

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

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA  
COSTERA**



**TESIS**

**“VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MODULACIÓN DE  
NEUROTRANSMISORES COMO HERRAMIENTA PARA LA  
REPRODUCCIÓN INDUCIDA EN CAMARONES PENEIDOS”**

**PRESENTA**

**JORGE VLADIMIR ALVAREZ MONTOYA**

Ensenada, Baja California, México, Junio del 2025

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

“VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MODULACIÓN DE  
NEUROTRANSMISORES COMO HERRAMIENTA PARA LA  
REPRODUCCIÓN INDUCIDA EN CAMARONES PENEIDOS”

T E S I S

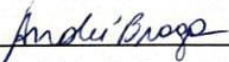
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS  
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA  
COSTERA


Presenta

JORGE VLADIMIR ALVAREZ MONTOYA

Aprobada por:

  
Dr. André Luiz Braga de Souza  
Director de tesis

  
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Codirector

  
Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza  
Sinodal

  
Dra. Sheila Castellanos Martínez  
Sinodal

## RESUMEN

La modulación de neurotransmisores se ha propuesto como una alternativa eficiente a la ablación del pedúnculo ocular (APO) para inducir la maduración ovárica y estimular la espermatogénesis en *Penaeus vannamei*. Sin embargo, su impacto en el comportamiento, hematología y calidad espermática se desconoce. Este estudio evaluó los cambios conductuales en hembras de *P. vannamei* antes y después de la inyección de neurotransmisores, así como los efectos hematológicos y parámetros de calidad espermática en machos tras su aplicación. Se realizaron dos bioensayos para evaluar los efectos de la modulación de neurotransmisores. En el Bioensayo 1, se seleccionaron 12 hembras divididas en dos grupos: uno tratado con serotonina y espiperona (5-HT/SPY) y otro solo con serotonina (5-HT). Cada organismo fue aclimatado individualmente y grabado antes y después de la aplicación del tratamiento, con un periodo total de observación de 80 minutos, incluyendo la oferta de alimento. Los videos fueron analizados mediante etogramas para registrar comportamientos y cambios morfológicos. En el Bioensayo 2, se trabajó con machos distribuidos en cuatro grupos: 5-HT/SPY, 5-HT, vehículo (etanol 95% y solución salina) y control. Los tratamientos se aplicaron cada 14 días y, tres horas después, se colectó hemolinfa para analizar el tiempo de coagulación, el conteo total y diferencial de hemocitos, por un periodo de siete semanas. Además, se evaluaron parámetros de calidad espermática al inicio y al final del experimento, incluyendo el peso del espermátforo, la melanosis, el conteo total de espermatozoides y su mortalidad. En el Bioensayo 1 se realizó un ANOVA para comparar los tiempos comportamentales entre tratamientos y una prueba de Fisher para evaluar su relación ( $p < 0.05$ ), se calculó el eta cuadrado ( $\eta^2$ ) como medida del tamaño del efecto. En el bioensayo 2, se realizó 2-ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ). En el bioensayo 1, ambos tratamientos provocaron cambios significativos en los patrones respecto al control, presentando desplazamiento errático, flexión abdominal, pérdida de equilibrio y pigmentación anormal rojiza en los apéndices. Se observó una relación significativa entre el tratamiento y la flexión abdominal y coloración de los apéndices ( $\eta^2 > 0.14$ ). En los machos, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de coagulación ni en el CTH. El CDH no cambió en los tratamientos 5-HT/SPY y 5-HT, pero sí por el tratamiento VEH, que presentó incremento de hemocitos granulares y disminución de hialinos. Además, se observó una tendencia de aumento en el número de espermatozoides con los tratamientos de neurotransmisores, mientras que el VEH aumentó la tasa de melanosis. Estos hallazgos demuestran que la inyección de neurotransmisores genera cambios en el comportamiento, modifica la composición celular de la hemolinfa y estimula la espermatogénesis en *P. vannamei*, respaldando su potencial como una técnica alternativa a la APO.

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica de la biología del camarón blanco del Pacífico .....	11
<i>Penaeus vannamei</i> .....	11
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	11
Características generales de <i>Penaeus vannamei</i> .....	11
Camaronicultura .....	13
BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Penaeus vannamei</i> .....	14
Neuroendocrinología.....	14
Sistema reproductivo .....	17
Reproducción inducida de <i>Penaeus vannamei</i> .....	18
Ablación del pedúnculo ocular (APO).....	19
MADURACIÓN SEXUAL.....	21
Desarrollo testicular y espermatogénesis.....	21
Calidad espermática .....	26
Reproducción en condiciones de laboratorio.....	26
Alternativas para el mejoramiento reproductivo de <i>Penaeus vannamei</i> .....	27
ANTECEDENTES.....	28
Efectos de la aplicación de serotonina y espiperona en la reproducción inducida de <i>Penaeus vannamei</i> .....	28
POLÍTICAS DE BIENESTAR ANIMAL .....	31

CAPÍTULO 2. Artículo sometido. Revista <i>Ciencias Marinas</i> .....	32
Resumen .....	33
1.Introducción.....	34
2.Material y métodos.....	35
Bioensayo 1: Efecto de un protocolo de modulación de neurotransmisores en el comportamiento de hembras de <i>Penaeus vannamei</i> .....	36
Bioensayo 2: Efecto de un protocolo de modulación de neurotransmisores en la hematología y calidad espermática de machos de <i>Penaeus vannamei</i> .....	38
3.Resultados .....	43
4.Discusión .....	50
5.Conclusión .....	57
CAPÍTULO 3. Conclusiones generales.....	59
REFERENCIAS .....	61

## AGRADECIMIENTOS

En esta sección quiero agradecer a todas las personas y organizaciones que de manera directa e indirecta hicieron posible este trabajo:

- A la UABC y el IIO por aceptarme en su programa educativo y brindarme herramientas en mi línea de investigación,
- a CONAHCYT por su apoyo económico durante mi estancia de maestría,
- a Pabis por ser un motor clave en mi vida,
- a Caramelo, mi pequeño gatijo que siempre llena de alegría (y pelos) mi vida,
- a mis padres por apoyarme en la búsqueda de mis sueños,
- a mis hermanos por inspirarme a ser mejor en lo que hago,
- a mis grupos de amigos: “Club de Tobi”, “Los 7 pecados renacidos”, “Los chupapis muñeños”, que me han regalado valiosas memorias y aplaudido cada logro, incluso cuando estos han sido los más pequeños,
- a mi familia Moreliana que me ha enseñado a disfrutar y hacer valer mi trabajo,
- a mis amigos y compañeros de posgrado que aportaron muchas experiencias y me hicieron forjar parte de mi carácter,
- a la Sala A de posgrado por los momentos de risas, lágrimas, apoyo, diversión y fiesta que caracteriza el espíritu de Marinas,
- a mi comité de tesis: Dra. Sonia Soto, Dra. Sheila Castellanos, Dr. Jorge Alfaro, Dr. Mario Galaviz y el Dr. André Braga por confiar en mi trabajo y brindarme de su experiencia,

- a los miembros del grupo Camarón UABC: Claro, Day, Myriam, Ernesto, Alan, Hilda y Francisco que estuvieron conmigo en cada momento y me brindaron su apoyo incondicional en cada fase de mis experimentos,
- a Jorge López Calderón que siempre ha sido mi mentor académico en los momentos donde lo he necesitado y por permitirme ser su apoyo en el Laboratorio de Botánica Marina,
- a Angélica que siempre brindó un excelente seguimiento administrativo y que agilizó muchos de los trámites que permitieron una conclusión satisfactoria de mi maestría,
- a Violeta Zetzangari por su grandioso trabajo como coordinadora del posgrado en Oceanografía Costera y brindando la información necesaria para la conclusión de la maestría,
- a los investigadores del IIO y FCM que siempre me dieron consejos y mostraron un constante interés en mi formación,
- y a todos los que están visitando este trabajo, fue pensado en ustedes.

## LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Descripción de los cambios morfológicos externos para la identificación de los estados de desarrollo de la gónada en machos de <i>Penaeus vannamei</i> de acuerdo a Chang <i>et al.</i> (2024). .....	22
Tabla II. Descripción del proceso de espermatogénesis en machos de <i>Penaeus vannamei</i> adaptado de Alfaro-Montoya <i>et al.</i> (2016). .....	23
Tabla III. Fases espermatogénesis en testículos de <i>Penaeus vannamei</i> adaptado de Alfaro-Montoya (2011). .....	24
Tabla IV. Patrones observados en las hembras de <i>Penaeus vannamei</i> durante el ensayo de comportamiento, incluyendo comportamientos locomotores, de alimentación y cambios físicos. ....	38
Tabla V. Patrones conductuales y cambios morfológicos externos en hembras de <i>Penaeus vannamei</i> antes (Control) y después de la inyección de serotonina (5-HT) y serotonina y espiperona (5-HT/SPY). .....	44

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía general externa de <i>Penaeus vannamei</i> (modificado de FAO, 2024). .....	12
Figura 2. Anatomía interna de <i>Penaeus vannamei</i> (modificado de Aguilar <i>et al.</i> , 2009). .....	12
Figura 3. Regiones endocrinas encargadas de los procesos reproductivos en <i>Penaeus vannamei</i> (Tinikul <i>et al.</i> , 2011). ....	15
Figura 4. Síntesis de las vías endocrinas encargadas de los procesos reproductivos en <i>Penaeus vannamei</i> . HIG. Hormona inhibidora de la gónada. HEG. Hormona estimuladora de la gónada (Alfaro, 2001; Tinikul <i>et al.</i> , 2011). ....	16
Figura 5. Diferencias sexuales en <i>Penaeus vannamei</i> . a. Flecha amarilla señala el petasma. b. Flecha amarilla señala el télico abierto.....	17
Figura 6. Sistema reproductivo de <i>Penaeus vannamei</i> . a. LB: Lóbulos testiculares, VDP: Vaso deferente proximal, VDM: Vaso deferente medio, VDD: Vaso deferente distal y AT: Ampolla terminal. b. LA: Lóbulo anterior, LL: Lóbulo lateral, O: Oviducto y LA: Lóbulo abdominal. Modificado de Alfaro (2001) y Braga <i>et al.</i> (2013). .....	18
Figura 7. Ablación del pedúnculo ocular en <i>Penaeus vannamei</i> . ....	20
Figura 8. Frecuencia absoluta de los patrones conductuales y cambios morfológicos externos de hembras de <i>Penaeus vannamei</i> antes (control, n = 6) y después de la inyección de neurotransmisores serotonina (5-HT) y serotonina y espiperona (5-HT/SPY) durante el periodo experimental. A. Desplazamiento. B. Desplazamiento errático. C. Pérdida de equilibrio. D. Sin movimiento. E. Búsqueda de alimento. F. Flexión abdominal. G. Color en apéndices. ....	45

Figura 9. Tiempo de coagulación en segundos de machos de *Penaeus vannamei* tres horas después de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas.....46

Figura 10. Conteo total de hemocitos (CTH) de machos de *Penaeus vannamei* tres horas después de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas.....47

Figura 11. Conteo diferencial de hemocitos de machos de *Penaeus vannamei* tres horas después de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas. A. Hemocitos granulares. B. Hemocitos hialinos. Letras minúsculas desiguales describen las diferencias significativas entre células granulares ( $n = 32, p < 0.05$ ). .....48

Figura 12. Calidad espermática de machos de *Penaeus vannamei* tras la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas. A. Peso del espermatóforo. B. Melanosis (%). C. Número total de espermatozoides ( $\times 10^6$ ). D. Espermatozoides muertos (%). .....49

## **CAPÍTULO 1.** Revisión bibliográfica de la biología del camarón blanco del Pacífico

*Penaeus vannamei*.

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

#### **Características generales de *Penaeus vannamei***

El camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* es un crustáceo decápodo que presenta un cuerpo alargado longitudinalmente y comprimido lateralmente con una tonalidad blanquecina translúcida. Su tagmosis está dividida en dos regiones: cefalotórax y un abdomen. En el cefalotórax, se encuentran los ojos, las antenas, las anténulas, los apéndices bucales y los pereiópodos (IMIPAS, 2018). Mientras que el abdomen se divide en seis somites donde se localizan los pleópodos, los urópodos y el telson. Este último un espino ubicado entre cada par de urópodos en el sexto somite (Fig. 1) (IMIPAS, 2018). En cuanto a la anatomía interna, el cefalotórax contiene órganos como el cerebro, el estómago, el corazón, y el hepatopáncreas, mientras que hacia el abdomen se extiende el cordón nervioso y el intestino (Fig. 2) (Aguilar *et al.*, 2009).



de sales en su medio. Esta adaptabilidad se vincula con su ciclo de vida; los organismos adultos que habitan por lo general en aguas oceánicas entre los 40 y 100 m de profundidad, donde ocurre la reproducción en esta etapa. Los ejemplares realizan la cópula y después las hembras desovan los huevos horas posteriores al apareamiento (FAO, 2024). Los huevos fecundados descienden al fondo marino, donde en un periodo de 12 a 14 horas termina el desarrollo embrionario y eclosiona el nauplio; la primera fase larval, seguida de las fases zoea y mysis. Todas estas fases larvales son de vida planctónicas y se desarrollan en el ambiente oceánico hasta culminar en el estadio postlarva (PL) posterior a la metamorfosis. Estas se asemejan morfológicamente a un juvenil presentando todos sus apéndices, incluyendo los de natación (pleópodos) que les permite migrar a ambientes fangosos ricos en nutrientes de zonas costeras, donde completan su desarrollo. Finalmente, los subadultos regresan a mar abierto donde alcanzan la madurez sexual para completar su ciclo de vida (IMIPAS, 2018; FAO, 2024).

### **Camaronicultura**

En 2022, *P. vannamei* se consolidó como el principal recurso producido a nivel mundial cuando se sumaron las cifras de pesca y acuicultura (FAO, 2024). Cuando se habla de la producción acuícola de la especie, esta actividad experimentó un crecimiento del 2.6% en 2020 en comparación con el año anterior. Dentro de los grupos de animales más cultivados, los crustáceos se posicionaron entre los de mayor producción, alcanzando 11.2 millones de toneladas métricas y generando ingresos \$81,500 millones de USD (FAO, 2022). De acuerdo con la FAO (2024), a pesar del desarrollo y de distintas tecnologías que son aplicadas para la producción de

crustáceos, solo unas cuantas especies dominan el mercado mundial. De un total de 49 especies de crustáceos cultivadas, *P. vannamei* destaca como la de mayor producción a nivel internacional, representando el 51.7% de la producción mundial con un valor de casi siete millones de toneladas (FAO, 2022; FAO, 2024).

En México, la producción nacional de camarón en 2023 superó las 192 mil 600 toneladas, con un valor económico de 19 mil 800 millones de pesos. Estas cifras lograron posicionar a México como el séptimo productor mundial de camarón y también como el segundo en Latinoamérica seguido de Ecuador (FAO, 2024; CONAPESCA, 2024). Por tanto, esta actividad representa una fuente económica importante para el país, realizándose con éxito en los estados de Sinaloa, Sonora, Nayarit, Tamaulipas y Colima, siendo Sinaloa y Sonora los estados líderes de producción nacional con 42% y 38% respectivamente (CONAPESCA, 2021).

## **BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Penaeus vannamei***

### **Neuroendocrinología**

En los crustáceos los procesos reproductivos son regulados por la interacción entre el sistema nervioso y las glándulas endocrinas (Alfaro *et al.*, 2004). Esta regulación se encuentra dada por el sistema nervioso central (SNC), órgano X - glándula sinusal (OX - GS), órgano mandibular (OM), ganglio torácico y glándula androgénica (GA) promoviendo un efecto en los procesos reproductivos (Fig. 3) (Tinikul *et al.*, 2009; Tinikul *et al.*, 2011).

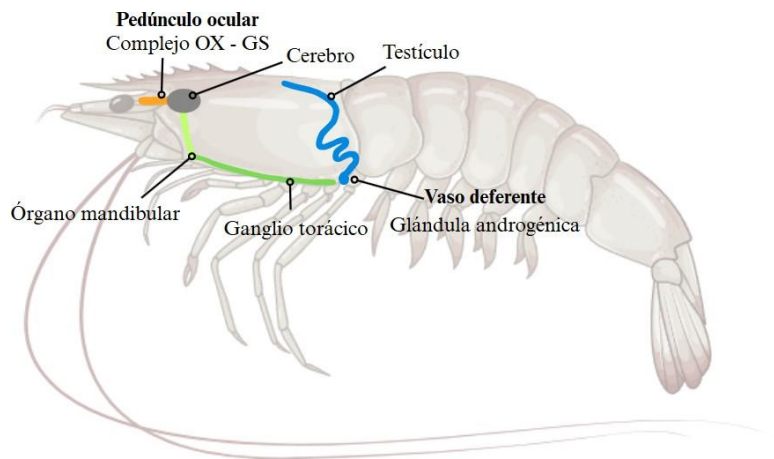


Figura 3. Regiones endocrinas encargadas de los procesos reproductivos en *Penaeus vannamei* (Tinikul *et al.*, 2011).

La regulación endocrina es dada por la hormona estimuladora de la gónada (HEG) producida y sintetizada en el ganglio torácico y cerebro y por la hormona inhibidora de la gónada (HIG) producida y sintetizada por el complejo OX – GS, de los pedúnculos oculares (Fig. 4). Sin embargo, el efecto positivo en estos procesos dependerá de los niveles presentes de las mismas (Tinikul *et al.*, 2009).

Se ha demostrado con anterioridad el papel que tienen los neurotransmisores en el proceso reproductivo en crustáceos decápodos (Vaca y Alfaro, 2000, Alfaro *et al.*, 2004, Wongprasert *et al.*, 2006), donde la serotonina (5-HT) estimula la liberación de HEG (producida por el ganglio torácico y cerebro) que promueve la liberación de la hormona de la glándula androgénica estimulando el desarrollo testicular y la espermatogénesis (Fingerman, 1997). Por otro lado, en los machos, las funciones endocrinas y de gametogénesis son dadas por la GA, OM y el testículo (Ngersoungnern *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2020), no obstante, aún se desconocen todas las hormonas involucradas en el proceso reproductivo.

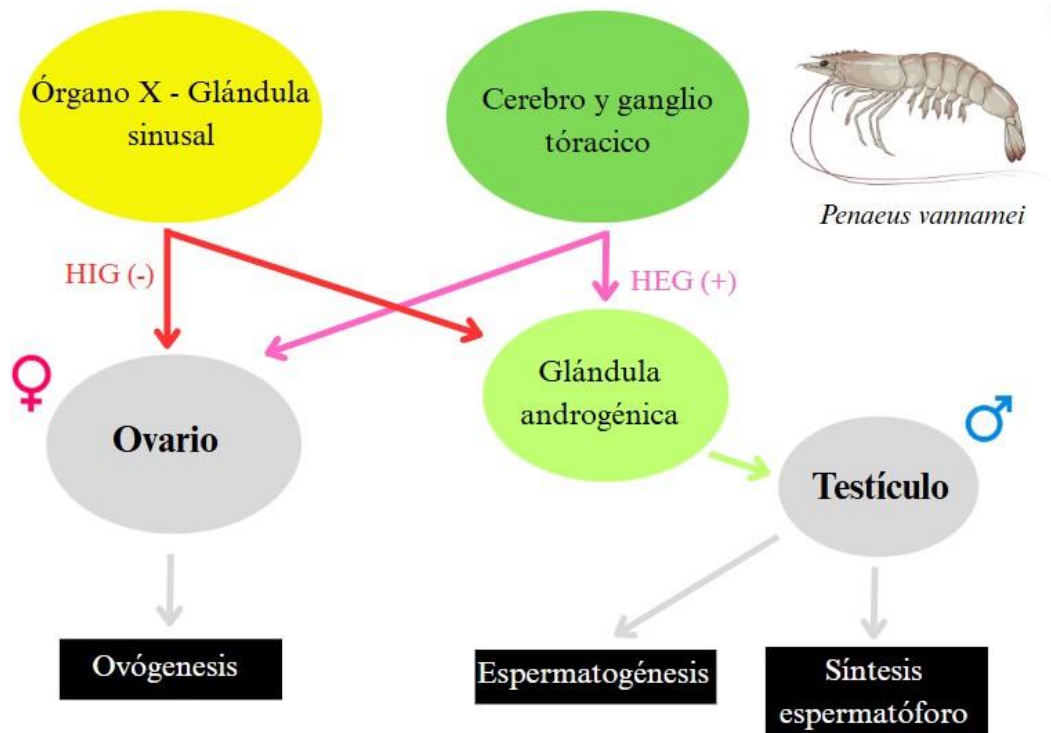


Figura 4. Síntesis de las vías endocrinas encargadas de los procesos reproductivos en *Penaeus vannamei*. HIG. Hormona inhibidora de la gónada. HEG. Hormona estimuladora de la gónada (Alfaro, 2001; Tinikul *et al.*, 2011).

## Sistema reproductivo

*P. vannamei* es un organismo dioico con diferencias sexuales secundarias en juveniles; gonopodos modificados en el primer par de pleópodos (petasma) en machos y un télico abierto en hembras, entre las terceras y quintas patas (Fig. 5) (Ramos-Cruz, 2012).

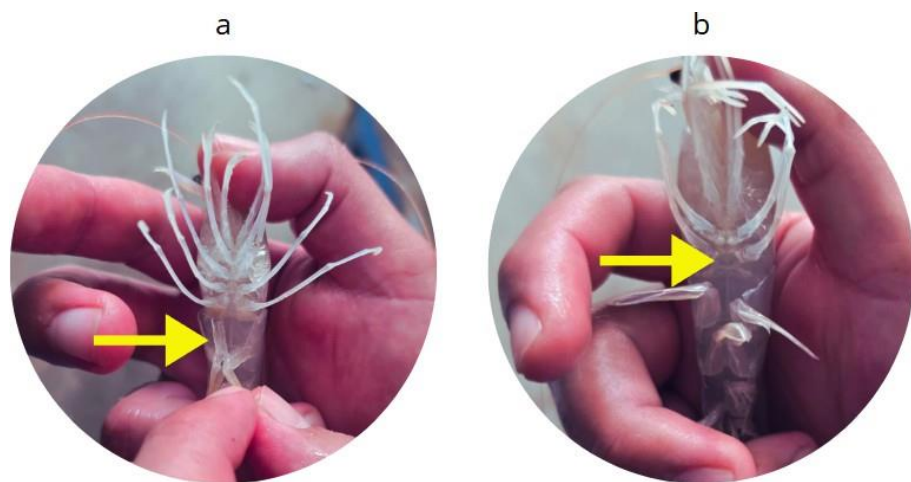


Figura 5. Diferencias sexuales en *Penaeus vannamei*. a. Flecha amarilla señala el petasma. b. Flecha amarilla señala el télico abierto.

El sistema reproductivo de los machos consta de testículo y vasos deferentes, mientras que las hembras constan de ovarios y oviductos (Fig. 6).

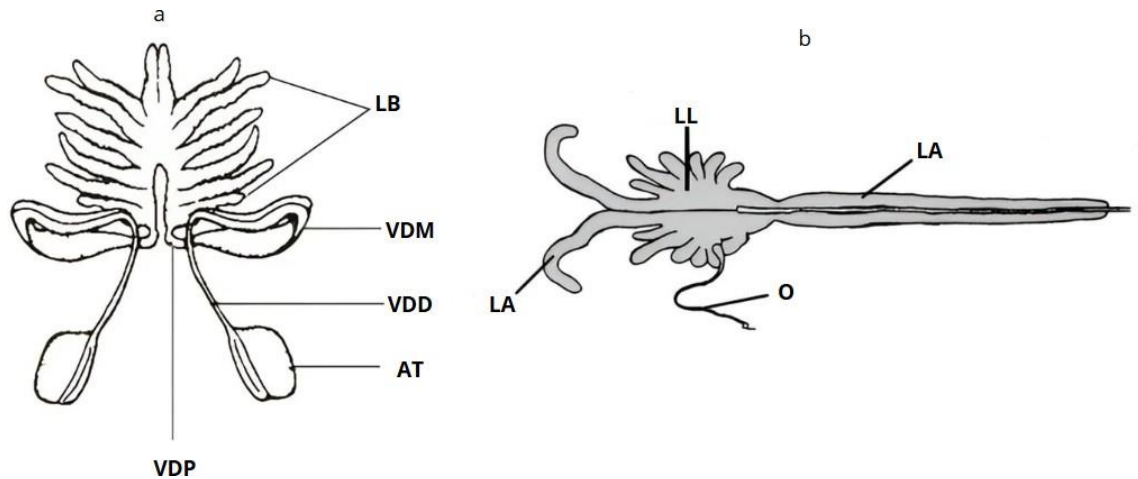


Figura 6. Sistema reproductivo de *Penaeus vannamei*. a. LB: Lóbulos testiculares, VDP: Vaso deferente proximal, VDM: Vaso deferente medio, VDD: Vaso deferente distal y AT: Ampolla terminal. b. LA: Lóbulo anterior, LL: Lóbulo lateral, O: Oviducto y LA: Lóbulo abdominal. Modificado de Alfaro (2001) y Braga *et al.* (2013).

### **Reproducción inducida de *Penaeus vannamei***

El incremento en la demanda de postlarvas ha generado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para su producción (FAO, 2022). Entre estas estrategias se encuentran las técnicas de reproducción inducida; centradas en manipular los factores ambientales que estimulan la maduración ovárica y apareamiento. Entre los principales factores se incluyen la temperatura, la salinidad, el fotoperiodo (luz:oscuridad) y la intensidad lumínica (FAO, 1988). Asimismo, es fundamental establecer esquemas de alimentación que aseguren cumplir con los requerimientos nutricionales específicos para reproductores (Alfaro, 2001). Dentro de estos

requerimientos, se busca una dieta rica en proteína (35 al 45%), lípidos (6 al 12% de EPA y DHA), carbohidratos (hasta 20%), vitaminas y minerales (vitamina C, E, B12, calcio, fósforo, zinc, entre otros) (FAO, 1988; Alfaro, 2001).

De acuerdo con Alfaro (2001) para *P. vannamei* es indispensable complementar la dieta de los reproductores con alimentos frescos. Por lo ello, los esquemas de alimentación se han basado en la administración alternada de almejas, calamares, pescados, mejillones, poliquetos, artemias, ostiones, junto con el alimento formulado. Esto permite ofrecer un perfil nutricional enriquecido y brinda una alimentación rica en nutrientes esenciales tales como colesterol, ácidos poliinsaturados (PUFAs) y aminoácidos (FAO, 1988; Alfaro, 2001). A pesar del manejo adecuado de los factores ambientales y nutricionales, en la industria es común recurrir a métodos adicionales para inducir o acelerar la maduración ovárica, entre los cuales destaca la ablación del pedúnculo ocular (APO).

### **Ablación del pedúnculo ocular (APO)**

La APO se basa en la remoción unilateral del pedúnculo ocular (Fig. 7), con el objetivo de eliminar el complejo OX-GS. Entre las hormonas sintetizadas en este complejo, está la HIG cuyos niveles disminuye después de la APO, generando el aumento en los niveles de la HEG generando la aceleración de la maduración ovárica (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). Esta técnica ha sido aplicada en numerosos laboratorios a nivel nacional por ser rápida, poco costosa y sencilla de realizar (Sainz-Hernández *et al.*, 2008).



Figura 7. Ablación del pedúnculo ocular en *Penaeus vannamei*.

Aunque la APO ha sido validada como una técnica eficaz para acelerar la maduración ovárica en camarones, se ha incrementado el cuestionamiento ético en torno a su uso, debido a la mutilación parcial de la hembra afectando el bienestar de la hembra. En este sentido, se han buscado protocolos menos invasivos que puedan sustituir a la APO. Investigaciones recientes han evidenciado que la producción de postlarvas puede mantenerse en niveles similares incluso sin recurrir a la APO, y que los lotes obtenidos de hembras no sometidas a este procedimiento muestran una mayor resistencia a patógenos (Zacarias *et al.*, 2019; Zacarias *et al.*, 2021).

Birch *et al.* (2021), por medio de una revisión de invertebrados marinos sintientes, en camarones peneidos reportaron que existe alta evidencia de receptores de dolor llamados nociceptores. A partir de este conocimiento, se han establecido normativas y estándares que buscan prohibir la APO por su afectación en el bienestar en los camarones de cultivo. La APO implica la mutilación irreversible del pedúnculo

ocular afectando procesos fisiológicos y metabólicos generando un aumento significativo en la mortalidad de los ejemplares (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). Es por lo anterior que se han explorado distintas técnicas alternativas a la ablación.

## **MADURACIÓN SEXUAL**

### **Desarrollo testicular y espermatogénesis**

El sistema reproductor en machos de *P. vannamei* se conforma de seis lóbulos testiculares (LT); vaso deferente divididos en tres secciones, proximal (VDP), medio (VDM), distal (VDD); y una ampolla terminal (AT) (Martínez *et al.*, 2013). El desarrollo de la gónada de *P. vannamei* comprende cuatro fases de desarrollo (Tabla I), donde el crecimiento de los testículos comienza en la fase III (PL165), donde estos comienzan a mostrar mayor crecimiento y diferenciación, así como la formación de los túbulos seminíferos y la aparición de células germinales (Chang *et al.*, 2024).

Tabla I. Descripción de los cambios morfológicos externos para la identificación de los estados de desarrollo de la gónada en machos de *Penaeus vannamei* de acuerdo a Chang *et al.* (2024).

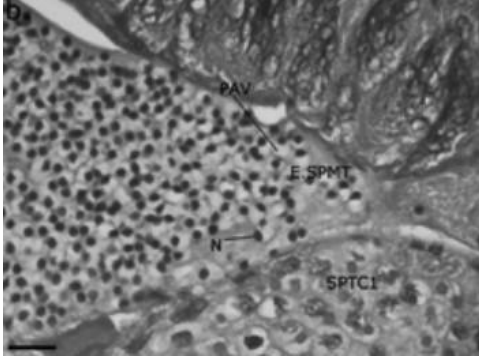
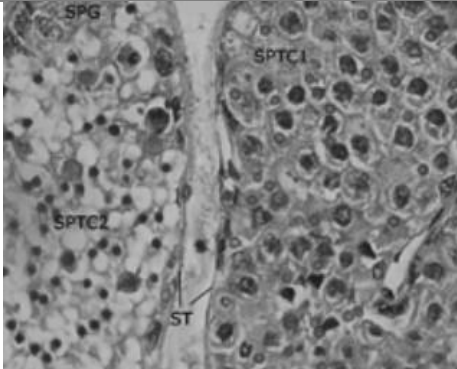
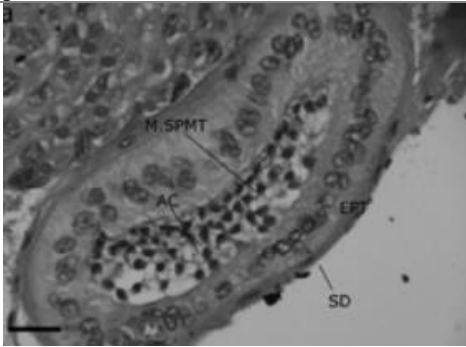
Fase de desarrollo	Características visuales
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Apertura genital visible en el quinto par de pereiópodos.</li> <li>● Prolongación del petasma en el primer par de pleópodos sin tocarse entre sí.</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Apertura genital agrandada.</li> <li>● Alargamiento de petasma sin tocarse entre sí.</li> <li>● Visualización temprana de la ampolla terminal de color blanquecina debajo de la apertura genital.</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Prolongación del petasma y unido parcialmente.</li> <li>● Visualización temprana de los espermátóforos en la ampolla terminal.</li> </ul>
IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Petasma fusionado.</li> <li>● Paquetes de espermátóforos desarrollados con elevación en el quinto par de periópodos, debajo de las aperturas genitales.</li> </ul>

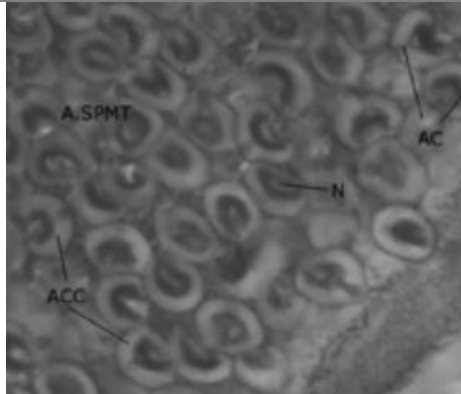
La formación de espermatozoides en *P. vannamei* es un proceso que ocurre en los testículos y vasos deferentes con un desarrollo asincrónico de grupo presentando diferentes estadios en las diferentes regiones de los lóbulos testiculares (Tabla II y III) (Alfaro-Montoya *et al.*, 2016).

Tabla II. Descripción del proceso de espermatogénesis en machos de *Penaeus vannamei* adaptado de Alfaro-Montoya *et al.* (2016).

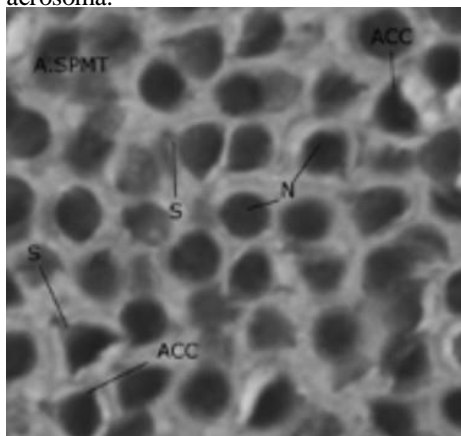
Etapa	Proceso	Descripción	Diámetro
I	Maduración de Espermatogonios	Espermatogonios ubicados en los lóbulos testiculares realizan la producción de espermátocitos primarios a partir del proceso de mitosis.	Espermatogonios (10-11 $\mu\text{m}$ ). Espermátocitos primarios (10-12 $\mu\text{m}$ ).
II	Meiosis I	Los espermátocitos primarios sufren proceso de meiosis I formando espermátocitos secundarios.	Espermátocitos secundarios después de meiosis I (7,5-11 $\mu\text{m}$ ).
III	Meiosis II	Los espermátocitos secundarios sufren proceso de meiosis II formando espermátidas.	Espermátidas (5-7,5 $\mu\text{m}$ ).
IV	Espermioagénesis	Maduración paulatina de espermátidas, encontrándose en procesos tempranos e intermedios. Proceso de polimerización de la espina en región anterior de la espermátida. Espermatozoides recién formados son compactados por el espermatóforo después de pasar por la ampolla terminal.	-

Tabla III. Fases espermatogénesis en testículos de *Penaeus vannamei* adaptado de Alfaro-Montoya (2011).

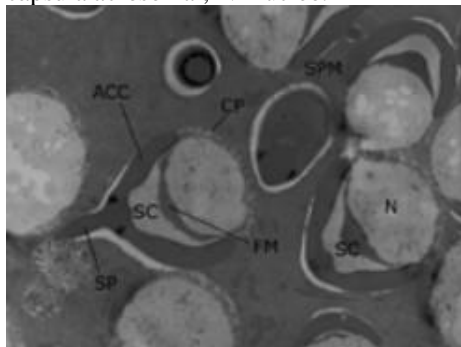
Proceso	Histología	Descripción
Meiosis I		Túbulos seminíferos con espermátocitos primarios. Los espermátocitos primarios sufrirán un proceso de meiosis I formando espermátocitos secundarios.
Meiosis II		Presencia de asincronidad en los túbulos seminíferos. Túbulos seminíferos con espermátocitos en diferentes estados de desarrollo (primario y secundario).
Espermioagénesis		Producción de espermátocitos llevada a cabo en ductos seminíferos y deferentes.



A. SPMT= espermatida avanzada, ACC= cápsula acrosomal, N= núcleo, AC= acrosoma.



A. SPMT= espermatida avanzada, ACC= cápsula acrosomal, N=núcleo.



ACC= Cápsula acrosomal, SP= esperina, SC= sub-acrosoma, FM= malla fribilar, CP= partículas citoplasmáticas, SPM= espermatozoide, N=núcleo.

## **Calidad espermática**

La calidad espermática constituye un factor importante en la calidad y éxito reproductivo de los machos (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2018). Este proceso suele ser evaluado por una serie de indicadores biológicos que muestren el estado actual de los reproductores, destacando: 1) peso del espermátforo; 2) número total de espermatozoides; 3) porcentaje de espermatozoides muertos; 4) presencia y/o ausencia del espermátforo, entre otros (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987; Alfaro y Lozano, 1993; Alfaro-Montoya y Vega (2011).

El potencial reproductivo de los machos para la producción de larvas no depende exclusivamente de la calidad espermática, sino que también depende de la condición de salud y reproductiva de las hembras; por lo que factores como el estado fisiológico, condición de salud y de maduración ovárica también será esencial para garantizar el éxito reproductivo en los estudios de reproducción inducida.

## **Reproducción en condiciones de laboratorio**

Los procesos reproductivos de *P. vannamei* ha sido llevada con éxito gracias a las mejoras tecnológicas de los sistemas de producción, buscando mejorar los factores abióticos que influyen en este proceso (luz, temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto y compuestos nitrogenados) así como la calidad nutricional en esta fase de desarrollo (González *et al.*, 2018). La madurez sexual de *P. vannamei* es un proceso continuo, en hembras se alcanza aproximadamente a los 28 g y en aproximadamente machos a los 20 g, ocurriendo de forma natural en los tanques de reproducción siempre y cuando los organismos estén saludables, sin embargo, este proceso es acelerado

realizando la APO en hembras que modifica los niveles de la hormona que promueve el desarrollo gonádico (Sainz-Hernández *et al.*, 2008).

De forma paralela, los procesos de maduración ovárica son complementados con dietas que cumplan con los requerimientos específicos; haciéndose necesaria la inclusión de alimento fresco que son ricos en nutrientes esenciales tales como colesterol, ácidos poliinsaturados (PUFAs) y amino ácidos (Alfaro, 2001). Para ello, se incluyen; almeja, calamar, pescado, poliquetos y ostiones. A su vez, se ha descrito que la inclusión de alimento peletizado y alimento fresco debe mantener una relación de hasta el 3 y 20 % de la biomasa alimentada para cada uno respectivamente (FAO, 1988; Alfaro, 2001).

### **Alternativas para el mejoramiento reproductivo de *Penaes vannamei***

Dentro de las técnicas más prometedoras está la aplicación de serotonina y espiperona (5-HT/SPY) como un procedimiento vanguardista para modular el sistema neuroendocrino; logrando igualar los rendimientos obtenidos por medio de la APO (Alfaro *et al.*, 2004; Alfaro-Montoya y Vega, 2011; Quesada-Ávila *et al.*, 2024). Estudios realizados en hembras de *P. vannamei* han demostrado la inducción de la madurez ovárica empleando la inyección intramuscular de 5-HT/SPY (Vaca y Alfaro, 2000; Alfaro *et al.*, 2004).

De forma paralela, se demostró que la inyección de 5-HT/SPY bajo las dosis de Alfaro *et al.* (2004) tiene una tendencia de aumento en la producción de espermatozoides de *P. vannamei*, demostrando el potencial reproductivo en machos de la especie (Alfaro-Montoya y Vega, 2011). Estos hallazgos resaltan la necesidad de evaluar el impacto del protocolo en el éxito reproductivo en condiciones de laboratorio

entre machos y hembras así como la calidad de la progenie. La determinación de esta respuesta propondría una visión integral en el uso de neurotransmisores en la reproducción inducida de *P. vannamei*.

Pese a esto, es necesario también de evaluar el impacto de la modulación de neurotransmisores no solo en la calidad espermática de los machos, sino también en el éxito reproductivo. Por ello, determinar los efectos observados en indicadores del comportamiento, parámetros hematológicos y de calidad espermática permitirá proponer una nueva visión en el comportamiento reproductivo de camarones peneidos.

## **ANTECEDENTES**

### **Efectos de la aplicación de serotonina y espiperona en la reproducción inducida de *Penaeus vannamei***

Si bien aún no se ha comprendido la función de los neurotransmisores en la maduración ovárica de los crustáceos, existe evidencia que reporta que la serotonina y la dopamina participan activamente en la regulación neuroendocrina de este proceso. Particularmente, se ha descrito que la serotonina tiene efectos positivos en la maduración ovárica, siendo demostrado esto en la expresión de receptores serotoninérgicos en la membrana de oocitos en fase III y IV, así como su implicación en la expresión génica asociada a la vitelogénesis y en las fases posteriores de maduración de los oocitos en *Penaeus monodon* (Ongvarrasopone *et al.*, 2006). Más tarde, Tomy *et al.* (2016) confirmaron que la serotonina influye en la maduración ovárica mediante un ensayo de expresión génica en *Penaeus indicus* observando la

activación de genes relacionados con la vitelogénesis y post vitelogénesis de los oocitos.

Por otro lado, para dopamina, se ha descrito un rol antagónico a la acción de la serotonina con un efecto directo en el retraso de la maduración ovárica (Tropea y López, 2013; Tinikul *et al.*, 2009). Estudios realizados en cangrejos de agua dulce *Barytelphusa guerini* por Prasad *et al.* (2014) con el neurotransmisor dopamina permitió observar el efecto inhibitorio al desarrollo ovárico y testicular en ejemplares de la especie, denotando su acción directa en la síntesis y liberación de HIG. De forma contraria, la combinación de serotonina y espiperona (un antagonista de dopamina) presentó una acción directa a la estimulación de la maduración ovárica cuando fue inyectada intramuscularmente a hembras de *P. vannamei* (Alfaro *et al.*, 2004; Quesada-Ávila *et al.*, 2024).

Pocas han sido las metodologías que han demostrado la eficacia en la maduración ovárica de crustáceos decápodos. Dentro de estas se ha empleado el silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia (Tiu y Chan, 2007; Feijó *et al.*, 2016) y el suministro de metil farnesoato (Nagaraju, 2007; Wilder *et al.*, 1994). Por esta razón, la búsqueda de estrategias alternativas a la APO para inducir la maduración ovárica *P. vannamei* aún continúa siendo estudiada.

Una de las primeras aproximaciones que se exploraron fue la utilización de serotonina como agente inductor, dado su efecto positivo previamente documentado en otras especies de crustáceos (Vaca y Alfaro; 2000; Alfaro *et al.*, 2004; Subramoniam y Kirubagaran, 2010). En el caso específico de *P. vannamei*, los trabajos pioneros fueron realizados por Vaca y Alfaro (2000), quienes evaluaron la maduración ovárica y desove del camarón mediante la inyección de serotonina, probando dos

concentraciones,  $15 \mu\text{g g}^{-1}$  y  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  del peso corporal. Los resultados obtenidos demostraron inducción de maduración y desove en ambos tratamientos, representando así una de las primeras evidencias del potencial de la manipulación de neurotransmisores como una alternativa viable al uso de la APO.

Posteriormente, Alfaro *et al.* (2004) evaluaron el desarrollo de una técnica para la maduración ovárica y desove de *P. stylirostris* y *P. vannamei* en combinación con machos de la misma especie. Para las hembras se emplearon dos combinaciones de moléculas: (1)  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  de serotonina y la hormona juvenil (JH III); y (2)  $25 \mu\text{g g}^{-1}$  de serotonina y  $1.5 \mu\text{g g}^{-1}$  o  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  de espiperona. Para ambas especies se observó que la primera combinación no presentó ninguna estimulación a la maduración ovárica mientras que la combinación entre serotonina y espiperona presentó la estimulación a la maduración ovárica y desove de ambas especies pero con disminución en la actividad de desove después de la tercera inyección. Lo anterior siendo atribuido a un agotamiento reproductivo por parte de las hembras experimentales.

Los valores de maduración ovárica de las hembras 5-HT/SPY presentaron valores muy similares a las hembras con APO, sin embargo, la maduración no se observó exclusivamente en hembras estimuladas con 5-HT/SPY, sino que también en las hembras control (sin inyección) y las inyectadas con el vehículo (solución salina y etanol al 95%). Este efecto coincide con lo reportado por Quesada-Ávila *et al.* (2024) empleando las dosis descritas por Alfaro *et al.* (2004) para *P. vannamei*. Como posible explicación de estos resultados, los autores propusieron la hipótesis de que el uso combinado de 5-HT/SPY induce a la maduración de otras hembras por medio de la liberación de compuestos químicos en el agua.

## **POLÍTICAS DE BIENESTAR ANIMAL**

La alta demanda a nivel nacional ha propiciado el empleo de la APO como una técnica para la obtención de larvas ya que acelera la maduración ovárica. Sin embargo, es poco ética por ser un método invasivo, por lo que es importante desarrollar métodos alternativos que favorezcan la integridad de los organismos que son sometidos a técnicas de reproducción inducida en laboratorio y que de forma paralela resulten eficientes y sostenibles para la industria acuícola.

Diversas normativas nacionales, como la Ley General de Vida Silvestre, la NOM-033-SAG/ZOO-2014 y la Ley de Protección Animal, promueven el trato digno hacia los animales bajo manejo humano. Con esto, se busca evitar sufrimiento y dolor a las especies animales en su interacción con el ser humano. Aunque inicialmente estas leyes son enfocadas en vertebrados, estas disposiciones establecen principios aplicables y que engloba también al sector acuícola, subrayando la necesidad de adoptar métodos alternativos a la APO que sean éticos, sostenibles y alineados con el marco legal vigente.

**CAPÍTULO 2. Artículo sometido. Revista *Ciencias Marinas*.**

“MODULACIÓN DE NEUROTRANSMISORES COMO HERRAMIENTA PARA  
LA REPRODUCCIÓN INDUCIDA EN CAMARONES: EFECTOS DE UN  
PROTOCOLO EN INDICADORES DE BIENESTAR ANIMAL”

Jorge Vladimir Alvarez-Montoya<sup>ab</sup>, Hilda Sanchez-Sanchez<sup>b</sup>, Sonia Soto-Rodríguez<sup>c</sup>,  
Jorge Enrique Alfaro-Montoya<sup>d</sup>, André Braga<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada  
(BC), C.P. 22870, México.

<sup>b</sup>Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja  
California, Ensenada (BC), C.P. 22870, México.

<sup>c</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Subsede Mazatlán, C.P.  
82112, México.

<sup>d</sup>Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica

E-mail address: andre.braga@uabc.edu.mx (André Braga)

## Resumen

La modulación de neurotransmisores se ha propuesto como una alternativa eficiente a la ablación del pedúnculo ocular (APO) para inducir la maduración ovárica y estimular la espermatogénesis en *Penaeus vannamei*. Sin embargo, su impacto en el comportamiento, hematología y calidad espermática se desconoce. Este estudio evaluó los cambios conductuales en hembras de *P. vannamei* antes y después de la inyección de neurotransmisores, así como los efectos hematológicos y parámetros de calidad espermática en machos tras su aplicación. Se realizaron dos bioensayos para evaluar los efectos de la modulación de neurotransmisores. En el Bioensayo 1, se seleccionaron 12 hembras divididas en dos grupos: uno tratado con serotonina y espiperona (5-HT/SPY) y otro solo con serotonina (5-HT). Cada organismo fue aclimatado individualmente y grabado antes y después de la aplicación del tratamiento, con un periodo total de observación de 80 minutos, incluyendo la oferta de alimento. Los videos fueron analizados mediante etogramas para registrar comportamientos y cambios morfológicos. En el Bioensayo 2, se trabajó con machos distribuidos en cuatro grupos: 5-HT/SPY, 5-HT, vehículo (etanol 95% y solución salina) y control. Los tratamientos se aplicaron cada 14 días y, tres horas después, se colectó hemolinfa para analizar el tiempo de coagulación, el conteo total y diferencial de hemocitos, por un periodo de siete semanas. Además, se evaluaron parámetros de calidad espermática al inicio y al final del experimento, incluyendo el peso del espermátforo, la melanosis, el conteo total de espermatozoides y su mortalidad. En el Bioensayo 1 se realizó un ANOVA para comparar los tiempos comportamentales entre tratamientos y una prueba de Fisher para evaluar su relación ( $p < 0.05$ ), se calculó el eta cuadrado ( $\eta^2$ ) como medida del tamaño del efecto. En el bioensayo 2, se realizó 2-ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ). En el bioensayo 1, ambos tratamientos provocaron cambios significativos en los patrones respecto al control, presentando desplazamiento errático, flexión abdominal, pérdida de equilibrio y pigmentación anormal rojiza en los apéndices. Se observó una relación significativa entre el tratamiento y la flexión abdominal y coloración de los apéndices ( $\eta^2 > 0.14$ ). En los machos, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de coagulación ni en el CTH. El CDH no cambió en los tratamientos 5-HT/SPY y 5-HT, pero sí por el tratamiento VEH, que presentó incremento de hemocitos granulares y disminución de hialinos. Además, se observó una tendencia de aumento en el número de espermatozoides con los tratamientos de neurotransmisores, mientras que el VEH aumentó la tasa de melanosis. Estos hallazgos demuestran que la inyección de neurotransmisores genera cambios en el comportamiento, modifica la composición celular de la hemolinfa y estimula la espermatogénesis en *P. vannamei*, respaldando su potencial como una técnica alternativa a la APO.

Palabras claves: serotonina, espiperona, ablación, etología, peneidos, neuromodulación.

## 1. Introducción

La acuicultura enfrenta el reto constante de mejorar la eficiencia reproductiva sin comprometer el bienestar de los organismos cultivados. En especies como el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*, ampliamente utilizada en la producción mundial, la manipulación reproductiva mediante protocolos hormonales o neuromoduladores ha abierto nuevas posibilidades para optimizar la producción larvaria (Alfaro *et al.*, 2004; Quesada-Ávila *et al.*, 2024). Sin embargo, aún se desconoce en gran medida cómo estas intervenciones afectan aspectos clave de la fisiología inmunitaria y el comportamiento reproductivo, especialmente bajo condiciones de cultivo.

Los neurotransmisores como la serotonina (5-HT) y la dopamina (DA) han demostrado ser actores cruciales en la regulación de funciones reproductivas e inmunológicas en crustáceos. La serotonina, en particular, ha sido ampliamente relacionada con la maduración gonadal y la estimulación de la espermatogénesis, mientras que la dopamina suele ejercer un efecto inhibitorio sobre estos procesos (Ongvarrasopone *et al.*, 2006; Alfaro y Vega, 2011; Tropea y López, 2013). La combinación de serotonina con antagonistas dopaminérgicos, como la espiperona (SPY), ha sido propuesta como una estrategia para potenciar los efectos reproductivos positivos de la 5-HT en hembras y machos de *P. vannamei* (Alfaro *et al.*, 2004; Alfaro y Vega, 2011; Quesada-Ávila, 2024). No obstante, las implicaciones inmunológicas y fisiológicas de este enfoque aún no están completamente dilucidadas. Este estudio evalúa de forma integral los efectos de la aplicación de la 5-HT y su combinación con la SPY en reproductores de *P. vannamei*, considerando variables como el comportamiento, hematología e indicadores de calidad espermática.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Origen de los animales

Se obtuvieron postlarvas de camarón blanco del Pacífico *P. vannamei* (n = 60,000 PL12) del laboratorio comercial Acuícola Maricultura del Pacífico S.A. de C.V., ubicado en Sinaloa, México. Los ejemplares se mantuvieron en tanques circulares de 10 m<sup>3</sup> en un sistema de biofloc (Braga *et al.*, 2015) en el Laboratorio de Producción de Crustáceos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC). Cuando alcanzaron la fase adulta (peso mayor a 20 g), los animales fueron sexados y se muestrearon (n = 15 ejemplares del lote) aleatoriamente realizando un análisis en fresco basado en la metodología de Durán (2016) para camarones peneidos para establecer un diagnóstico presuntivo y estado de salud del lote experimental. Para ello, fue revisado externamente los ejemplares para identificar su coloración típica e integridad de los tejidos externos: exoesqueleto, antenas, anténulas, pereiópodos y pleópodos. Aunado a ello, se realizó la disección de los ejemplares para el análisis en fresco de branquias, hepatopáncreas e intestino para dar un valor numérico cualitativo basado en las descripciones de Durán (2016) para *P. vannamei*.

Una vez confirmada la calidad del lote, se seleccionaron machos (n = 32; peso promedio =  $27.5 \pm 2.3$  g) y hembras (n = 12; peso promedio =  $30.4 \pm 2.9$  g) con la presencia de todos los apéndices y libres de melanosis en el exoesqueleto. Los reproductores seleccionados fueron aclimatados en tanques circulares con área de fondo de 1.4 m<sup>2</sup> en agua clara por tres semanas; se mantuvieron en una temperatura de

28.5 ± 0.4 °C, con una salinidad de 33 ppm y con un fotoperiodo de 14:10 luz:oscuridad. Para eso, temperatura y salinidad fueron medidos diariamente, mientras que pH y nitrógeno amoniacal total (NAT; NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se midieron semanalmente. Diariamente se realizó una remoción del alimento excedente, de las mudas presentes y un recambio del 70% del agua con el fin de mantener la calidad del agua recomendada para cultivo de camarón (Bückle *et al.*, 2006; González-González *et al.*, 2009). Los camarones fueron alimentados en cinco horarios con alimento fresco: calamar, mejillón, artemia y poliqueto, al 4% de la biomasa ajustado semanalmente al consumo real, para un total del 16% diario.

Al final de la aclimatación, los individuos fueron divididos en dos grupos experimentales para la realización de dos bioensayos distintos. El bioensayo 1 evaluó el efecto del protocolo descrito por Alfaro *et al.* (2004) en el comportamiento de hembras de *P. vannamei* mientras que el bioensayo 2 evaluó el mismo protocolo, pero en parámetros hematológicos y calidad espermática de machos de *P. vannamei*.

Bioensayo 1: Efecto de un protocolo de modulación de neurotransmisores en el comportamiento de hembras de *Penaeus vannamei*

Se analizaron dos grupos experimentales (n = 6 por grupo): (1) inyección intramuscular de serotonina y espiperona (25 µg de serotonina/g de peso corporal y 5 µg de espiperona g<sup>-1</sup> de peso corporal) (5-HT/SPY) y (2) inyección intramuscular de serotonina (25 µg de serotonina g<sup>-1</sup> de peso corporal) (5-HT). La inyección de serotonina se realizó en el pleurito izquierdo del segundo segmento abdominal y la inyección de espiperona en el pleurito opuesto del mismo segmento según la dosis

correspondiente para su peso corporal (Alfaro *et al.*, 2004). Las hembras antes de la aplicación de los tratamientos sirvieron como grupo control (n = 6).

Cada hembra fue acondicionada individualmente en peceras de 35 L, las cuales se mantuvieron a una temperatura  $28.5 \pm 0.4$  °C y una salinidad de 33 ppm, con una línea de aire conectada a una piedra difusora. Las hembras fueron aclimatadas durante 20 minutos para evitar habituación entre ellas, según lo recomendado por Gutiérrez-Vera *et al.* (2024). Posteriormente, se retiraron de la pecera para aplicar la inyección según el grupo experimental y fueron devueltas a sus peceras, grabando su comportamiento durante 30 minutos. Luego, se ofreció poliqueto fresco (4% de su biomasa húmeda del ejemplar) y se continuó con la grabación por otros 30 minutos, totalizando 80 minutos de grabación por organismo. Durante el período experimental, el comportamiento de las hembras fue grabado con una cámara de 13 MP, a una resolución de 1080p y 30 cuadros por segundo, registrando un tiempo total de 80 minutos por organismo.

Para determinar los patrones observados en las hembras tras la aplicación de los tratamientos, se analizaron cada uno de los videos y se realizaron etogramas; incluyendo los comportamientos locomotores, de alimentación y los cambios físicos (80 min. en total para cada hembra). La Tabla IV resume estos patrones registrados durante este trabajo.

Tabla IV. Patrones observados en las hembras de *Penaeus vannamei* durante el ensayo de comportamiento, incluyendo comportamientos locomotores, de alimentación y cambios físicos.

Patrones conductuales y morfológicos externos	Descripción
Desplazamiento	El ejemplar presenta movimiento continuo a partir de los pereiópodos y pleópodos.
Desplazamiento errático	El ejemplar presenta descoordinación en la dirección de su movimiento, cambios en la orientación de su cuerpo y/o giros abruptos.
Pérdida de equilibrio	El ejemplar presenta volteo involuntario de su cuerpo, nula capacidad para mantener su postura estable con dificultad para enderezar su cuerpo y/o postura inicial.
Sin movimiento	El ejemplar no presenta movimiento.
Búsqueda de alimento	El ejemplar busca localizar y capturar alimento con sus apéndices bucales.
Cambio en el color de apéndices	El ejemplar presenta cambios atípicos en la tonalidad y coloración de los pereiópodos y pleópodos.
Flexión abdominal	El ejemplar presenta cambio anormal en su postura abdominal.

Bioensayo 2: Efecto de un protocolo de modulación de neurotransmisores en la hematología y calidad espermática de machos de *Penaeus vannamei*

El experimento tuvo una duración de siete semanas donde solo fueron utilizados machos de *P. vannamei*, con muestreos cada 14 días. Fueron establecidos cuatro grupos experimentales: (1) machos inyectados con serotonina y espiperona (25  $\mu\text{g}$  de serotonina  $\text{g}^{-1}$  y 5  $\mu\text{g}$  de espiperona  $\text{g}^{-1}$ ) (5-HT/SPY); (2) machos inyectados con serotonina (25  $\mu\text{g}$  de serotonina  $\text{g}^{-1}$ ) (5-HT); (3) machos inyectados con los vehículos de las soluciones de serotonina y espiperona (solución salina y etanol al 95%,

respectivamente) (VEH); y (4) machos sin inyección (control). Para permitir la cohabitación sin barrera entre individuos de diferentes tratamientos en el mismo tanque, los animales fueron identificados individualmente mediante anillos de colores en la base del pedúnculo ocular a excepción del grupo control.

Para el experimento, se emplearon cuatro tanques circulares con área de fondo de 1.4 m<sup>2</sup> donde fueron sembrados ocho animales en cada uno de los tanques; dos por cada grupo experimental. Los tanques fueron provistos de dos calentones de 500 watts y piedra difusora de aire. Las condiciones de calidad de agua y alimentación fueron las mismas de las descritas anteriormente para el período de aclimatación (Sección 2.1).

Los machos de los tratamientos 5-HT/SPY, 5-HT y VEH fueron inyectados con sus respectivos tratamientos cuatro veces cada 14 días en un período de siete semanas, correspondiendo al tiempo necesario para lograr un efecto estimulador en la producción de espermatozoides de acuerdo con los resultados presentados por Alfaro-Montoya y Vega (2011). A las tres horas postratamiento (3 h pt), se extrajo 100 µL hemolinfa de cinco camarones tomados al azar de cada grupo experimental. La hemolinfa fue extraída con una jeringa que atravesó la membrana artrodial del seno ventral del primer par de pleópodos y se colocaron dentro de un tubo eppendorf con 200 µL de anticoagulante MAS (390 mg Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O (COO)<sub>3</sub>, 980 mg NaCl, 1030 mg C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 160 mg C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, pH 7.2, Rezende *et al.*, 2022) previamente enfriada a 4°C. Después, se tomaron 50 µL de la hemolinfa diluida en anticoagulante MAS y se colocó dentro de un tubo eppendorf con 350 µL con fijador MAS-Formol 4% (48 mL MAS, 2 mL Formaldehído 37%) y se almacenaron a 4°C para la realización de análisis hematológicos posteriores (Sección 2.1.2).

### 2.1.1. Solución de serotonina y espiperona

Las soluciones y dosis de serotonina y espiperona fueron elaboradas e inyectadas con base a lo reportado por Alfaro *et al.* (2004). Para la preparación de las soluciones experimentales se pesó 9.3 mg de serotonina (SIGMA<sup>®</sup>, USA) y posteriormente se disolvió en 1 mL de solución salina (2,163 mg NaCl, 112 mg KCl, 53 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 19 mg NaOH, 493 MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, pH 7.4), resultando en una solución con concentración de 9.3 mg mL<sup>-1</sup>. Para la solución de espiperona (SIGMA<sup>®</sup>, USA), se pesó 3.7 mg y se disolvió en 1 mL de etanol 95% en baño maría a 50 °C para facilitar su disolución, obteniéndose una concentración de 3.7 mg mL<sup>-1</sup>. Las soluciones fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

### 2.1.2. Hematología

#### 2.1.2.1. Tiempo de coagulación

El tiempo de coagulación de la hemolinfa se modificó a partir del método de Chang *et al.* (2015). La hemolinfa fue extraída de la región ventral entre el último par de pereiópodos y el primer par de pleópodos y previo a la mezcla con anticoagulante MAS se colocó una gota de la misma sobre un portaobjetos y se agitó con la aguja de la misma jeringa en un ángulo de 30 ° en diferentes direcciones hasta la formación de coágulos. El tiempo de coagulación fue igual al tiempo transcurrido para la formación de coágulos para cada uno de los ejemplares.

### 2.1.2.2. Conteo total de hemocitos y conteo diferencial de hemocitos

Los conteos de hemocitos totales (CTH) se determinaron realizando el conteo de 10  $\mu$ L de la solución de hemocitos fijadas en MAS-Formol 4% en una cámara de Neubauer (Costa y Martins, 2009). Los conteos se realizaron en un microscopio óptico (Axioskop 2, Zeiss Alemania) con el objetivo 20x contando los cuatro cuadrantes de cada lado de la cámara. Para el conteo diferencial de hemocitos (CDH), fue colocada una pequeña gota de hemolinfa fijada en MAS-Formol 4% sobre un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos realizando el conteo de 100 células al azar con el objetivo de inmersión 100x.

### 2.1.3. Calidad espermática

Las variables de calidad espermática fueron dadas por los parámetros de peso del espermátforo, melanosis (%), número total de espermatozoides ( $\times 10^6$ ) y tasa de espermatozoides muertos (%). La tasa de espermatozoides muertos fue calculada de la siguiente forma: TEM (%) = (número de espermatozoides vivos/número de espermatozoides muertos) \* 100. Para la identificación de espermatozoides vivos y muertos se empleó la tinción azul de tripano (SIGMA<sup>®</sup>, USA) empleado para la viabilidad celular. Los espermatozoides muertos fueron identificados cuando las células se tiñeron producto de la penetración de la tinción a través de la membrana.

Estos parámetros fueron analizados dos veces durante el periodo experimental, inicial (día 0) y final (a la séptima semana). Ambos espermátforos fueron extraídos

manualmente (Nakayama *et al.*, 2020); uno fue acondicionado de manera aleatoria e individual en navecillas de plástico, siendo pesado en una balanza analítica, mientras que el otro espermátforo fue macerado con apoyo de pinzas estériles en 1.8 mL de solución salina contenidos en un viales de vidrio. Una vez macerado, se adicionaron 0.2 mL de tinción azul de tripano al frasco; la solución se homogenizó con el apoyo de una pipeta de plástico. Las muestras se dejaron reposar por cinco minutos. Posteriormente, fue tomado 1 mL de la muestra con una pipeta automática y se colocó en cámara de Neubauer, dejando reposar cinco minutos después del montaje. El conteo de espermatozoides totales y muertos fue efectuado bajo un microscopio óptico (Axioskop 2, Zeiss y Alemania) y contabilizados con un contador manual. Los conteos se realizaron en la cuadrícula central del hemocitómetro (área total 1 mm<sup>2</sup>).

## 2.2. Análisis estadísticos

Para el ensayo de comportamiento se revisaron las premisas de normalidad y homocedasticidad, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias en los tiempos registrados para cada tipo de comportamiento tras la aplicación de los tratamientos. Se realizó una prueba *post hoc* de Tukey cuando se presentaron diferencias significativas. Por otro lado, se realizó una prueba de independencia con el estadístico de Fisher con el fin de evaluar la relación del comportamiento de los ejemplares con respecto a los grupos experimentales por medio de tablas de contingencia de 2 x 2. Cuando se observó la dependencia entre variables ( $p < 0.05$ ) se calculó el eta cuadrado ( $\eta^2$ ) para conocer el tamaño del efecto de la variable independiente, considerándose una relación muy fuerte cuando  $p > 0.14$ .

Para los análisis de coagulación, CHT, CDH y calidad espermática se verificaron las premisas de normalidad y homocedasticidad por medio de las pruebas Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Se realizó un análisis de varianza de dos vías (2-ANOVA) para evaluar diferencias entre los tratamientos, los muestreos y la interacción entre ellos. Se realizó una prueba *post hoc* de Tukey cuando se presentaron diferencias significativas.

### 3. Resultados

#### 3.1 Bioensayo 1

De los 960 minutos (16 h) de grabación, fue posible diferenciar siete patrones conductuales y cambios morfológicos externos en las hembras: desplazamiento, desplazamiento errático, pérdida de equilibrio, inmovilidad, búsqueda de alimento, flexión del músculo abdominal y cambio de color en apéndices. Durante el periodo de aclimatación (control), desplazamiento y sin movimiento fueron los únicos comportamientos presentes. Sin embargo, posterior a la inyección de 5-HT/SPY y 5-HT, se observó la presencia de los otros comportamientos: desplazamiento errático, pérdida de equilibrio, flexión abdominal y cambio en el color de los apéndices, pasando de un color grisáceo a rojizo. Entre los patrones registrados, únicamente el desplazamiento errático y la pérdida de equilibrio presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ( $p < 0.05$ ). El desplazamiento errático fue estadísticamente más frecuente en el grupo 5-HT/SPY, mientras las hembras del 5-HT presentaron pérdida de equilibrio durante un intervalo de tiempo

significativamente más largo, en ambos casos en comparación con el grupo control. No hubo diferencia significativa para la búsqueda de alimento entre los tratamientos (Tabla V).

Tabla V. Patrones conductuales y cambios morfológicos externos en hembras de *Penaeus vannamei* antes (Control) y después de la inyección de serotonina (5-HT) y serotonina y espiperona (5-HT/SPY).

Patrones	Grupos experimentales		
	Control	5-HT	5-HT/SPY
Desplazamiento (min)	3.13 ± 2.4 <sup>a</sup>	22.45 ± 11.60 <sup>a</sup>	16.26 ± 12.69 <sup>a</sup>
Desplazamiento errático (min)	0 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.15 <sup>a,b</sup>	4.23 ± 2.56 <sup>b</sup>
Pérdida de equilibrio (min)	0 <sup>a</sup>	23.79 ± 20.17 <sup>b</sup>	21.38 ± 5.28 <sup>a,b</sup>
Inmovilidad (min)	16.10 ± 4.76 <sup>a</sup>	17.64 ± 7.58 <sup>a</sup>	19.66 ± 17.89 <sup>a</sup>
Búsqueda alimento (min)	N/A	11.38 ± 6.85 <sup>a</sup>	9.65 ± 11.79 <sup>a</sup>
Flexión del músculo abdominal (%)	0	80	67
Cambio de color en apéndices (%)	0	40	83

Letras desiguales representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n = 12. Patrones en minutos se expresan como media ± desviación estándar.

Según la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ), se observó dependencia significativa de la frecuencia absoluta de la flexión abdominal en relación a 5-HT, presentando un  $\eta^2$  de 0.25. Para 5-HT/SPY, se observaron dependencias muy fuertes ( $p > 0.14$ ) de las frecuencias de la flexión y del cambio en el color de los apéndices en relación al tratamiento, con valores de  $\eta^2$  de 0.58 y 0.69, respectivamente. No se encontraron dependencias significativas de los demás patrones conductuales (Fig. 8).

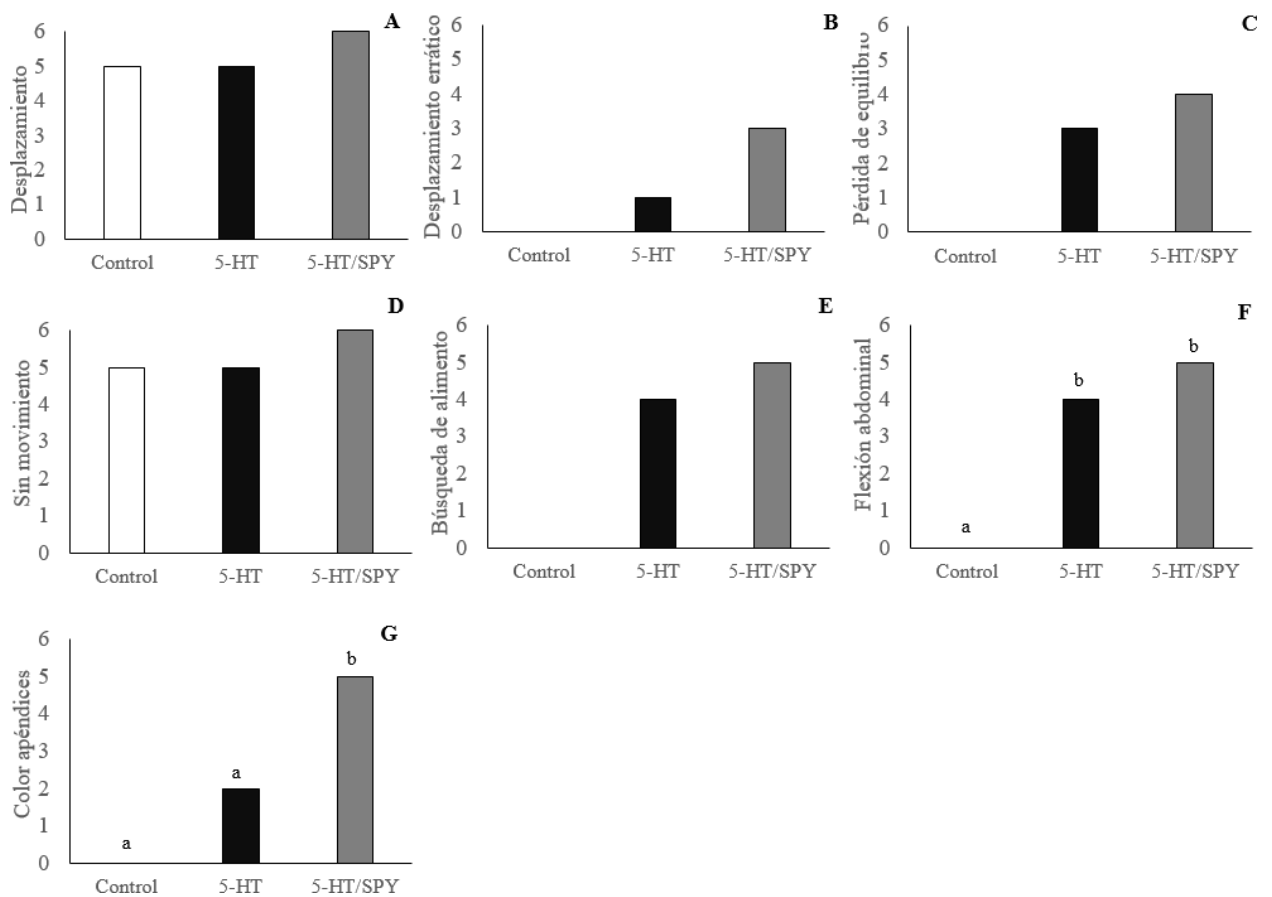


Figura 8. Frecuencia absoluta de los patrones conductuales y cambios morfológicos externos de hembras de *Penaeus vannamei* antes (control, n = 6) y después de la inyección de neurotransmisores serotonina (5-HT) y serotonina y espiperona (5-HT/SPY) durante el periodo experimental. A. Desplazamiento. B. Desplazamiento errático. C. Pérdida de equilibrio. D. Sin movimiento. E. Búsqueda de alimento. F. Flexión abdominal. G. Color en apéndices.

## 3.2 Bioensayo 2

### 3.2.1 Hematología

El tiempo de coagulación y el CTH no presentaron diferencias significativas a lo largo de los muestreos (Figs. 9 y 10).

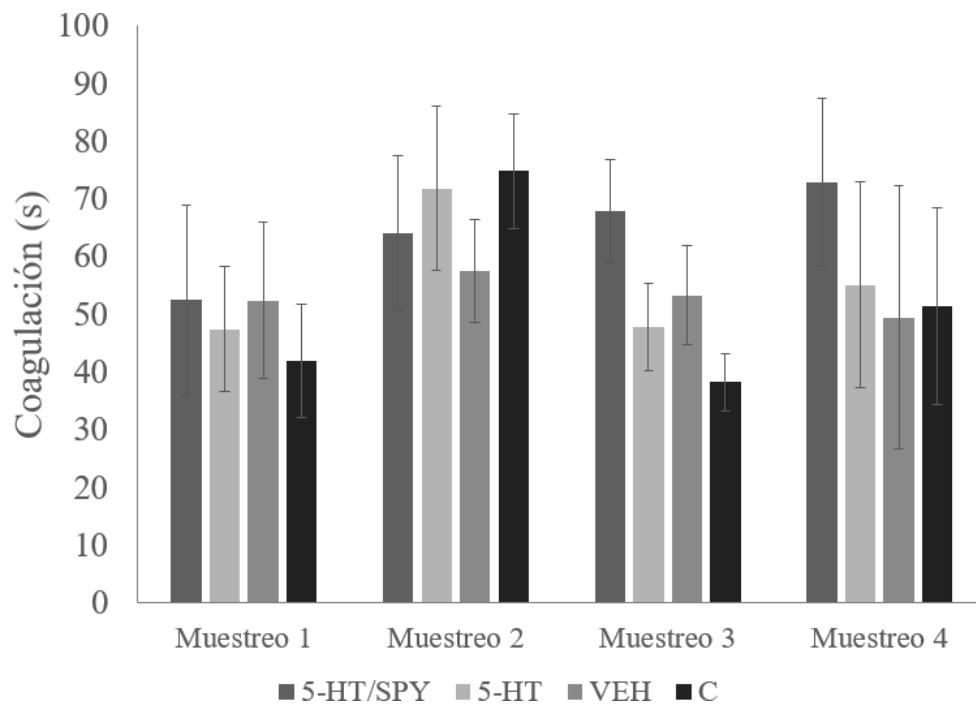


Figura 9. Tiempo de coagulación en segundos de machos de *Penaeus vannamei* tres horas después de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas.

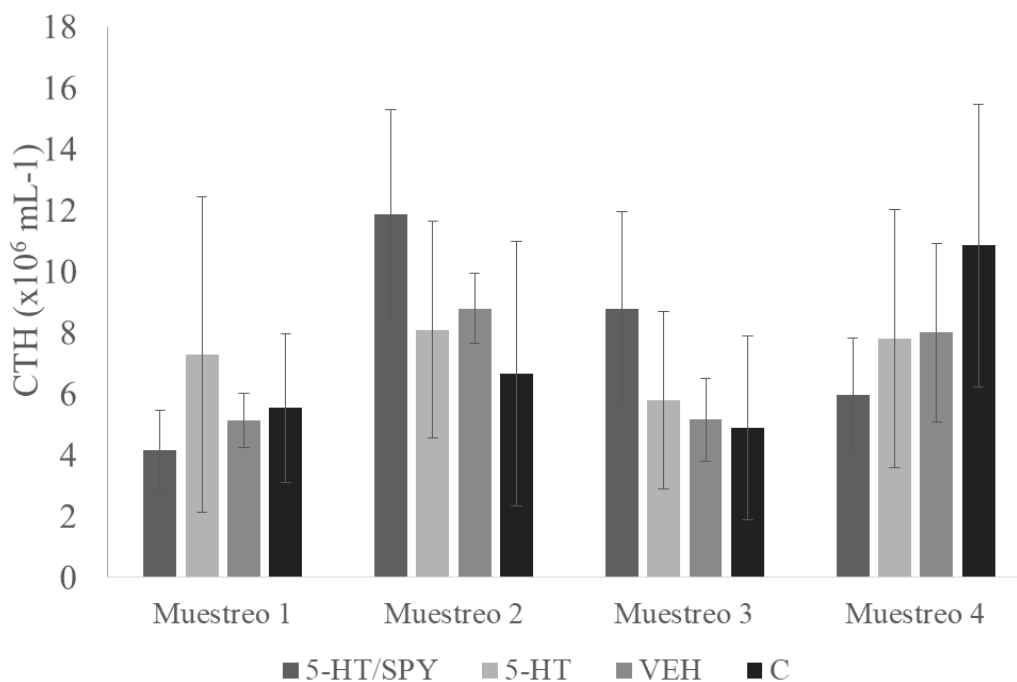


Figura 10. Conteo total de hemocitos (CTH) de machos de *Penaeus vannamei* tres horas después de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas.

Para CDH, se demostró diferencias significativas en la cantidad de hemocitos granulares y hialinos durante cada muestreo mostrando una interacción entre el tratamiento y los muestreos ( $p < 0.05$ ). El tratamiento VEH presentó significativamente los valores más altos de granulares en todos los muestreos, mientras que la cantidad de estos hemocitos en los grupos 5-HT/SPY, 5-HT y control no fueron significativamente diferentes entre ellos, pero si con el VEH, a excepción del muestreo 2, donde no hubo diferencias (Fig. 11A). Por otro lado, este fue importante que se repitió en el recuento de células hialinas, donde los grupos 5-HT/SPY, 5-HT y control no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero si con el VEH, a excepción del muestreo 2 y 4 donde no hubo diferencias. El VEH presentó significativamente la menor cantidad de células hialinas en todos los muestreos (Fig. 11B).

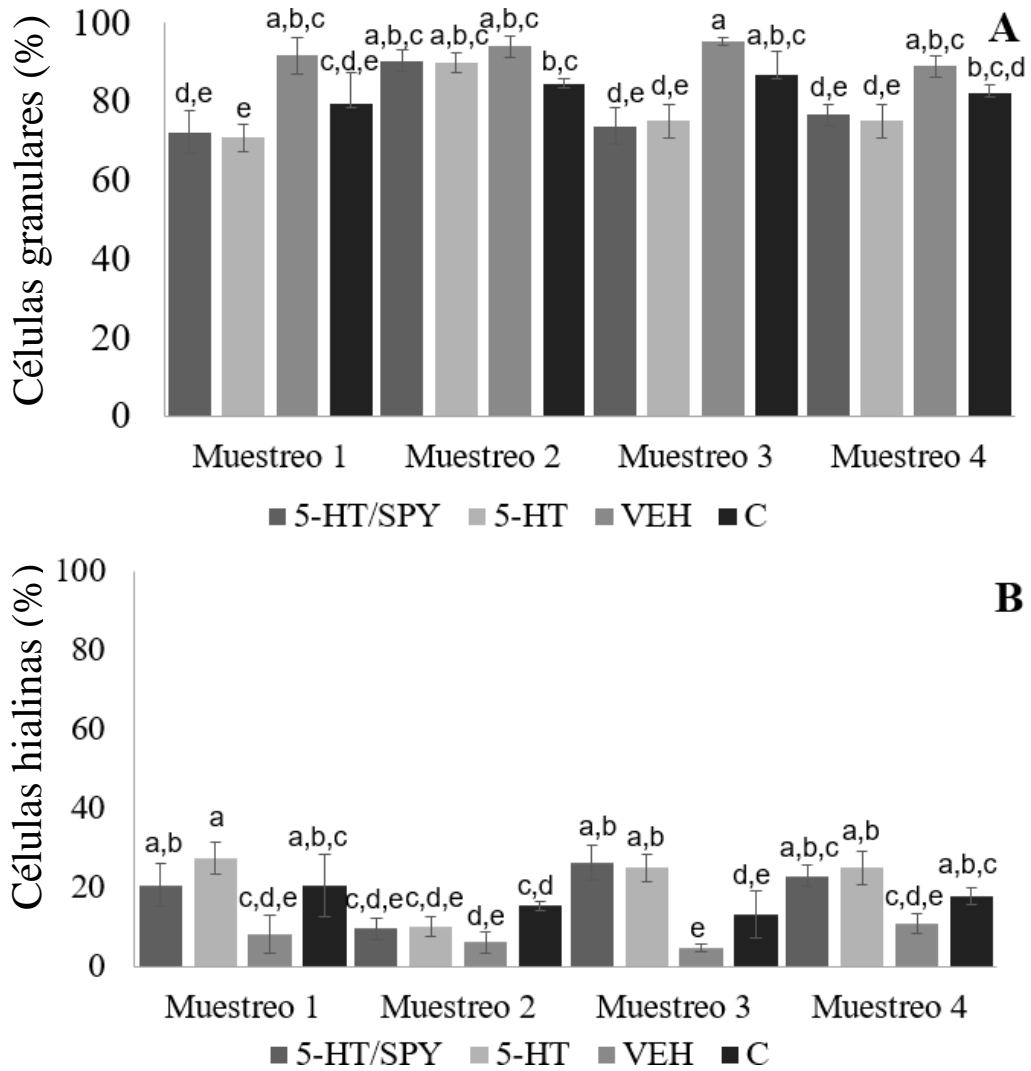


Figura 11. Conteo diferencial de hemocitos de machos de *Penaeus vannamei* tres horas después de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas. A. Hemocitos granulares. B. Hemocitos hialinos. Letras minúsculas desiguales describen las diferencias significativas entre células granulares ( $n = 32$ ,  $p < 0.05$ ).

### 3.2.2 Calidad espermática

No se encontraron diferencias significativas en peso del espermátforo (g), número total de espermatozoides ( $\times 10^6$ ) y tasa de espermatozoides muertos (%) entre los grupos experimentales (Fig. 12). Todos los grupos experimentales presentaron un aumento en la tasa de espermátforos melanizados, siendo más pronunciado en VEH.

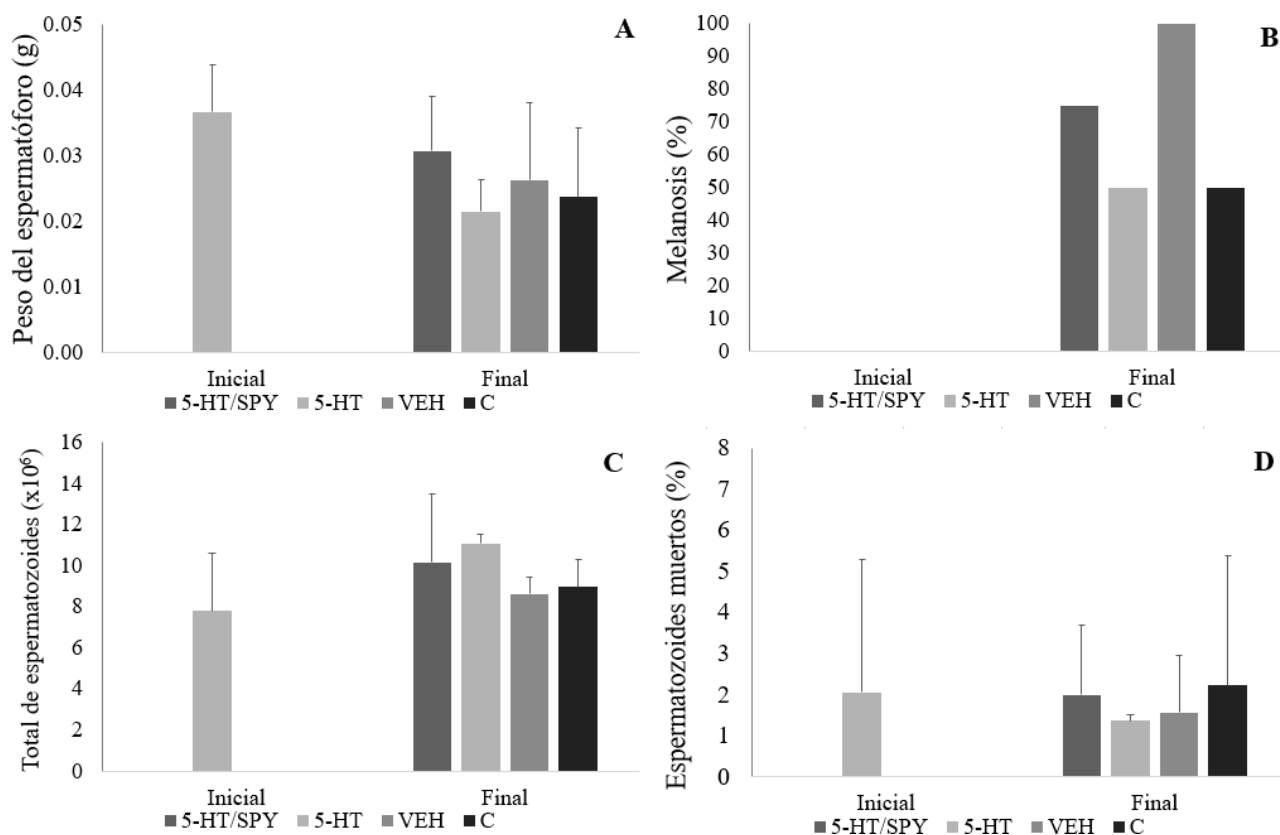


Figura 12. Calidad espermática de machos de *Penaeus vannamei* tras la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (5-HT/SPY), serotonina (5-HT), vehículo (VEH) y grupo control (C) durante el periodo experimental de siete semanas. A. Peso del espermátforo. B. Melanosis (%). C. Número total de espermatozoides ( $\times 10^6$ ). D. Espermatozoides muertos (%).

#### 4. Discusión

Después de la inyección intramuscular serotonina (5-HT) y su combinación con espiperona (5-HT/SPY), se observaron cambios significativos en el comportamiento de las hembras de *P. vannamei*, donde los ejemplares presentaron nado errático y pérdida de equilibrio durante los primeros 24 minutos de su aplicación, conductas que se encontraron ausentes en las hembras control. Este hallazgo guarda relación con lo reportado por Peeke *et al.* (2000), que observaron que la respuesta conductual de la langosta americana *Homarus americanus* depende de la dosis de 5-HT, donde la inyección de dosis superiores a  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  inhibieron la actividad motriz mientras que dosis de  $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  no alteraron su comportamiento. Las dosis de este trabajo ( $25 \text{ } \mu\text{g}$  de serotonina  $\text{g}^{-1}$  y  $5 \text{ } \mu\text{g}$  de espiperona  $\text{g}^{-1}$ ) se basan en las dosis reportadas por Alfaro *et al.* (2004) y aunque fueron inferiores a lo empleado por Peeke *et al.* (2000), también provocaron alteraciones en la locomoción de *P. vannamei*. El apartado es para otros animales y no *vannamei*, discutir o justificar por qué.

La combinación de serotonina con espiperona (5-HT/SPY) tuvo un efecto más agudo en los patrones de desplazamiento errático y el cambio de color de los apéndices. Esto podría sugerir una acción sinérgica entre ambos compuestos, ya que la SPY actúa como antagonista de los receptores tipo  $D_2$  de dopamina (DA) y del receptor  $5\text{-HT}_2$  de la serotonina, interfiriendo en rutas neuroendocrinas asociadas al comportamiento. En *P. clarkii* se observó que la SPY reduce la respuesta sináptica en las terminales de neuronas motoras; identificándose que el receptor  $5\text{-HT}_{2\beta}$  tiene una participación en la actividad motriz (Tabor y Cooper, 2002; Clark *et al.*, 2004). Aunado a ello, se ha reportado que el receptor  $D_2$  regula procesos de locomoción, alimentación y reproducción, mientras que  $5\text{-HT}_{2\beta}$  está vinculado con la neurogénesis

de crustáceos decápodos (Tejas *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Por lo que, su modulación podría explicar la variabilidad conductual que se observó en las hembras tratadas con este protocolo y respalda la hipótesis de que las alteraciones observadas en las hembras podrían estar relacionadas con la interacción de estos compuestos neuromoduladores en los receptores de membrana de *P. vannamei*.

No obstante, surge la interrogante de si los patrones observados podrían estar influidos, en parte, por el vehículo empleado para la disolución de SPY (etanol al 95%). Gutierrez *et al.* (2022) reportaron en *P. clarkii* que exposiciones de hasta 30 minutos a etanol disuelto en agua en concentraciones entre 0.1 y 1 M, provocaron una reducción notable de la actividad locomotora y Swierzbinski y Herberholz (2018) describieron que la exposición etanol disuelto en agua a una concentración de 100 mM por 90 minutos modula la actividad de interneuronas gigantes responsables de respuestas de escape en esta misma especie, destacando la sensibilidad de la red neuronal motora a este compuesto. Estos antecedentes llevaron a considerar que parte de las alteraciones conductuales detectadas en *P. vannamei* en este ensayo podrían no ser exclusivas del efecto farmacológico de la 5-HT y su combinación con SPY, sino también reflejar una posible interacción con los vehículos utilizados. Para identificar esta posibilidad, se diseñó un segundo experimento únicamente con machos y que incorporó controles con los vehículos, permitiendo aislar las respuestas individuales con 5-HT/SPY, 5-HT, VEH y grupo control en variables hematológicas y calidad espermática *P. vannamei*.

En este segundo ensayo se observó que la inyección intramuscular de 5-HT/SPY, 5-HT y VEH no alteraron significativamente los tiempos de coagulación en *P. vannamei* en comparación con el grupo control. Aunque algunos estudios sugieren

que neurotransmisores como la DA podrían intervenir en mecanismos de coagulación en *P. vannamei* al disminuir la cantidad de células hialinas encargadas en este proceso hasta 18 horas posteriores de su inyección (Pan *et al.*, 2011). En comparación, se ha reportado que las células Tgase+ presentes en los hemocitos hialianos son las responsables de los procesos de coagulación en *P. vannamei* (Cui *et al.*, 2022). En el presente estudio, la cantidad de hemocitos hialianos en los grupos tratados con 5-HT fue similar a la del grupo control en la mayoría de los muestreos, lo que podría explicar la ausencia de diferencias en los tiempos de coagulación entre estos grupos experimentales.

Así mismo, Ekhoie *et al.* (2012) reportaron que el etanol aumenta los tiempos de coagulación debido a que degrada las redes de fibrina y retrasa la formación de coágulos. En este trabajo no se observó ninguna alteración significativa que pudiera relacionarse con un efecto directo de la 5-HT, su combinación con la SPY o el empleo de etanol. A pesar de que en algunos grupos los tiempos de coagulación fueron ligeramente más altos cuando se utilizó etanol como vehículo, esta variación no fue suficiente para establecer un efecto directo. Por lo que estos resultados sugieren que, al menos bajo las condiciones evaluadas y con las dosis empleadas, la coagulación en *P. vannamei* no parece verse alterada por la modulación de estos neurotransmisores.

En cuanto al CTH, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con 5-HT/SPY, 5-HT, VEH y el grupo control en *P. vannamei* durante los muestreos. Noonin (2018) reportó que en el cangrejo del Pacífico *Pacifastacus leniusculus* la 5-HT juega un papel en la hematopoyesis, observando un incremento en el CTH dos horas posteriores a la inyección de este neurotransmisor. El tiempo de muestreo cobra fuerza en este análisis, ya que se ha descrito que la 5-HT circula

rápidamente por la hemolinfa durante los primeros 60 min de su aplicación (Peeke *et al.*, 2000). Por otro lado, la combinación de 5-HT con SPY no mostró cambios significativos en el CTH pese a su antagonismo en receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos (Halberstadt *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Pan *et al.* (2011) reportaron que la inyección de DA ( $10^{-7}$  M por camarón) redujo el CTH a las 3 horas de su aplicación, atribuyendo esta respuesta a la posible liberación de enzimas que degradan del sistema profenoloxidasa (proPO), lo que lleva a una disminución en la actividad de la fenoloxidasa y a la degranulación celular. En este trabajo no se observaron cambios significativos en el CTH cuando se empleó 5-HT o su combinación con SPY, posiblemente porque en este trabajo, las dosis por camarón se encontraron por debajo de lo empleado por Pan *et al.* (2011). Con respecto a los vehículos, estos no presentaron alguna alteración en el CTH, lo cual también fue reportado por Pan *et al.* (2011) y Granados-Echegoyen *et al.* (2015) para solución salina y etanol respectivamente.

Los hemocitos son claves en procesos de defensa inmunológica en camarones peneidos (Cui *et al.*, 2022), sin embargo, la inyección de aminas biógenas, procesos de estrés y exposición a patógenos se han reportado como factores que pueden alterar la composición de la hemolinfa (Tong *et al.*, 2020; Le Moullac *et al.*, 1998; Yildirim-Aksoy *et al.*, 2022). Estos resultados podrían indicar que los neurotransmisores ocasionan una respuesta en la hematología de *P. vannamei* pero su efecto en la CTH cambia por factores como el tipo de neurotransmisor, la dosis y el tiempo de muestreo.

En el CDH se observó que en todos los grupos experimentales y en todos los muestreos la cantidad de hemocitos granulares fue mayor que la cantidad de hemocitos hialinos. Se ha descrito que los hemocitos se clasifican según su función en tres tipos:

granulares, que participan activamente en procesos de fagocitosis y almacenamiento de la enzima proPO; semigranulares, con participación en el encapsulamiento y la fagocitosis; e hialinos, encargados de los procesos de coagulación de la hemolinfa y el endurecimiento del exoesqueleto (Gholamhosseini *et al.*, 2020). La variación en la cantidad de estos hemocitos es producto de la respuesta primaria de inmunidad celular no específica en crustáceos (Johansson *et al.*, 2000; Vargas-Albores *et al.*, 2005).

En el tratamiento VEH se observó la predominancia de células granulares en todos los muestreos. Sin embargo, estos valores difieren con lo reportado por Pang *et al.* (2011), quienes no encontraron cambios significativos en el CDH cuando emplearon solución salina como vehículo. El etanol es un fijador no diferencial que elimina el agua, desnaturaliza y precipita proteínas de los tejidos (Lam-Ubol *et al.*, 2018). Esto podría sugerir que el efecto puede ser atribuido al etanol, ya que puede afectar la viabilidad de los hemocitos y generar la fijación de los tejidos (Goldstein, 1986; Nakhleh *et al.*, 2017; Lam-Ubol *et al.*, 2018).

Además, se ha reportado que el etanol genera radicales libres que inducen estrés oxidativo, lo que podría activar mecanismos de defensa y favorecer el aumento de hemocitos granulares, responsables de liberar enzimas antioxidantes para proteger al organismo (Koch *et al.*, 2004). Aunque en este estudio no se midieron parámetros enfocados al gasto energético, que durante cada muestreo se hayan presentado niveles altos de hemocitos granulares podría indicar que hubo una activación continua del sistema inmune, generando un mayor gasto energético para contrarrestar el posible daño generado por el etanol (Xin y Zhang, 2023).

Los grupos 5-HT/SPY, 5-HT y control presentaron en la mayoría de los muestreos una cantidad similar de hemocitos hialinos. Tong *et al.* (2020) reportaron

que el neurotransmisor 5-HT en *P. vannamei* activa la vía PLC-DAG-PKC que se encarga de la síntesis y liberación de células hialinas encargadas principalmente en los procesos de fagocitosis, coagulación y modular el sistema proPO. Así mismo, observaron que compuestos como la DA y la norepinefrina (NE) activan la vía lo que provoca una disminución en la actividad fagocítica. Sin embargo, este efecto se mantuvo incluso cuando se utilizó SPY, un antagonista de DA, bloqueando los efectos inmunomoduladores de la DA y manteniendo los valores de hemocitos hialinos en estos grupos experimentales (Pan *et al.*, 2011). En contraste, la cantidad de hemocitos hialinos en los grupos 5-HT/SPY, 5-HT y control, en comparación con el grupo VEH, sugiere un perfil inmunológico más equilibrado, vinculado con funciones como la fagocitosis y la regulación del sistema proPO. Cabe destacar que, aunque el grupo 5-HT/SPY incluye etanol como vehículo, no mostró la disminución en hemocitos hialinos observada en el VEH, lo que indica que la presencia del neuroactivo podría atenuar el efecto del etanol. Este hallazgo respalda la eficacia y estabilidad del protocolo originalmente desarrollado por Alfaro *et al.* (2004), al mostrar que la combinación de serotonina y espiperona no compromete el equilibrio inmunológico en los animales tratados.

Por último, los parámetros de calidad espermática no se vieron alterados por la inyección de 5-HT/SPY y 5-HT durante el periodo experimental, no obstante, la producción de espermatozoides en estos grupos presentó una tendencia de aumento superior a VEH y control. Esta tendencia coincide con lo reportado por Alfaro-Montoya y Vega (2011) en esta especie con la aplicación 5-HT y su combinación con SPY. Pocos han sido los trabajos que se han centrado en estudiar el efecto de la 5-HT en machos de *P. vannamei*, sin embargo, se ha descrito que los neurotransmisores

pueden inducir respuestas fisiológicas en los machos de camarones peneidos solo cuando actúan en conjunto con estímulos ambientales apropiados, como fotoperiodo o contacto con hembras receptivas. Además, la espermatogénesis es un evento que requiere más tiempo para observar efectos tras una modulación neuroendocrina (Alfaro-Montoya y Vega, 2011). Por ello, es posible que el periodo de evaluación en este estudio haya sido insuficiente para identificar cambios significativos en la calidad espermática.

Alfaro-Montoya y Vega (2011), al igual que en este trabajo, los autores inyectaron cuatro veces a los machos durante un periodo de siete semanas, observando una tendencia de aumento en el número de espermatozoides de *P. vannamei* en el tratamiento que incluyó SPY, mientras que en *P. stylirostris* y *P. occidentalis* esta tendencia se registró únicamente con 5-HT. Los autores sugieren que esta distinción entre especies se debe a diferencias en la regulación endocrina de la reproducción entre estas especies.

De forma paralela la SPY juega un rol antagónico de los receptores D<sub>2</sub> de DA, enfocado en la reproducción en crustáceos. Diferentes estudios han descrito que la DA tiene un efecto supresor en la liberación de gonadotropinas y otros neuropéptidos que regulan la maduración gonadal en machos y hembras (Prasad *et al.*, 2014). En este estudio, la combinación de 5-HT con SPY en machos mostró una tendencia a favorecer el efecto positivo de la 5-HT sobre la espermatogénesis, al no verse influida por la acción antagónica y supresora de la DA, se observaron valores ligeramente superiores en comparación con los grupos VEH y control (Alfaro-Montoya y Vega, 2011). Lo anterior sugiere que el incremento de espermatozoides en este trabajo fue producto de la inyección de neurotransmisores que promueve la estimulación de la

espermatogénesis en crustáceos decápodos una vez alcanzada su madurez sexual (Sarojini *et al.*, 1995a; Sarojini *et al.* 1995b; Klingunga *et al.*, 2012; Farhadi *et al.*, 2020).

Por otro lado, el papel inmunológico de los hemocitos granulares y su papel en la ruta de activación del proPO cobra sentido ya que se ha vinculado con la aparición de melanosis. En este estudio, el grupo VEH presentó una cantidad elevada de hemocitos granulares, lo que podría estar relacionado con una activación constante del sistema inmune y alteraciones de la ruta proPO (Pan *et al.*, 2011). Braga *et al.* (2018) señalan que la melanización puede desencadenarse ante eventos de estrés específicos, como el daño en tejidos reproductivos, por ejemplo, durante la extracción del espermátforo. En ese sentido, la infiltración de hemocitos y la activación del sistema proPO forman parte de la respuesta inflamatoria. Pese a que se ha descrito que la melanosis puede ser causada por agentes infecciosos, daño tisular o estrés fisiológico (Cerenius & Söderhäll, 2004; Amparyup *et al.*, 2013) en este estudio no se realizaron estudios para evaluar esta activación. Considerando lo anterior, existe la posibilidad de que el etanol, al actuar como estresor, podría estar favoreciendo este tipo de respuesta en el sistema reproductor, contribuyendo a la aparición de espermátforos melanizados debido a su predominancia en los machos con VEH. No obstante, esta hipótesis debe ser confirmada con estudios específicos que evalúen el efecto del etanol sobre la integridad tisular y la activación del sistema proPO en *P. vannamei*.

## 5. Conclusión

El protocolo de modulación con 5-HT y su combinación SPY modificó el comportamiento de hembras de *P. vannamei* sin alterar negativamente los parámetros

los tiempos de coagulación y el conteo total de hemocitos en machos. Estos protocolos no alteraron la composición celular, a diferencia del grupo VEH, que presentó un aumento de hemocitos granulares, posiblemente relacionado con una respuesta al estrés fisiológico inducido por el etanol. Esta respuesta sugiere que el etanol como vehículo podría inducir activación inmunitaria, pero es mitigado cuando se emplean neurotransmisores. Se observó una tendencia al aumento en la producción de espermatozoides únicamente en los grupos con 5-HT y 5-HT/SPY, lo que podría estar reflejando su efecto estimulante sobre la espermatogénesis. Estos hallazgos respaldan el uso del protocolo con neurotransmisores como una herramienta funcional y segura en el manejo reproductivo de *P. vannamei* aportando evidencia al entendimiento del vínculo entre comportamiento, inmunidad y neurotransmisores en crustáceos.

### CAPÍTULO 3. Conclusiones generales.

Esta investigación evaluó el efecto de un protocolo de modulación con neurotransmisores como alternativa a la APO en el camarón blanco *P. vannamei* establecidas por Alfaro *et al.* (2004). Estos efectos fueron reportados a partir del estudio del comportamiento, hematología y calidad espermática en condiciones de cautiverio con la implementación de este protocolo en machos y hembras, los cuales hasta el momento no han sido reportados para la especie.

En las hembras, la aplicación de neurotransmisores provocó cambios en el comportamiento, lo que sugiere una acción neuromoduladora mientras que en machos los vehículos (etanol 95% y solución salina) cambiaron la composición celular de la hemolinfa, sin embargo, la combinación con serotonina y espiperona estabilizó este efecto. De forma complementaria, se observó un incremento en los procesos de espermatogénesis en los machos que fueron tratados con neurotransmisores. Lo anterior complementa el efecto reportado por Alfaro *et al.* (2004) y Quesada-Ávila *et al.* (2024) en el aceleramiento de la maduración ovárica en hembras de *P. vannamei*, lo cual resulta importante, ya que el éxito en los procesos reproductivos en los camarones peneidos depende de ambos sexos.

Estos hallazgos permite el establecimiento de pautas conductuales en *P. vannamei*, las cuales no han sido reportadas, y que podrían establecer posibles indicadores de bienestar animal. Así mismo, se demostró que los neurotransmisores no alteran la hematología y procesos reproductivos, demostrando que es posible estimular a procesos reproductivos con este protocolo sin comprometer el estado de los organismos de cultivo. Lo anterior representa un paso más adelante hacia un cultivo

de camarón libre de técnicas de crueldad animal y que se apega ante las políticas actuales de bienestar animal dentro del sector acuícola.

## REFERENCIAS

- Aguilar Padilla, J. A., Kondo López, J., Arosemena Villarreal, R. & Preciado Rubio, V. (2009). Plan maestro de camarón de altamar del estado de Sinaloa. Isa. Culiacán, Sin. 344 p.
- Alfaro Montoya, J. (2001). Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement. Texas A & M University, Estados Unidos.
- Alfaro, J., & Lozano, X. (1993). Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society, 24(4), 522-529.
- Alfaro, J., Zúñiga, G., & Komen, J. (2004). Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and a dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 236 (1–4), 511–522.
- Alfaro-Montoya, J. & Vega, L. A. (2011). The effect of environmental cues and neurotransmitters on male sexuality of the Eastern Pacific *Penaeus (Litopenaeus)* species. Aquaculture (316), 60-67.
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., Vargas, M., & Umaña-Castro, R. (2016). Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoal capacitation. Invertebrate reproduction & development, 61(1), 9-17.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2013).

- Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 990-1001.
- Birch, J., Burn, C., Schnell, A., Browning, H., & Crump, A. (2021). Review of the evidence of sentience in cephalopod molluscs and decapod crustaceans.
- Braga, A., Lopes, D. L., Magalhaes, V., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2015). Use of biofloc technology during the pre-maturation period of *Litopenaeus vannamei* males: effect of feeds with different protein levels on the spermatophore and sperm quality. *Aquaculture research*, 46(8), 1965-1973.
- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M. C., Romano, L.A., Poersch, L. H. & Wasielesky, W. (2018). Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture* (486), 64-67.
- Braga, A., Lopes, D., Poersch, L. & Wasielesky Jr, W. (2013). Spermatophore and sperm quality of the Pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed with fresh food supplemented with pollen and paprika. *Aquaculture*, 380, 29-32.
- Bückle, L. F., Barón, B., & Hernández, M. (2006). Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Revista de biología tropical*, 54(3), 745-753.
- Ceballos-Vázquez, B. P., Aparicio-Simón, B., Palacios, E., & Racotta, I. S. (2004). Sperm Quality Over Consecutive Spermatophore

- Regenerations in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 35(2), 178-188.
- Chang, Z. W., Chiang, P. C., Cheng, W., & Chang, C. C. (2015). Impact of ammonia exposure on coagulation in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 98-102.
- Chang, T., Wang, P., Han, F., Liang, X., Xiao, X., Chen, H. & Li, E. (2024). Characterization of gonadal development phases and maturation mechanisms in male Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 584, 740669.
- Clark, M. C., Dever, T. E., Dever, J. J., Xu, P., Rehder, V., Sosa, M. A., & Baro, D. J. (2004). Arthropod 5-HT<sub>2</sub> receptors: a neurohormonal receptor in decapod crustaceans that displays agonist independent activity resulting from an evolutionary alteration to the DRY motif. *Journal of Neuroscience*, 24(13), 3421-3435.
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). (2021). Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2021. Gobierno de México.
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). (2024). Se posiciona México como el segundo mejor productor de camarón en Latinoamérica. Gobierno de México.
- Costa, A. M., & Martins, P. C. C. (2009). Análise da contagem total de

- hemócitos e capacidade coagulante da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em cultivos com ocorrência de necrose muscular. Boletim do Instituto de Pesca, 35(4), 545-551.
- Cui, C., Tang, X., Xing, J., Sheng, X., Chi, H., & Zhan, W. (2022). Single-cell RNA-seq uncovered hemocyte functional subtypes and their differentiatonal characteristics and connectivity with morphological subpopulations in *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in immunology*, 13, 980021.
- Durán Cobo, G. M., (2016). Evaluación patológica de *Litopenaeus vannamei* cultivados en granjas ubicadas en el estuario del Río Chone (Ecuador). *AquaTIC*, (44), 30-42.
- Ekhoeye, E. I., Nwangwa, E. K., & Ugoji, A. E. (2012). Chronic alcohol consumption modulates the clotting time in wistar rats. *Journal of dental and medical Sciences*, 2, 5.
- Farhadi, A., Harlioglu, M.M. & Yilmaz, O. (2020). Effect of serotonin injection on the reproductive parameters and haemolymph methyl farnesoate level in the narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Aquac. Res.* 51, 155-163.
- Feijó, R. G., Braga, A. L., Lanes, C. F., Figueiredo, M. A., Romano, L. A., Klosterhoff, M. C. & Marins, L. F. (2016). Silencing of gonad-inhibiting hormone transcripts in *Litopenaeus vannamei* females by use of the RNA interference technology. *Marine Biotechnology*, 18, 117-123

- Fingerman, M. (1997). Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction & Development*, Vol. 31(1-3), 47-54.
- Gholamhosseini, A., Kheirandish, M. R., Shiry, N., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Roshanpour, H., & Banaee, M. (2020). Use of a methanolic olive leaf extract (*Olea europaea*) against white spot virus syndrome in *Penaeus vannamei*: Comparing the biochemical, hematological and immunological changes. *Aquaculture*, 528, 735556.
- Goldstein, D. B. (1986). Effect of alcohol on cellular membranes. *Annals of emergency medicine*, 15(9), 1013-1018.
- González-González, A., Mendoza-Alfaro, R., Aguirre-Guzman, G., & Sánchez-Martínez, J. G. (2009). Growth performance, survival and maturation of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an inland CRS with no water reposition. *Aquaculture Research*, 40(12), 1428-1438.
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alexander-Aguilera, A., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernández, N., & de Jesús Chairez-Martinez, E. (2015). Effects of aqueous and ethanol extract of dried leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae) on haematological and biochemical parameters of wistar rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(2), 129-134.
- Gutierrez, A., Creehan, K. M., de Guglielmo, G., Roberts, A. J., & Taffe,

- M. A. (2022). Behavioral effects of ethanol in the Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). *Journal of the experimental analysis of behavior*, 117(3), 472-492.
- Gutiérrez-Vera, J. A., Ponce-Rivas, E., Braga, A., Paniagua-Chávez, C. G., Alfaro-Montoya, J., & Rosales-Leija, M. (2024). Evidence of the existence of site-specific female contact pheromones involved in the sexual interaction behavior of the pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Animals*, 14(11), 1523.
- Halberstadt, A. L., Van Der Heijden, I., Ruderman, M. A., Risbrough, V. B., Gingrich, J. A., Geyer, M. A., & Powell, S. B. (2009). 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors exert opposing effects on locomotor activity in mice. *Neuropsychopharmacology*, 34(8), 1958-1967.
- Instituto Mexicano de Investigación en Pesca y Acuicultura Sustentable (IMIPAS). (2018). *Acuicultura camarón blanco del Pacífico*. Gobierno de México.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3), 45-52.
- Klinbunga, S., Petkorn, S., Kittisenachai, S., Phaonakrop, N., Roytrakul, S., Khamnamtong, B. & Menasveta, P. (2012). Serotonin-induced reproductive gene expression in *Penaeus monodon*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 363, 162-170.
- Koch, O. R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farrè, S., & Galeotti, T. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses in

ethanol-induced cell injury. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 191-198.

Lam-Ubol, A., Kitrueangphatchara, K., Putthanuparp, T., Arayakhun, R., Kwanthong, R., & Choonhawarakorn, K. (2018). Nonformalin fixative agents: a comparative study of fixative efficacy and histomorphology. *International Journal of Surgical Pathology*, 26(8), 701-706.

Leung-Trujillo, J.R. & Lawrence, A.L. (1987). Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*. 65, 363-370

Martínez, M. D. L. Á. P., Morales, I. M., Bustamante, M. L. U., Montaldo, H. H., & Castillo-Juárez, H. (2013). Morfología del sistema reproductor y del espermatóforo de *Litopenaeus vannamei*, camarón blanco del Pacífico. *Hidrobiológica*, 23(3), 313-319.

Nagaraju, G. P. C. (2007). Is methyl farnesoate a crustacean hormone? *Aquaculture*, 272 (1-4), 39-54.

Nakayama, C. L., Lopes, D., Braga, A., Wasielesky, W., & Cavalli, R. O. (2020). Does temperature affect the occurrence of penaeid spermatophore melanization related to successive manual extrusions? A case study with the closed thelycum *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture International*, 28(4), 1657-1663.

Nakhleh, J., El Moussawi, L., & Osta, M. A. (2017). The melanization

response in insect immunity. *Advances in insect physiology*, 52, 83-109.

Ngernsoungnern, P., Ngernsoungnern, A., Kavanaugh, S., Sobhon, P., Sower, S. A., & Sretarugsa, P. (2008). The presence and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like factor in the central nervous system of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology*, 155(3), 613-622.

Noonin, C. (2018). Involvement of Serotonin in crayfish hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 86, 189-195.

Ongvarrasopone, C., Roshorm, Y., Somyong, S., Pothiratana, C., Petchdee, S., Tangkhabuanbutra, J. & Panyim, S. (2006). Molecular cloning and functional expression of the *Penaeus monodon* 5-HT receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1759(7), 328-339.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). (2022). Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. La transformación azul en acción. Roma, FAO.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). (1988). Consultoría en la maduración de camarones

- peneidos (*P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. schmitti*): 14/12/87-08/01/88. Informe técnico.
- Pan, L., Hu, F., & Zheng, D. (2011). Effect of dopamine injection on the hemocyte count and prophenoloxidase system of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Ocean University of China*, 10, 280-286.
- Peeke, H. V. S., Blank, G. S., Figler, M. H., & Chang, E. S. (2000). Effects of exogenous serotonin on a motor behavior and shelter competition in juvenile lobsters (*Homarus americanus*). *Journal of Comparative Physiology A*, 186, 575-582.
- Prasad, G. L. V., Naik, B. R., Ko, J. E., & Nagaraju, G. P. (2014). Effects of naloxone, serotonin, and dopamine on reproduction of the freshwater crab *Barytelphusa guerini*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 321(3), 173-182.
- Quesada-Ávila, I., Alfaro-Montoya, J., Umaña-Castro, R., Braga, A., Ramírez-Alvarado, M., & Ventura, T. (2024). Serotonin plus sipiperone induce ovarian maturation, spawning and potential release of ovarian maturation inducing pheromones in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Aquaculture Reports*, 37, 102257.
- Ramos-Cruz, S. (2012). Aspectos biológicos y poblacionales del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), durante la veda de 2006 en el Golfo de Tehuantepec, México. *CICIMAR Oceánides*,

27(1), 11-24.

- Rezende, P. C., Miranda, C., Fracalossi, D. M., Hayashi, L., Seiffert, W. Q., do Nascimento Vieira, F., & Schleder, D. D. (2022). Brown seaweeds as a feed additive for *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system improved resistance to thermal stress and white spot disease. *Journal of Applied Phycology*, 34(5), 2603-2614.
- Sainz Hernández, J. C., Racotta, I. S., Dumas, S., & Hernández-López, J. (2008). Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*, 283, 1–4.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R. & Fingerman, M. (1995a). In vivo effects of dopamine and dopaminergic antagonists on testicular maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol. Bull.* 189, 340–346.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Devi, M. & Fingerman, M., (1995b). Dopaminergic inhibition of 5-hydroxytryptamine-stimulated testicular maturation in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112C, 287–292.
- Subramoniam, T., & Kirubakaran, R. (2010). Endocrine regulation of vitellogenesis in lobsters. *J. Mar. Biol. Ass.* 52, 229-236.
- Swierzbinski, M. E., & Herberholz, J. (2018). Effects of ethanol on sensory inputs to the medial giant interneurons of crayfish. *Frontiers in Physiology*, 9, 448.
- Tabor, J. N., & Cooper, R. L. (2002). Physiologically identified 5-HT<sub>2</sub>-

like receptors at the crayfish neuromuscular junction. *Brain research*, 932(1-2), 91-98.

Tan, K., Jiang, H., Jiang, D., & Wang, W. (2020). Sex reversal and the androgenic gland (AG) in *Macrobrachium rosenbergii*: A review. *Aquaculture and Fisheries*, 5(6), 283-288.

Tejas Juárez, J. G., Mancilla Díaz, J. M., Florán Garduño, B., & Escartín Pérez, R. E. (2010). Los receptores dopaminérgicos D2/D3 hipotalámicos participan en la regulación del comportamiento alimentario. *Revista mexicana de análisis de la conducta*, 36(2), 53-69.

Tinikul, Y., Poljaroen, J., Nuurai, P., Anuracpreeda, P., Chotwivatthanakun, C., Phoungpetchara, I., Kornthong, N., Poomtong, T., Hanna, P.J., & Sobhon, P. (2011). Existence and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Cell and Tissue Research*, 343 (3), 579-593.

Tinikul, Y., Soonthornsumrith, B., Phoungpetchara, I., Meeratana, P., Poljaroen, J., Duangsuwan, P. & Sobhon, P. (2009). Effects of serotonin, dopamine, octopamine, and spiperone on ovarian maturation and embryonic development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Crustaceana*, 82(8).

Tiu, S. H. K., & Chan, S. M. (2007). The use of recombinant protein and

- RNA interference approaches to study the reproductive functions of a gonad-stimulating hormone from the shrimp *Metapenaeus ensis*. The FEBS journal, 274 (17), 4385-4395.
- Tomy, S., Saikrithi, P., James, N., Balasubramanian, C. P., Panigrahi, A., Otta, S. K., & Ponniah, A. G. (2016). Serotonin induced changes in the expression of ovarian gene network in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture, 452, 239-246.
- Tong, R., Pan, S., Pan, L., & Zhang, L. (2020). Effects of biogenic amines on the immune response and immunoregulation mechanism in hemocytes of *Litopenaeus vannamei* in vitro. Molecular immunology, 128, 1-9.
- Tropea, C., & Lopez Greco, L. S. (2013). Effect of long-term injection of dopamine on the ovarian growth of *Cherax quadricarinatus* juvenile females (Parastacidae, Decapoda). Acta Zoologica, 94 (4), 462-470.
- Vaca, A. A., & Alfaro, J. (2000). Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by serotonin injection. Aquaculture, 182 (3-4), 373-385.
- Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., & Hernández-López, J. (2005). Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. Aquaculture Research, 36(4), 352-360.
- Wilder, M. N., Okumura, T., Suzuki, Y., Fusetani, N., & Aida, K. (1994).

Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration.

Wongprasert, K., Asuvapongpatana, S., Poltana, P., Tiensuwan, M., & Withyachumnarnkul, B. (2006). Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 261(4), 1447-1454.

Xin, F., & Zhang, X. (2023). Hallmarks of crustacean immune hemocytes at single-cell resolution. *Frontiers in Immunology*, 14, 1121528.

Yildirim-Aksoy, M., Eljack, R., Peatman, E., & Beck, B. H. (2022). Immunological and biochemical changes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105787.

Zacarias, S., Carboni, S., Davie, A., & Little, D. C. (2019). Reproductive performance and offspring quality of non-ablated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under intensive commercial scale conditions. *Aquaculture*, 503, 460-466.

Zacarias, S., Fegan, D., Wangsoontorn, S., Yamuen, N., Limakom, T., Carboni, S. & Shinn, A. P. (2021). Increased robustness of postlarvae and juveniles from non-ablated Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, broodstock post-challenged with pathogenic isolates of *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) and white spot disease (WSD). *Aquaculture*, 532, 736033.

Zhang, Y., Benton, J. L., & Beltz, B. S. (2011). 5-HT receptors mediate

lineage-dependent effects of serotonin on adult neurogenesis in  
*Procambarus clarkii*. Neural development, 6, 1-22.