2.6 Materiales y Métodos.....	17
2.6.1 Material biológico y diseño experimental	17
2.6.2 Parámetros Físicos y Químicos	19
2.6.3 Alimento consumido	19
2.6.4 Desempeño Zootécnico	20
2.6.5 Análisis histológico	20
2.6.6 Análisis Estadístico.....	22
2.7 Resultados.....	22
2.7.1 Parámetros físicos y químicos	22
2.7.2 Desempeño Zootécnico	23
2.7.3 Análisis Histológico.....	24
2.8 Discusión	30

Capítulo 3: Conclusión y Perspectivas a futuro	39
Bibliografía.....	41

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomía general externa de <i>Penaeus vannamei</i> (modificado de FAO, 1995).....	2
Figura 2. Morfología de branquias de <i>Penaeus vannamei</i> (Modificado de Bauer, 2023)	3
Figura 3. Medidas de Filamentos branquiales de <i>Penaeus vannamei</i> . A) Largo. B) Ancho con mayor longitud. C) Ancho con menor longitud. D) Ancho de base (Modificado de Bauer, 2023).....	21
Figura 4. Mortalidad de juveniles de <i>Penaeus vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de alcalinidad durante 30 días.....	24
Figura 5. Cambios histológicos en branquias de <i>Penaeus vannamei</i> a 14 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad.....	25
Figura 6. Cambios histológicos en branquias de <i>Penaeus vannamei</i> a 30 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad.....	26
Figura 7. Cambios de la estructura histológica de hepatopáncreas de <i>Penaeus vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de alcalinidad.....	29

Lista de tablas

Tabla 1. Rangos recomendados de los parámetros de calidad de agua en la acuicultura del camarón (Van Wyk et al., 1999)	8
Tabla 2. Valores medio $\pm$ desviación estándar de los parámetros de calidad de agua durante el cultivo (30 días) de <i>Penaeus vannamei</i> en diferentes tratamientos experimentales. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.....	22
Tabla 3. Valores medios $\pm$ desviación estándar de los parámetros de producción durante el cultivo (30 días) de <i>Penaeus vannamei</i> en diferentes tratamientos experimentales.....	23
Tabla 4. Valores medios $\pm$ desviación estándar de las medidas de los filamentos branquiales de <i>Penaeus vannamei</i> en μm a los 14 días de exposición. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.....	27
Tabla 5. Valores medios $\pm$ desviación estándar de las medidas de los filamentos branquiales de <i>Penaeus vannamei</i> en μm a los 30 días de exposición. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.....	28
Tabla 6. Valores medios $\pm$ desviación estándar de las medidas del área de células vesiculares (B) y residuales (R) de <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 y 30 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad. Las letras en superíndice indican las	

diferencias significativas encontradas en los
tratamientos.....30

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Características Generales de *Penaeus vannamei*.

Penaeus vannamei (camarón blanco del Pacífico) es un crustáceo nativo de las aguas costeras del Océano Pacífico, con una amplia distribución desde México hasta Perú (INAPESCA, 2018). Habita aguas marinas y estuarinas poco profundas de fondos arenosos y fangosos. Pertenece a la familia Penaeidae de la orden Decápoda caracterizados por poseer un cuerpo alargado y comprimido lateralmente (Bauer, 2023).

Su cuerpo está dividido en dos regiones; una anterior (cefalotórax), donde se encuentra las anténulas, compuestas por un par de pequeños flagelos que funcionan como quimiorreceptores de distancia y unas antenas que cumplen la función de estabilización durante el nado y detección de vibraciones en el agua. También en el cefalotórax se encuentra una prolongación hacia delante en forma de espina llamada rostro que cumple una función de defensa. A cada lado del rostro se encuentran los ojos, fijados sobre un pedúnculo que permiten la rotación del ojo (Dall et al., 1990). Los pereópodos (cinco pares de patas torácicas) son apéndices que les sirven para alimentarse y caminar.

La segunda región es la parte posterior (abdomen), que está compuesta por seis segmentos. Los pleópodos (cinco pares de apéndices abdominales) se encuentran a lo largo de los cinco primeros segmentos, en el sexto segmento se encuentran los urópodos que junto a un telson forman una cola que le permite escapar de situaciones de riesgo y como aletas estabilizadoras durante el nado hacia delante y de dirección cuando se impulsan hacia atrás (Alday-Sanz, 2010; Bauer, 2023). La superficie externa de estas regiones está cubierta por un exoesqueleto quitinoso (Dall et al.,

1990) que cambian varias veces a lo largo de su vida, actuando como una barrera física y química contra lesiones e invasión microbiana (Soni et al., 2023) (Figura 1)

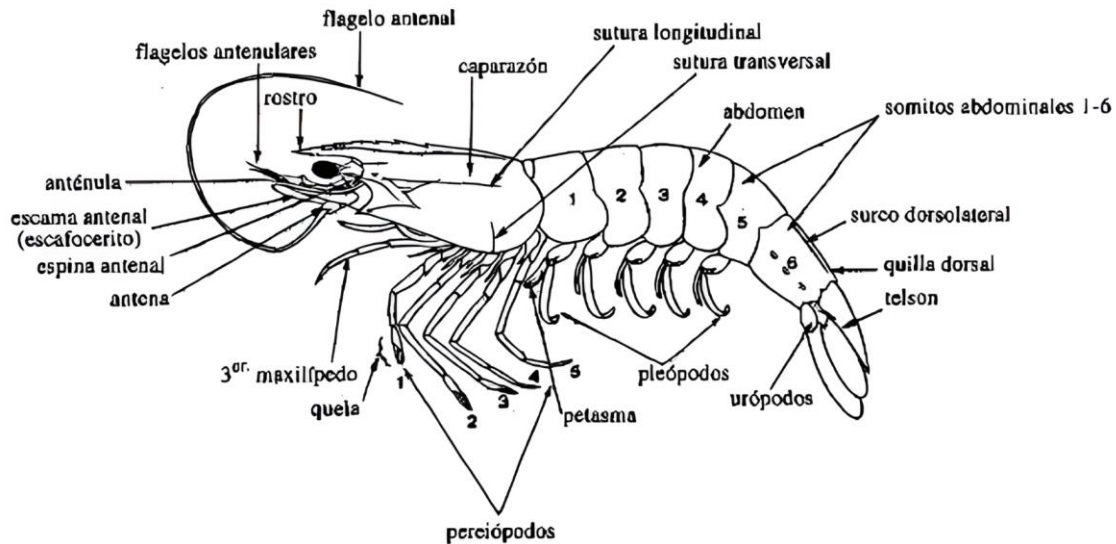


Figura 1. Anatomía general externa de *Penaeus vannamei* (modificado de FAO, 1995).

Los camarones son especies eurihalinas con un patrón hiper-hipo osmoregulator que se establece en las primeras etapas post larvares (patrón de osmorregulación ontogénica tipo 3) debido a que viven en un entorno muy variable y en constante cambio durante su ontogenia desafiando permanentemente su homeostasis fisiológica (Chong-Robles et al., 2014; Fehsenfeld y Weihrauch, 2017). Esto por qué los adultos viven en el océano, donde las hembras liberan los huevos fertilizados y se da el desarrollo de las larvas: seis nauplios, tres protozoeas, y tres etapas de mysis. Luego, las postlarvas son reclutadas en las zonas costeras (estuarios y lagunas) donde crecen hasta convertirse en juveniles (Bauer, 2023; Chong-Robles et al., 2014). Esto es posible porque estos organismos tienen órganos reguladores eficientes, tal como las branquias, que les permiten soportar estos cambios durante su ciclo de vida.

1.2 Branquias

Las branquias son el principal órgano de la homeostasis del líquido extracelular, en donde se realiza el intercambio pasivo de gases respiratorios (CO_2 y O_2), intercambio iónico y excreción de desechos tóxicos. Como principal desecho metabólico de los crustáceos está el amoníaco, lo que convierte a los camarones en organismos amoniotéticos, excretando la orina a través del poro excretor por el epitelio branquial (Freire et al., 2008; Henry et al., 2012).

Las branquias están ubicadas en la cavidad branquial en el cefalotórax, cubiertas por una extensión ventrolateral del exoesqueleto (branquiostegita), y se conforman de un eje central (raquis) a lo largo del cual surgen filamentos (ramas secundarias) otorgándole una forma ramificada (dendobranquia) (Figura 2) (Bauer, 2023). Por lo tanto, este órgano se encuentra en estrecho contacto con el medio acuoso, que a menudo se inflama o se daña cuando hay cambios drásticos en los factores ambientales (Soni et al., 2023).

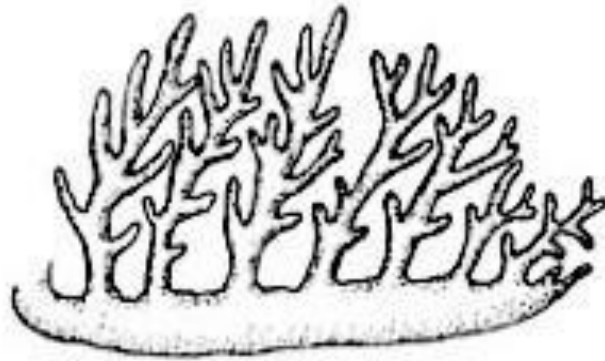


Figura 2. Morfología de branquias de *Penaeus vannamei* (Modificado de Bauer, 2023).

La barrera agua-hemolinfa en el filamento está conformada por cutícula, epitelio y lámina basal, teniendo un grosor de aproximadamente 1.0 - 1.5 μm . Estas dimensiones junto con la circulación sanguínea continua son los factores que permiten que el oxígeno y el dióxido de carbono se difundan a través de la superficie cuticular (Foster y Howse, 1978). La especialización del epitelio branquial puede ser vista en un nivel ultraestructural y se identifican cinco tipos de células: delgadas, gruesas, brida, atenuadas y pilastras (Fehsenfeld y Weihrauch, 2017; Freire et al., 2008). Las células pilastras o pilares, se encuentran en las laminillas branquiales, siendo su rasgo más característico la abundancia de microtúbulos y tonofilamentos de tipo desmosomal en la superficie de las células basales. Dos o más células de pilastra pueden abarcar todo el espacio de la hemolinfa a través de la lámina, sostienen el tabique intralaminar en las laminillas branquiales y limitan la deformación del espacio hemolinfa durante los cambios en la presión hidrostática. Mientras que las células de pilastra más simples pueden ejercer estas funciones estructurales exclusivamente, otras células de pilastra muestran similitudes con las células gruesas y las células de brida y parecen estar involucradas en el transporte de iones y en el proceso de muda de los peneidos, secretando líquido de muda y materiales cuticulares (Freire et al., 2008; Foster y Howse, 1978).

Durante desafíos metabólicos como cambios de las condiciones ambientales, las branquias brindan un soporte importante para alcanzar la homeostasis interna del organismo, misma actividad que necesita de un gasto energético elevado, por lo que los camarones necesitan de una gran reserva de energía, particularmente lípidos, que se encuentran almacenadas en la glándula del intestino medio también conocida como hepatopáncreas (Wang et al., 2014).

1.3 Hepatopáncreas

El hepatopáncreas es una glándula tubular pareada y es la principal glándula digestiva de los crustáceos (Röszer, 2014; Zhao et al., 2017). Está relacionado con la síntesis y secreción de enzimas digestivas y de moléculas inmunitarias, la absorción y reserva de nutrientes y de productos tóxicos para el organismo (Yohana et al., 2023; Zhao et al., 2017). Durante la etapa de crecimiento, la función principal del hepatopáncreas es digerir, asimilar y almacenar nutrientes para el crecimiento de los tejidos y el consumo de energía (Wang et al., 2014).

El hepatopáncreas de los camarones está compuesto por túbulos arborizados en ramas primarias y secundarias con células epiteliales especializadas, juega un papel crucial en procesos vitales como la absorción de nutrientes, la endocitosis y la digestión intracelular de partículas de alimentos, el almacenamiento de glucógeno y lípidos, la excreción de metabolitos de nitrógeno o el almacenamiento de calcio (Röszer, 2014). Las células vesiculares (B) tienen una red de microvellosidades que aumentan el área de superficie en contacto con la capa epitelial, y secretan enzimas digestivas (lipasas y proteasas). Las células residuales (R), almacenan y reciclan productos de desecho en el hepatopáncreas, para reducir toxicidad en órganos por acumulación de subproductos tóxicos (Yohana et al., 2023). Las células fibrilares (F) cumplen un papel de desintoxicación, ayudan en la eliminación de productos tóxicos, mientras las células embrionarias (E) tienen funciones específicas relacionadas con el crecimiento y regeneración de tejido (CECCALDI et al., 1989).

Este órgano es esencial para el crecimiento, la salud y la capacidad de enfrentar enfermedades en los camarones, esto resalta la importancia de implementar prácticas de manejo que aseguren un ambiente óptimo para el desarrollo de los

organismos de la producción acuícola, donde la salud de los camarones es un factor determinante para el éxito en los sistemas de cultivo.

1.4 Camaronicultura

La acuicultura del camarón se encuentra por encima de su captura (pesquería), por ser una alternativa con mayor viabilidad económica en la producción de alimentos (Bauer, 2023; Godínez-Siordia et al., 2011). El comienzo de esta práctica tuvo lugar en Centro y Sur América a principios de 1980 (FAO, 2009), misma que ha ido incrementando año tras año, con una producción estimada de 6.8 millones de toneladas anuales (FAO, 2024) donde Ecuador y México son los principales productores de camarón en el hemisferio occidental. Esta actividad no solo contribuye a la economía de muchos países costeros, generando empleos y divisas, sino que también desempeña un papel crucial en la seguridad alimentaria, contribuyendo al objetivo 2: Hambre Cero de la agenda 2030 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

La acuicultura es una práctica donde organismos acuáticos se cultivan en condiciones controladas. El camarón *P. vannamei* es una especie de rápido crecimiento y con una tolerancia a altas densidades (Yohana et al., 2023). Su producción consta de varios ciclos de cultivo; que comienzan por la reproducción, cría y larvicultura, seguida de una precría en granjas de cultivo que finaliza con la etapa de engorda. Durante este proceso, el manejo de alimentos y el monitoreo constante de varios parámetros de calidad de agua son sumamente importantes para alcanzar los objetivos de producción.

1.5 Calidad del agua

Un suministro de agua de buena calidad es esencial para cualquier operación de cultivo acuícola. Los criterios para el agua de buena calidad varían según el tipo de organismos y se establecen por niveles seguros, es decir, propiedades físicas y químicas del agua que tiene efectos adversos insignificantes en el crecimiento y la supervivencia de los camarones. Los factores dominantes en la composición del agua son muy variados, e incluyen procesos físicos, químicos y biológicos. Los objetivos de la gestión del agua son proporcionar agua de alta calidad y minimizar las fluctuaciones de los parámetros de calidad del agua (Venkateswarlu et al., 2019). Para *P. vannamei*, los rangos recomendados para su cultivo se plasman en la Tabla 1.

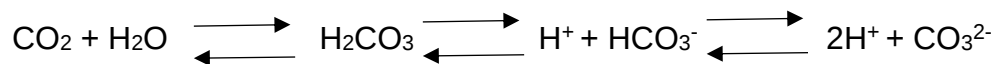
Tabla 1. Rangos recomendados de los parámetros de calidad de agua en la acuicultura del camarón (Van Wyk et al., 1999).

Parámetro de calidad de agua	Rango recomendado
Temperatura	28 - 32 °C
Oxígeno disuelto	5.0 - 9.0 ppm
Dióxido de carbono	≤ 20 ppm
pH	7.0 - 8.3
Salinidad	0.5 - 35 ppt
Dureza total (CaCO_3)	≥ 150 ppm
Alcalinidad total (CaCO_3)	≥ 100 ppm
Amonio desionizado (NH_3)	≤ 0.03 ppm
Nitrito (NO_2^-)	≤ 1 ppm
Nitrato (NO_3^-)	≤ 60 ppm

De los parámetros antes mencionados, la alcalinidad es un parámetro que se ha visto un poco descuidado en los sistemas de cultivo, pero que puede ser clave para el buen desarrollo del organismo.

1.6 Alcalinidad

La disolución de la molécula CO_2 en el agua desencadena una serie de transformaciones químicas que constituyen el llamado sistema carbónico - carbonato. Una vez disuelto en la masa de agua, una pequeña parte permanece como gas disuelto, mientras que la mayor parte reacciona con el agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3) e ion bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}). Generando un reservorio de carbono inorgánico.



Principalmente, la suma de las concentraciones de bases titulables mencionadas anteriormente (carbonato, bicarbonato e hidróxido) forman la alcalinidad, que se define como la capacidad que tiene el agua de neutralizar iones de hidrógeno (Boyd et al., 2016; Manahan, 2006).

La alcalinidad proviene de rocas, sales y las actividades fotosintéticas de los organismos autótrofos, siendo la roca caliza la mayor fuente de alcalinidad (Boyd et al., 2016; Addy et al., 2004). Los cuerpos hídricos alcalinos son una característica prominente en numerosas regiones del globo terrestre (Zhang et al., 2023, 2024). En áreas semiáridas donde la evaporación supera significativamente la precipitación, se produce una concentración de iones, lo que resulta en cuerpos de agua con altas concentraciones de alcalinidad (Velasquez-Lopez, 2001).

El carbono inorgánico desempeña un papel crucial para la formación del exoesqueleto del camarón. Según Van Wyk et al. (1999), en el exoesqueleto es donde se encuentra la mayor cantidad de CaCO_3 que es movilizado durante la muda con el fin de ablandar esta estructura y se excreta al ambiente o es reservado en gastrolitos para la formación del nuevo exoesqueleto. Generalmente, los crustáceos decápodos experimentan una pronunciada alcalosis en la premuda (aumento de HCO_3^- en la hemolinfa) para compensar una acidosis concomitante de origen principalmente metabólico (aumento del lactato de la hemolinfa) después de una exudación exitosa (Fehsenfeld y Weihrauch,

2017). Por lo que como se mencionó anteriormente la alcalinidad recomendada es de ≥ 100 mg/L de CaCO_3 .

A pesar de que, históricamente, en la camaronicultura las altas concentraciones de alcalinidad no han sido consideradas un aspecto preocupante, recientemente se ha evidenciado que una alta alcalinidad puede detener los procesos de muda por un exceso de pérdida de sal (Venkateswarlu et al., 2019). Además, alteraciones en el equilibrio ácido-base que provoquen cambios en el pH de los fluidos intra o extracelulares pueden perjudicar el funcionamiento y la regulación de las proteínas, conduciendo a alteraciones en las funciones fisiológicas (Fehsenfeld y Weihrauch, 2017). En adición, el análisis histológico de branquias y hepatopáncreas han revelado daños de los tejidos en *P. vannamei* cuando han sido sometidos a concentraciones mayores a 300 mg/L de CaCO_3 (Duan et al., 2023; Zhang et al., 2023).

1.7 Histología

La histología es la rama de la biología que se dedica al estudio de los tejidos biológicos. A través del análisis microscópico, se investiga la estructura, organización y función de los tejidos que componen los organismos vivos. Los tejidos se clasifican en cuatro tipos principales: tejido epitelial, tejido conectivo, tejido muscular y tejido nervioso (Ross y Pawlina, 2006).

La histología utiliza diversas técnicas para preparar y observar los tejidos, tales como: fijación para preservar la estructura de los tejidos; corte en donde se seccionan los tejidos en láminas muy delgadas; y la tinción donde se utilizan colorantes para resaltar estructuras celulares específicas (Mescher, 2013)

La histología no solo estudia la estructura normal de los tejidos, sino que también es crucial en la comprensión de enfermedades (histopatología), ayudando a identificar cambios en los tejidos asociados con diferentes patologías. El principal instrumento en histología es el microscopio. Existen varios tipos como el microscopio óptico y el electrónico, que permiten observar detalles a diferentes escalas (Ross y Pawlina, 2006). Esta herramienta ha sido fundamental para caracterizar las respuestas fisiológicas del camarón ante diversos factores estresantes (Fernandes et al., 2017; Yu et al., 2020). En cuanto a la alcalinidad, trabajos recientes han sido publicados demostrando los efectos de diferentes concentraciones en la integridad de tejidos. Por esta razón, la elección de esta herramienta en el presente trabajo es crucial para evaluar los efectos de altas concentraciones de alcalinidad durante una exposición crónica.

Capítulo 2: Análisis de los cambios histológicos en las branquias y hepatopáncreas de *P. vannamei* expuestos a un estrés crónico de alta alcalinidad.

2.1 Introducción

La acuicultura del camarón ha experimentado una notable expansión desde 1980 a los últimos años con una producción anual de aproximadamente 6.8 millones de toneladas métricas (FAO, 2024). Este crecimiento se debe al aumento de la demanda de este recurso acuícola (FAO, 2023), que se ha extendido incluso hacia regiones semiáridas. En estas áreas donde la evaporación supera significativamente la precipitación, se produce una notable concentración de iones, como el bicarbonato, que pueden resultar en el incremento de la alcalinidad (Velasquez-Lopez, 2001), lo que resulta en cuerpos de agua distintos a los tradicionalmente utilizados.

Adicionalmente, los cuerpos hídricos alcalinos son una característica prominente en numerosas regiones del globo terrestre (Zhang et al., 2023, 2024), como en aguas subterráneas donde la degradación de la materia orgánica ocasiona las elevadas concentraciones de carbono inorgánico (Domènech y Peral, 2012). Estas características en el agua pueden ser perjudiciales para la producción de algunos alimentos acuícolas o agrícolas (Manahan, 2006; Lin et al., 2013). No obstante, el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) sobresale entre otras especies por su rápido y continuo crecimiento, así como por su capacidad para tolerar elevadas concentraciones de alcalinidad (Van Wyk et al., 1999). Por lo que ha sido considerado como una especie ideal para la utilización de recursos hídricos con esta característica.

La alcalinidad es la capacidad del agua de neutralizar iones de hidrógeno y actuar como un depósito de carbono inorgánico. La alcalinidad en agua está conformada por bases titulables, principalmente de ion carbonato, bicarbonato e hidróxido (Manahan, 2006). El

carbono inorgánico desempeña un papel crucial para la formación del exoesqueleto del camarón. Según varios estudios, los niveles de alcalinidad superiores a 100 mg/L son recomendables para mantener la estabilidad del pH y promover el crecimiento saludable del camarón (Van Wyk et al. 1999, Yao y Zhou, 2010; Furtado et al., 2011)

Sin embargo, investigaciones recientes han revelado efectos adversos en la fisiología de camarones cultivados a concentraciones que antes no se consideraban elevadas para la camaronicultura. El estudio sobre las respuestas fisiológicas de los camarones frente a concentraciones elevadas de alcalinidad representa un campo de investigación en expansión en la acuicultura, donde se han revelado consecuencias adversas en el desarrollo de *P. vannamei* cuando se enfrenta a niveles elevados de alcalinidad (Duan et al., 2023; Shi et al., 2023; Song et al., 2024). Aunque la mayoría de estos estudios han abordado los efectos de la exposición aguda, estos trabajos han observado que el estrés alcalino induce daños histológicos en branquias y hepatopáncreas (Ge et al., 2023; Zhang et al., 2023; Li et al 2024). A pesar de la prevalencia de estos estudios, aún existe una falta de comprensión sobre los efectos específicos en la integridad de las branquias y el punto de inicio de los cambios histopatológicos en estas estructuras en respuesta al estrés alcalino crónico.

Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo generar conocimiento sobre las respuestas fisiológicas de los juveniles de camarón ante el estrés por alcalinidad durante un cultivo, centrándose en los efectos a nivel de tejidos.

2.2 Antecedentes

El estudio de las respuestas fisiológicas de los camarones a las altas concentraciones de alcalinidad es un área de investigación emergente. Recientemente se han reportado efectos negativos en el crecimiento, homeostasis, digestión, metabolismo e inmunidad

de *P. vannamei* cuando son expuestos a altas alcalinidades (Duan *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2024). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han concentrado en los efectos de la exposición aguda.

Shi *et al.* (2023) investigaron el mecanismo de respuesta natural del camarón blanco del Pacífico ante el estrés agudo (24 horas) de alcalinidad (350 mg/l). Los autores reportaron la sobre expresión de genes relacionados a la homeostasis (Na/K-ATPasa, anhidrasa carbónica y cotransportador de Na/K/2Cl), digestión (tripsina, quimiotripsina y alfa-amilasa) e inmunidad (GPX, PO, APC y AKP), excepto para genes del sistema enzimático CTP, indicando una inhibición en la oxidación de ácidos grasos. Por lo anterior, se concluye que *P. vannamei* pudiera hacer frente a un estrés por alcalinidad, pero que esto ocasiona altos niveles de autofagia activando la función inmune y perjudicando el óptimo desarrollo en el crecimiento del camarón.

En otro ensayo sobre exposición aguda llevado a cabo por Zhang *et al.* (2023), se expusieron juveniles de *P. vannamei* a una dosis subletal de 350 mg/L CaCO₃ por 24 horas, a la que denominaron como estrés alcalino. A nivel histológico, se observaron daños en branquias como desprendimiento de células epiteliales a partir de las dos horas de exposición, ruptura de filamentos branquiales y necrosis. Así mismo, aparición de vacuolas y células inflamatorias en el hepatopáncreas, además de pérdida de la integridad de la membrana basal.

Otras especies de crustáceos decápodos también han sido estudiadas bajo condiciones de exposición aguda de alcalinidad. Por ejemplo, se han demostrado los efectos de dicha exposición en *Exopalaemon carinicauda* donde se produjeron cambios histológicos en branquias a las 48 horas de exposición de 400 mg/L CaCO₃ (Ge *et al.*, 2023). Los autores reportaron un aumento del tamaño de las células pilares en branquias lo que conlleva a

un aumento de superficie, interpretándose como una adaptación al estrés para optimizar la absorción de oxígeno (Ge *et al.*, 2023). De manera similar, (Li *et al.*, 2024) expusieron *E. carinicauda* a 321 mg/L CaCO_3 por 72 horas, encontrando necrosis y desaparición de células secretoras y de almacenamiento en el hepatopáncreas, además de separación de los túbulos.

A diferencia de la exposición aguda, pocos son los estudios donde se han evaluado las respuestas al estrés crónico de alcalinidad. Recientemente, Song *et al.* (2024) demostraron que la exposición crónica (siete días) de estrés por carbonatos (295 mg/L CaCO_3) afectó a la red de bacterias benéficas del intestino, favoreciendo el rol de las bacterias patógenas. Acerca del desempeño de zootécnico, Furtado *et al.* (2015) reportaron que, a los 49 días de cultivo en un sistema biofloc, el crecimiento semanal, el peso final y la ganancia de peso de juveniles de *P. vannamei* fueron mejores cuando se mantuvieron en los niveles de alcalinidad más altos (300 mg/L CaCO_3) a comparación de los que se cultivaron en concentraciones más bajas (75 mg/L CaCO_3). Sin embargo, no se presentaron resultados sobre cambios en la histología de los organismos. Por otro lado, Duan *et al.* (2023) observaron una reducción del crecimiento y la supervivencia de juveniles de *P. vannamei* cuando fueron cultivados a 200 y 320 mg/L CaCO_3 durante 14 días. En adición, estos autores demostraron daños en hepatopáncreas, como atrofia y deformación de túbulos, daño de membrana basal y reducción en tamaño y número de células B.

A pesar de lo anterior, no se conocen los efectos de un estrés crónico de alcalinidad en la integridad de branquias. Luego, no hay registros en la literatura sobre la concentración a partir de donde se empezarían a observar los cambios relacionados a un estrés alcalino. Así mismo, se desconoce las respuestas adaptativas que pudiera presentar *P.*

vannamei ante una exposición crónica, como las reportadas para *E. carinicauda* ante una exposición aguda (Ge et al., 2023).

2.3 Justificación

Aunque negligenciada en diversos sistemas acuícolas tradicionales, la alcalinidad constituye un parámetro crucial en la camaronicultura, debido a que los camarones utilizan el carbonato de calcio para la constitución de su exoesqueleto, además, de servir como fuente de carbono inorgánico para el crecimiento de microorganismos como las bacterias nitrificantes. Las concentraciones recomendadas para el óptimo crecimiento de *P. vannamei* se encuentran por encima de los 100 mg/L y a menudo se realizan correcciones en las unidades de producción, con el fin de incrementar la concentración de alcalinidad con la ayuda de carbonos inorgánicos en forma de carbonatos. Esto se hace necesario cuando la fuente del agua no contiene la concentración mínima mencionada anteriormente, o bien cuando la demanda de consumo de alcalinidad por los organismos presentes en el cultivo resulta en una reducción de la concentración a lo largo de un ciclo. Los cuerpos hídricos alcalinos están distribuidos ampliamente en varias partes del mundo, de los cuales han sido utilizadas comúnmente en cultivos de camarones ciertas fuentes que pueden tener hasta cuatro veces más de la concentración mínima recomendada de alcalinidad. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado efectos adversos en la fisiología de camarones cultivados a concentraciones que anteriormente no se consideraban elevadas en este contexto de la camaronicultura. La descripción de daños en tejidos, tales como branquias y hepatopáncreas, en camarones cultivados a 350 mg/L son algunos de los resultados de dichas investigaciones. No obstante, todavía no se conoce a qué concentración empiezan los efectos histopatológicos en branquias. Por lo anterior, la presente tesis está enfocada en

generar conocimientos sobre las respuestas fisiológicas terciarias a nivel de tejidos en juveniles de camarón ante el estrés crónico por alcalinidad durante un cultivo. Al hacerlo se busca mejorar la comprensión de los riesgos asociados a la alta alcalinidad y contribuir al desarrollo de protocolos más eficientes y responsables en la acuicultura de camarones.

2.4 Hipótesis

Juveniles de *P. vannamei* cultivados a 300 mg CaCO₃/L de alcalinidad presentarán daños histopatológicos en branquias y hepatopáncreas perjudicando el desarrollo en el crecimiento y la supervivencia de los camarones.

2.5 Objetivos

Objetivo general

- Determinar la concentración de alcalinidad donde empiezan los daños histopatológicos y reducción del desempeño de crecimiento en juveniles de *P. vannamei*.

Objetivos específicos

- Evaluar el desempeño del crecimiento y sobrevivencia de los juveniles cultivados a diferentes concentraciones de alcalinidad durante 30 días.
- Analizar histológicamente branquias y hepatopáncreas de los juveniles a los 14 y 30 días de un cultivo a diferentes concentraciones de alcalinidad.

2.6 Materiales y Métodos

2.6.1 Material biológico y diseño experimental

El estudio se realizó durante el mes de agosto del año 2023 en el Laboratorio de Producción de Camarón del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC, México). Juveniles de *P. vannamei* de

aproximadamente 1.5 g ($n = 336$), fueron engordados en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (Baja California, México) en el sistema experimental descrito por Gutiérrez-Vera et al. (2024) y trasladados al IIO-UABC. Una vez en el laboratorio, los juveniles fueron acondicionados en tanques experimentales (60L) a una densidad de 28 camarones/m² equipados con sistema de aireación compuesto por un soplador, mangueras y piedras difusoras. Los tanques contaban con cuatro sustratos verticales de malla de 30 x 46 cm.

Durante siete días, se realizó una aclimatación de los juveniles en las unidades experimentales, donde se mantuvo la salinidad a 35 ± 1 ppt y la temperatura a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mediante el uso de calentadores con termostato (LOMAS, ECO THERMAL, China). Para mantener la calidad de agua dentro de los rangos recomendados para cultivo de camarón (Van Wyk et al., 1999) se realizó un recambio de agua diario del 90% del volumen del tanque.

Después de la aclimatación, en los mismos tanques, se realizó un experimento de 30 días. El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno: T120 (control) T200, T300 y T400, donde se mantuvo la alcalinidad a 120, 200, 300 y 400 mg de CaCO₃/L, respectivamente. Diariamente en un reservorio con agua de mar filtrada (120mg/L CaCO₃) se ajustó la alcalinidad para las concentraciones experimentales de T200, T300 y T400, con la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) siguiendo la metodología descrita por Furtado et al. (2011). Por otro lado, el tratamiento T120 no contó con adición de una fuente de carbonato, ya que esta fue la concentración natural del agua de mar filtrada obtenida en el laboratorio. Durante el periodo experimental, los parámetros de calidad de agua se mantuvieron de la misma forma descrita anteriormente para la aclimatación.

Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial formulada para contener 35% de proteína cruda (Micropellet 35%, ZEIGLER®, México) ofertada cuatro veces al día (10:00, 14:00, 18:00 y a las 22:00 h). La tasa de alimentación inicial se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Garza de Yta et al. (2004) con ajustes de acuerdo con el consumo observado en cada alimentación y resultado del peso promedio semanal (biometría).

2.6.2 Parámetros Físicos y Químicos

La temperatura, el oxígeno disuelto y el pH se tomaron dos veces al día (mañana y tarde) con un oxímetro (YSI550A, YSI, USA) y un potenciómetro (ROULAN, China), respectivamente. La salinidad se midió una vez a la semana con un refractómetro óptico (RSA0100, TRANS INSTRUMENTS, China). Las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) se midieron una vez al día con kits colorimétricos (API, Mars Fishcare North America, USA). La alcalinidad fue monitoreada dos veces al día, antes y después del recambio diario y reajuste de las concentraciones experimentales, siguiendo una modificación de la metodología descrita por APHA (2012) al reemplazar al ácido clorhídrico (HCl) por ácido sulfúrico (H₂SO₄).

2.6.3 Alimento consumido

Inicialmente, se determinó el porcentaje de lixiviación. Para lo que se pesaron 10 g de la dieta en triplicado y se acondicionaron en bolsas de malla de 400 µm. Las tres bolsas fueron sumergidas en tanques del mismo tipo utilizados en el experimento manteniendo las mismas condiciones de aireación constante y temperatura. Pasadas 24 horas se recolectaron y se secaron en un horno a 60 °C durante 24 horas. Una vez que se obtuvo un peso constante en el horno, el peso se registró y se calculó la diferencia entre el peso

inicial y final, determinando el porcentaje de lixiviación. Durante el experimento, el alimento no consumido fue recolectado cada mañana para posteriormente ser secado y pesado para la determinación de la cantidad de alimento consumido (g) según la metodología modificada de Lara et al. (2017), con base en la siguiente fórmula:

$$\text{Alimento consumido (g)} = \text{ALN} - (\text{AO} * \text{MS} * (100 - \% \text{ L}))$$

Donde: ALN es el alimento no consumido (g), AO el alimento ofertado (g), MS la materia seca (%) y L la lixiviación (%).

2.6.4 Desempeño Zootécnico

Biometrías fueron realizadas al día 0 y, posteriormente, a cada siete días, tomándose una muestra de 10 camarones de cada tanque pesados con una báscula de precisión 0.001 g (METTLER TOLEDO, METTLER INSTRUMENT, Suiza). En el día 30, se cuantificaron y pesaron todos los camarones vivos para la evaluación final del crecimiento y supervivencia en cada tratamiento. Las siguientes métricas fueron calculadas para determinar el desempeño zootécnico:

Sobrevivencia (S; %) = $[(N1 - N2) / N1] \times 100$; Ganancia de peso (GP; g) = $Pf - Pi$; Peso final = $\sum Pfv / N$; Crecimiento semanal (G/P; g/semana) = GP / T ; Biomasa final (BF; g) = $\sum Pfv$; Tasa de conversión alimenticia (TCA) = AC / GP ; Productividad (P; kg/m²) = $(Bf - Bi) / Sp$.

Donde: N1 es el número de camarones iniciales, N2 es el número final de camarones, Pf es el peso final, Pi es el peso inicial, Pfv peso final de los camarones vivos, T es el tiempo en semanas de cultivo, AC el alimento consumido, Bf la biomasa final, Bi la biomasa inicial y Sp la superficie (m²).

2.6.5 Análisis histológico

El día 1, 14 y 30 se realizaron muestreos de cinco camarones seleccionados aleatoriamente que se fijaron en solución de Davidson durante 48 horas, luego fueron transferidos en alcohol 70%, los tejidos se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol (70, 80, 90, 96 y 100%), se aclararon en Xileno, se incluyeron en parafina y se seccionaron con un microtomo a 4 μ m. Los tejidos seccionados fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

Para la determinación de los parámetros morfométricos, se realizó una calibración en el software ImageJ con imágenes de reglillas tomadas con el microscopio óptico (Axiostar plus, Zeiss, Alemania) y con el mismo objetivo se realizaron 20 mediciones de una distancia conocida con la herramienta “straight”, se procedió a realizar un promedio de las mediciones tomadas, y se utilizó de referencia para la calibración.

Se realizaron las siguientes mediciones: largo, ancho con mayor longitud (AML), ancho con menor longitud (AMEL) y ancho de base (AB) de los filamentos branquiales a los 14 y 30 días en todos los tratamientos con la herramienta “straight” (Figura 3). Para el hepatopáncreas, se midió el área de las células vesiculares (B) y residuales (R) con la herramienta “Polygon selection” a los 14 y 30 días en todos los tratamientos.

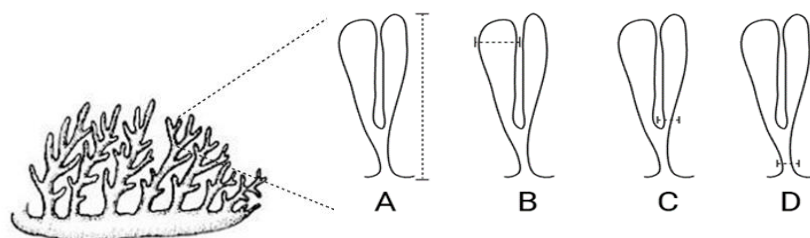


Figura 3. Medidas de Filamentos branquiales de *Penaeus vannamei*. A) Largo. B) Ancho con mayor longitud. C) Ancho con menor longitud. D) Ancho de base (Modificado de Bauer, 2023).

2.6.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, cuando las premisas normalidad y homocedasticidad fueron cumplidas, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para verificar la existencia de diferencias significativas entre los grupos, seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey cuando diferencias fueron identificadas. Para los casos en que las premisas no se cumplieron, se llevó a cabo un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para todos los análisis, se utilizó el software IBM SPSS Statistics 26, utilizando un nivel de confianza del 95%.

2.7 Resultados

2.7.1 Parámetros físicos y químicos

Los parámetros físicos y químicos muestreados durante los 30 días del periodo experimental se muestran en la Tabla 2. La temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, NAT, nitritos y nitratos no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). El pH del tratamiento T400 fue significativamente mayor a los demás tratamientos ($P < 0.05$) y no hubo diferencia significativa entre T120, T200 y T300. Los valores de alcalinidad fueron significativamente diferentes de acuerdo con el diseño experimental.

Tabla 2. Valores medio $\pm$ desviación estándar de los parámetros de calidad de agua durante el cultivo (30 días) de *Penaeus vannamei* en diferentes tratamientos experimentales. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.

Parámetros	T120	T200	T300	T400
Temperatura (°C)	27.82 $\pm$ 0.25	27.69 $\pm$ 0.20	27.82 $\pm$ 0.43	28.07 $\pm$ 0.61
Salinidad (‰)	35.30 $\pm$ 1.01	35.30 $\pm$ 1.01	35.30 $\pm$ 1.01	35.30 $\pm$ 1.01
pH	8.06 $\pm$ 0.18 ^a	8.06 $\pm$ 0.03 ^a	8.06 $\pm$ 0.02 ^a	8.20 $\pm$ 0.04 ^b
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	119 $\pm$ 4.25 ^a	201 $\pm$ 6.65 ^b	300 $\pm$ 4.53 ^c	401 $\pm$ 7.43 ^d
OD (mg/l)	5.69 $\pm$ 0.43	5.64 $\pm$ 0.37	5.59 $\pm$ 0.27	5.81 $\pm$ 0.14
NAT (mg/l)	0.28 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.05
NH ₃ (mg/l)	0.017 $\pm$ 0.004	0.019 $\pm$ 0.003	0.018 $\pm$ 0.00	0.028 $\pm$ 0.00
NH ₄ (mg/l)	0.27 $\pm$ 0.054	0.26 $\pm$ 0.056	0.27 $\pm$ 0.056	0.26 $\pm$ 0.054

OD: oxígeno disuelto; NAT: nitrógeno amoniacal total; NH₃: amoniac; NH₄: amonio

2.7.2 Desempeño Zootécnico

Los parámetros del desempeño zootécnico tomados durante el periodo experimental se muestran en la Tabla 3. Los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí en ninguno de los parámetros evaluados ($P > 0.05$). La mortalidad en todos los tratamientos se muestra en la (Figura 4).

Tabla 3. Valores medios $\pm$ desviación estándar de los parámetros de producción durante el cultivo (30 días) de *Penaeus vannamei* en diferentes tratamientos experimentales.

Parámetros	T120	T200	T300	T400
Productividad (kg/m ²)	0.04 $\pm$ 0.005	0.06 $\pm$ 0.004	0.05 $\pm$ 0.023	0.02 $\pm$ 0.015
Sobrevivencia (%)	46.42 $\pm$ 18.89	48.81 $\pm$ 5.45	51.19 $\pm$ 16.87	34.52 $\pm$ 5.45
Ganancia peso (g)	2.91 $\pm$ 1.26	3.72 $\pm$ 0.71	3.11 $\pm$ 0.24	2.50 $\pm$ 1.23
CS (g/semana)	0.68 $\pm$ 0.30	0.92 $\pm$ 0.18	0.77 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.31
FCA	1.28 $\pm$ 1.16	0.94 $\pm$ 0.84	1.10 $\pm$ 0.48	2.66 $\pm$ 1.53
Peso final (g)	3.99 $\pm$ 1.27	4.93 $\pm$ 1.69	4.63 $\pm$ 1.05	4.11 $\pm$ 1.47
TCE (%/día)	3.28 $\pm$ 1.73	4.33 $\pm$ 0.65	3.77 $\pm$ 0.29	2.81 $\pm$ 1.52
Alimento consumido (g)	41.72 $\pm$ 6.02	43.57 $\pm$ 1.91	41.81 $\pm$ 7.15	42.13 $\pm$ 3.41

CS: Crecimiento semanal; FCA: factor de conversión alimenticia; TCE: tasa de crecimiento específica

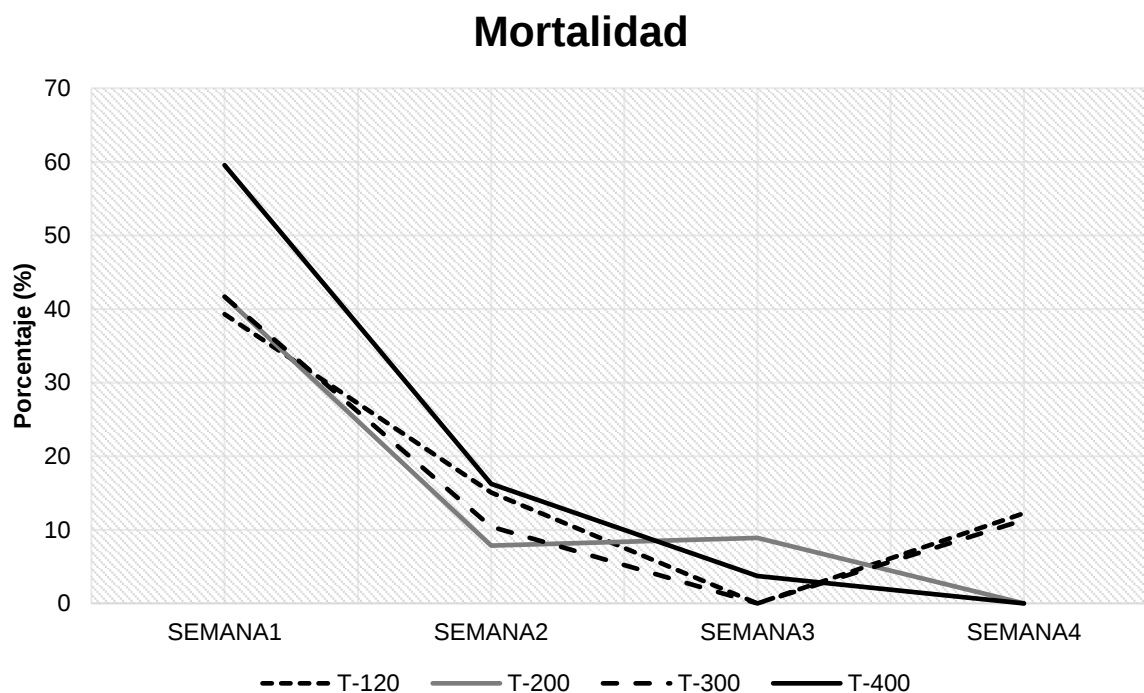


Figura 4. Mortalidad de juveniles de *Penaeus vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de alcalinidad durante 30 días.

2.7.3 Análisis Histológico

2.7.3.1 Branquias

No se observaron cambios en la morfología de branquias en el T120 a los 14 y 30 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad. Para T200 se observó una hipertrofia celular, mientras que para T300 se apreció una hipertrofia celular más evidente de los filamentos branquiales. Para T400 se observó pérdida de la estructura del filamento branquial (necrosis), además de túbulos atrofiados y ausencia de células pilares (Figura 5 y 6).

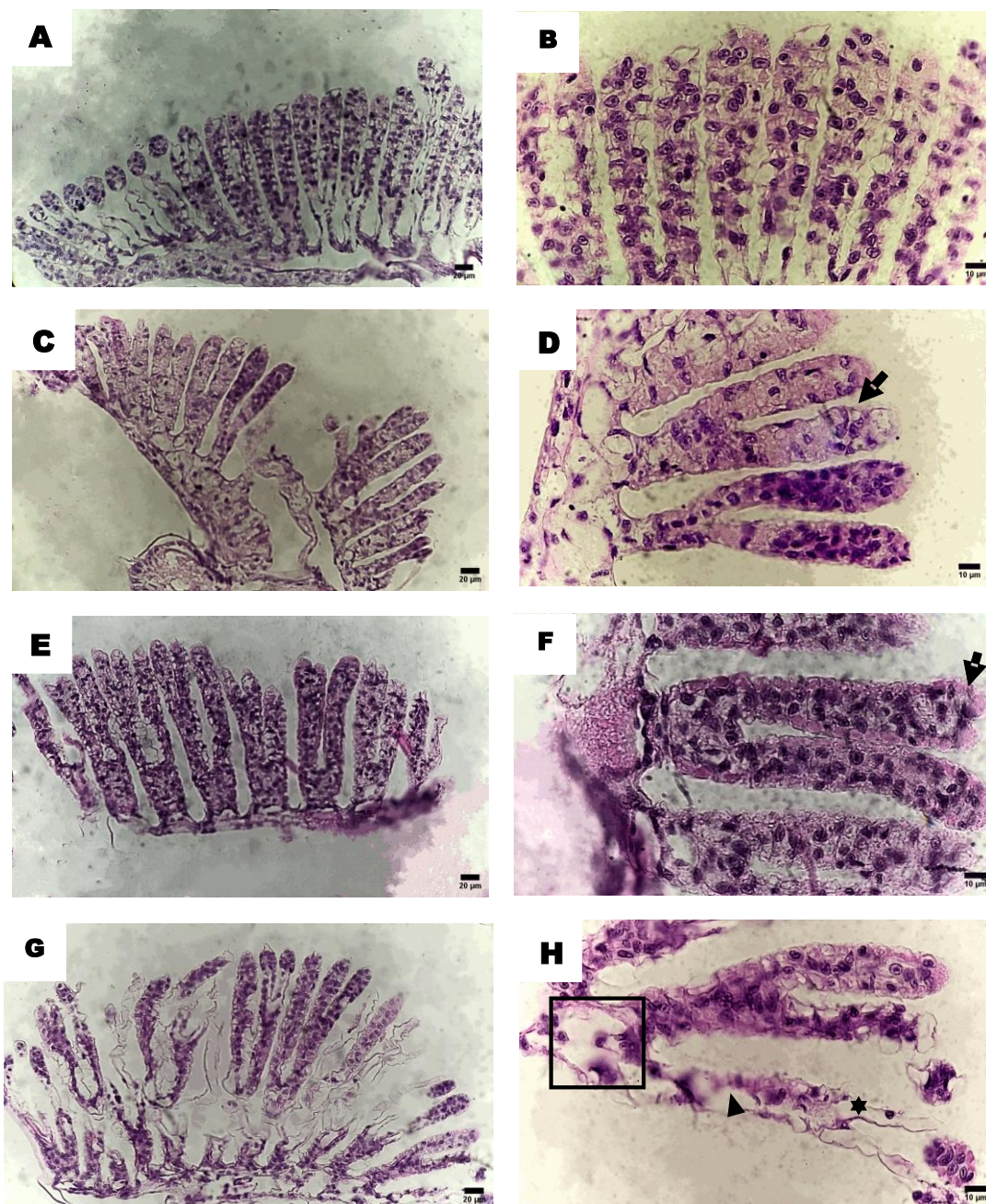


Figura 5. Cambios histológicos en branquias de *Penaeus vannamei* a 14 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad. **A)** Estructura histológica de branquia del grupo control (x 40, escala = 20 µm). **B)** Estructura histológica de branquia del grupo control (x 100, escala = 10 µm). **C)** Estructura histológica de branquia de T200 (x 40, escala = 20 µm). **D)** Estructura histológica de branquia de T200. Hipertrofia celular (flecha) (x 100, escala = 10 µm). **E)** estructura histológica de branquia de T300 (x 40, escala = 20 µm). **F)** Estructura histológica de branquia de T300. Los filamentos presentan una hipertrofia celular (flecha) (x 100, escala = 10 µm Estructura). **G)** Estructura histológica de branquia de T400 (x 40, escala = 20 µm). **H)** Estructura histológica de branquia de T400. Se observa atrofia (cabeza de flecha) y pérdida de la estructura (estrella) del filamento branquial, mientras que, en la base, las células pilares se disolvieron (cuadro) (x 100, escala = 10 µm).

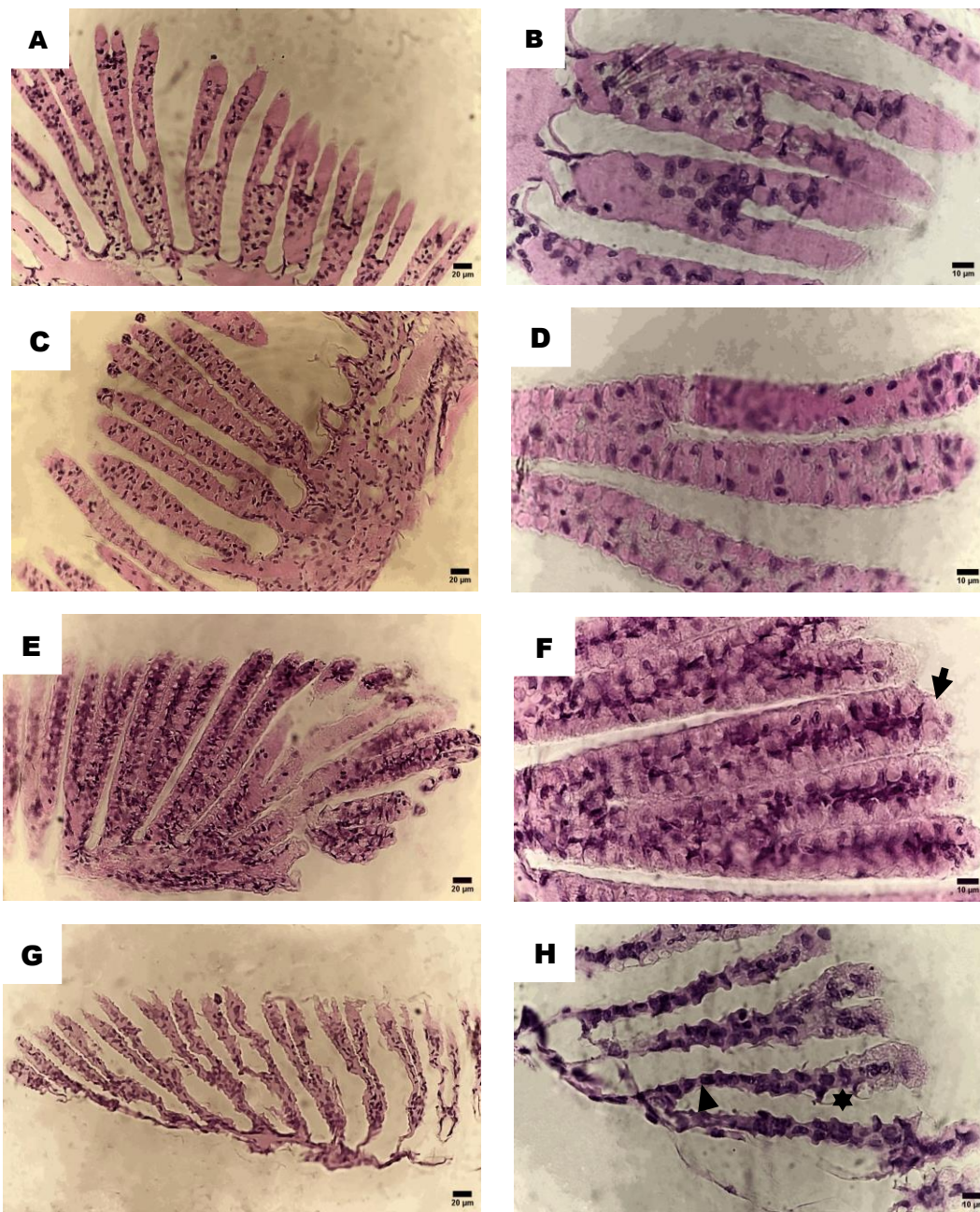


Figura 6. Cambios histológicos en branquias de *Penaeus vannamei* a 30 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad. A) Estructura histológica de branquia del grupo control (x 40, escala = 20 μ m). **B)** Estructura histológica de branquia del grupo control (x 100, escala = 10 μ m). **C)** Estructura histológica de branquia de T200 (x 40, escala = 20 μ m). **D)** Estructura histológica de branquia de T200 (x 100, escala = 10 μ m). **E)** Estructura histológica de branquia de T300 (x 40, escala = 20 μ m). **F)** Estructura histológica de branquia de T300. Los filamentos presentan una hipertrofia celular, se observa un aumento del volumen de células (flecha) (x 100, escala = 10 μ m). **G)** Estructura histológica de branquia de T400 (x 40, escala = 20 μ m). **H)** Estructura histológica de branquia de T400. Se observa una atrofia (cabeza de flecha) y pérdida de la estructura (asterisco) del filamento branquial (x 100, escala = 10 μ m).

A los 14 días de la exposición, ninguna diferencia estadística fue observada entre T120 y T200 para los parámetros morfométricos en branquias, ni para el ancho con mayor longitud entre los grupos experimentales. T300 presentó valores significativamente mayores del ancho con mayor longitud y del ancho de base con relación a los demás grupos experimentales ($P < 0.05$). Por otro lado, T400 presentó valores significativamente mayores del largo en relación al T120 y T200, presentando una tendencia de incremento del T300 para el T400 (Tabla 4).

Tabla 4. Valores medios $\pm$ desviación estándar de las medidas de los filamentos branquiales de *Penaeus vannamei* en μm a los 14 días de exposición. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.

Medidas (μm)	T-120	T-200	T-300	T-400
Largo	165 $\pm$ 10.1 ^{bc}	136 $\pm$ 4.3 ^c	190 $\pm$ 20.4 ^{ab}	226 $\pm$ 19.2 ^a
AML	29 $\pm$ 2.5 ^b	31 $\pm$ 6.8 ^b	44 $\pm$ 2.5 ^a	27 $\pm$ 6.0 ^b
AMEL	15 $\pm$ 2.5	15 $\pm$ 1.7	18 $\pm$ 2.9	15 $\pm$ 5.1
AB	17 $\pm$ 4.9 ^b	23 $\pm$ 3.3 ^b	33 $\pm$ 1.4 ^a	18 $\pm$ 2.7 ^b

AML= ancho con mayor longitud; AMEL= ancho con menor longitud; AB= ancho de base.

A los 30 días de la exposición, tampoco se observaron diferencias significativas entre T120 y T200. Para T300, solo el ancho con menor longitud fue significativamente mayor con respecto al T120 y a T400. T400 presentó valores significativamente menores del ancho con mayor longitud y ancho de base con respecto a los otros grupos experimentales. Para el largo, T400 presentó menores valores en comparación con T120 y T200, no presentando diferencia significativa en relación a T300, los cuales presentaron una tendencia inversa a lo observado a los 14 días (Tabla 5).

Tabla 5. Valores medios $\pm$ desviación estándar de las medidas de los filamentos branquiales de *Penaeus vannamei* en μm a los 30 días de exposición. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.

Medidas (μm)	T-120	T-200	T-300	T-400
Largo	239 $\pm$ 22.6 ^a	243 $\pm$ 19.4 ^a	230 $\pm$ 19.7 ^{ab}	184 $\pm$ 13.0 ^b
AMA	44 $\pm$ 1.1 ^a	48 $\pm$ 8.0 ^a	46 $\pm$ 3.5 ^a	20 $\pm$ 0.2 ^b
AMEA	14 $\pm$ 0.5 ^{bc}	19 $\pm$ 2.3 ^{ab}	24 $\pm$ 4.8 ^a	6 $\pm$ 1.7 ^c
AB	26 $\pm$ 1.8 ^a	31 $\pm$ 2.2 ^a	30 $\pm$ 5.6 ^a	12 $\pm$ 2.7 ^b

AML: ancho con mayor longitud; AMEL: ancho con menor longitud; AB: ancho de base.

2.7.3.2 Hepatopáncreas

Para el T120 no se observaron cambios en los túbulos hepatopancreáticos a los 14 y 30 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad. Para T200 se observó desprendimiento de células epiteliales a los 14 días. T300 presentó daño de la membrana basal a los 14 días. En T400 se observaron daños de la membrana basal a los 14 y 30 días. A los 14 días, los camarones de este tratamiento presentaron una ampliación del lumen tubular y disminución significativa de células fibrilares (F) y residuales (R), lo que se observó en menor grado a los 30 días. En T400 se observó un aumento del volumen de células vesiculares (B) aún a los 30 días de exposición (Figura 7) (Tabla 6).

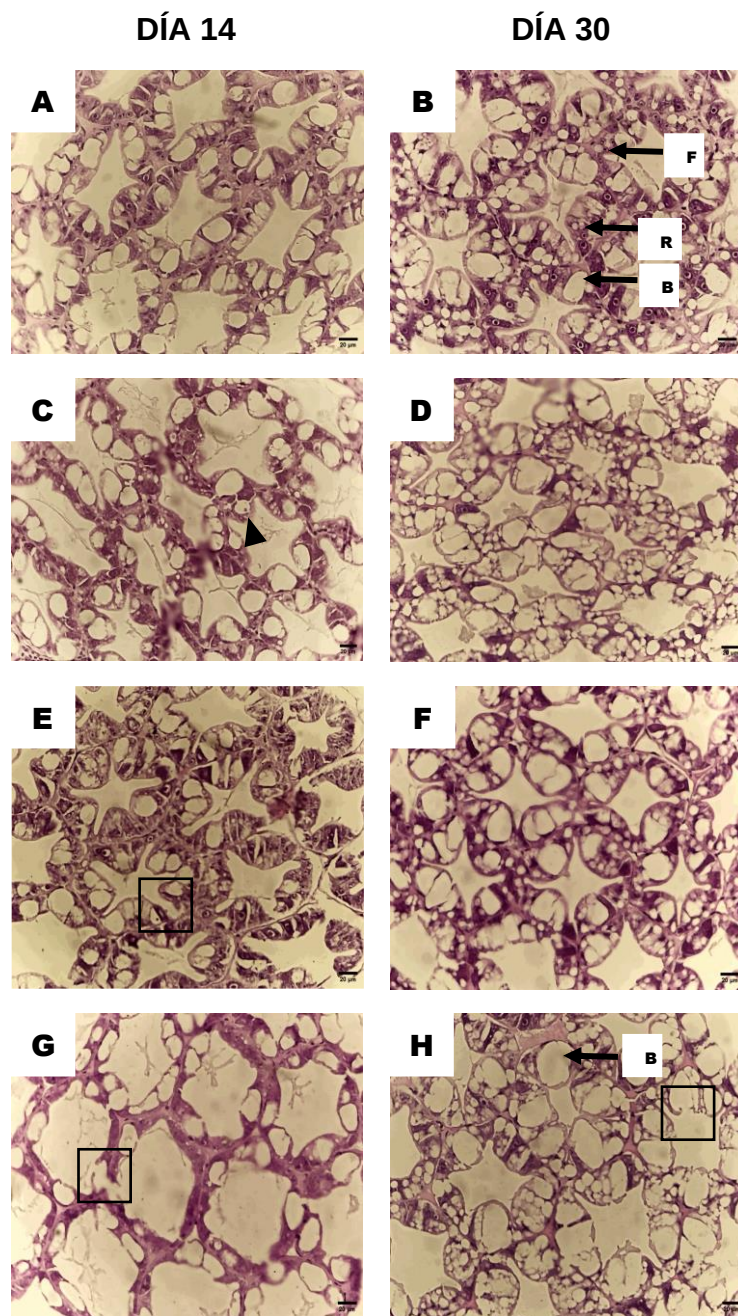


Figura 7. Cambios de la estructura histológica de hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de alcalinidad. A) Estructura histológica del hepatopáncreas del grupo control a 14 días de exposición. **B)** Estructura histológica del hepatopáncreas del grupo control a 30 días de exposición. Células vesiculares (B), células fibrilares (F) y células residuales (R). **C)** Estructura histológica del hepatopáncreas de T200 a 14 días de exposición. Desprendimiento de célula epitelial (cabeza de flecha). **D)** Estructura histológica del hepatopáncreas de T200 a 30 días de exposición. **E)** Estructura histológica del hepatopáncreas de T300 a 14 días de exposición. Daño de membrana basal (cuadro). **F)**

Estructura histológica del hepatopáncreas de T300 a 30 días de exposición. **G)** Estructura histológica del hepatopáncreas de T400 a 14 días de exposición. Daño de membrana basal (cuadro). Expansión de lumen tubular y disminución de células R y F. **H)** Estructura histológica del hepatopáncreas de T400 a 30 días de exposición. Aumento del volumen de células B (flecha) y daño de la misma (cuadro) (x 40, escala = 20 μ m).

A los 14 días, no se presentaron diferencias significativas en el área de las células B entre los grupos experimentales, mientras que el T400 presentó un aumento significativo con respecto a los demás grupos en el día 30. Para el área de las células R, en el día 14 se presentó una diferencia significativa en el T200 y el T120 con respecto a T300 y T400, siendo el área de dichas células menor en estos últimos. En el día 30, el área de las células R fue significativamente menor en el T400 con respecto a T300 y el T120, no presentando diferencias significativas con T200 (Tabla 6).

Tabla 6. Valores medios $\pm$ desviación estándar de las medidas del área de células vesiculares (B) y residuales (R) de *Penaeus vannamei* a los 14 y 30 días de exposición a diferentes concentraciones de alcalinidad. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas encontradas en los tratamientos.

Tratamientos	T-120	T-200	T-300	T-400
ACB (μ m)				
Día 14	397 $\pm$ 115	444 $\pm$ 142	331 $\pm$ 704	432 $\pm$ 141
Día 30	432 $\pm$ 169 ^b	473 $\pm$ 287 ^b	488 $\pm$ 175 ^b	901 $\pm$ 302 ^a
ACR (μ m)				
Día 14	23.12 $\pm$ 4.58 ^a	27.36 $\pm$ 6.52 ^a	11.84 $\pm$ 2.97 ^b	6.70 $\pm$ 3.28 ^b
Día 30	32.91 $\pm$ 10.01 ^a	26.04 $\pm$ 5.07 ^{ab}	31.42 $\pm$ 8.87 ^a	13.05 $\pm$ 2.67 ^b

ACB= área de células B, ACR= área de células R.

2.8 Discusión

La alcalinidad se mantuvo acorde al diseño experimental, con los cuatro grupos de concentraciones estadísticamente diferentes: 119 $\pm$ 4.25, 200 $\pm$ 6.65, 300 $\pm$ 4.53 y 400 $\pm$ 7.43 mg/L para los tratamientos T120, T200, T300 y T400, respectivamente. En relación

con los demás parámetros, solo el pH presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales, presentando el T400 el mayor valor promedio (8.20 ± 0.04). Este también es un resultado esperado, ya que por lo general hay una relación proporcional positiva entre alcalinidad y pH (Addy et al., 2004). Esta relación se da debido a que cuando se añade una base a una solución, se incrementa la concentración de iones de carbonato y bicarbonato, los cuales pueden neutralizar más iones de H^+ disminuyendo la acidez, lo que equivale a un aumento en el pH (Boyd et al., 2011).

Aunque el pH registrado en el T400 estuvo dentro del recomendado para la fase de engorda de camarón (Van Wyk et al., 1999), este parámetro pudiera haber afectado el equilibrio entre el NH_3 y NH_4^+ . Sin embargo, siguiendo la tabla presentada por Van Wyk et al. (1999), donde se muestra la proporción de la forma no ionizada, que es la más tóxica, en el NAT con relación al pH y la temperatura, se obtiene que en este estudio se mantuvo una concentración promedio estimada de NH_3 inferior al límite considerado seguro para camarón (≤ 0.03 mg/L) (Tabla 1). Además del pH y NH_3 , todos los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los rangos recomendados para la fase de engorda de camarón (Van Wyk et al., 1999; Venkateswarlu et al., 2019). Por lo anterior, es posible inferir que los resultados obtenidos en el presente trabajo estén relacionados principalmente a las concentraciones de alcalinidad.

El crecimiento y la supervivencia de los camarones no se vieron afectados por las diferentes concentraciones de alcalinidad, presentando el T200 una tendencia de mayor ganancia de peso (3.72 ± 0.71 g). Estos resultados coinciden con lo anteriormente reportado por Maicá et al. (2018) para postlarvas de *P. vannamei* cultivadas durante tres días en agua clara y biofloc donde no se observaron diferencias en la supervivencia y se

obtuvo la mayor ganancia de peso en ambos sistemas (0.45 ± 0.06 g y 0.49 ± 0.07 g, respectivamente) en la concentración de 200 mg/L. En juveniles, Sakthivel et al. (2014) observaron mayor ganancia de peso (8 ± 0.14 g) en alcalinidad de 250 mg/L después de 48 días de cultivo en sistema biofloc. En otro trabajo también con juveniles cultivados por 45 días en biofloc, Furtado et al. (2015) reportaron una mayor ganancia de peso de camarones en alcalinidad de 300 mg/L (5.24 ± 0.42 g). En la literatura, se reporta incluso el cultivo de camarón por 94 días a concentraciones de alcalinidad más altas (i.e., 450 mg/L) sin comprometer su crecimiento (Miranda et al., 2010). Con base en estos resultados y en los encontrados en el presente trabajo, en un primer momento se podría concluir que los camarones son capaces de sobrevivir y crecer cuando son cultivados a altas concentraciones de alcalinidad (e.g., 300 y 450 mg/L). Sin embargo, Duan et al. (2023) reportaron una reducción de la ganancia de peso en juveniles mantenidos en agua clara por 14 días en concentraciones de alcalinidad de 200 y 320 mg/L (0.70 y 0.50 g, respectivamente), además de observar una disminución en la supervivencia en las mismas concentraciones. Por lo anterior, es necesario realizar más investigaciones para comprender los efectos del estrés alcalino no sólo en el crecimiento, sino en las demás respuestas fisiológicas del camarón.

Aunque no hubo diferencias estadísticas en la supervivencia entre los grupos experimentales, es importante destacar que los valores estuvieron por debajo de lo esperado. Estos bajos valores fueron registrados incluso en el control, en el cual se mantuvo una alcalinidad de 120 mg/L, por lo que no hay indicios de que este resultado esté relacionado con las concentraciones de alcalinidad. La alta mortalidad registrada durante el experimento probablemente estuvo relacionada a la aclimatación de los

animales a las condiciones experimentales. Como se demuestra en la Fig. 1, una mortalidad entre 40 y 60% se presentó apenas en los primeros siete días experimentales, la cual se redujo a partir de la segunda semana. Como fue descrito anteriormente, los camarones utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos de otro laboratorio de investigación y transferidos al IIO-UABC. Después de la transferencia, se realizó una semana de aclimatación previa al experimento; sin embargo, se infiere que habría sido necesario de una semana adicional para la aclimatación completa de los camarones.

Además de los efectos en crecimiento y supervivencia discutidos anteriormente, en el presente trabajo se evaluaron los cambios histológicos en branquias y hepatopáncreas de los camarones expuestos a diferentes concentraciones de alcalinidad. En branquias, se observaron cambios histológicos en la morfología a los 14 días, presentando un aumento de la severidad en la hipertrofia de los filamentos branquiales, que comenzó menos severo en los 200 mg/L alcanzando su máximo a los 300 mg/L, donde se observó una hipertrofia celular más evidente. Dicha hipertrofia estuvo acompañada de un aumento significativo del AML y AB en T300 (Tabla 4). El incremento del área de superficie es una compensación fisiológica conocida como compromiso osmorespiratorio en donde se maximiza la absorción del oxígeno y se aumenta la difusión de iones durante un desafío metabólico, ya que la difusión de iones es proporcional al área de superficie e inversamente proporcional a la distancia de difusión (Zimmer y Perry, 2022). Resultados similares fueron reportados previamente por Ge et al. (2023) para *E. carinicauda* donde observaron un aumento en el volumen de las vacuolas de los nefrocitos branquiales y células pilares alargadas, acompañados de un incremento en la osmolalidad y el pH de

la hemolinfa en las primeras 48 horas de estrés por alcalinidad, que posteriormente fueron decreciendo gradualmente tendiendo a estabilizarse.

Indicios de un proceso de hipertrofia fueron observados en T200 y T300 a los 30 días, demostrándose por los valores de AML y del AB de los filamentos estadísticamente iguales al control (Tabla 5). Estos resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los camarones de T200 y T300 pudieron hacer frente al estrés al aumentar el área de superficie de sus branquias para compensar el desequilibrio provocado por la alcalinidad, sin comprometer la integridad de los filamentos branquiales. Estos son resultados novedosos ya que no hay demostración de los cambios histológicos por estrés alcalino en *P. vannamei* después de los 14 días disponibles en la literatura (Duan et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Un patrón diferente al observado en T200 y T300 fue el registrado T400, en donde desde los 14 días ya se observaron rupturas de los filamentos, sin indicios de recuperación a los 30 días. Los datos morfométricos, en particular de largo a los 14 días (Tabla 4), son un indicio de que los camarones de este tratamiento sufrieron un incremento del área de las branquias intentando recuperar la homeostasis, tal como se mencionó anteriormente para T200 y T300. Sin embargo, es posible sugerir que, al contrario de los demás tratamientos, en T400 los camarones no fueron capaces de mantener el compromiso osmorespiratorio a los 14 días, resultando en la ruptura de la estructura branquial, histológicamente demostrada por una destrucción notable de los filamentos branquiales, por la presencia de necrosis y por la pérdida de las células pilares que forman la estructura de soporte de las branquias. Rupturas como las observadas en este trabajo, por lo general, son asociadas al bloqueo de iones y al aumento de la presión osmótica

intracelular, ocasionando una posible disminución de la actividad de enzimas transportadoras de iones, mientras la pérdida celular puede ocasionar una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (Freire et al., 2008; Zhang et al., 2023). Esto podría explicar por qué no se observaron indicios de recuperación de las branquias en T400 luego de 30 días, donde se observó una atrofia de los filamentos, observándose valores menores en los parámetros morfométricos obtenidos en este tratamiento en comparación con los demás grupos experimentales (Tabla 5). Zhang et al. (2023) también reportaron filamentos atrofiados en camarones mantenidos a 350 mg/L, lo que posiblemente está asociado a la pérdida de las células pilares alterando la morfología de la estructura.

En el hepatopáncreas también se observó una severidad progresiva a los 14 días de exposición con las crecientes concentraciones de alcalinidad. En T200 apenas se presentó un ligero desprendimiento celular, mientras que en T300 fueron observados daños en la membrana basal y disminución del volumen de las células R. Daños más severos en la estructura tubular y el espacio intratubular, además de la reducción en número y volumen de las células R se presentaron en T400. Descripciones de cambios histológicos en el hepatopáncreas de crustáceos como resultado de la alta concentración de alcalinidad han sido reportados con más frecuencia para exposiciones agudas. Por ejemplo, en *E. carinicauda* mantenidos por 72 horas a 320 mg/L se presentaron daños muy severos en el hepatopáncreas, tales como alteración de la morfología normal y separación entre los túbulos hepatopancreáticos, así como necrosis en las células R y B (Li et al., 2024). Zhang et al. (2023), al exponer juveniles de *P. vannamei* a 350 mg/L por 24 horas, observaron necrosis parcial de los túbulos y ruptura de la membrana basal. En

una exposición crónica, Duan et al. (2023) reportaron una atrofia de los túbulos a los 14 días de exposición de juveniles a una concentración de 320 mg/L. Es importante recalcar que los daños reportados en los trabajos mencionados anteriormente se han presentado siempre en concentraciones superiores a 300 mg/L, tanto en exposiciones agudas como crónicas. Por lo que los resultados de este trabajo corroboran que, por arriba de esta concentración, los efectos del estrés alcalino son más severos a nivel histológico.

Los daños más severos observados en T400 posiblemente son resultados de un desequilibrio en el metabolismo del hepatopáncreas como fue sugerido por Duan et al. (2023). Estos autores reportaron que, bajo un estrés alcalino crónico (14 días), el transporte transmembrana de sustancias se vio afectado, alterando la desintoxicación de juveniles de *P. vannamei*. La glándula del intestino medio juega un papel importante en la desintoxicación de los crustáceos, en particular las células R son las encargadas de almacenar y reciclar subproductos tóxicos de la digestión con el fin de evitar acumulación y, por ende, daños a otros órganos (Zhang et al., 2017; Yohana et al., 2023). En el presente trabajo, la hipótesis de que los daños observados a los 14 días están relacionados a la pérdida de capacidad de desintoxicación es corroborada por la reducción significativa del volumen de células R registrada en T300 y T400 en comparación con los demás grupos experimentales.

A los 30 días, el hepatopáncreas mostró una recuperación en todas las concentraciones. En T300, dicha recuperación se demostró por el aumento del volumen de las células R, al ya no presentar diferencias con el control y T200. En T400, aunque se observaron indicios de una recuperación, tal como la tendencia de restauración de la forma normal de la estructura de los túbulos hepatopancreáticos, las células R siguieron presentando

un volumen menor con respecto al control. Además de no observarse una recuperación del volumen de las células R, en el T400 se presentó un aumento en el volumen de las células B a los 30 días en comparación con los demás grupos. Las células B son las encargadas de la secreción de enzimas digestivas, las cuales pueden sufrir hipertrofia cuando el camarón está bajo estrés como una compensación para optimizar la asimilación de nutrientes y, por ende, generar la energía necesaria para hacer frente al estrés (Fernández et al., 2008; Yohana et al., 2023). Por lo anterior, en el presente trabajo se demuestra que los camarones mantenidos en T400 no fueron capaces de recuperar los daños histológicos en el hepatopáncreas a los 30 días de exposición. Al contrario, siguieron presentando cambios que sugieren la continuidad del estrés alcalino, a diferencia de aquellos mantenidos en T300, que presentaron signos de una recuperación más pronunciada.

En este trabajo se observaron cambios en branquias y hepatopáncreas más evidentes a partir de los 300 mg/L. Sin embargo, en T300 se observaron apenas cambios caracterizados como una compensación fisiológica, restaurando la estructura normal de ambos tejidos a los 30 días. Por otro lado, en T400 ambos tejidos presentaron daños, siendo apenas parcial la recuperación del hepatopáncreas, mientras que en las branquias los daños siguieron progresando. Shi et al. (2023) demostraron que el estrés por alcalinidad (350 mg/L) inhibe la oxidación de ácidos grasos, que son componentes indispensables de la membrana celular. A su vez, se sabe que alteraciones de la misma pueden afectar la capacidad de osmorregulación del organismo (Li et al., 2017), siendo posible que los cambios en ambos tejidos encontrados en el presente trabajo estén de alguna manera relacionados. De ser así se hipotetiza, con base en los resultados de los

tejidos evaluados en el presente trabajo, que la recuperación de los daños causados por el estrés alcalino podría empezar por el sistema digestivo. Por otro lado, en este trabajo no fue posible determinar el tiempo necesario para la completa recuperación de los daños causados por la concentración de alcalinidad en T400, así que se hacen necesarias más investigaciones para comprender el proceso de recuperación de daños histológicos en diferentes tejidos de camarón.

Capítulo 3: Conclusión y Perspectivas a futuro

En conclusión, las altas concentraciones de alcalinidad no comprometieron el crecimiento ni la supervivencia de juveniles de *P. vannamei*. Sin embargo, a concentraciones de 200 y 300 mg/L se observaron cambios que caracterizan una compensación fisiológica para enfrentar el estrés ambiental, mientras que a 400 mg/L ya se observaron daños en este tejido. Estos efectos del estrés alcalino se observaron a los 14 días, pero a los 30 días los cambios observados a 200 y 300 mg/L se revirtieron en branquias y hepatopáncreas, mientras que a 400 mg/L estos siguieron progresando. Por lo anterior, es posible concluir que los cambios histológicos causados por el estrés alcalino son dosis y tiempo dependiente.

Aunque el crecimiento y la supervivencia no se vieron afectados, los cambios ocasionados en las branquias, el principal órgano de osmorregulación, recalcan la necesidad de evaluar los efectos del estrés alcalino en otros tejidos relacionados a este proceso, tal como la glándula antenal. Así mismo, los cambios observados en el hepatopáncreas dan un indicio de cómo el sistema digestivo es afectado por la calidad de agua, por lo que se sugiere evaluar también los efectos en otros órganos relacionados con la nutrición, tal como el intestino. Algo muy interesante observado en el presente trabajo fueron los signos de recuperación a los 30 días, por lo que se hace necesario estudiar cómo se da esta recuperación, determinando dónde y cuándo empieza este proceso. Además, se demostraron indicios de que *P. vannamei* realiza estrategias para poder enfrentar desafíos metabólicos. Por lo que se sugiere el uso de las herramientas ómicas y bioinformáticas, en particular la transcriptómica para determinar biomarcadores moleculares relacionados con el metabolismo, la osmorregulación, la inmunología, el

estrés oxidativo, etc. con el fin de comprender mejor la compensación fisiológica para enfrentar el estrés alcalino.

Bibliografía

- Addy, K., Green, L., Herron, E., 2004. pH and Alkalinity. Rhode Island, USA
www.uri.edu/ce/wq/has/html/has_wellfacts.html
- Alday-Sanz, V., 2010. The shrimp book. Nottingham University Press.
https://books.google.com/books/about/The_Shrimp_Book.html?hl=es&id=eLqxAwAAQB
AJ
- APHA (American Public Health Association). (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. (Washington, DC, 1496 pp).
- Bauer, R. T. (2023). Shrimps: their Diversity, Intriguing Adaptations and Varied Lifestyles (Springer, Vol. 42). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-031-20966-6>
- Boyd, C. E., Tucker, C. S., and Somridhivej, B. (2016). Alkalinity and Hardness: Critical but Elusive Concepts in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 6–41.
<https://doi.org/10.1111/jwas.12241>
- Boyd, C. E., Tucker, C. S., Viriyatum, R. (2011). Interpretation of pH, acidity, and alkalinity in aquaculture and fisheries. *North American Journal of Aquaculture*, 73(4), 403–408.
<https://doi.org/10.1080/15222055.2011.620861>
- Ceccaldi, J., Franco-Japonaise, M. and Chiyoda-Ku, S., (1989). Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. In *Advances in Tropical Aquaculture* (Vol. 9).
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L., and Giffard-Mena, I. (2014). Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*, 422–423, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.034>

- Dall, W., Hill, B., Rothlisberg, P., and Sharples, D. (1990). The biology of the Penaidae. Advances in marine Biology 27. Academy Press, New York.
- Domènech, X., Peral, J. (2012). Química ambiental de sistemas terrestres. Editorial Reverté, España.
- Duan, Y., Xing, Y., Zhu, X., Li, H., Wang, Y., Nan, Y. (2023). Integration of transcriptomic and metabolomic reveals carbonate alkalinity stress responses in the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*. Aquatic Toxicology, 260, 106569. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106569>
- FAO. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro- Oriental (Vol. 1).
- FAO., 2023. China becomes the world's top shrimp importer | GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1633618/>
- FAO., 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture. In The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- Fehsenfeld, S., and Weihrauch, D. (2017). Acid–Base Regulation in Aquatic Decapod Crustaceans. In Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates (pp. 151–191). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0_6
- Fernandes, A., Josende, M., Nascimento, J., Santos, A., Sahoo, S., Da Silva, F., Romano, L., Furtado, C., Wasielesky, W., Monserrat, J., and Ventura-Lima, J. (2017). Exposure to few-layer graphene through diet induces oxidative stress and histological changes in the marine shrimp: *Litopenaeus vannamei*. Toxicology Research, 6(2), 205–214. <https://doi.org/10.1039/c6tx00380j>

- Fernández, A., Díaz, A., Velurtas, S., Petriella, A., Fenucci, J. (2008). Effects of different dietary vitamin A levels in the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda, Solenoceridae). In *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3).
- Foster, C., y Howse, H. (1978). A morphological study on gills of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Tissue and Cell*, 10(1), 77–92.
- Freire, C., Onken, H., McNamara, J., (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. In *Comparative Biochemistry and Physiology. A Molecular and Integrative Physiology*. Elsevier, 151(3), pp. 272–304.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.008>
- Furtado, P., Poersch, L., Wasielesky, W., (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321(1–2), 130–135.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034>
- Furtado, P., Poersch, L., Wasielesky, W., (2015). The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*, 23(1), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9819-x>
- Garza de Yta, A., Rouse, D., Davis, D., (2004). Influence of nursery period on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* under pond production conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(3), 357–365. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00099.x>
- Ge, Q., Wang, J., Li, J., Li, J. (2023). Effect of high alkalinity on shrimp gills: Histopathological alternations and cell specific responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 256.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114902>

- Godínez-Siordia, D., Chávez-Sánchez, M., and Gómez-Jiménez, S. (2011). Acuicultura epicontinental del camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 14(1), 55–62. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915703004>
- Gutiérrez-Vera, J.A.; Ponce-Rivas, E.; Braga, A.; Paniagua-Chávez, C.G.; Alfaro-Montoya, J.; Rosales-Leija, M. Evidence of the Existence of Site-Specific Female Contact Pheromones Involved in the Sexual Interaction Behavior of the Pacific Whiteleg Shrimp *Penaeus vannamei*. *Animals* 2024, 14, 1523. <https://doi.org/10.3390/ani14111523>
- Henry, R. P., Lucu, Č., Onken, H., & Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>
- INAPESCA (Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura). (2018). Acuicultura Camarón blanco del Pacífico. Instituto Mexicano de Investigación En Pesca y Acuicultura Sustentable. México. <https://www.gob.mx/imipas/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Lara, G., Hostins, B., Bezerra, A., Poersch, L., Wasielesky, W. (2017). The effects of different feeding rates and re-feeding of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc culture system. *Aquacultural Engineering*, 77, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.02.003>
- Li, E., Wang, X., Chen, K., Xu, C., Qin, J. G., Chen, L. (2017). Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture* 9(1) pp. 57–75. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12104>

- Li, W., Wang, J., Li, J., Liu, P., Fei, F., Liu, B., Li, J. (2024). The effect of astaxanthin on the alkalinity stress resistance of *Exopalaemon carinicauda*. Science of The Total Environment, 917, 170415. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170415>
- Lin, T., Lai, Q., Yao, Z., Lu, J., Zhou, K., Wang, H. (2013). Combined effects of carbonate alkalinity and pH on survival, growth and haemocyte parameters of the Venus clam *Cyclina sinensis*. Fish and Shellfish Immunology, 35(2), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.006>
- Maicá, P., Furtado, P., Martins, Á., Miranda Filho, K., Wasielesky Junior, W. (2018). Effect of alkalinity on food consumption of Juvenile pacific white shrimp reared in clear water and biofloc system. Boletim Do Instituto de Pesca, 44(2). <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.222>
- Manahan, S. E. (2006). Introducción a la química ambiental (1a ed.), Editorial Reverté, España.
- Mescher, A. (2013). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition. Estados Unidos: McGraw-Hill Education.
- Miranda, I., Valles, J., Sánchez, R., Álvarez, Z. (2010). Cultivo del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) En agua dulce. Scielo analytics pp.339-346. <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0798-2259.
- Ross, M., Pawlina, W., (2006). Histology: A Text and Atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology. Reino Unido: Lippincott Williams & Wilkins.

- Röszer, T. (2014). The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. In *Cell and Tissue Research*, 358(3) pp. 685–695. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1985-7>
- Sakthivel, A., Selvakumar, P., Gopalakrishnan, A. (2014). Effect of mineral deposition on shrimp *Litopenaeus vannamei* in high alkaline water of pennar river, Andhra Pradesh of southeast coast of India. *Aquaculture Research and Development*, 5(4). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000241>
- Shi, X., Zhang, R., Liu, Z., Sun, J., Li, L., Zhao, G., Lu, J. (2023). Combined analysis of mRNA and miRNA reveals the mechanism of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under acute alkalinity stress. *PLOS ONE*, 18(8), e0290157. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0290157>
- Song, Z., Li, K., & Li, K. (2024). Integrated characterizations of intestinal bacteria and transcriptomics revealed the acute stress response to carbonate alkalinity in white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 146, 109420. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109420>
- Soni R., Chandra S., Morales-Oyervides L., and Fouillaud M. (2023). Current Status of Marine Water Microbiology. In *Current Status of Marine Water Microbiology*. Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-99-5022-5>
- Van Wyk, P. M., Bros, W. Z., Scarpa, J. (1999). Farming marine shrimp in recirculating fresh water systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee. <https://www.researchgate.net/publication/242621708>

- Velasquez-Lopez, P. (2001). Low-salinity, inland shrimp culture in Brazil and Ecuador economic, disease issues move farms away from coasts. THE ADVOCATE, 3(4), 62–64. <https://www.researchgate.net/publication/320893036>
- Venkateswarlu, V., Sessaiah, P., Arum, P., Behra, P. (2019). A study on water quality parameters in shrimp *Litopenaeus vannamei* semi-intensive grow out culture farms in coastal districts of Andhra Pradesh, India. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 7(4), 394–399.
- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H., and Cheng, Y. (2014). Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: Gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. PLoS ONE, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084921>
- Yao, Z., Zhou, K., 2010. Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post-larval *Litopenaeus vannamei*. Chinese Journal of Ecology 29(5):945 -950 <https://www.researchgate.net/publication/265381406>
- Yohana, M., Ray, G., Yang, Q., Tan, B., Chi, S., Lin, H., Mao, M., Yi, Y. (2023). Implications of dietary soybean meal replacement with corn gluten meal on growth performance, antioxidant activities, hepatopancreatic histopathology, and intestinal flora of juvenile Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Reports, 33. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101821>
- Yu, Q., Xie, J., Huang, M., Chen, C., Qian, D., Qin, J. G., Chen, L., Jia, Y., and Li, E. (2020). Growth and health responses to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Reports, 16. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100280>

- Zhang, K., Pan, L., Chen, W., Wang, C. (2017). Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture Research*, 48(3), 1194–1208. <https://doi.org/10.1111/are.12961>
- Zhang, R., Shi, X., Guo, J., Mao, X., & Fan, B. (2024). Acute stress response in hepatopancreas of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to high alkalinity. *Aquaculture Reports*, 35, 101981. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2024.101981>
- Zhang, R., Shi, X., Liu, Z., Sun, J., Sun, T., Lei, M. (2023). Histological, Physiological and Transcriptomic Analysis Reveal the Acute Alkalinity Stress of the Gill and Hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology*, 25(4), 588–602. <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10228-1>
- Zhao, W., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Wang, M., Yang, G., Qi, C., & Wang, B. (2017). Transcriptome, antioxidant enzyme activity and histopathology analysis of hepatopancreas from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed with aflatoxin B1(AFB1). *Developmental and Comparative Immunology*, 74, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.031>
- Zimmer, A., Perry, S., 2022. Physiology and aquaculture: A review of ion and acid-base regulation by the gills of fishes. *Fish and Fisheries*, 23(4), 874–898. <https://doi.org/10.1111/faf.12659>