



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



Efectos del uso de la serotonina y del antagonista de la dopamina (espiperona) en la calidad espermática y estrés oxidativo de machos *Litopenaeus vannamei* tras sucesivas extracciones de espermátforo

TESIS

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

PRESENTA

Aketzali Amador Esquivel

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, ENERO 2024

Resumen

El cultivo de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es una de las industrias más importantes a nivel mundial y está constituido por un paquete tecnológico de tres fases: reproducción inducida, cultivo de larvas y crecimiento. Las principales limitantes se encuentran en la fase de reproducción inducida, para contrarrestar esto, en la actualidad se induce a la maduración por medio de la extirpación del pedúnculo ocular en hembras que en la actualidad se considera menos viable por sus efectos negativos concomitantes en diversos ámbitos, tal como el estrés oxidativo. Por este motivo se han propuesto alternativas a esta técnica, tal como la manipulación de neurotransmisores mediante la inyección intramuscular de serotonina (5-HT) y espiperona (SPY), antagonista del neurotransmisor dopamina (DA), de la cual ya existe un protocolo en el que se considera su aplicación en la industria por medio del alimento. Sin embargo, para que esto suceda es indispensable saber los efectos de este protocolo en ambos sexos, a pesar de esto, las investigaciones se han centrado en el desempeño reproductivo de las hembras, no hay estudios del efecto que puede tener la aplicación de 5-HT y SPY en machos *L. vannamei*. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la inyección de serotonina y espiperona (5-HT – SPY), en la calidad espermática y el estrés oxidativo de machos adultos *L. vannamei* después de regeneraciones sucesivas de los espermatozoides inducidas por su extracción manual. Para cumplir con este objetivo, se establecieron tres grupos experimentales: Control (C), Solución Salina Fisiológica (SSF), y Serotonina y Espiperona (5-HT – SPY), cada uno con 4 réplicas de 20 machos, realizándose muestreos cada 15 días, resultando en un total de cuatro aplicaciones y cinco extracciones de espermatozoides. Estos espermatozoides se utilizaron para evaluar la calidad espermática, la cual consistió en la evaluación de la ausencia de espermatozoides, presencia de melanización, peso del espermatozoides, conteo de espermatozoides, tasa de espermatozoides muertos e índice espermatosomático. Al final del estudio, se aplicó eutanasia a los camarones y se colectaron hepatopáncreas y testículos para la extracción del ARN, a partir del cual se sintetizó cDNA para la medición de la expresión relativa mediante genes blanco representativos de los procesos de estrés oxidativo (*LvTRx*, *LvcMnSOD*, *LvGPx*,) y reproducción (*LvDmc1*) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando tres genes de referencia (*LvEF1 α* , *LvL8* y *LvGAPDH*). Se obtuvo un mayor número en el conteo total de espermatozoides en el tratamiento 5-HT – SPY en la quinta extracción a comparación de los otros grupos experimentales y se encontró una relación entre estas dos variables mediante una regresión lineal. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los otros parámetros evaluados para calidad espermática. De igual manera, no hubo diferencias significativas en la expresión génica de los genes blanco para estrés oxidativo ni para el gen *LvDmc1*. En conclusión, la respuesta a la aplicación de 5HT – SPY para promover el aumento del número de espermatozoides en machos *L. vannamei* muestra un comportamiento tiempo-dependiente sin promover el estrés oxidativo a los 15 días post-inyección.

Palabras clave: ***L. vannamei*, machos, calidad espermática, neurotransmisores, serotonina, dopamina, espiperona, estrés oxidativo, expresión génica, qPCR.**

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

**EFFECTOS DEL USO DE LA SEROTONINA Y DEL ANTAGONISTA
DE LA DOPAMINA (ESPIPERONA) EN LA CALIDAD
ESPERMÁTICA Y ESTRÉS OXIDATIVO DE MACHOS *Litopenaeus*
vannamei TRAS SUCESIVAS EXTRACCIONES DE
ESPERMATÓFORO**

T E S I S

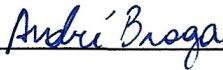
**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

AKETZALI AMADOR ESQUIVEL

Aprobada por:



Dr. André Luiz Braga de Souza

Director de tesis



Dra. Laura Liliana López Galindo

Co-directora de tesis



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

Sinodal



Dr. Misael Rosales Leija

Sinodal

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

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

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Director de tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Aketzali Amador Esquivel** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

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


EFFECTOS DEL USO DE LA SEROTONINA Y DEL ANTAGONISTA DE LA DOPAMINA (ESPIPERONA) EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y ESTRÉS OXIDATIVO DE MACHOS *Litopenaeus vannamei* TRAS SUCESIVAS EXTRACCIONES DE ESPERMATÓFORO

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

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

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

A t e n t a m e n t e,



Dr. André Luiz Braga de Souza
Director de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

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

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

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Co-directora de tesis** encargada de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Aketzali Amador Esquivel** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

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

EFFECTOS DEL USO DE LA SEROTONINA Y DEL ANTAGONISTA DE LA DOPAMINA (ESPIPERONA) EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y ESTRÉS OXIDATIVO DE MACHOS *Litopenaeus vannamei* TRAS SUCESIVAS EXTRACCIONES DE ESPERMATÓFORO

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

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

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,



Dra. Laura Liliana López Galindo
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

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

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

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Aketzali Amador Esquivel** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

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

EFFECTOS DEL USO DE LA SEROTONINA Y DEL ANTAGONISTA DE LA DOPAMINA (ESPIPERONA) EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y ESTRÉS OXIDATIVO DE MACHOS *Litopenaeus vannamei* TRAS SUCESIVAS EXTRACCIONES DE ESPERMATÓFORO

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

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

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

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

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

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Aketzali Amador Esquivel** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

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

EFECTOS DEL USO DE LA SEROTONINA Y DEL ANTAGONISTA DE LA DOPAMINA (ESPIPERONA) EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y ESTRÉS OXIDATIVO DE MACHOS *Litopenaeus vannamei* TRAS SUCESIVAS EXTRACCIONES DE ESPERMATÓFORO

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

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

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. Misael Rosales Leija
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Dedicatoria

A nube, nos volveremos a encontrar.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCyT) por haberme otorgado la beca 798153 para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), Facultad de Ciencias Marinas, al Laboratorio de producción de camarón y al Laboratorio de Genómica funcional por su recibimiento y valioso apoyo en mi formación.

Al Dr. André L. Braga de Souza por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, su apoyo, enseñanzas, tiempo y por todos los conocimientos, académicos y personales, que me brindo durante la maestría.

A la Dra. Laura L. López Galindo por adoptarme en su equipo, por sus conocimientos, el tiempo y recursos invertidos en mí, por sus palabras de aliento y sobre todo le agradezco profundamente por mostrarme y abrirme el mundo de la biología molecular.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Mario A. Galaviz Espinoza y Dr. Misael Rosales Leija, por sus valiosos aportes, comentarios, correcciones y acompañamiento durante la realización de mi maestría.

Al personal del laboratorio de genómica funcional, muchas gracias, Enrique Valenzuela por siempre apoyarme en cuestión de material, información y espacios.

A mis compañeros de laboratorio Vita M., Raul Claro de los Santos, Vladimir Montoya, Dayanna Vera, Rigo A., Mari Notario, definitivamente sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis compañeros y amigos de la maestría, Selene, Isabel, Abril, Iliana, Ileana, sobre todo, sin ustedes la maestría no hubiese sido lo mismo, les debo mis días más amenos.

A mis amigos de juegos de mesa y DnD, gracias por darme un espacio seguro donde jugar y reír.

A mis fisgonas, que, a pesar de la distancia y mi ausencia, nunca me abandonaron en esencia. Las quiero con todo mi ser.

A mi familia, Elena, Jesús, Jazmín, Nahum, Fany, la vida con ustedes es más bonita, sin su apoyo, constancia y creencia en mí, esto no habría sido posible. Por siempre estaré agradecida con ustedes.

A Raúl, por estar y acompañarme en mis días más oscuros y alegres, por ser motivo de muchos de ellos y realmente ser un compañero con el cual sé que cuento para todo, tienes mi amor y aprecio infinito, gracias por todo (literalmente TODO)

A todos aquellos que pudiese haber omitido por algún problema de memoria, tienen mi más sentido agradecimiento porque sé que este logro fue gracias al esfuerzo colectivo y no solo del individual.

índice

Resumen	ii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Índice de fotografías	x
Capítulo 1: Revisión de la biología reproductiva de los machos <i>Litopenaeus vannamei</i>	1
1. Introducción general	1
1.1 Características generales de <i>Litopenaeus vannamei</i>	1
1.2 Camaronicultura de <i>L. vannamei</i>	2
1.3 Ablación del pedúnculo ocular (APO)	3
1.4 Estrés oxidativo	4
1.5 Alternativas para el mejoramiento reproductivo en <i>L. vannamei</i>	9
1.5.1 Serotonina y Dopamina	10
1.6 Neuroendocrinología y morfología reproductiva de machos <i>L. vannamei</i>	12
1.6.1 Neuroendocrinología	13
1.6.2 Anatomía	15
1.7 Maduración sexual	18
1.7.1 Nivel 1. Maduración testicular	19
1.7.2 Nivel 2. Maduración en el conducto deferente	22
1.7.3 Nivel 3. Síntesis de espermátóforos	23
1.8 Calidad del espermátóforo y espermática	26
1.8.1 Extracción de espermátóforos	28
1.9 Reproducción inducida en machos <i>L. vannamei</i>	30
Capítulo 2: Evaluación del efecto de Serotonina y Espiperona en la calidad espermática y estrés oxidativo del camarón blanco del Pacífico, <i>Litopenaeus vannamei</i> , tras sucesivas extracciones del espermátóforo	32
2. Antecedentes	32
2.1 Efectos reproductivo de la aplicación de 5-HT y el antagonista de la DA, SPY	32
2.2 Expresión de genes inducidos por la aplicación de 5-HT y SPY	34
Justificación	35
Hipótesis	36
Objetivos	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37

Introducción	38
Materiales y métodos	41
Resultados	49
Discusión	54
Capítulo 3: Conclusión y perspectivas futuras	57
Bibliografía	59
Anexo 1: Instalaciones	104
Anexo 2: Aplicación de inyección	105

Índice de tablas

Tabla 1. Células involucradas en la espermatogénesis de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Chow et al., 1991; Alfaro, 2013; Alfaro et al., 2017).	21
Tabla 2 Lista de oligonucleótidos utilizados durante este estudio para análisis de expresión relativa en qPCR.F: Oligonucleótido Forward; R: oligonucleótido reverse; pb: pares de bases; e: eficiencia; H: hepatopáncreas; T: testículo; NA: no evaluado en el tejido. † Primers diseñados en el software Primer3 para este estudio.	46
Tabla 3. Regresión lineal del parámetro conteo total de espermatozoides (CTE) evaluado en el camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> bajo tres tratamientos experimentales: C, 5-HT – SPY y SSF.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía general externa de los peneidos (A) (Modificado de Von Rintelen & Cai, 2009) y anatomía general interna de <i>Litopenaeus vannamei</i> (B). (Modificado de Duarte et al., 2020).....	1
Figura 2. Sistema reproductor masculino de <i>Litopenaeus vannamei</i> . (A) Ubicación anatómica: T testículo, VD vaso deferente, HP hepatopáncreas (modificado de Alfaro, 2010). (B) Sistema reproductivo aislado: LT Lóbulos testiculares, VDP Vaso deferente proximal, SC saco ciego, VDMA vaso deferente medio ascendente, VDMD vaso deferente medio descendente, VDD vaso deferente distal, AT Ampolla terminal, DB Ductos blanquecinos (modificado de Martínez et al., 2013).	17
Figura 3. Modelo propuesto para la maduración sexual masculina y la capacitación espermática de <i>Litopenaeus</i> basado en Alfaro et al. (2007), Alfaro & Lozano, 1993, y modificado de Alfaro et al (2017).....	19
Figura 4 Parámetros para evaluar la calidad del espermátforo y calidad espermática del camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> bajo dos tratamientos experimentales y un Control: C, 5-HT – SPY y SSF. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los valores medios se muestran en barras junto con su desviación estándar.....	50
Figura 5. Expresión relativa (medias retransformadas a partir de logaritmo) de LvDmc1 en el testículo de adultos <i>L. vannamei</i> bajo tres tratamientos experimentales (C, Control; SSF, solución salina fisiológica; y 5-HT – SPY, Serotonina espiperona). Los valores medios se muestran en barras.	52

Figura 6. Expresión relativa (medias retransformadas a partir de logaritmo) de a) LvGPx, b) LvcMnSOD, y c) LvTRx en el hepatopáncreas de adultos *L. vannamei* bajo tres tratamientos experimentales (C, Control; SSF, solución salina fisiológica; y 5-HT – SPY, Serotonina espiperona). Los valores medios se muestran en barras..... 53

Figura 7. Representación gráfica de la disposición de las tuberías y los flujos de agua (verde) y de aire (azul) en el sistema utilizado en el experimento. 104

Índice de fotografías

Fotografía 1. Sistema utilizado para la ejecución del experimento..... 104

Fotografía 2. Sujeción y aplicación de una inyección intramuscular lateral en el segundo segmento abdominal de un macho adulto *Litopenaeus vannamei*. 105

Capítulo 1: Revisión de la biología reproductiva de los machos

Litopenaeus vannamei

1. Introducción general

1.1 Características generales de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco del Pacífico o camarón patiblanco, *Litopenaeus vannamei*, es un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Penaeidae, con un cuerpo alargado, dividido en cefalotórax (rostró, ojos, antena, anténulas y pereiópodos), abdomen (6 segmentos o somitas abdominales y pleópodos) y cola (telson y urópodos), de color blanco translúcido con tonos amarillos (Figura 1A) (FAO, 2006; INAPESCA, 2018). De forma interna, en el cefalotórax se encuentra, de rostral a caudal, el cerebro, estómago, hepatopáncreas y corazón, mientras que, a lo largo del abdomen dorsal, se encuentra el intestino (Figura 1B) (Dall et al., 1991).

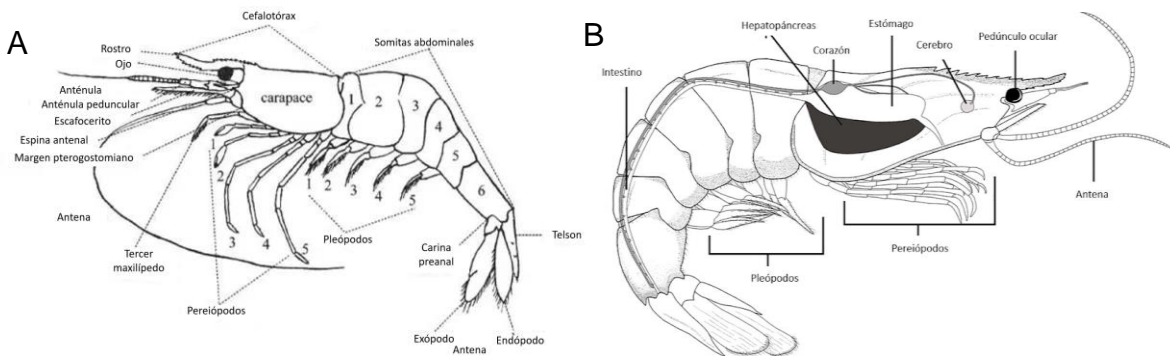


Figura 1. Anatomía general externa de los peneidos (A) (Modificado de Von Rintelen & Cai, 2009) y anatomía general interna de *Litopenaeus vannamei* (B). (Modificado de Duarte et al., 2020).

Su ciclo de vida es de tres fases: larvaria (nauplio, zoea y mysis), postlarva y adulto, las hembras y los machos inician la maduración a partir de los 28 g y 20 g

respectivamente, a la edad de 6 a 7 meses; y desovan cuando alcanzan un peso entre 30 a 45 g (FAO, 2006).

Su cultivo se ha extendido exitosamente debido a la disponibilidad de reproductores seleccionados genéticamente (Martin et al., 2009; Shin et al., 2023), reproductores libres de patógenos virales (SPF) y resistentes a patógenos específicos (SPR) (Huang et al., 2011; Motte et al., 2003), una alta supervivencia (Magallón et al., 2006), mayor rentabilidad (Nisar et al., 2021), el uso más eficiente de las proteínas vegetales en dietas formuladas (Nunes et al., 2022), adaptabilidad a un amplio rango de salinidad (Roy et al., 2010; Esparza et al., 2019), cultivo a una alta densidad (Esparza et al., 2015), tolerancia a la toxicidad por amoníaco y nitrito (Long et al., 2021), entre otras características que hacen de esta especie el peneido más cultivado a nivel mundial (FAO, 2022).

1.2 Camaronicultura de *L. vannamei*

El camarón *L. vannamei* es una especie con un alto valor unitario, además fue la principal especie producida en 2020 con 5.8 millones de toneladas y aporta el 52.9% de la producción acuícola de crustáceos (FAO, 2022), siendo México el séptimo productor a nivel mundial con una producción de camarón valuada en alrededor de 15 mil millones de pesos mexicanos y una producción de más de 200 mil toneladas (SIAP, 2020). Aunado a lo anterior se pronostica que siga creciendo para cubrir la demanda mundial (FAO, 2022) donde la innovación tecnológica en las fases de la producción de camarón es indispensable.

Las fases de producción de camarón son: (1) maduración y reproducción; (2) desove y cría desde huevo a postlarva; y (3) engorde desde postlarva a tamaño comercial. Las

últimas fases dependen totalmente de la primera, por lo que se han buscado e implementado técnicas para la inducción y mejoramiento de la reproducción. Se considera que el principal obstáculo en la reproducción en cautiverio de camarones peneidos es la inducción a la maduración ovárica de las hembras, por lo que se han utilizado técnicas como la ablación unilateral del pedúnculo ocular (APO) en hembras *L. vannamei* (Ponce et al., 2011; Kannan et al., 2015).

1.3 Ablación del pedúnculo ocular (APO)

Este es un procedimiento que genera picos predecibles de maduración y desove y consiste en la remoción unilateral del pedúnculo ocular, lugar donde se encuentra el complejo neuroendocrino órgano X/glándula sinusal (COXGS) (Montoya, 1998; Alfaro et al., 2019). Esta técnica sigue vigente por su rapidez, sencillez y bajo costo. Además, promueve la maduración ovárica y el desove en menor tiempo al reducir del ciclo de muda de 27 a 14 días (Sainz-Hernández et al., 2008; Treerattrakool et al., 2014).

Sin embargo, la aplicación de la APO se ha ido reduciendo debido a que diversos estudios han reportado problemas asociados como consecuencia del desequilibrio hormonal resultante de la remoción del complejo COXGS, debido a que este complejo también regula otros procesos biológicos como el crecimiento, la muda, el metabolismo, la osmolaridad, la aclimatación estacional térmica y la pigmentación (Quackenbush, 1986; Kannan et al., 2015; Tinikul et al., 2015; Ventura et al., 2017; Subramoniam, 2017a; González et al., 2018).

En general, la APO repercute en los crustáceos en los siguientes ámbitos: (1) Reproductivo, se ha descrito una menor supervivencia de los reproductores y sus larvas,

así como la disminución de la cantidad de nauplios por desove (Seminario & Saldarriaga, 2013); (2) Inmune, se postula que causa alteración de las concentraciones de metabolitos involucrados en el sistema fenoloxidasa (Dumas & Sainz, 1999) y se ha demostrado que participa en la hepatopancreatitis necrotizante (Covarrubias et al., 2006); (3) Bienestar animal, se han reportado la generación de estrés (Luis & Aguiar, 2019; Birch et al., 2021;) y procesos infecciosos y necrosis a causa de las lesiones en el sitio de corte (Uawisetwathana et al., 2011); y en el (4) Metabólico, se describe una variación de la concentración de diversos metabolitos en respuesta al aumento de los requerimientos energéticos, por ejemplo, glucosa, triglicéridos y proteínas en la hemolinfa (Sainz et al., 2008).

Aunado a lo anterior, Lee et al. (2017) realizaron un estudio genómico en donde encontraron que la APO también induce el aumento de expresión génica relacionada a la respuestas de estrés, y concluyen que este aumento sugiere que el requerimiento de energía para transferir moléculas energéticas en el hepatopáncreas a otros órganos es mayor en la APO que en la reproducción natural. Este aumento del requerimiento energético se traduce en un aumento de la demanda metabólica, el cual induce un aumento de la producción y concentración de especies reactivas de oxígeno (EROS) provocando estrés oxidativo (Almansa et al., 2020).

1.4 Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son radicales libres con electrones desapareados en su órbita exterior; debido a esto, son altamente reactivos (Ahmed, 2005), por lo que, cuando el exceso de producción de EROS se filtra desde las

mitocondrias al citoplasma celular, provoca daños a las moléculas lipídicas (formación de especies similares a malonaldehído), proteicas (grupos carbonilo no peptídicos) y ácidos nucleicos (8-hidroxidesoxiguanosina y otras bases oxidadas) debido a la oxidación (Ahmed, 2005) afectando así diversas funciones tanto metabólicas como fisiológicas (Livingstone, 2001; Xu et al., 2018).

Los camarones sintetizan EROS para hacer frente a los factores estresantes ambientales (Limón & Gonsebatt, 2009) y como parte normal del metabolismo mitocondrial, la producción a nivel mitocondrial es proporcional al consumo de oxígeno y la tasa metabólica mitocondrial de los organismos (Paital & Chainy, 2010), en otras palabras, se debe al metabolismo aeróbico de los organismos, el cual utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, pero también puede generar algunos radicales libres (Ahmed, 2005), así que, cuando aumentan las reacciones glucolíticas, aumenta el consumo de oxígeno e inducen una mayor producción de EROS como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot) (Roch, 1999; Bogdan et al., 2000).

Los organismos han adquirido mecanismos protectores para mantener la homeostasis redox (González et al., 2020) y mantener el equilibrio con el nivel más bajo posible de EROS en el interior de la célula (Schwarz, 1996; Aruoma, 1998; Holmblad & Soderhall, 1999) con el mecanismo conocido como preparación para el estrés oxidativo "POS", el cual les permite hacer frente a la sobreproducción de EROS y protegerse de los efectos tóxicos de las EROS, a través del sistema antioxidante principalmente, el cual es un proceso metabólico que protege a los organismos aeróbicos contra las EROS como

sistema captador de radicales libres (Zhang et al., 2009), este proceso incluye mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, en este último encontramos al ácido ascórbico, β -caroteno, glutatión y α -tocoferol (Schwarz, 1996; Aruoma, 1998; Holmblad & Soderhall, 1999).

El mecanismo oxidante enzimático, se considera como la primera línea de defensa contra las EROS (Stohs & Bagchi, 1995; Pal, 1994), este consiste en el aumento de la síntesis y secreción de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la tiorredoxina (TRx), entre otras (Pal, 1994; Tassanakajon et al., 2013; Quintaneiro et al., 2015), por la relevancia de estas enzimas, se describirán brevemente a continuación.

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido por lo que puede eliminar los aniones superóxido y desintoxicarlos convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Luego, el peróxido de hidrógeno se transforma en agua y oxígeno mediante CAT, GPx o TRx (Bowler et al., 1992; Nordberg, 2001). Existen varios tipos de SOD que se diferencian en el metal presente en su sitio activo y en sus estructuras primarias y secundarias. Las familias principales son SOD de cobre/zinc (Cu/ZnSOD), SOD de manganeso (MnSOD), SOD de hierro (FeSOD) y SOD de níquel (NiSOD) (Bowler et al., 1992; Kim et al., 1996). Dentro de la familia de las MnSOD, hay dos miembros reportados en crustáceos, una MnSOD mitocondrial (mMnSOD) y una MnSOD citoplasmática (cMnSOD) (Brouwer et al., 2003; Cheng et al., 2006; Gómez-Anduro et al., 2006; Lin et al., 2015). La cMnSOD ha sido caracterizada y reportada por primera vez por Gómez et al. (2006) en el camarón *L. vannamei*.

Las GPx pertenecen a una familia de oxidorreductasas, son enzimas reductoras de hidropoxidasa dependientes de selenio que contribuyen a eliminar el hidropérido lipídico, eliminar el H₂O₂, reducir el daño de los hidropéridos orgánicos, etc. (Mouatassim et al., 1999; Koeberle et al., 2020) lo que protege las biomembranas y otros componentes celulares del daño oxidativo al catalizar la reducción de una variedad de hidropéridos, utilizando glutatión como sustrato reductor durante la fagocitosis y/o el metabolismo fisiológico (Arthur, 2000; Liu et al., 2004). El ADNc completo de GPx se clonó y caracterizó en *L. vannamei* por Liu et al. (2007) y su nivel de transcripción y la actividad de las proteínas aumenta significativamente cuando los camarones son sometidos a una invasión de patógenos, lo que sugiere que la GPx podría desempeñar un papel importante en la inmunidad y en la reacción de defensa oxidativa de los camarones (Fan et al., 2022).

La TRx (también conocida como TPx), es una peroxidasa importante que puede eliminar el hidropérido con tioredoxina como donante inmediato de hidrógeno y fue la última proteína antioxidante identificada (Lim et al., 1993; Zoon et al., 1994). Son proteínas bastante abundantes (Chae et al., 1999) y puede proteger a los organismos contra una gran diversidad de tipos de estrés oxidativo, además de regular la transducción de señales intracelulares (Kang et al., 2005; Rhee et al., 2005). El ADNc de TRx de *L. vannamei* (*LvTRx*) fue secuenciado, clonado y expresado por Aispuro et al. (2008), quienes encontraron que fue mejor antioxidante en comparación con el glutatión reducido y el ácido ascórbico. La expresión del gen *LvTRx* puede inducirse cuando los organismos se enfrentan a estrés oxidativo causado por infección viral, temperatura o

estimulación con H₂O₂, sin embargo, su expresión a nivel de transcripción no cambia significativamente cuando los camarones fueron expuestos a hipoxia (Kim et al., 2005; Lee et al., 2005).

Por otro lado, es posible que el sistema antioxidante fisiológico no sea suficiente para eliminar o neutralizar la sobreproducción de EROS, y cuando la tasa de neutralización por parte del sistema antioxidante es menor a la tasa de producción de EROS, los organismos entran en estrés oxidativo, lo que puede ocasionar un daño oxidativo severo (Yoshikawa & Naito, 2002; Singaram et al., 2013), el cual puede influir en los niveles de esas enzimas antioxidantes (Fei et al., 2020a). Por lo tanto, la evaluación de los niveles de enzimas antioxidantes, la actividad enzimática o la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes se consideran comúnmente marcadores potenciales del estado de salud de un camarón (Le Moullac & Haffner, 2000; Rodriguez & Le Moullac, 2000; Downs et al., 2001; Campa et al., 2009).

Aunque es bien conocido que la respuesta de un organismo a factores estresantes fisiológicos y ambientales incluye cambios rápidos en la expresión génica, seguidos de la síntesis de proteínas involucradas en la adaptación (Staib et al., 2007), la investigación relacionada con la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes se centra en la clonación y caracterización molecular, por lo tanto, se sabe poco sobre la regulación a nivel génica de los sistemas antioxidantes en la respuesta al estrés fisiológico de los invertebrados acuáticos (Zhou et al., 2010), a diferencia del estrés provocado por factores ambientales, tales como la temperatura (Xu et al., 2018; López-Galindo et al., 2023),

fotoperiodo (Fei et al., 2020b), exposición a patógenos (Fan et al., 2022) o compuestos tóxicos (Harayashiki et al., 2018).

La actividad del sistema antioxidante es proporcional con la capacidad de desintoxicación (Pinho et al., 2005; Quintaneiro et al., 2015) por lo que su actividad y producción ocurre en mayor medida en los órganos con intensas funciones metabólicas y desintoxicantes, como lo es el hepatopáncreas en los crustáceos (Pan et al., 2011; Wang et al., 2013; Yu et al., 2018; Song et al., 2019), por lo tanto, la evaluación de estrés oxidativo en este órgano es relevante para evaluar las técnicas alternativas para el mejoramiento reproductivo, tal como se ha evaluado para la APO (Almeida et al., 2004; Lee et al., 2017; Almansa et al., 2020), en reproductores antes de implementarlas a nivel industria, debido a que el mantenimiento de la salud de los reproductores de *L. vannamei* es particularmente importante para el desarrollo sostenible de la industria (Wang et al., 2013; Xiaolong et al., 2017).

1.5 Alternativas para el mejoramiento reproductivo en L. vannamei

Se han propuesto diversas alternativas a la APO para la inducción de la maduración y mejoramiento reproductivo, principalmente en hembras, tales como la terapia hormonal, uso de feromonas, RNA de interferencia, mejoramiento genético y la manipulación de neurotransmisores (Alfaro et al., 2019).

Sin embargo, estas alternativas cuentan con limitaciones, tal y como se enlista a continuación: la terapia hormonal no ha dado resultados aplicables a nivel industria (Yano et al., 1988; Tsukimura & Kamemoto I., 1991); las feromonas no se han caracterizado ni estandarizado para *L. vannamei* (Thiel et al., 2011; Alfaro et al., 2019; Gutiérrez, 2022);

mientras que los estudios con RNA de interferencia reportan una respuesta tardía (Feijó et al., 2016) por lo que se requiere más investigación para transferir esta tecnología a la industria (Alfaro et al., 2019); y el mejoramiento genético tiene diversas aproximaciones que aún se encuentran en desarrollo y en su mayoría son a largo plazo (Alfaro et al., 2019).

La manipulación de neurotransmisores se ha visto como una alternativa prometedora debido a que existen diversos trabajos que describen su estímulo directo en la reproducción, por ejemplo, se ha demostrado que la dopamina y la octopamina tienen efectos inhibidores sobre los sistemas reproductivos femeninos (Tinikul et al., 2008; Tinikul et al., 2011; Nagur et al., 2013; Tinikul et al., 2014), mientras que la leucina encefalina (Kishori & Reddy, 2000; Kishori et al., 2012), la hormona concentradora del pigmento rojo (Rodríguez et al., 2002) y la serotonina (Tinikul et al., 2008; Nagur et al., 2013) tienen efectos estimulantes sobre el sistema reproductor femenino.

De forma particular, Alfaro et al. (2004) propusieron un protocolo para la inducción a la maduración y desove, obteniendo resultados similares a la APO, pero con una menor mortalidad, por medio de la aplicación de serotonina (5-HT) y espiperona (SPY), antagonista del neurotransmisor dopamina (DA), en hembras *L. vannamei*.

1.5.1 Serotonina y Dopamina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina biogénica que funciona como un neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona, por lo que se le describe como 'agente promotor de la actividad' en varias especies (Beltz, 1999; Cooper et al., 2003; Spitzer et al., 2008) de varios procesos, como el comportamiento social y diferentes

actividades fisiológicas sistémicas en los decápodos (Mattson & Spaziani, 1986; Sarojini et al., 1995a; Lee et al., 2001; Spitzer et al., 2008).

En el ámbito reproductivo se le reconoce como una hormona gonadotrófica y se sabe que la serotonina induce la maduración de las gónadas en ambos sexos (Siangcham et al., 2013). Aunque se desconocen todas las vías de señalización implicadas, se ha propuesto que tiene un papel regulador en la secreción de farnesoato de metilo (MF) del órgano mandibular (MO) en los decápodos (Nagaraju, 2007; Farhadi et al., 2020;), y a su vez se conoce que el MF es un factor que estimula la maduración gonadal de varias especies de decápodos, como en *P. clarkii* (Rodríguez et al., 2002; Laufer et al., 2005;); *Oziotelphusa senex senex* (Reddy et al., 2004.), *Sicyonia ingentis* (Paran et al., 2010) y en *L. vannamei* (Alfaro et al., 2008).

La serotonina también estimula la liberación de otras neurohormonas, incluida la hormona hiperglucémica de los crustáceos (CHH), la hormona liberadora del pigmento rojo (RPDH), la hormona neurodepresora (NDH) y la hormona inhibidora de la muda (MIH), la neurohormona del órgano pericárdico y el neuromodulador o neurohormona del ganglio (Sarojini et al., 1994). Además, la 5-HT desempeña otras funciones, tales como la migración del pigmento retiniano proximal, estomatogástrico, las respuestas conductuales, la osmorregulación y la mecanorrecepción (Fingerman et al., 1994).

Por otro lado, la dopamina (DA) es una catecolamina que actúa como neurohormona y funge como neurotransmisor y neuromodulador, modulando la síntesis y liberación de diversas hormonas, tales como la RPDH y la hormona inhibidora de las gónadas (GIH), inhibe la síntesis de la GSH, lo que a su vez modula la vitelogenina (Vg) y la hormona de

la glándula androgénica (AGH) (Fingerman, 1987, 1997; Tinikul et al., 2009b), y la CHH (Sarojini et al., 1995a). También modula diversas respuestas fisiológicas (Chang et al., 2007).

De forma general se ha descrito que inhibe la maduración gonadal en los crustáceos decápodos *Macrobrachium rosenbergii* (Ohs et al., 2006; Tinikul et al., 2008; Tinikul et al., 2009a), *P. clarkii* (Sarojini et al., 1995a), *L. vannamei* (Tinikul et al., 2011, 2014) y *Penaeus monodon* (Nagur Babu et al., 2013).

No obstante, pocos estudios han investigado los efectos y funciones de estos neurotransmisores en la reproducción de los crustáceos decápodos machos (Khalaila et al., 2002; Tinikul et al., 2008; Tinikul et al., 2009b), debido a que ha recibido menos atención en comparación con el sistema reproductivo femenino en términos de morfología, endocrinología y función (Browdy, 1998; Kishori & Reddy, 2000; Perez-Velazquez et al., 2003; Nagur Babu et al., 2013). Por este motivo, la reproducción de machos peneidos aún se considera un desafío en la industria de la acuicultura de camarones (Parnes et al., 2004).

1.6 Neuroendocrinología y morfología reproductiva de machos L. vannamei

Los neurotransmisores regulan diversos aspectos de las respuestas fisiológicas, la reproducción, el crecimiento, la muda, la actividad locomotora, el comportamiento y la diferenciación sexual en los decápodos (Kishori & Reddy, 2000; Tinikul et al., 2008).

Hasta el momento, sólo unas pocas investigaciones han estudiado el papel y las consecuencias de los neurotransmisores en el sistema reproductivo masculino de los crustáceos decápodos (Sarojini et al., 1995b) y la mayoría de las publicaciones se han

centrado en las hembras (Kishori y Reddy, 2000; Tinikul et al., 2008; Tinikul et al., 2011; Kishori et al., 2012; Nagur et al., 2013; Tinikul et al., 2014). Sin embargo, para la implementación de técnicas de mejora reproductiva, tal como la de la aplicación de 5-HT – SPY, es indispensable tener conocimiento sobre lo que se ha descrito en el campo de la neuroendocrinología de los machos.

1.6.1 Neuroendocrinología

La regulación neuroendocrina de la reproducción y maduración sexual en crustáceos decápodos macho está regulada en tres niveles (Okimura, 2004): (1) el sistema nervioso central (SNC) y el complejo órgano X-glándula sinusal (COXGS); (2) la glándula androgénica y el órgano mandibular; y (3) testículos y caracteres sexuales secundarios (Fingerman, 1987; Khalaila et al., 2002; Nagaraju, 2007; Tinikul et al., 2008; Alfaro, 2010; Nagur et al., 2013; Alfaro et al., 2016).

En el primer nivel, el SNC y COXGS tienen acción estimuladora principalmente mediante la síntesis y liberación de la 5-HT (Sarojini et al., 1994; Tinikul et al., 2008, 2011; Nagur et al., 2013) y acción inhibitoria mediante la síntesis y liberación de la DA y la octopamina (Nagur et al., 2013; Tinikul et al., 2014;).

La 5-HT estimula la liberación de una hormona estimulante de las gónadas (GSH) que activa la síntesis y liberación de la hormona de la glándula androgénica (AGH) por parte de la glándula androgénica (AG), por lo que tiene influencia en el desarrollo testicular y espermatogénesis (Sarojini et al., 1994, 1993; Fingerman, 1997; Simeó et al., 2010). Por otro lado, la DA inhibe la liberación de GSH y estimula la liberación de la hormona

inhibidora de las gónadas (GIH), inhibiendo así la maduración testicular y la espermatogénesis (Fingerman, 1997; Simeó et al., 2010).

Una hormona más en este nivel fue identificada en *Penaeus monodon*, la llamada hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Ngersoungnern et al., 2008), la cual se clasificó como neurohormona peptídica que regula las funciones reproductivas y no reproductivas en vertebrados e invertebrados (Tsai, 2006; Maruska & Tricas, 2011; Sherwood & Adams, 2015) y se cree que está involucrada en la regulación de la 5-HT y AG, así como posiblemente de la GSH, por lo que de forma indirecta promueve la maduración testicular (Poljaroen et al., 2011; Siangcham et al., 2013). Otra neurohormona que regula el desarrollo testicular de los crustáceos es la corazonina (Crz) (Poljaroen et al., 2011), debido a que bloquea las acciones de los estimuladores reproductivos endógenos, que incluyen la GnRH, para inhibir la función AG (Siangcham et al., 2013).

En el segundo nivel, el órgano mandibular (MO) tiene un efecto estimulador directo sobre el desarrollo testicular por la acción del farnesoato de metilo (MF) debido a que este actúa como gonadotropina y morfógeno, al ser captado por los receptores de MF presentes en los testículos (Rotllant et al., 2000; Laufer & Biggers, 2001; Nagaraju et al., 2003; Nagaraju, 2007; Alfaro et al., 2008), de acuerdo con Fingerman (1997) el RPCH estimula la síntesis de MF por parte del órgano mandibular.

Asimismo, la AG es el órgano endocrino que controla las características primarias y secundarias de los machos mediante la síntesis y liberación de la AGH quien es la responsable de la desencadenar la maduración testicular, la espermatogénesis

(Fingerman, 1997; Alfaro-Montoya & Hernández, 2012), las características sexuales masculinas secundarias y el comportamiento masculino (Okuno et al., 1999; Ventura et al., 2009; Phoungpetchara et al., 2011).

La AGH se ha identificado como una hormona glandular androgénica proteica (Hasegawa et al., 1987; Sagi & Aflalo, 2005) pero, de igual manera, en crustáceos decápodos se han identificado moléculas lipídicas como farnesilacetona y esteroides que pueden desempeñar funciones complementarias a AGH (Sagi & Aflalo, 2005)

Por el lado contrario, el MO está bajo la acción inhibitoria de la hormona inhibitoria de MO de la glándula sinusal (Huberman, 2000; Nagaraju, 2007) que a su vez inhibe de forma directa la secreción de AGH (Khalaila et al., 2002).

Por último, en el tercer nivel, no han demostrado ninguna función endocrina en los testículos (Fingerman, 1987, 1997), sin embargo, el sistema reproductivo masculino también podría ser una fuente de feromonas inductoras de la maduración ovárica (Huberman, 2000).

1.6.2 Anatomía

En la especie *L. vannamei*, como en la mayoría de los crustáceos decápodos, los sexos están diferenciados y pueden identificarse por la presencia o ausencia de gonópodos. En machos, los gonópodos se encuentran en el primer par de pleópodos cerca de los poros genitales, el cual es más grande que el de las hembras y recibe el nombre de petasma (Bauer, 1986; Dall et al., 1990; Harlioğlu, 2016), estos son los encargados de transferir los espermatozoides formados en las ampollas terminales del

macho al télico de la hembra durante el apareamiento (Dall et al., 1990; Harlioğlu et al., 2018).

De forma general la reproducción de *L. vannamei* se basa en un modelo de télico abierto, con espermátóforos complejos y sin receptáculos seminales en las hembras (Pérez, 1975; Bauer & Cash, 1991) y en el género *Litopenaeus*, se ha caracterizado a la anatomía, con la descripción de la glándula accesoria, ámpulas terminales, los testículos y ductos deferentes, estos últimos se subdividen en 4 regiones: ducto deferente proximal, ducto medio descendente y ascendente, ducto distal (King, 1948; Alfaro, 2013; Subramoniam, 2017a, 2017b).

Los testículos son un par de órganos tubulares retorcidos con alrededor de 8 lóbulos ubicados dorsalmente al hepatopáncreas (Fig. 2 A) (Harlioğlu et al., 2018). Los lóbulos testiculares están compuestos por túbulos seminíferos contorneados (Alfaro, 2013), la capa externa está formada por tejido conectivo, y dentro de estos están presentes diferentes etapas de la espermatogénesis de acuerdo con sus regiones. Cada túbulo seminífero tiene tres regiones: (1) Región germinal, en donde se encuentran espermatogonias ubicadas en la periferia de los túbulos; (2) Centro espermatogénico, el cual está en el centro, es grande y contiene espermátocitos y espermátidas; y (3) Capa de células nodrizas, las cuales son alargadas y rodean el centro espermatogénico (King, 1948; Wikramanayake et al., 1992; Garza-Torres et al., 2009; Alfaro-Montoya et al., 2017).

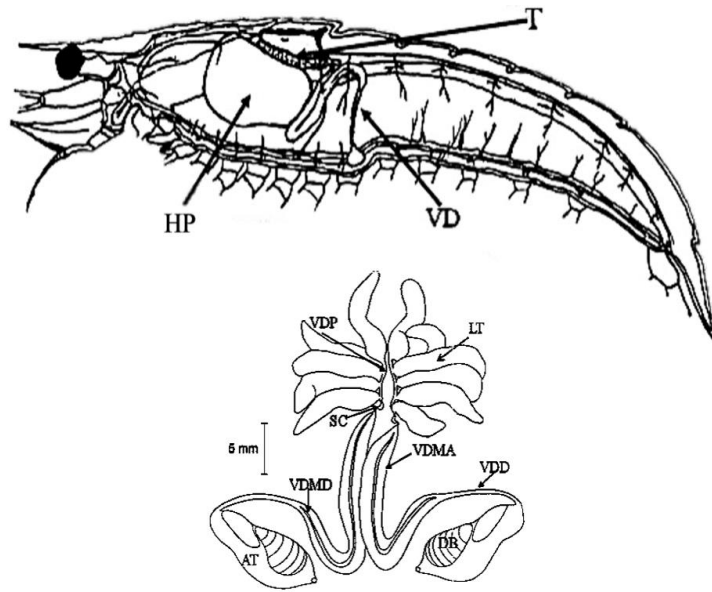


Figura 2. Sistema reproductor masculino de *Litopenaeus vannamei*. (A) Ubicación anatómica: T testículo, VD vaso deferente, HP hepatopáncreas (modificado de Alfaro, 2010). (B) Sistema reproductivo aislado: LT Lóbulos testiculares, VDP Vaso deferente proximal, SC saco ciego, VDMA vaso deferente medio ascendente, VDMD vaso deferente medio descendente, VDD vaso deferente distal, AT Ampolla terminal, DB Ductos blanquecinos (modificado de Martínez et al., 2013).

Los conductos deferentes se originan en la parte posterior del testículo (Fig. 2 A) (Harlioğlu et al., 2018) y tienen una función de acuerdo con sus regiones (Fig. 2 B). El conducto deferente proximal transporta espermátidas sin púas desde los testículos hacia el conducto deferente medial ascendente. Las capas primaria y secundaria de espermátóforos se sintetizan en los conductos deferentes ascendentes y descendentes, respectivamente (Ro et al., 1990; Bauer & Cash, 1991).

La ampolla terminal es histológicamente compleja, con cámaras separadas para el ensamblaje de subunidades adicionales de espermátóforo: placa dorsal, alas, masa glutinosa y adhesivo (Talbot et al., 1989) y se abre al exterior a través de un gonópodo en la base del quinto par de pereiópodos (Ventura et al., 2009; Phoungpetchara et al., 2011).

En las glándulas accesorias encontramos a la AG, la cual es una masa celular no neural similar a un cordón, que está asociada a la ampolla terminal y se extiende a lo largo de la región distal de los conductos deferentes descendentes (Fingerman, 1997; Campos et al., 2006; Garza et al., 2009; Alfaro & Hernández, 2012; Vázquez et al., 2014).

1.7 Maduración sexual

La maduración sexual comienza en los conductos seminíferos del testículo y finaliza en las ampollas terminales con la formación de la espiga acrosómica. Alfaro et al. (2017) propusieron un modelo de maduración sexual masculina de tres niveles independientes: (1) Maduración testicular, espermatogénesis; (2) Maduración del conducto deferente, maduración espermática; y (3) Síntesis de espermátóforos (Fig. 3), el cual fue utilizado por Ceballos et al. (2003) para explicar sus hallazgos sobre la calidad de los espermátóforos de *L. vannamei* cultivados en estanques; además de los niveles mencionados, otro sucede en las hembras: maduración final y capacitación de espermatozoides (Alfaro, 2010).

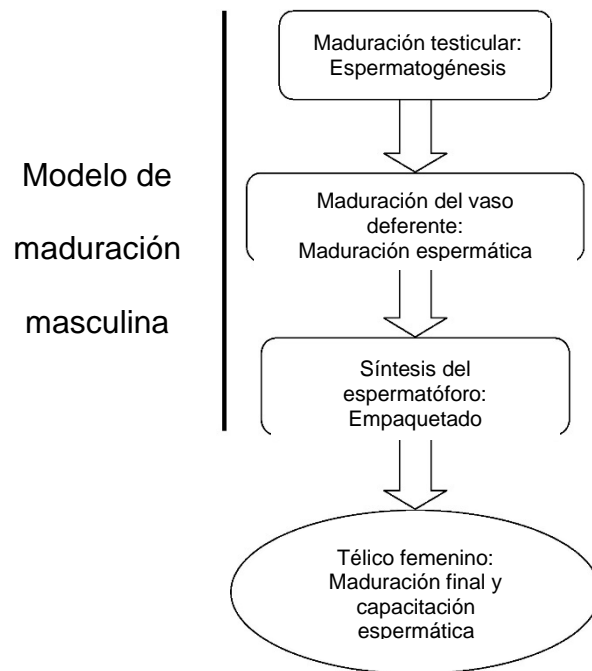


Figura 3. Modelo propuesto para la maduración sexual masculina y la capacitación espermática de *Litopenaeus* basado en Alfaro et al. (2007), Alfaro & Lozano, 1993, y modificado de Alfaro et al (2017).

1.7.1 Nivel 1. Maduración testicular

Este nivel ocurre en los túbulos seminíferos e incluye la espermatogénesis en los testículos, un proceso que comprende la diferenciación de las espermatogonias a espermátidas tardías en los túbulos seminíferos y se caracteriza por la descondensación de la cromatina, la ruptura de la envoltura nuclear, la reducción del citoplasma mediante la degeneración de los orgánulos y desarrollo de la vesícula acrosómica (Alfaro et al., 2017).

1.7.1.1 Espermatozoides

Los espermatozoides de los crustáceos decápodos son diferentes de los espermatozoides de otros animales. Tienen una o más estructuras de púas en lugar de

flagelos por lo que se dividen comúnmente en dos grupos: multistelados o unistelados, los espermatozoides unistelados son típicos de Penaeidae (Clark et al., 1981; Braga et al., 2013; Camargo et al., 2017).

Además, los espermatozoides de *L. vannamei* tienen un diámetro del cuerpo entre 3 a 4 μm y están compuestos por un apéndice inmóvil solitario alargado discontinuo con el núcleo (Griffin et al., 1988) también llamada espina (Alfaro et al., 2007) y un cuerpo principal, el cual, desde un punto de vista ultraestructural, está formado por 4 regiones: (1) Acrosomal, la cual abarca la espina y la cápsula acrosomal o capa hemisférica; (2) Subacrosomal, malla filamentosa o fibrilar; (3) Nuclear, la cual incluye la cromatina no condensada; y (4) Borde hemisférico, compuesto de partículas citoplasmáticas (Dougherty & Dougherty, 1989; Jamieson, 1994; Alfaro et al., 2007; Tudge et al., 2014; Alfaro et al., 2017).

1.7.1.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso sincronizado en las regiones del túbulo seminífero pero asincrónico en túbulos adyacentes, abarca desde las espermatogonias y su maduración gradual de espermatoцитos primarios, secundarios, espermátidas tempranas, medias, en los testículos, avanzadas y espermatozoides en ductos deferentes y ampollas terminales, respectivamente (King, 1948; Chow et al., 1991; Alfaro, 2013; Alfaro et al., 2017). En la Tabla 1 se enlistan y describen estas células con más detalle.

La diferenciación de las espermatogonias en espermátidas tardías mediante divisiones meióticas se observa dentro de los túbulos seminíferos y se resume en cuatro

procesos: (1) Descondensación de la cromatina, la cual es precedida por la condensación de las espermatogonias a los espermatocitos secundarios y, luego, la descondensación gradual en las etapas más avanzadas; (2) Ruptura de la envoltura nuclear, lo que resulta en la mezcla del contenido del nucleoplasma y citoplasmático; (3) Reducción del citoplasma y degeneración de orgánulos, lo que resulta en abundantes vesículas en las primeras espermátidas; y (4) Formación del acrosoma, comenzando con la fusión de las vesículas citoplasmáticas (Alfaro, 2010; Alfaro et al., 2017).

Tabla 1. Células involucradas en la espermatogénesis de *Litopenaeus vannamei* (Chow et al., 1991; Alfaro, 2013; Alfaro et al., 2017).

Célula	Tamaño (μm)	Características morfológicas
Espermatogonia	D: 10 - 11 DN: 7.4 ± 0.3	<ul style="list-style-type: none"> • Célula de forma ovalada. • Un núcleo con un nucléolo grande. • El citoplasma tiene mitocondrias y pequeños cuerpos densos en electrones en la periferia de la superficie nuclear. • Las células epiteliales de soporte con núcleos elongados las rodean.
Espermatocitos primarios	D: 10 - 12 DN: 7.5 ± 1.3	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas. • Núcleo compuesto principalmente de cromatina basófila no condensada. • Citoplasma con mitocondrias y ribosomas abundantes, y mayoritariamente ocupado por el retículo endoplasmático rugoso, proliferando paralelo a la envoltura nuclear. • Vesícula densa en electrones unida a una membrana eosinófila, incrustada en las vesículas del retículo endoplasmático y ubicada cerca de la región nuclear. • En diversas fases de meiosis I
Espermatocitos secundarios	D: 5 - 11 DN: 3.4 ± 0.2	<ul style="list-style-type: none"> • Células altamente condensadas. • Núcleo homogéneo compacto y basófilo, con la cromatina limitada por la envoltura. • Región citoplasmática, retículo endoplásmico rugoso y el número de mitocondrias se reducen, con un aumento de vesículas. • La vesícula densa en electrones está ausente. • Completan la meiosis II.

Espermátidas tempranas	DN: 4.3 ± 0.0	<ul style="list-style-type: none"> • Núcleos esféricos con cromatina condensada con un patrón granular por presencia de heterocromatina. • Región citoplasmática con hebras de retículo endoplásmico rugoso con abundantes ribosomas asociados a la envoltura nuclear. • Presencia ocasional de tipo Golgi y mitocondrias. • Vesícula pro-acrosomal transparente presente. • Acrosoma ausente.
Espermátidas intermedias o medias	ND	<ul style="list-style-type: none"> • Núcleo compacto con cromatina condensada, e inicio de la descondensación, por lo que se presentan dos regiones laterales. • Citoplasma reducido con la presencia reducida de cuerpos tipo Golgi, retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias. • Vesícula acrosómica acidófila, formada mediante la fusión de las vesículas proacrosomales, con un granulo anterior. • Ruptura de la envoltura nuclear, el contenido nuclear se mezcla con el citoplasma en algunas áreas.
Espermátidas tardías o avanzadas	ND	<ul style="list-style-type: none"> • Núcleo compuesto por cromatina descondensada de aspecto floculento y rodeado posterolateralmente por una fina banda citoplasmática. • El citoplasma perinuclear con patrón granular compuesto por algunas mitocondrias y abundantes vesículas. • La vesícula acrosómica con forma ligeramente cóncava interna con una protuberancia apical incluye la cápsula acrosómica y el gránulo anterior. • Presencia de casquete acrosómico con dos casquetes acrosómicos laterales con material heterogéneo granulado, y un casquete central homogéneo.

Donde D, es diámetro, DN es diámetro nuclear, ND, sin datos.

La espermatogénesis avanza en los túbulos seminíferos hasta la mitad de la etapa espermátida, las espermátidas avanzadas son colectadas en ductos seminíferos pequeños, que gradualmente se integran en los conductos deferentes, esta masa espermátida es transportada a lo largo de los conductos deferentes, siendo envuelta y almacenada en la ampolla terminal, formando el espermatóforo que será expulsado a través de los gonópodos (Chow et al., 1991; Parnes et al., 2006; Garza et al., 2009; Alfaro, 2013).

1.7.2 Nivel 2. Maduración en el conducto deferente

La maduración de los espermatozoides en el conducto deferente comienza cuando las espermátidas tardías se transfieren a los conductos seminíferos y termina con la

formación de la espiga acrosómica en las ampollas terminales donde los espermatozoides contienen espermatozoides maduros. Se caracteriza por el desarrollo de nuevas estructuras, como la región subacrosomal y las partículas laterales densas en electrones del gránulo anterior que se acompaña de una expansión del gránulo anterior hacia la capa acrosómica central (Alfaro, 2010; Alfaro et al., 2017).

Particularmente, en el conducto deferente medio ascendente comienza la polimerización de la espina, la cual se reconoce como una estructura típica acidófila, por otro lado, en el conducto descendente se muestra la cápsula semiesférica o acrosomal definitivamente, además de la compactación del núcleo en la región posterior de la espermatida (Alfaro, 2013).

1.7.3 Nivel 3. Síntesis de espermatozoides

Los espermatozoides de los camarones peneidos son transportados a lo largo del conducto deferente como una masa compacta, empaquetados en varias capas de tejido y almacenados en la ampolla terminal, formando el espermatozoides (Dall et al., 1990; Leung & Lawrence, 1991; Bauer & Cash, 1991; Alfaro, 2010). La concentración y distribución de estos espermatozoides pueden variar en el espermatozoides dependiendo de las características reproductivas de cada especie de peneido. En *L. vannamei* los espermatozoides se encuentran en el centro del espermatozoides (Bauer & Cash, 1991; Beirão et al., 2019).

Las células observadas en las ámpulas terminales y el espermatozoides están compuestas por un cuerpo principal esférico y, desde el acrosoma, se extiende un único apéndice llamado espiga, la cual se encuentra con elongación completa (Alfaro, 2013).

Los espermatozoides se caracterizan por la presencia de cromatina en estado descondensado, pero con un patrón fibroso formado por una red granular y filamentos, de igual manera se observa una banda citoplásmica perinuclear sin cambios, así como una concavidad interna de la vesícula acrosómica más evidente, esta vesícula está compuesta por una región subacrosomal, una tapa acrosómica y una espiga, sin el granulo anterior. La región subacrosomal se observa extendida e incluye dos regiones: una red filamentosa y una zona clara (Alfaro et al., 2017).

A pesar de que los espermatozoides de las ámpulas terminales y espermatóforos muestran elongación completa de las espinas y una estructura completa, los espermatozoides continúan su maduración y capacitación luego de la copula en el tético de las hembras (Aungsuchawan et al., 2011; Alfaro et al., 2007).

1.7.3.1 Generalidades del espermatóforo

En especies que tienen fertilización externa, como los peneidos, el espermatóforo cubre y protege a los espermatozoides hasta la fertilización, por lo que su estructura es compleja debido a que debe proteger a los espermatozoides de la exposición a factores ambientales (Subramoniam, 1995; Subramoniam, 2017c).

El espermatóforo se describe como una cápsula que se forma a partir de una sustancia celular producida por el epitelio secretor de los conductos deferentes. Su forma es acorde a la forma y la contracción de la luz de los conductos deferentes y la composición de las sustancias celulares en las capas de los espermatóforos (Harlioğlu et al., 2018).

Hasta la fecha se han clasificado tres tipos de espermatozoides en los decápodos, el tipo de espermatozoides tubular complejo con varias capas construidas a partir de una sustancia acelular presente en forma de columna interrumpida con estructuras accesorias para la unión externa al túbulo femenino es el que corresponde al de los camarones peneidos (Pérez-Farfante, 1975; Alfaro, 2010; Harlioğlu et al., 2018).

La renovación de los espermatozoides en *L. vannamei* depende principalmente de tres mecanismos: (1) Muda, la cual implica la degradación interna de los espermatozoides durante las 12 h previas a la muda, posiblemente por procesos de degradación de la matriz acelular y fagocitosis de los espermatozoides y se produce de forma cíclica cada dos semanas dependiendo del tamaño de los machos (Parnes et al., 2006; Heitzmann & Diter, 1993); (2) Apareamiento; y (3) Deterioro del espermatozoides, consecuencia de las condiciones de cultivo (Alfaro et al., 2017).

El deterioro del espermatozoides es una condición que implica la falta de renovación por muda o apareamiento, causada por la acción de patógenos, estrés o infiltración hemocítica por extracción manual repetida, y consiste en la generación de nuevos espermatozoides normales después del deterioro completo de los espermatozoides antiguos en donde estos toman un color marrón (melanización) y sigue su deterioro completo hasta su degradación (Dougherty & Dougherty, 1989; Heitzmann & Diter, 1993; Parnes et al., 2006; Braga et al., 2018a).

Esta melanización es causada por un proceso inflamatorio caracterizado por una infiltración hemocítica, presente alrededor e insertada en el tejido conectivo, a pesar de

que esta infiltración no es observable en la masa espermática, la calidad del esperma si se ve afectada (Braga et al., 2018a).

Esta condición se ha descrito en diferentes ambientes de cultivo y tanques de producción (Alfaro & Lozano, 1993; Parnes et al., 2006), por lo que Diamond et al. (2008) propusieron que el deterioro del espermátforo es una adaptación al cautiverio ya que no se han reportado casos de melanización en la naturaleza.

1.8 Calidad del espermátforo y espermática

El control de la reproducción masculina es un asunto importante en la industria de la acuicultura de crustáceos, al representar el 50% del éxito del cultivo, y uno de los principales factores que afectan la eficiencia reproductiva masculina es la calidad del esperma (Harlioğlu et al., 2018), por esta razón la calidad del esperma ha recibido una consideración cada vez mayor y es una prioridad para muchos investigadores y en el desarrollo de empresas biotecnológicas (Leung & Lawrence, 1985; Meunpol et al., 2005; Bugnot & López, 2009).

Desde la perspectiva de la biología, la calidad del esperma es la capacidad del espermatozoide para fertilizar un óvulo y producir una progenie normal (Bobe & Labbé, 2010), por lo que la calidad del esperma puede evaluarse mediante cualquier parámetro o biomarcador directamente asociado con la capacidad de fertilización del esperma (Harlioğlu et al., 2018), uno de los parámetros más comúnmente utilizado para determinar la calidad del esperma en camarones peneidos es la calidad de los espermátforos (Braga et al., 2010), inclusive este ya es un factor decisivo para el éxito de la inseminación

artificial, y también se utiliza como uno de los criterios de selección por parte de los criadores de reproductores (Leung & Lawrence, 1985; Ceballos et al., 2003).

La calidad del espermátforo y espermática de los crustáceos decápodos se determina analizando diferentes parámetros, principalmente el peso de los espermátforos, recuento de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides anormales (;Leung & Lawrence, 1987; Parnes et al., 2004; Alfaro, 2013), y de los últimos en añadirse a esta lista han sido los siguientes: número de espermatozoides en el conducto deferente, viabilidad del esperma, reacción acrosómica, tamaño del espermátforo, melanización y tasa de ausencia de espermátforo y contenido energético del espermátforo (Harlıođlu et al., 2018).

Sin embargo, para los crustáceos decápodos algunos biomarcadores requieren análisis bioquímicos avanzados y costosos equipos de laboratorio y/o disponibilidad de huevos (éxito de la fertilización) (Harlıođlu et al., 2018), mientras que otros, se realizan por metodologías más accesibles como el método gravimétrico, para el peso de los espermatozoides, mediante inspección visual (melanización o ausencia de espermátforo) o protocolos con microscopia electrónica (Alfaro, 1996; Ceballos et al., 2004; Braga et al., 2010; Duangjai et al., 2023).

Lo descrito para el conteo del número total de espermatozoides consiste en la extracción de los espermátforos para posteriormente homogenizarlos en una solución salina fisiológica libre de calcio. La concentración de esperma se calcula insertando una muestra de la suspensión homogeneizada en un hemocitómetro y la concentración de espermatozoides se obtiene por medio de un proceso de recuento celular estándar

mediante microscopía óptica (Meunpol et al., 2005; Coman et al., 2007; Braga et al., 2010; Braga et al., 2018b).

Por otro lado, se han aplicado técnicas colorimétricas, como la tinción de azul tripán (Leelatanawit et al., 2014; Braga et al., 2018b) o eosina-nigrosina (Uberti et al., 2014; Castelo et al., 2015), para evaluar la integridad de la membrana celular y así estimar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos mediante su observación bajo un microscopio óptico. Además, se ha descrito recientemente la citometría de flujo como una técnica más sensible y menos susceptible a errores manuales en comparación con la microscopía óptica (Lezcano et al., 2004; Uberti et al., 2014), sin embargo, esta herramienta es poco accesible para algunos laboratorios.

1.8.1 Extracción de espermátóforos

El término “extracción de espermátóforo” se refiere al método de recolección de espermátóforo para una posterior colecta del esperma en camarones peneidos. Este método se utiliza para evaluar la calidad del esperma para ensayos de rendimiento reproductivo, el desarrollo de protocolos de refrigeración y criopreservación, inseminación artificial, entre otros; y se han descrito dos procedimientos: (1) Extracción manual del espermátóforo, la cual se realiza presionando suavemente la región latero ventral de las coxas del quinto par de pereiópodos (Peixoto et al., 2004; Nakayama et al., 2008); y (2) Extracción eléctrica, esta consiste en la aplicación de un ligero estímulo eléctrico de 4.5 a 9 V en la misma zona cerca de los gonoporos que la extracción manual (Sandifer et al., 1984; Pratoomchat et al., 1993; Nakayama et al., 2008).

La extracción manual es un procedimiento sencillo, con la ventaja de aplicarse más directamente en el punto de extracción del espermatóforo, sin embargo, el éxito de su aplicación depende de la experiencia, habilidad y capacidad del ejecutor para reducir el tiempo requerido para manipular el organismo durante este proceso. El método eléctrico tiene la ventaja de ser rápido y eficiente independientemente de la experiencia del operador, pero puede tener efectos nocivos en la calidad del esperma de los espermatóforos regenerados y causar estrés en el animal por el paso de la corriente eléctrica por todo su cuerpo (Rosas et al., 1993; Nakayama et al., 2008).

Ambos métodos de extracción pueden provocar daños en el sistema reproductor masculino si se realizan incorrectamente, lo que podría comprometer la calidad de los espermatóforos regenerados tras múltiples extracciones en el mismo macho dando lugar a un proceso de melanización que puede provocar una disminución del número de espermatozoides (Alfaro & Lozano, 1993; Pascual et al., 1998a).

Pero de acuerdo con lo descrito por Nakayama et al. (2008) en *Farfantepenaeus paulensis*, para la reutilización de machos después de la extracción inicial del espermatóforo, el método manual es más adecuado para mantener el número de espermatozoides, el peso del espermatóforo, el peso corporal y el índice espermatosomático después de la regeneración. Braga et al. (2014) respalda esta recomendación, quien sostiene que se formaron espermatóforos de calidad similar en 16 días sin muda y en 24 h con muda después de la extracción manual en *F. paulensis*; asimismo, Beirão et al. (2019) describió que en *F. paulensis* se observaron disminuciones significativas ($P > 0.05$) en el peso corporal, el peso de los espermatóforos y el índice

espermiosomático (ESI) al final del período experimental mediante el uso de estimulación eléctrica.

1.9 Reproducción inducida en machos *L. vannamei*

La producción de espermia y la calidad y madurez del sistema de reproducción masculino en crustáceos decápodos machos se ve afectada por numerosos factores, tanto externos como internos (Nagabhushanam & Kulkarni, 1981; Pérez-Velázquez et al., 2001; Yamaguchi et al., 2008; Braga et al., 2010). Los externos son los contaminantes ambientales, la temperatura del agua, el cautiverio, el fotoperiodo, la salinidad, el estrés, las enfermedades, la edad, el tamaño de los machos y la nutrición de los reproductores (Pascual et al., 1998a; Ceballos et al., 2003; Bugnot & López, 2009; Wang et al., 2011; Harlioğlu et al., 2013); mientras que los internos son el sistema endocrino y las hormonas (Leung & Lawrence, 1985; Alfaro, 1996; Nagaraju et al., 2003; Alfaro et al., 2008).

Los factores internos se han logrado manipular para inducir y mejorar la reproducción mediante diversos procedimientos tales como la ablación del pedúnculo ocular y la aplicación de hormonas o neurotransmisores (Pérez-Velázquez et al., 2001; Nagaraju et al., 2003; Alfaro et al., 2008; Lewis & Ford, 2012; Harlioğlu et al., 2018).

Hasta el momento, en machos *L. vannamei* se han realizado los procedimientos que se enlistan a continuación: (1) Ablación uni y bi-lateral del pedúnculo ocular, este indujo una mejora significativa en el recuento y viabilidad de los espermatozoides, así como un aumento en calidad y balance energético de los espermátóforos (Leung & Lawrence, 1985; Salvador et al., 1988; Vázquez et al., 2013); (2) Ablación de las glándulas androgénicas, la cual incide directamente en la espermatogénesis (Alfaro et al., 2016);

(3) La aplicación de la hormona juvenil III y farnesoato de metilo, los cuales influyeron positivamente en el recuento y anomalías de espermatozoides (Alfaro et al., 2008); y (4) La aplicación de 17α -Metiltestosterona y 17α -Hidroxiprogesterona, la cual mejoró el recuento de espermatozoides y peso de los espermatóforos y redujo las anomalías de los espermatozoides (Alfaro, 1996).

Capítulo 2: Evaluación del efecto de Serotonina y Espiperona en la calidad espermática y estrés oxidativo del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, tras sucesivas extracciones del espermátforo

2. Antecedentes

2.1 Efectos reproductivo de la aplicación de 5-HT y el antagonista de la DA, SPY

Diversos estudios han informado que la 5-HT es estimulante mientras que la DA inhibe el desarrollo gonadal en ambos sexos de crustáceos decápodos (Kulkarni & Fingerman, 1992; Fingerman et al., 1994; Sarojini et al., 1993, 1994, 1995b; Fingerman, 1997; Alfaro et al., 2004; Wongprasert et al., 2006; Tinikul et al., 2008; Poljaroen et al., 2011). La mayoría de los estudios reproductivos se han centrado en los efectos de la administración de 5-HT en decápodos hembras, por ejemplo, la inyección de 5-HT induce la maduración, el crecimiento ovárico y el desove en diversas especies.

Kulkarni & Fingerman (1992) describieron que la 5-HT aumentaba el índice ovárico y el tamaño de los ovocitos en *Uca pugilator*, resultados similares fueron reportados para *Procambarus clarkii* donde la inyección de 5-HT indujo maduración ovárica (Kulkarni et al., 1992; Sarojini et al., 1995a), mientras que para *Penaeus monodon*, Nagur et al. (2013) describieron que, además de la maduración ovárica, el desove obtenido era de excelente calidad. Además, Alfaro et al. (2004) sugirieron que la combinación de SPY y 5-HT no sólo induce el desove y la maduración, sino que también induce la liberación de feromonas en el agua, lo que induce la maduración. De manera similar, Vaca & Alfaro,

(2000) demostraron que la maduración en *L. vannamei* podía inducirse incluso con una única inyección de 5-HT en una dosis de 50 µg/g de peso corporal. Además, Zacharia & Kakati, (2004) investigaron el efecto de la inyección de 5-HT en la estructura histológica de los ovarios en hembras *Fenneropenaeus merguensis*. Estos autores encontraron que la inyección de 5-HT aceleró el desarrollo de los ovarios y aumentó el índice gonadosomático. Por último, Aktaş & Kumlu, (2005) encontraron resultados similares en *Penaeus semisulcatus*.

De manera similar, en los decápodos machos, se han encontrado acciones agonistas por parte de 5-HT. Por ejemplo, en *P. clarkii* (Sarojini et al., 1994) y *Macrobrachium rosenbergii* (Poljaroen et al., 2011; Siangcham et al., 2013) aumenta el desarrollo de los testículos (aumentando el índice testicular (IT) el diámetro de los túbulos seminíferos y proliferación de celular germinales), aumenta el tamaño de AG, promueve la proliferación de células AG y la producción de factor de glándula androgénica similar a la insulina (IAG), de forma similar Farhadi et al. (2020) describe que dosis de 10 µl g p.c.⁻¹ de 5-HT aumentan significativamente la producción de espermatozoides, el IT, índice hepatosomático (IHP), índice del vaso deferente (VDI) e índice gonadosomático (GSI) en machos de *P. leptodactylus* y proponen que hay una respuesta dosis-dependiente, tal y como lo había propuesto Sarojini et al. (1993) para *Uca pugilator*. Por otro lado, en un estudio realizado por Alfaro-Montoya & Vega (2011) mencionan que la aplicación de 5-HT no indujo ninguna mejora en la calidad de los espermátóforos de *L. stylirostris* y *L. vannamei*.

Ahora bien, la DA tiene efectos opuestos a la 5-HT, tanto en machos como en hembras, lo que sugiere que estos dos neurotransmisores desempeñan funciones opuestas en el control de la espermatogénesis y la maduración testicular en los machos (Tinikul et al., 2011; Siangcham et al., 2013), así como en la ovogénesis y el desarrollo ovárico en las hembras (Sarojini et al., 1996; Chen et al., 2003; Tinikul, et al., 2008, 2009a, 2009b), además, se encuentra distribuido en el sistema nervioso de *Pacifastacus leniusculus* (Laxmyr, 1984), *L. vannamei* (Tinikul et al., 2011), *P. clarkii* (Mercier et al., 1991; Álvarez et al., 2020), y *M. rosenbergii* (Tinikul et al., 2009a). Por lo que su inhibición por medio de un antagonista como la espiperona (SPY) ha dado resultados agonistas al desarrollo y maduración gonadal en crustáceos hembra, tal y como lo describe Greco et al. (2002) para *P. clarkii*, Zapata et al. (2003) para *Chasmagnathus granulata*, Alfaro et al. (2004) para *L. vannamei*, y Tinikul et al. (2009b) para *M. rosenbergii*.

Por otro lado, existen dos estudios con resultados contradictorios del uso de SPY en crustáceos decápodos machos, en el primero (Sarojini et al., 1995c) describen que el uso de SPY indujo la maduración testicular en *U. pugilator*, mientras que Alfaro-Montoya & Vega (2011) reportaron que la inyección de SPY en combinación con 5-HT en *L. stylirostris*, *L. vannamei* y *P. occidentalis*, indujo algún grado de respuesta sexual negativa.

2.2 Expresión de genes inducidos por la aplicación de 5-HT y SPY

Hasta el momento, no existe algún estudio respecto a la inducción de la expresión de algún gen por la aplicación de 5-HT y/o SPY. Sin embargo, se ha descrito que 5-HT podría inducir la expresión del gen de la vitelogenina (vg) y sus receptores (vgr), además de

genes implicados en la maduración del ovocito (*cdc2* y ciclina B) en *Penaeus indicus* (Tomy et al., 2016). De igual manera, machos *M. rosenbergii* a los que se les aplicó 5-HT mostraron una proliferación de células germinales (Poljaroen et al., 2011; Siangcham et al., 2013), por lo que es posible que el gen *LvDmc1*, el cual es un gen que se expresa abundantemente en espermatogonias (Okutsu et al., 2010), también este regulado por 5-HT.

Por el lado de vista metabólico, Lee et al. (2017) realizaron un estudio transcriptómico en hembras *L. vannamei* con APO, donde encontraron un aumento de genes que sugiere un mayor requerimiento de energía para transferir sustratos de energía en el hepatopáncreas como resultado del estrés agudo inducido por la APO, por lo tanto, si la aplicación de 5-HT y SPY provocan un estrés producto de un aumento de las reacciones glucolíticas, es probable que se observe la expresión de algún gen relacionado al estrés oxidativo, tal como *LvcMnSOD*, *LvGPx* o *LvTRx*.

Justificación

Para poder implementar protocolos de mejoramiento reproductivo en una especie es necesario caracterizar sus efectos en ambos sexos, puesto que el éxito reproductivo depende de la respuesta de ambos. Por lo que en el caso del protocolo de la administración de 5-HT y SPY, donde ya se ha demostrado ser una alternativa a la APO viable en hembras *L. vannamei*, es crucial examinar los efectos de la administración de este protocolo principalmente en la calidad espermática y estrés oxidativo de los machos *L. vannamei* antes de implementar esta técnica a nivel industria para cumplir con los

estándares internacionales del cultivo de camarón y evitar impactos negativos en el mejoramiento de la etapa de reproducción controlada.

Hipótesis

Machos *L. vannamei* tratados con el protocolo de manipulación de serotonina (5-HT) y espiperona (SPY) mediante cuatro inyecciones consecutivas con 5-HT y SPY (5-HT – SPY) presentarán mejor calidad espermática (tasa de ausencia de espermátóforos, tasa de espermátóforos melanizados, peso del espermátóforo, número total de espermatozoides y tasa de espermatozoides muertos) inclusive después de sucesivas regeneraciones de los espermátóforos inducidas mediante su extracción manual. Así mismo, al final de dicho protocolo, se observarán niveles de expresión altos de genes relacionados a la espermatogénesis (*LvDmc1*) en el testículo y niveles bajos de genes de respuesta a estrés oxidativo (*LvTRx*, *LvcMnSOD* y *LvGPx*) en el hepatopáncreas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos de un protocolo de manipulación de serotonina y dopamina mediante la inyección de serotonina y espiperona (5-HT – SPY) en la calidad espermática y los niveles de expresión de genes relacionados a la espermatogénesis y estrés oxidativo de machos *L. vannamei* después de regeneraciones sucesivas de los espermátóforos inducidas por su extracción manual.

Objetivos específicos

- a. Evaluar la calidad espermática de machos inyectados con 5-HT – SPY a lo largo de cuatro regeneraciones sucesivas de los espermátóforos.
- b. Evaluar el nivel de expresión del gen *LvDmc1* (Homólogo *L. vannamei* DNA meiotic recombinase 1) en testículo a través de PCR en tiempo real.
- c. Evaluar los niveles de expresión de los genes *LvTRx* (*L. vannamei* Thioredoxin), *LvcMnSOD* (*L. vannamei* Cytoplasmatic Manganese Superoxide Dismutase) y *LvGPx* (Glutathione Peroxidase) involucrados en el proceso de estrés oxidativo en hepatopáncreas de machos a través de PCR en tiempo real.

Introducción

De acuerdo con la FAO (2020), el cultivo de *L. vannamei* es una de las industrias más importantes a nivel mundial al aportar el 52.9% de la producción acuícola de crustáceos, y se prevé que siga creciendo esta producción debido a que es parte del objetivo 14 del Plan de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030 de la ONU, el cual propone impulsar la acuicultura gracias a que esta ofrece diversas oportunidades para reducir el hambre y mejorar la nutrición, aliviar la pobreza, generar crecimiento económico y salvaguardar el ecosistema marino (ONU, 2015). Sin embargo, para que exista este crecimiento, el cultivo debe ser más eficiente y estar acorde a los lineamientos internacionales, lo cual se logrará con la aplicación de innovaciones tecnológicas acordes a los nuevos lineamientos en puntos clave o de mejora del cultivo en concordancia al bienestar animal (Kumaran et al., 2017; Birch et al., 2021; FAO, 2020; Albalat et al., 2022; Pimentel et al., 2022).

Asimismo, al ser nombrados los crustáceos decápodos como seres sintientes por parte del Parlamento británico, a partir de la revisión publicada por Birch et al. (2021), se enfatizó la necesidad de técnicas para el mejoramiento de la reproducción acorde al bienestar animal, tales como la terapia de hormonas, feromonas, RNA de interferencia, la inversión sexual, la hibridación, la fertilización in vitro mejoramiento genético y la manipulación de neurotransmisores (Tsukimura & Kamemoto I., 1991; Feijó et al., 2016; Alfaro et al., 2019; Gutiérrez, 2022), siendo obsoletas técnicas invasivas como la ablación del pedúnculo ocular (APO) la cual ha sido la técnica más extendida y efectiva, al ser un

procedimiento simple y efectivo, esto debido a que proporciona tasas de maduración y desove mayores a la reproducción natural (Palacios et al., 1999).

De las técnicas anteriormente descritas, destaca la manipulación de neurotransmisores con serotonina (5-HT) y espiperona (SPY), antagonista del neurotransmisor dopamina (DA), al ser una técnica exitosa en hembras *L. vannamei* al obtener una inducción de la maduración y rendimiento de nauplios similar a lo obtenido con la APO (Alfaro et al., 2004). Sin embargo, esta técnica, así como las anteriormente mencionadas, se han centrado en el desempeño reproductivo de las hembras, con poca atención al desempeño reproductivo de los machos, a pesar de que la contribución genética paterna es fundamental para lograr altas tasas de fertilización y producir descendencia de buena calidad (Aquino et al., 2022; Duangjai et al., 2023).

Al respecto, solo se han realizado dos estudios en machos, el primero fue realizado por Sarojini et al. (1995c) con *Procambarus clarkii* donde encontraron que los machos tratados con la aplicación de 5-HT y SPY, presentaron una mayor madurez testicular y glándulas androgénicas más desarrolladas, además detallan que es debido a que la 5-HT libera la hormona estimulante de las gónadas (GSH) mientras que la SPY bloquea la acción de DA la cual es la encargada de la liberación de la hormona inhibidora de las gónadas (GIH) y la inhibición de la GSH; por otro lado, en el segundo estudio donde se aplicó esta técnica a machos *L. vannamei*, Alfaro & Vega (2011) describen que su aplicación no benefició la calidad reproductiva, sin embargo el objetivo de este estudio incluye la influencia del efecto medioambiental en los parámetros de calidad espermática,

por lo que la influencia de los neurotransmisores pudo verse alterada, además, este efecto no se evaluó tras sucesivas regeneraciones.

Aunado a lo anterior, cabe señalar que en programas de reproducción inducida, debido al manejo y condiciones de cultivo implementadas en los reproductores, se puede ocasionar una alta demanda metabólica, la cual puede desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) por parte de las mitocondrias como subproducto de la producción de ATP, con un consecuente desequilibrio entre la concentración de EROS y los sistemas de defensa antioxidante, lo que puede inducir estrés oxidativo (OS), provocando daño celular (Metcalf & Monaghan, 2013; Almansa et al., 2020). Por lo tanto, para evaluar de forma integral el impacto de una técnica para la mejora reproductiva, es necesario evaluar el estrés oxidativo resultante, de forma particular, en este estudio, se evaluaron los antioxidantes endógenos tiorredoxina (TRx), superóxido dismutasa citoplasmática de manganeso (cMnSOD) y glutatión peroxidasa (Gpx), debido a que estos dependen de las condiciones fisiológicas del organismo (Montalvo et al., 2022).

Si la administración de 5-HT y SPY se tecnifica a otros métodos, como la inclusión en la dieta, como lo describen Ohs et al. (2006) para DA y (Aktaş et al., 2014) para 5-HT, será indispensable evaluar el efecto que tiene la manipulación de estos dos neurotransmisores, 5-HT y DA mediante SPY, en machos *L. vannamei* particularmente en los rubros de: (1) la calidad reproductiva, incluyendo su relación con expresión de genes (Duangjai et al., 2023); y (2) el estrés oxidativo ocasionado por el aumento de la demanda metabólica de la reproducción (Almansa et al., 2020), para que esta técnica pueda aplicarse y extenderse dentro del cultivo del camarón de forma confiable. Por lo

que el objetivo de este trabajo fue la evaluación del efecto de la aplicación de 5-HT – SPY en la calidad espermática y estrés oxidativo de machos *L. vannamei*.

Materiales y métodos

1.1 Animales y aclimatación

Se obtuvieron postlarvas del laboratorio comercial *Maricultura Vigas*, Campeche, México, y fueron mantenidas en el Laboratorio de Producción de Camarón del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO – UABC).

Una vez que las postlarvas alcanzaron la fase adulta, se seleccionaron 60 machos con un peso promedio de 32.47 g y ausencia de necrosis en el exoesqueleto, presencia de todos los apéndices, tracto reproductivo y espermátóforos íntegros (Braga et al., 2010). Los machos seleccionados se colocaron aleatoriamente en 4 tanques cuadrangulares (Anexo 1), 15 camarones por tanque, con un volumen útil de 800 L y un área de 1 m² de fondo.

El recambio de agua fue del 18.73 y 35.91%, para la primeras cuatro semanas y las ultimas semanas respectivamente de acuerdo con el incremento de la biomasa, mediante flujo continuo de agua de mar con una salinidad de 34.37 ± 0.25 ppm. Se mantuvo la temperatura en 27.64 ± 1.14 °C, el oxígeno a 6.28 ± 0.14 mg/L, el amonio 0.15 ± 0.06 y un fotoperiodo natural de 13 h luz: 11 h oscuridad.

Los organismos fueron alimentados ad libitum y alternadamente cuatro veces al día con el alimento comercial BumperCrop® (VIMIFOS®, México), el cual

fue enriquecido con los ingredientes: paprica, lecitina granular, ácido ascórbico, mejillón y calamar, todos molidos, lo cual se absorbió por el alimento comercial considerando las recomendaciones descritas por Braga et al. (2010) y con una composición proximal final de 33.1% de proteína cruda y 10.1% de lípidos.

Los machos permanecieron en estas condiciones por una semana previa al inicio del experimento para su aclimatación.

1.2 Diseño experimental

El experimento tuvo una duración de 58 días y se realizaron 5 muestreos cada 15 días. Las condiciones de alimentación, calidad de agua y fotoperiodo se mantuvieron iguales a las del proceso de aclimatación.

Se establecieron un control y dos tratamientos experimentales, Control (C), Solución salina fisiológica (SSF) y Serotonina y espiperona (5-HT – SPY). El control y cada tratamiento contó con 4 réplicas integradas por un total de 20 machos distribuidos en los 4 tanques, 5 machos de cada tratamiento en cada tanque, por lo que cada tratamiento tuvo un marcaje por corte de urópodo. El C consistió en pesaje y extracción de ambos espermátóforos de forma manual en cada muestreo, siguiendo el procedimiento descrito por Nakayama et al., 2008. Los tratamientos SSF y 5-HT – SPY siguieron el protocolo descrito por Alfaro et al. (2004). El tratamiento SSF consistió en el pesaje, extracción manual de ambos espermátóforos y dos inyecciones intramusculares (Anexo 2) con 0.075 mL de solución salina fisiológica (pH de 7.4). El tratamiento 5-HT – SPY fue la inyección

intramuscular de 5 HT a una dosis de 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso total y SPY a una dosis de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso total.

1.3 Calidad del espermatóforo y espermática

El espermatóforo y la calidad de los espermatozoides se evaluó mediante los siguientes parámetros: porcentaje de ausencia de espermatóforo, porcentaje de presencia de melanización, peso del espermatóforo, conteo total de espermatozoides, tasa de espermatozoides muertos e índice espermatosomático. Estos parámetros se midieron en los machos en etapa de intermuda al inicio del experimento (Día 0) y posteriormente en los días 15, 30, 44 y 58.

Mediante un examen externo visual se determinó y contabilizó la ausencia de espermatóforo y la presencia de melanosis en las coxas del quinto par de pereiópodos y en los espermatóforos extruidos (Nakayama et al., 2020; Braga et al., 2018b). Ambos espermatóforos de cada macho fueron extruidos manualmente siguiendo el protocolo descrito por Nakayama et al., 2008, uno de ellos fue seleccionado al azar y pesado, mientras que el otro fue homogenizado en 1.8 mL de solución salina fisiológica. El conteo de espermatozoides, así como la mortalidad espermática, se realizó contando las células presentes en la solución resultante utilizando un hemocitómetro bajo un microscopio óptico de acuerdo con el método descrito por Leung-Trujillo & Lawrence (1987). Por último, se calculó el índice espermatosomático (IES) utilizando la siguiente fórmula (Nakayama et al., 2008).

$$IES = \frac{\text{Peso del espermatóforo}}{\text{Peso corporal}} \times 100_{(1)}$$

1.4 Material biológico, extracción de ARN, Tratamiento con DNasa, y síntesis de cDNA

Los organismos fueron anestesiados mediante técnicas de reducción térmica (4 °C). Se realizó la disección y colecta de hepatopáncreas y testículos almacenados en tubos Eppendorf de 1.5 ml con buffer NAP (Camacho et al., 2013) y se almacenaron a -40 °C.

El ARN total se extrajo de 50 mg de tejido, hepatopáncreas y testículo, de cada organismo experimental (C, SSF y 5-HT – SPY). El tejido fue homogeneizado en tubos de 2 ml con 500 µl de TRIReagent® (SIGMA-Aldrich®, EE. UU.) y 200 mg de perlas de zirconia de 1.0 mm (BioSpecproducts®, EE. UU.) en un homogeneizador de tejidos FastPrep-24®5G (MP Biomedicals®, EE. UU.) durante un ciclo de 30 s a 4 m s⁻¹ y dos ciclos de 20 s a 4 m s⁻¹, para hepatopáncreas y testículo, respectivamente.

El pellet de ARN se eluyó en 50 – 100 µL de agua libre de nucleasas. La integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El buffer de carga fue preparado con GelRed® (Biotium®, EE. UU.) para la tinción de los fragmentos de ARN total, mientras que la concentración y pureza se midió con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific®, EE. UU.).

Posteriormente, se trataron 8 µg de ARN total para remover ADN genómico con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega®, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante con pasos de purificación y precipitación adicionales (López-Galindo et al., 2019). La purificación se corroboró mediante electroforesis en gel de

agarosa al 1.5% y PCR punto final, utilizando el gen *LvrpL8* como control de amplificación.

El cDNA se sintetizó con el kit ImProm-II® Reverse Transcription System y el Oligo dt₁₅ (ImProm-II®, Promega®, EE. UU.) con 1 µg de ARN total purificado en un volumen de reacción total de 20 µL (50 ng µL⁻¹) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El cDNA obtenido se almacenó a -40 °C hasta su uso para las reacciones de qPCR.

1.5 Expresión génica relativa

Se evaluaron los niveles de expresión de los genes *LvTRx*, *LvcMnSOD* y *LvGPx* en el hepatopáncreas; y *LvDMC1* en el testículo de camarones macho *L. vannamei* en los grupos experimentales C, SSF y 5-HT – SPY mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un termociclador en tiempo real StepOnePlus® (AppliedBiosystems®, EE. UU.).

Los cebadores específicos para los genes blanco se diseñaron con las secuencias de ARNm disponibles en la base de datos nucleótidos de GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Tabla 2) empleando el software Primer3 (Kõressaar et al., 2018) y Oligoanalyzer® de Integrated DNA Technologies (IDT) (Owczarzy et al., 2008) para la identificación de formación de dímeros y estructuras secundarias.

Se evaluaron tres genes de referencia: proteína ribosomal L8 (*LvrpL8*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*LvGAPDH*) y factor de elongación 1 alfa (*LvEf1α*), los cuales fueron validados en cada tejido y condición experimental.

Tabla 2 Lista de oligonucleótidos utilizados durante este estudio para análisis de expresión relativa en qPCR. F: Oligonucleótido Forward; R: oligonucleótido reverse; pb: pares de bases; e: eficiencia; H: hepatopáncreas; T: testículo; NA: no evaluado en el tejido. † Primers diseñados en el software Primer3 para este estudio.

Gen/Cebador	No. de acceso en el GenBank	Secuencia del cebador (5'→ 3')	Longitud del producto (bp)	e		Referencia
				H	T	
<i>LvrpL8</i>	DQ316258	(F) ATGAACCCTGTAGAGCATCCT (R) CCTTTGTACCACGGATGAGACCA	141	1.8209	1.7354	(López-Galindo et al., 2023)
<i>LvGAPDH</i>	MG787341.1	(F) TCGGCAAGGAGTGCTCTTAT (R) GCCTTAGCGTCAAAGATGGA	151	1.7963	1.7071	(López-Galindo, 2014)
<i>LvEF1α</i>	GU136229	(F) GAAATCCGACAACATGGGCT (R) CCAATCTTGTACACGTCCTG	162	1.7211	1.9258	(López-Galindo et al., 2023)
<i>LvTRx</i>	EU499301.1	(F) CCTCTTCCCACATTCGCCAA (R) GATCATTTTGCACGGCCAC	135	1.6877	NA	†
<i>LvcMnSOD</i>	DQ005531	(F) CGTAGAGGGTATTGTCGT (R) TTGAAATCATACTTGAGGG	153	1.7465	NA	(Wang et al., 2009; Zhou et al., 2010)
<i>LvGPx</i>	AY973252	(F) GGAATCCACCAGATGAACC (R) CTCGAAGTTGTTCCCAGGAC	154	1.7525	NA	(López-Galindo et al., 2023)
<i>LvDmc1</i>	HQ116385.1	(F) ATCAGCGAGGAATACAACGTGT (R) TGTCTCCAATCGGTTTCTCG	107	NA	1.8465	†

Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado con un volumen de reacción final de 10 µL con 1x SYBR® Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems®, EE. UU.), cebadores forward y reverse 0.2 µM, 3 µL de cDNA (dilución 1:10, lo equivalente a 15 ng de cDNA) y 1.6 µL de agua estéril libre de nucleasas.

Las condiciones del programa de amplificación fueron 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 58° C (*LvTRx*, *LvGPx*, *LvGAPDH* y *LvEf1α*) o 60 °C (*cMnSOD*, *LvDmc1* y *LvrpL8*) durante 30 s, además se incluyó

una curva de disociación a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s, 95 °C durante 15s, con una rampa de 0.3 °C.

Posteriormente, se realizó un análisis de estabilidad utilizando el programa RefFinder (Xie et al., 2012) el cual integra los programas Genorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) y el método comparativo Delta-Ct (Silver et al., 2006). Se utilizaron los genes *LvEf1α* y *LvrpL8* como genes de referencia en hepatopáncreas y *LvEf1α* y *LvGAPDH* en testículo. Los valores de eficiencia para la curva estándar de cada gen ($e = \left(\frac{101}{\text{pendiente}-1}\right) * 100$) se obtuvieron a partir de una dilución inicial 1:10 y 6 diluciones seriadas 1:3 a partir de un pool de cDNA.

1.6 Análisis estadísticos

Para la calidad espermática, se realizó la transformación de los datos de porcentaje con arcoseno, sin embargo, solo se presentan los valores no transformados. Para los parámetros evaluados, se comprobaron las premisas de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene) para posteriormente realizar un análisis de varianza bifactorial (2-ANOVA) para identificar diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de la calidad del espermátforo y calidad espermática entre muestreos, tratamientos y su intersección. En los casos donde hubo diferencias significativas, se realizó una regresión lineal de los tratamientos en el parámetro identificado. De igual manera, en los tratamientos donde la significancia fue $P <$

0.05 en la regresión lineal, se ejecutó un ANOVA para identificar diferencias significativas entre los valores medios de los muestreos. Por último, se aplicó la prueba *post hoc* HSD de Tukey ($P < 0.05$) en el caso donde hubo diferencias significativas en el ANOVA.

Para los datos de expresión relativa de genes, el valor de la expresión relativa se calculó por medio de la aplicación del método delta-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$), el cual considera la eficiencia de amplificación de cada gen. Además, este modelo estimó las cantidades de expresión relativa (NRQ) normalizadas a partir del ciclo de cuantificación utilizando genes blanco-normalizados con genes de referencia estables (Hellemans et al., 2008). Antes de los análisis estadísticos, los datos de NRQ se transformaron a Log10, y se realizó la retransformación de las medias para su graficado (Zar, 1999).

Se evaluaron las premisas de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene), para posteriormente realizar un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos (C, SSF y 5-HT – SPY) en los niveles de expresión de los genes blanco-seleccionados (*LvDmc1*, *LvTRx*, *cMnSOD*, *LvGPx*) de los organismos experimentales. Se ejecutó el análisis *post hoc* de las medias utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($P < 0.05$).

En todos los análisis se empleó el programa SPSS versión 23 de IBM® y tuvieron un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Resultados

Calidad espermática y del espermatóforo

Los resultados de la calidad espermática y del espermatóforo se muestran gráficamente en la Fig.4. El conteo de espermatozoides fue mayor de manera significativa ($P < 0.05$) en el tratamiento 5-HT – SPY en la quinta extracción, donde el valor inicial promedio para todos los grupos experimentales fueron 16.38 ± 9.90 millones de espermatozoides; mientras que en la 5° extracción el valor promedio para el tratamiento 5-HT – SPY fue de 36.54 ± 5.16 . Por el contrario, el grupo control en la 5° extracción tuvo un valor promedio de 25.20 ± 10.62 millones de espermatozoides y el grupo SSF tuvo un valor promedio de 24.76 ± 4.26 .

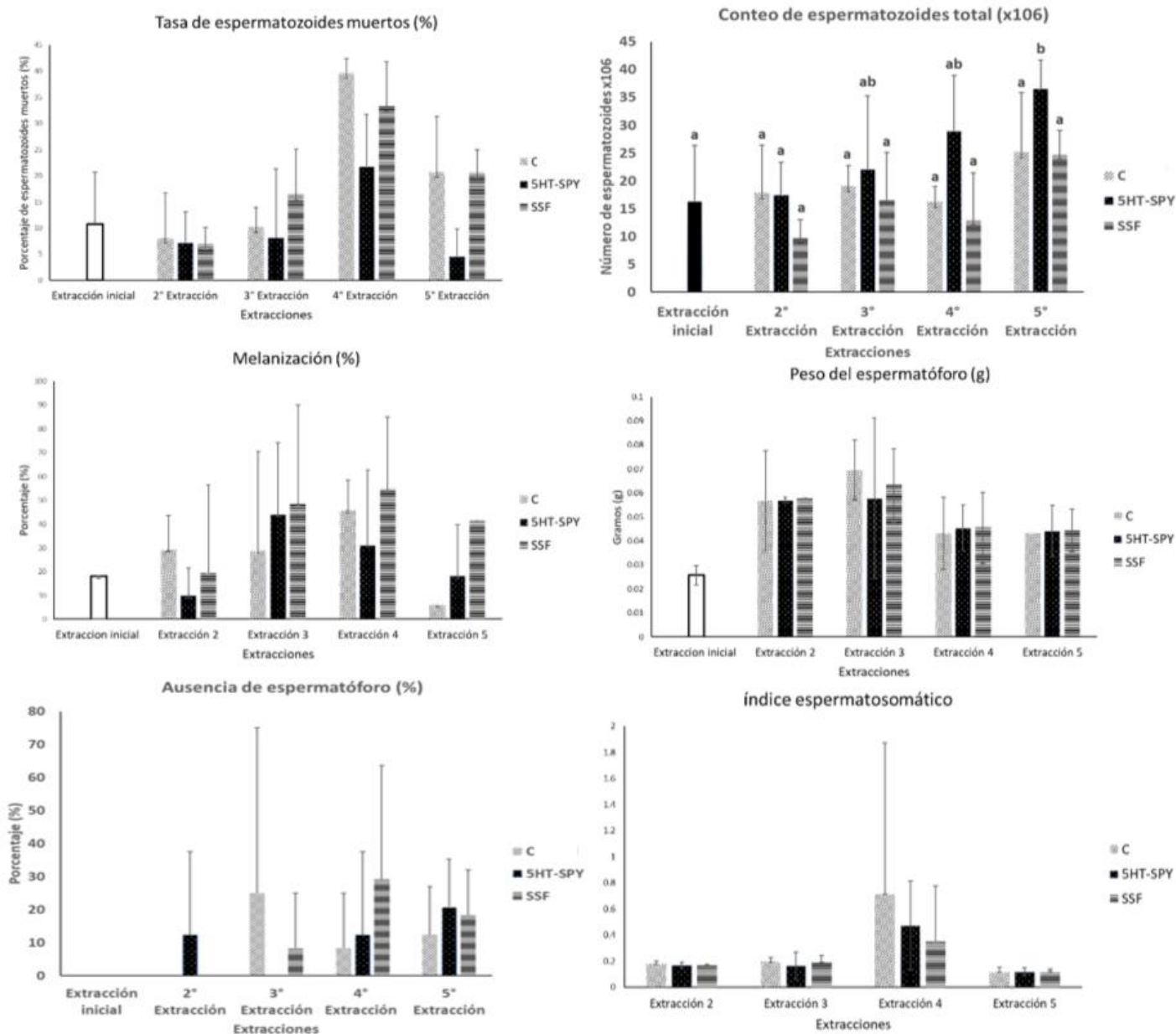


Figura 4 Parámetros para evaluar la calidad del espermátforo y calidad espermática del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* bajo dos tratamientos experimentales y un Control: C, 5-HT – SPY y SSF. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los valores medios se muestran en barras junto con su desviación estándar.

Los resultados de la regresión lineal se resumen en la Tabla 3, donde se observa una relación significativa en el tratamiento 5-HT – SPY y el parámetro CTE.

Tabla 3. Regresión lineal del parámetro conteo total de espermatozoides (CTE) evaluado en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* bajo tres tratamientos experimentales: C, 5-HT – SPY y SSF.

Tratamiento	Ecuación ($Y = B_0 + B_1X$)	R	P
C	CTE = 14.14 + 1.60 (Extracción/aplicación)	0.122	0.132
5-HT - SPY	CTE = 8.73 + 5.18 (Extracción/aplicación)	0.500	0.000
SSF	CTE = 10.12 + 1.991 (Extracción/aplicación)	0.156	0.085

No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en la evaluación de los parámetros tasa de espermatozoides muertos, peso del espermatóforo, melanización, ausencia de espermatóforo ni en el índice espermatosomático, entre tratamientos ni extracciones (Fig. 4).

Expresión génica relativa

La expresión relativa del gen *LvDmc1* no presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$; Fig. 5). Sin embargo, se observó una tendencia de disminución de la expresión de este gen en los tratamientos SSF y 5-HT – SPY en comparación con C.

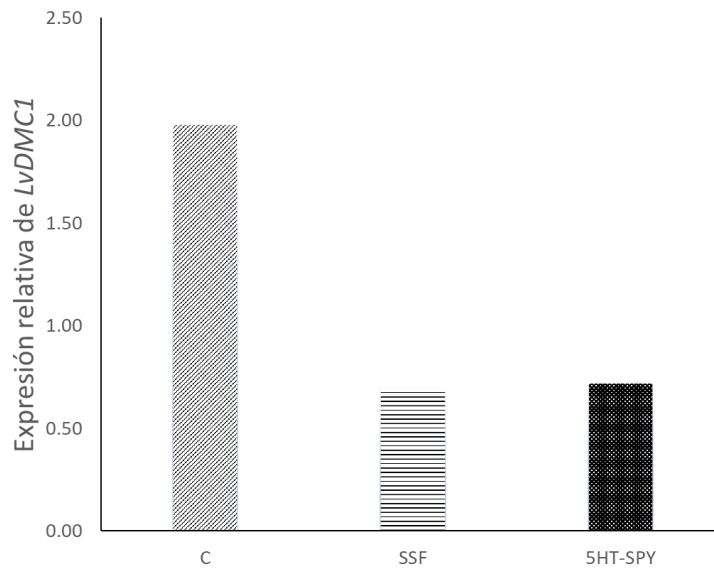


Figura 5. Expresión relativa (medias retransformadas a partir de logaritmo) de *LvDmc1* en el testículo de adultos *L. vannamei* bajo tres tratamientos experimentales (C, Control; SSF, solución salina fisiológica; y 5-HT – SPY, Serotonina espiperona). Los valores medios se muestran en barras.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *LvTRx*, *LvcMnSOD* y *LvGPx*, entre tratamientos ($P > 0.05$; Fig. 6).

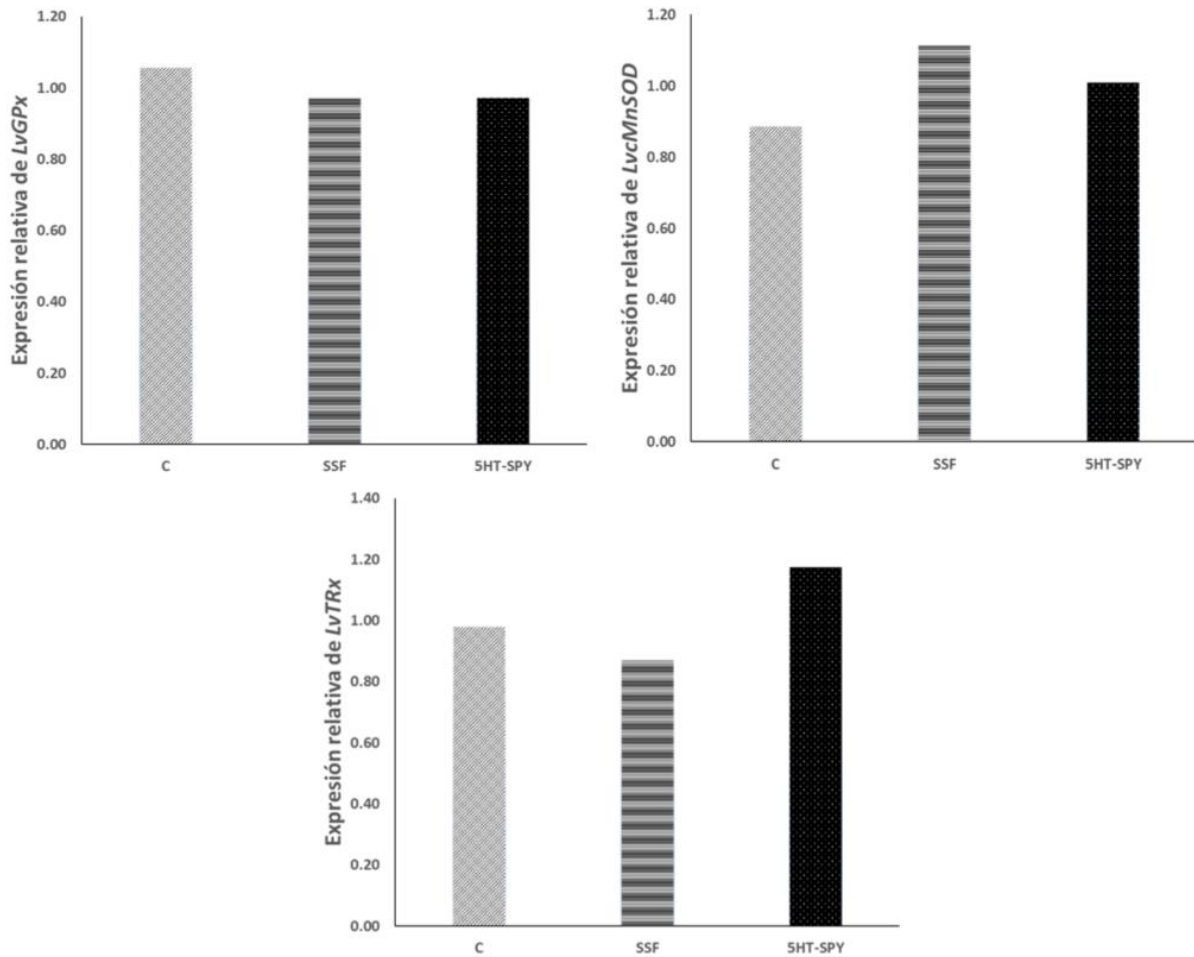


Figura 6. Expresión relativa (medias retransformadas a partir de logaritmo) de a) *LvGPx*, b) *LvcMnSOD*, y c) *LvTRx* en el hepatopáncreas de adultos *L. vannamei* bajo tres tratamientos experimentales (C, Control; SSF, solución salina fisiológica; y 5-HT – SPY, Serotonina espiperona). Los valores medios se muestran en barras.

Discusión

La inyección periódica y prolongada de 5-HT – SPY indujo un aumento en el conteo total de espermatozoides a partir de la quinta extracción del espermatóforo y cuarta aplicación en *L. vannamei*, a la misma dosis que induce maduración ovárica (Alfaro et al., 2004), esto no coincide con lo reportado por Alfaro & Vega (2011), quienes realizaron tres aplicaciones de 5-HT – SPY, sin extracciones periódicas, en esta misma especie y no encontraron diferencias significativas en el conteo total de espermatozoides.

Asimismo, se han observado resultados similares en otros crustáceos decápodos. Sarojini et al., (1995a) demostraron que la 5-HT y los bloqueadores de los receptores DA, SPY y pimozida, indujeron la maduración testicular y de las glándulas androgénicas en *Procambarus clarkii*. De igual manera, en *Uca pugnax* la maduración testicular se ve afectada en un patrón dosis dependiente por la serotonina y dopamina, siendo que la inyección de 5-HT indujo la maduración testicular y el desarrollo de glándulas androgénicas (Sarojini et al., 1993; Sarojini et al., 1995c).

Lo anterior sugiere que en *L. vannamei* se requiere de un estímulo prolongado de 5-HT, amina biogénica responsable de la liberación de la hormona estimulante de las gónadas (GSH), lo cual desencadena el desarrollo y estímulo de las glándulas androgénicas, lo que a su vez induce la liberación de la hormona androgénica, la cual a su vez es responsable de la maduración testicular y la espermatogénesis en crustáceos decápodos (Farhadi et al., 2020; Fingerman, 1997; Sarojini et al., 1995a).

Por otro lado, la DA tiene acciones antagónicas con la 5-HT, tal como la liberación de la hormona inhibidora de las gónadas (GIH) y una reducción de la síntesis de la GSH

y, consecuentemente, detiene la síntesis de la hormona androgénica de la glándula androgénica, por lo que un bloqueador de este neurotransmisor, tal como lo es la SPY, permitió la acción de la 5-HT sin una regulación negativa (Ohs et al., 2006; Sarojini et al., 1995a).

Sin embargo, el resto de los parámetros de calidad del espermátforo y espermática evaluados en el grupo experimental 5-HT – SPY, así como el grupo SSF y control, presentaron el comportamiento esperado tras sucesivas extracciones atribuidas al agotamiento reproductivo (Pérez-Rodríguez et al., 2019; Pascual et al., 1998b; Alfaro & Iozano, 1993; Leung & Lawrence, 1987). Braga et al. (2018a) describen una disminución del número total de espermatozoides, un aumento de la melanización, menor peso del espermátforo, así como un aumento en la tasa de mortalidad espermática después de realizar tres extracciones. Una idea similar puede encontrarse en lo descrito por Nakayama et al. (2020) quien menciona que la melanización aumenta a partir de la segunda extracción, esta melanización podría ser una de las responsables de la reducción de la calidad espermática al existir una reducción progresiva del conteo de espermatozoides y un aumento de las tasas de espermatozoides muertos y anormales de acuerdo con lo reportado por Díaz et al. (2001).

A pesar de que el gen *LvDmc1* es un potencial indicador del desarrollo de las células germinales al expresarse en espermátgonias y oogonias premeióticas (Okutsu et al., 2010), no se encontraron diferencias entre grupos experimentales en su nivel de expresión génica, sin embargo, es posible que no se haya encontrado transcritos debido a que, de acuerdo con lo descrito por diversos autores, la expresión génica se da horas

después del estímulo (Fan et al., 2022; Mohamad et al., 2017; Sookruksawong et al., 2013; Lin et al., 2010; De la vega et al., 2007) y en este estudio las muestras se tomaron 14 días después de la última aplicación de los tratamientos.

No hubo diferencias en la expresión relativa de las enzimas antioxidantes evaluadas entre tratamientos, por lo que se podría inferir que se conservó la homeostasis celular y el equilibrio de las concentraciones de las especies reactivas de oxígeno (EROS) y estas enzimas. Metcalfe & Monaghan (2013) describen que un mayor esfuerzo reproductivo se asocia con un mayor estrés oxidativo, por ende, un mayor daño el cual acorta la vida útil del organismo, esto podría sugerir que la aplicación de 5-HT – SPY no ocasiona un sobre esfuerzo reproductivo, por otro lado, no concordaría con el comportamiento del resto de los parámetros evaluados en todos los grupos experimentales. Almansa et al. (2020) menciona que el desequilibrio oxidativo inducido por el aumento de la demanda metabólica en la reproducción podría ser transitoria y podría pasarse por alto si el muestreo no se realiza en el momento preciso.

Además, de forma particular, Fan et al. (2022), Sookruksawong et al. (2013), Lin et al. (2010) y De la vega et al. (2007) mencionan que la expresión de genes de enzimas antioxidantes se da las primeras 24h posterior al estímulo, ya no encontrándose cambios a los 10 días en *L. vannamei*, *M. japonicus* y *P. monodon*, respectivamente. Por lo tanto, la ausencia de diferencia del nivel de expresión de las enzimas antioxidantes no descarta la presencia de estrés oxidativo en el grupo experimental 5-HT – SPY.

Capítulo 3: Conclusión y perspectivas futuras

De acuerdo con los resultados de este estudio y con el conocimiento hasta el momento publicado, el protocolo para la inducción de la maduración mediante la manipulación de 5-HT y DA propuesto por Alfaro et al. (2004) para hembras *L. vannamei* mediante la inyección de 5-HT – SPY, es un protocolo adecuado para su aplicación en machos de esta misma especie, inclusive pareciera ser favorable para la producción de espermatozoides en un plazo de 58 días, con cuatro aplicaciones de 5-HT – SPY, a pesar de las extracciones sucesivas del espermatóforo. Estas aplicaciones y lapso son importantes debido a que la influencia de estos neurotransmisores parece depender tanto de la dosis, como se ha descrito en otros estudios, como del tiempo, como se descubrió en este estudio.

Antes de su aplicación en el alimento u otra vía de implementación a nivel industria, se recomienda evaluar otros aspectos de la calidad espermática como lo es la presencia de anomalías espermáticas, tasa de fertilización y eclosión, la reacción acrosómica, el contenido energético del espermatóforo, así como la integridad del DNA mediante fluorescencia; inclusive, es deseable empezar a implementar técnicas más sensibles, aunque sean más costosas, como lo es la citometría de flujo para evaluar la integridad de la membrana citoplasmática, o los perfiles transcriptómicos o análisis proteómicos que funjan como biomarcadores que describan la composición o proteínas relacionadas con la fisiología y función del esperma.

Con lo referente a la expresión génica, aunque los resultados sugieren que no hubo un estímulo de expresión génica para el gen *LvDmc1* ni para los genes de estrés

oxidativo, se recomienda tomar muestras para el análisis de qPCR en periodos más cortos a los presentados en este estudio, se sugiere se tomen horas después de la aplicación de 5-HT – SPY.

De la misma manera, se deben considerar otros marcadores de estrés oxidativo, como la cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs), el estado antioxidante total, la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas, entre otros.

Por último, se debe considerar que la salud y el bienestar animal de los peneidos es multifactorial, por lo que, al tratarse de manipulación de neurotransmisores principales, es importante considerar la ejecución de otros estudios complementarios tales como la evaluación de moléculas energéticas en la hemolinfa y estudios etológicos.

Bibliografía

- Ahmed, R. G. (2005). Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development? *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 15(2), 55–63.
- Aispuro Hernandez, E., Garcia Orozco, K. D., Muhlia Almazan, A., Del-Toro Sanchez, L., Robles Sanchez, R. M., Hernandez, J., Gonzalez Aguilar, G., Yepiz Plascencia, G., & Sotelo-Mundo, R. R. (2008). Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 148(1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.03.013>
- Aktaş, M., Ciğer, O., Genç, E., Ayce Genç, M., & Çavdar, N. (2014). Mannan oligosakkarit ve serotonin'in beyaz bacaklı{dotless} karides *Litopenaeus vannamei* (Boone)'nin kabuk değişimi, büyüme, vücut kompozisyonu ve hepatopankreas histolojisi üzerine etkileri. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1), 205–211. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_22
- Aktaş, M., & Kumlu, M. (2005). Gonadal Maturation and Spawning in *Litopenaeus semisulcatus* de Hann, 1844 by Hormone Injection. *Turkish Journal of Zoology*, 29, 193–199.
- Albalat, A., Zacarias, S., Coates, C. J., Neil, D. M., & Planellas, S. R. (2022). Welfare in Farmed Decapod Crustaceans, With Particular Reference to *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.886024>

- Alfaro, J. (1996). Effect of 17 α -Methyltestosterone and 17 α -Hydroxyprogesterone on the Quality of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Spermatophores. *Journal of the world aquaculture society*, 27(4).
- Alfaro, J., & Lozano, X. (1993). Development and Deterioration of Spermatophores in Pond-Reared *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(4).
- Alfaro, J., Ulate, K., & Vargas, M. (2007). Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Penaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture*, 270(1–4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.011>
- Alfaro, J., Zúñiga, G., García, A., & Rojas, E. (2008). Preliminary evaluation of the effect of juvenile hormone III and methyl farnesoate on spermatophore quality of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Marina y Ocenografía*, 43(1), 167–171.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.020>
- Alfaro Montoya, J., Braga, A., & Umaña Castro, R. (2019). Research frontiers in penaeid shrimp reproduction: Future trends to improve commercial production. *Aquaculture*, 503, 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.068>
- Alfaro Montoya, J. (2010). The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture*, 300(1–4), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.008>

- Alfaro Montoya, J. (2013). Histological description of oogenesis and spermatogenesis in the cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(2), 335–345. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572013000200012>
- Alfaro Montoya, J., Braga, A., Vargas, M., & Umaña-Castro, R. (2017). Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoal capacitation. *Invertebrate Reproduction and Development*, 61(1), 9–17. <https://doi.org/10.1080/07924259.2016.1244573>
- Alfaro Montoya, J., & Hernández, L. (2012). The histological structure of the androgenic gland and cellular cord of the male reproductive system of adult *Litopenaeus* and *Rimapenaeus byrdi*. *Journal of Crustacean Biology*, 32(3), 351–357. <https://doi.org/10.1163/193724012X626511>
- Alfaro Montoya, J., Hernández-Noguera, L., Vega-Alpízar, L., & Umaña-Castro, R. (2016). Effects of androgenic gland ablation on growth, sexual characters and spermatogenesis of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) males. *Aquaculture Research*, 47(9), 2768–2777. <https://doi.org/10.1111/are.12727>
- 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(1–4), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.022>
- Almansa Ordonez, A., Bellido, R., Vassena, R., Barragan, M., & Zambelli, F. (2020). Oxidative stress in reproduction: A mitochondrial perspective. *Biology*, 9(9), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology9090269>

- Almeida, E. A., Petersen, R. L., Andreatta, E. R., & Bainy, A. C. D. (2004). Effects of captivity and eyestalk ablation on antioxidant status of shrimps (*Farfantepenaeus paulensis*). *Aquaculture*, 238(1–4), 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.010>
- Alvarez Lee, L., García-Gasca, A., Martínez-Díaz, S., & Gutiérrez-Rivera, N. (2020). Selection of reference genes for the study of relative gene expression during development of *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquaculture Research*, 51(7), 2997–3006. <https://doi.org/10.1111/are.14638>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Falck Orntoft, T. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer research*, 64, 5245–5250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>
- Aquino, J. I. L., Elliott, L., Zeng, C., & Paris, D. B. B. L. (2022). Recent developments in male fertility evaluation, sperm cryopreservation and artificial fertilization, and their potential application to decapod crustacean aquaculture. *Reviews in Aquaculture* (Vol. 14, Issue 2, pL. 848–889). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/raq.12627>
- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. In *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* (Vol. 57).
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199–212. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>

- Aungsuchawan, S., Browdy, C. L., & Withyachumnarnkul, B. (2011). Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, *42*(2), 188–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02579.x>
- Bauer, R. T. (1986). Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, *6*(3), 313–325.
- Bauer, R. T., & Cash, C. E. (1991). Spermatophore Structure and Anatomy of the Ejaculatory Duct in *Litopenaeus setiferus*, *F. duorarum*, and *F. aztecus* (Crustacea: Decapoda): Homologies and Functional Significance. *Source: Transactions of the American Microscopical Society*, *110*(2), 144–162.
- Beirão, J., Boulais, M., Gallego, V., O'Brien, J. K., Peixoto, S., Robeck, T. R., & Cabrita, E. (2019). Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology*, *133*, 161–178. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.004>
- Beltz, B. S. (1999). Distribution and functional anatomy of amine-containing neurons in decapod crustaceans. *Microscopy Research and Technique*, *44*(2–3), 105–120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19990115/01\)44:2/3<105::AID-JEMT5>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19990115/01)44:2/3<105::AID-JEMT5>3.0.CO;2-K)
- Birch, J., Burn, C., Schnell, A., Browning, H., & Crump, A. (2021). Review of the Evidence of Sentience in Cephalopod Mollusks and Decapod Crustaceans. *London School of Economics and Political Science*
- Bobé, J., & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>

- Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12(5), 64–76. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00149-7)
- Bowler, C., Montagu, M. Van, & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (Vol. 43). www.annualreviews.org
- Braga, A. L., Nakayama, C. L., Martins, J. G., Colares, E. P., & Wasielesky, W. (2010). Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendrobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. *Aquaculture*, 307(1–2), 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.010>
- Braga, A., Lopes, D. L. A., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2014). Spermatophore replacement of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* after manual extrusion: Effect of molting. *Aquaculture*, 433, 313–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.032>
- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M. C., Romano, L. A., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2018a). Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture*, 486, 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.018>
- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M., Romano, L., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2018b). Infertility of biofloc-reared *Litopenaeus vannamei* males associated with a spermatophore mycobacterial infection: Description of the pathological condition and implications for the broodstock management and larval production. *Aquaculture*, 492, 357–360. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.039>

- Braga, A., Nakayama, C. L., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2013). Unistellate spermatozoa of decapods: Comparative evaluation and evolution of the morphology. In *Zoomorphology* (Vol. 132, Issue 3, pL. 261–284). <https://doi.org/10.1007/s00435-013-0187-2>
- Brouwer, M., Brouwer, T. H., Grater, W., & Brown-Peterson, N. (2003). Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. In *Biochem. J* (Vol. 374).
- Browdy, C. L. (1998). Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. In *Aquaculture* (Vol. 164).
- Bugnot, A. B., & López Greco, L. S. (2009). Sperm production in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture*, 295(3–4), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.021>
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., & Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 663–673. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12108>
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure and Development*, 46(4), 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2017.01.006>
- Campa-Córdova, A. I., Núñez-Vázquez, E. J., Luna-González, A., Romero-Geraldo, M. J., & Ascencio, F. (2009). Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*.

Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 149(3), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.006>

Campos-Ramos, R., Garza-Torres, R., Guerrero-Tortolero, D. A., Maeda-Martínez, A. M., & Obregón-Barboza, H. (2006). Environmental sex determination, external sex differentiation and structure of the androgenic gland in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 37(15), 1583–1593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01604.x>

Castelo-Branco, T., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., Soares, R., & Peixoto, S. (2015). Sperm vitrification in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 436, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.005>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb01073.x>

Ceballos-Vázquez, B. P., Rosas, C., & Racotta, I. S. (2003). Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 228(1–4), 141–151. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00322-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00322-3)

Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., & Rhee, S. G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. In *Diabetes Research and Clinical Practice* (Vol. 45). www.elsevier.com/locate/diabres

- Chang, C. C., Wu, Z. R., Chen, C. S., Kuo, C. M., & Cheng, W. (2007). Dopamine modulates the physiological response of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 270(1–4), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.013>
- Chen, Y. N., Fan, H. F., Hsieh, S. L., & Kuo, C. M. (2003). Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 228(1–4), 383–395. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00324-7)
- Cheng, W., Tung, Y. H., Liu, C. H., & Chen, J. C. (2006). Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(4), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.016>
- Chow, S., Dougherty, W. J., & Sandifer, L. A. (1991). Unusual Testicular Lobe System in the White Shrimps, *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1761) and *L. vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaeidae); A New Character for Dendrobranchiata? *Crustaceana*, 60(3). <https://about.jstor.org/terms>
- Clark, W. H., Kleve, G. A. N. D., & Yudin, A. I. (1981). An Acrosome Reaction in Natantian Sperm. In *The journal of experimental zoology* (Vol. 218).
- Coman, G. J., Arnold, S. J., Callaghan, T. R., & Preston, N. L. (2007). Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 263(1–4), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.016>
- Cooper, R. L., Ward, E., Braxton, R., Li, H., & Warren, W. M. (2003). The effects of serotonin and ecdysone on primary sensory neurons in crayfish. *Microscopy Research and Technique*, 60(3), 336–345. <https://doi.org/10.1002/jemt.10272>

- Covarrubias, M. S. M., Osuna-Duarte, A. G., Garcia-Gasca, A., Lightner, D. v., & Mota-Urbina, J. C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of white shrimp *Litopenaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18(1), 19–25. <https://doi.org/10.1577/H05-010.1>
- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, L. C., & Sharples, D. J. (1991). 2. Morphology. In J. H. S. Blaxter & A. J. Southward (Eds.), *The Biology of the Penaeidae* (Vol. 27, pL. 7–54). Academic Press.
- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, L. C., Sharples, D. J., Blaxter, J. H. S., Southward, A. J., Jovanovich, H. B., San, L., & York, D. N. (1990). *The Biology of the Penaeidae* Academic Press. In *Advances in MARINE BIOLOGY* (Vol. 27).
- De La Vega, E., Hall, M. R., Wilson, K., Reverter, A., Woods, R., & Degnan, B. M. (2007). Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Physiological Genomics*, 31(1), 126-138. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00068.2007>
- Diamond, S., Powell, A., Shields, R. J., & Rowley, A. F. (2008). Is spermatophore melanisation in captive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) a result of an auto-immune response? *Aquaculture*, 285(1–4), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.029>
- Díaz, A. C., Gimenez, A. V. F., Harán, N. S., & Fenucci, J. L. (2001). Reproductive Performance of Male Argentine Red Shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in Culture Conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(2), 236–242. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb01101.x>

- Dougherty, W. J., & Dougherty, M. M. (1989). Electron Microscopical and Histochemical Observations on Melanized Sperm and Spermatophores of Pond-Cultured Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In *Journal of invertebrate pathology* (Vol. 54).
- Downs, C. A., Fauth, J. E., & Woodley, C. M. (2001). Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Marine Biotechnology*, 3(4), 380–397. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0008-3>
- Duangjai, E., Umyoo, P., Meunpol, O., & Puanglarp, N. (2023). Sperm Quality Assessment of White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Broodstock using Comet Assay. *Trends in Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.48048/tis.2023.4768>
- Duarte Restrepo, E., Jaramillo-Colorado, B. E., & Duarte-Jaramillo, L. (2020). Effects of chlorpyrifos on the crustacean *Litopenaeus vannamei*. *PLoS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231310>
- Dumas, S., & Sainz Hernández, J. C. (1999). Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol, glucosa, lactato, proteína, prefontoloxidasa y fenoloxidasa en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. [Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas]. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/14873/1/sainz1.pdf>
- Esparza-Leal, H. M., Cardozo, A. P., & Wasielesky, W. (2015). Performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks at high stocking density in clear-water versus biofloc system. *Aquacultural Engineering*, 68, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.07.004>

- Esparza-Leal, H. M., Ponce-Palafox, J. T., Cervantes-Cervantes, C. M., Valenzuela-Quiñónez, W., Luna-González, A., López-Álvarez, E. S., Vázquez-Montoya, N., López-Espinoza, M., & Gómez-Peraza, R. L. (2019). Effects of low salinity exposure on immunological, physiological and growth performance in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 50(3), 944–950. <https://doi.org/10.1111/are.13969>
- Fan, J. Q., Li, B. Bin, Hong, Q. M., Yan, Z. Y., Yang, X. J., Lu, K. C., Chen, G. L., Wang, L., & Chen, Y. H. (2022). A Glutathione Peroxidase Gene from *Litopenaeus vannamei* Is Involved in Oxidative Stress Responses and Pathogen Infection Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010567>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. In *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020*. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. In *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- FAO, Food and agriculture organization of the united nations. (2006). *Fisчерies and Aquaculture. Litopenaeus vannamei*. https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en
- Farhadi, A., Harlioğlu, M. M., & Yılmaz, Ö. (2020). Effect of serotonin injection on the reproductive parameters and haemolymph methyl farnesoate level in the narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Aquaculture Research*, 51(1), 155–163. <https://doi.org/10.1111/are.14360>

- Fei, F., Gao, X., Wang, X., Liu, Y., Bin, H., & Liu, B. (2020a). Effect of spectral composition on growth, oxidative stress responses, and apoptosis-related gene expression of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100267>
- Fei, F., Liu, B., Gao, X., Wang, X., Liu, Y., & Bin, H. (2020b). Effects of supplemental ultraviolet light on growth, oxidative stress responses, and apoptosis-related gene expression of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 520. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735013>
- Feijó, R. G., Braga, A. L., Lanes, C. F. C., Figueiredo, M. A., Romano, L. A., Klosterhoff, M. C., Nery, L. E. M., Maggioni, R., Wasielesky, W., & Marins, L. F. (2016). Silencing of Gonad-Inhibiting Hormone Transcripts in *Litopenaeus vannamei* Females by use of the RNA Interference Technology. *Marine Biotechnology*, 18(1), 117–123. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9676-2>
- Fingerman, M. (1987). The endocrine mechanisms of crustaceans. In *Source: Journal of Crustacean Biology* (Vol. 7, Issue 1).
- Fingerman, M. (1997). Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*, 31(1–3), 47–54. <https://doi.org/10.1080/07924259.1997.9672562>
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Sarojini, R., & Reddy, L. S. (1994). Biogenic amnes in crustaceans: identification, locatization and roles. *Reddy Source: Journal of Crustacean Biology*, 14(3), 413–437.

- Garza-Torres, R., Campos-Ramos, R., & Maeda-Martínez, A. M. (2009). Organogenesis and subsequent development of the genital organs in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 296(1–2), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.012>
- Gómez-Anduro, G. A., Barillas-Mury, C. V., Peregrino-Uriarte, A. B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., & Yepiz-Plascencia, G. (2006). The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(10), 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.01.002>
- González Ferriol, M., Luis, J., Aguiar, B., & Ramos Trujillo, L. (2018). *Endocrinology of reproduction in Crustacean Decapods (Crustacea Decapoda): Scientific*. <http://www.cim.uh.cu/rim/>
- González-Ruiz, R., Granillo-Luna, O. N., Peregrino-Uriarte, A. B., Gómez-Jiménez, S., & Yepiz-Plascencia, G. (2020). Mitochondrial manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular characterization and effect of high temperature, hypoxia and reoxygenation on expression and enzyme activity. *Journal of Thermal Biology*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102519>
- Greco, L. S. L., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M., & Fingerman, M. (2002). Effects of some steroids and other compounds on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during early vitellogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, 292(1), 82–87. <https://doi.org/10.1002/jez.1144>

- Griffin, F. J., Shigekawa, K., & Clark, W. H. (1988). Formation and Structure of the Acrosomal Filament in the Sperm of *Sicyonia ingentis*. *The journal of experimental zoology*.
- Gutiérrez Vera, J. A. (2022). Feromonas sexuales femeninas de contacto en *Litopenaeus vannamei*: Estandarización del protocolo para su detección y sus efectos en el comportamiento de cortejo en machos. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Harayashiki, C. A. Y., Reichelt-Brushett, A., Butcher, P., & Benkendorff, K. (2018). Ingestion of inorganic mercury by juvenile black tiger prawns (*Penaeus monodon*) alters biochemical markers. *Ecotoxicology*, 27(9), 1225–1236. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1975-8>
- Harlioğlu, M. M. (2016). Visibility of precursors of the gonopods in a freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 (Decapoda, Astacidae). *Crustaceana*, 89(3), 369–381. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003528>
- Harlioğlu, M. M., Köprücü, K., Harlioğlu, A. G., Yonar, S. M., Duran, T. Ç., Çakmak, M. N., Aksu, Ö., Özcan, S., Kutluyer, F., & Gündoğdu, H. (2013). Effect of dietary n-3 series fatty acids on sperm production in the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz) (Astacidae). *Aquaculture International*, 21(2), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9549-x>
- Harlioğlu, M. M., Farhadi, A., & Gür, S. (2018). Determination of sperm quality in decapod crustaceans. *Aquaculture*, 490, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.031>

- Hasegawa, Y., Haino-Fukushima, K., & Katakufu, Y. (1987). Isolation and Properties of Androgenic Gland Hormone from the Terrestrial Isopod, *Armadillidium vulgare*. In *General and comparative endocrinology* (Vol. 67).
- Heitzmann, J., & Diter, A. (1993). Spermatophore formation in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone 193 1: dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture*, 116.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2008). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Holmblad, T., & Soderhall, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. In *Aquaculture* (Vol. 172).
- Huang, W. J., Leu, J. H., Tsau, M. T., Chen, J. C., & Chen, L. L. (2011). Differential expression of LvHSP60 in shrimp in response to environmental stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(2), 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.001>
- Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. In *Aquaculture* (Vol. 191). www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- INAPESCA. (2018). Instituto Nacional de Pesca, & Gobierno de México. (2018, March 16). *Acuacultura Camarón blanco del Pacífico*. Gobierno de México.
- Jamieson, B. G. M. (1994). Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: evidence from a review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1314), 373–393. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0116>

- Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., & Choi, M. H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: Therapeutic implications. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 11, Issue 12, pL. 571–578). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.10.006>
- Kannan, D., Thirunavukkarasu, P., Jagadeesan, K., Shettu, N., & Aswini, K. (2015). Procedure for maturation and spawning of imported shrimp *Litopenaeus vannamei* in commercial hatchery, South East Coast of India. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000146>
- Khalaila, I., Manor, R., Weil, S., Granot, Y., Keller, R., & Sagi, A. (2002). The eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 127, 147–156. www.academicpress.com
- Kim, E. J., Kim, H. P., Hah, Y. C., & Roe, J. H. (1996). Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry*, 241(1), 178–185. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0178t.x>
- Kim, I., Lee, K. S., Hwang, J. S., Ahn, M. Y., Li, J., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2005). Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin gene from the mole cricket, *Gryllotalpa orientalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 140(4), 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.12.005>
- King, J. E. (1948). A Study of the Reproductive Organs of the Common a study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus).
 Source: *Biological Bulletin*, 94(3), 47.

<http://www.jstor.org>URL:<http://www.jstor.org/stable/1538251>Accessed:23-12-

201518:41UTC<http://www.jstor.org/page/info/about/policies/terms.jsp>

Kishori, B., & Reddy, L. S. (2000). Antagonistic effects of opioid peptides in the regulation of ovarian growth of the indian rice field crab, *Oziotelphusa senex senex fabricius*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37(2), 107–111.

<https://doi.org/10.1080/07924259.2000.9652409>

Kishori, B., Reddy, P. R., & Reddy, P. S. (2012). Stimulation of ovarian maturation in freshwater crab, *Oziotelphusa senex senex fabricius* by leucine enkephalin. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 7(4), 110-114.

<https://doi.org/10.5829/idosi.gjbb.2012.7.4.65126>

Koeberle, S. C., Gollowitzer, A., Laoukili, J., Kranenburg, O., Werz, O., Koeberle, A., & Kipp, A. L. (2020). Distinct and overlapping functions of glutathione peroxidases 1 and 2 in limiting NF- κ B-driven inflammation through redox-active mechanisms. *Redox Biology*, 28.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101388>

Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3-masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11), 1937–1938. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036>

Kulkarni, G. K., & Fingerman, M. (1992). Effects of 5-Hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Biochem. Physiol*, IOIC(2), 419423.

Kulkarni, G. K., Nagabhushanam, R., Amaldoss, G., Jaiswal, R. G., & Fingerman, M. (1992). In vivo stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*

- (Girard), by 5-hydroxytryptamine. *Invertebrate Reproduction and Development*, 21(3), 231–240. <https://doi.org/10.1080/07924259.1992.9672242>
- Kumaran, M., Anand, L. R., Kumar, J. A., Ravisankar, T., Paul, J., vasagam, K. L. K., Vimala, D. D., & Raja, K. A. (2017). Is Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in India is technically efficient? — A comprehensive study. *Aquaculture*, 468, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.019>
- Laufer, H., & Biggers, W. J. (2001). *Unifying Concepts Learned from Methyl Farnesoate for Invertebrate Reproduction and Post-Embryonic Development* 1 443 methyl farnesoate in invertebrates introduction (Vol. 41, Issue 2). <https://academic.oup.com/icb/article/41/3/442/175728>
- Laufer, H., Demir, N., Pan, X., Stuart, J. D., & Ahl, J. S. B. (2005). Methyl farnesoate controls adult male morphogenesis in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Journal of Insect Physiology*, 51(4 SPEC. ISS.), 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.02.007>
- Laxmyr, L. (1984). Biogenic amines and dopa in the central nervous system of decapod crustaceans. In *Biochem. Physiol* (Vol. 77, Issue 1).
- Le Moullac, G., & Haffner, L. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. In *Aquaculture* (Vol. 191). www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- Lee, C. Y., Yang, L. F., & Zou, H. S. (2001). Serotonergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone secretion in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(3), 376–382. <https://doi.org/10.1086/320430>
- Lee, J. H., Suryaningtyas, I. T., Yoon, T. H., Shim, J. M., Park, H., & Kim, H. W. (2017). Transcriptomic analysis of the hepatopancreas induced by eyestalk ablation in shrimp,

Litopenaeus vannamei. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 24, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.08.004>

Lee, K. S., Ryul Kim, S., Sook Park, N., Kim, I., Dong Kang, P., Hee Sohn, B., Ho Choi, K., Woo Kang, S., Ho Je, Y., Mong Lee, S., Dae Sohn, H., & Jin, B. R. (2005). Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.008>

Leelatanawit, R., Uawisetwathana, U., Khudet, J., Klanchui, A., Phomklad, S., Wongtripop, S., Angthoung, P., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2014). Effects of polychaetes (*Perinereis nuntia*) on sperm performance of the domesticated black tiger shrimp (*Litopenaeus monodon*). *Aquaculture*, 433, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.034>

Leung-Trujillo, J. K., & Lawrence, A. L. (1985). The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1–4), 258–266. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00208.x>

Leung-Trujillo, J. R., & Lawrence, A. L. (1987). Observations on the Decline in Sperm Quality of *Litopenaeus setiferus* Under Laboratory Conditions. *Aquaculture*, 65, 363–370.

Leung-Trujillo, J. R., & Lawrence, A. L. (1991). Spermatophore Generation Times in *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei*, and *L. stylirostris*. *Journal of the world aquaculture society*, 22(4), 244–251.

- Lewis, C., & Ford, A. T. (2012). Infertility in male aquatic invertebrates: A review. In *Aquatic Toxicology* (Vols. 120–121, pL. 79–89). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.002>
- Lezcano, M., Granja, C., & Salazar, M. (2004). The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology*, 48(3), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.003>
- Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K., & Kim I.H. (1993). Removal of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192(1), 273–280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1410>
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. In *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (Vol. 674, Issues 1–2, pL. 137–147). <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015>
- Lin, Y. C., Chen, J. C., Chen, Y. Y., Yeh, S. T., Chen, L. L., Huang, C. L., Hsieh, J. F., & Li, C. C. (2015). Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(1), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.012>
- Lin, Y., Lee, F., Wu, C., & Chen, J. (2010). Molecular cloning and characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase (CyTMNSOD) and mitochondrial manganese superoxide dismutase (MTMNSOD) from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1), 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.012>

- Liu, C. H., Tseng, M. C., & Cheng, W. (2007). Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(1), 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.002>
- Liu, J., Zhang, K., Ren, X., Luo, G., & Shen, J. (2004). Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 185–189. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00763-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00763-3)
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656–666.
- Long, J., Cui, Y., Wang, R., Chen, Y., Zhao, N., Wang, C., Wang, Z., & Li, Y. (2021). Combined effects of high salinity and ammonia-N exposure on the energy metabolism, immune response, oxidative resistance and ammonia metabolism of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100648>
- López Galindo, L. L. (2014). Evaluación transcriptómica de la respuesta a la exposición a TCMáx en *Litopenaeus vannamei* ablacionados y no ablacionados, aclimatados a diferentes temperaturas [Maestría]. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, Baja California.
- López-Galindo, L., Juárez, O. E., Larios-Soriano, E., Vecchio, G. Del, Ventura-López, C., Lago-Lestón, A., & Galindo-Sánchez, C. (2019). Transcriptomic analysis reveals insights on male infertility in octopus maya under chronic thermal stress. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01920>

- López-Galindo, L., Larios-Soriano, E., Ventura-López, C., Díaz, F., Re, D., & Galindo-Sánchez, C. E. (2023). Eyestalk ablation and acclimation temperatures affect juveniles *Litopenaeus vannamei* thermo-tolerance: molecular biomarkers of cell protection oxidative stress, and compensatory mechanisms. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 51(2), 295–308. <https://doi.org/10.3856/vol51-issue2-fulltext-2926>
- Luis, J., & Aguiar, B. (2019). Obtención de la hormona inhibidora de la muda II del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): efecto sobre la maduración ovárica y el desove. <https://www.researchgate.net/publication/335796764>
- Magallón Barajas, F. J., Servín Villegas, R., Portillo Clark, G., & López Moreno, B. (2006). *Litopenaeus vannamei* (Boone) post-larval survival related to age, temperature, pH and ammonium concentration. *Aquaculture Research*, 37(5), 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01455.x>
- Martin, J. L., Millous, O., Normant, Y., Gillet, D., Le Moine, O., Febvre, A., Vilmorin, P., La, J. J., Mu, L., Guesne, J. M., Calvas, J., Couteaux, E., Bonfils, J., Robert, J. Y., Le Bitoux, J. F., Robert, S., Hatt, L. J., Jarillo, M., Landret, J. P., ... Michel, A. (2009). Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *L. stylirostris* and *L. vannamei*. *Proceedings of the World Mariculture Society*, 10(1–4), 445–452. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1979.tb00040.x>
- Martínez, I., Montaldo, H. H., & Castillo-Juárez, H. (2013). Morphology of the reproductive system and spermatophore of *Litopenaeus vannamei*, the Pacific white shrimp L. *Hidrobiológica*, 23(3), 313–319. <https://www.researchgate.net/publication/287321052>

- Maruska, K. P., & Tricas, T. C. (2011). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) modulates auditory processing in the fish brain. *Hormones and Behavior*, 59(4), 451–464. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.01.003>
- Mattson, M. P., & Spaziani, E. (1986). Regulation of Y-Organ Ecdysteroidogenesis by Molt-Inhibiting Hormone in Crabs: Involvement of Cyclic AMP-Mediated Protein Synthesis. *General and comparative endocrinology*, 63, 414–423.
- Mercier, J. A., Orchard, I., & Schmoeckel, A. (1991). Catecholaminergic neurons supplying the hindgut of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2778–2785. www.nrcresearchpress.com
- Metcalfe, N. B., & Monaghan, L. (2013). Does reproduction cause oxidative stress? An open question. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 28, Issue 6, pL. 347–350). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.015>
- Meunpol, O., Meejing, P., & Piyatiratitivorakul, S. (2005). Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research*, 36(12), 1216–1225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01342.x>
- Mohamad, A., Arshad, A., Sung, Y. Y., & Jasmani, S. (2017). Effect of thermal stress on HSP70 gene expression and female reproductive performance of giant freshwater prawn, *Macrobrachium Rosenbergii*. *Aquaculture Research*, 49(1), 135-150. <https://doi.org/10.1111/are.13442>
- Montalvo, G., Campos, S., Arenas, M., Barreto, A., Escalante, K., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2022). Immune gene expression and antioxidant response to vitamin E enriched diets for males *Litopenaeus vannamei* breeder (Boone, 1931). *Comparative Biochemistry and*

Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology, 268.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111187>

Montoya, J. A. (1998). Control de la reproducción de Camarones Marinos. *Uniciencia*, 8792.

Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E., & Boulo, V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219(1–4), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00631-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00631-2)

Mouatassim, S. El, Gué Rin, P., & Mé Né Zo, Y. (1999). Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 5, Issue 8).

Nagabhushanam, R., & Kulkarni, G. K. (1981). Effect of exogenous testosterone on the androgenic gland and testis of a marine penaeid prawn, *parapenaeopsis hardwick* (miers) (crustacea, decapoda, penaeidae). In *Aquaculture* (Vol. 23).

Nagaraju, G. L. C. (2007). Is methyl farnesoate a crustacean hormone? In *Aquaculture* (Vol. 272, Issues 1–4, pL. 39–54). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.014>

Nagaraju-Chandra, L. G., Suraj, N. J., & Sreenivasula Reddy, L. (2003). Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcomsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 76, 1171–1178. www.brill.nl

Nagur Babu, K., Pallavi, P., Reddy, D., & Nanda Kumar, N. V. (2013). Ovarian maturation and spawning in the tiger shrimp, *Penaeus monodon* by serotonin and dopamine injection. *International journal of pharmacy & life sciences. (IJPLS)*, 4(7), 2785–2793.

- 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. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00549-6>
- Nakayama, C., Peixoto, S., Lopes, D., Vita, G., Krummenauer, D., Foes, G., Cavalli, R., & Wasielesky, W. (2008). Métodos de extrusão manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). *Ciência Rural*, 38(7), 2018–2022.
- National Library of Medicine. (2023). *National Center for Biotechnology Information*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ngernsoungnern, P., Ngernsoungnern, A., Kavanaugh, S., Sobhon, P., Sower, S. A., & Sretarugsa, L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.08.012>
- Nisar, U., Zhang, H., Navghan, M., Zhu, Y., & Mu, Y. (2021). Comparative analysis of profitability and resource use efficiency between *Litopenaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* in India. *PLoS ONE*, 16(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250727>
- Nordberg, Jonas. (2001). *Thioredoxin reductase: interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid*.

- Nunes, A. J. P., Dalen, L. L., Leonardi, G., & Burri, L. (2022). Developing sustainable, cost-effective and high-performance shrimp feed formulations containing low fish meal levels. In *Aquaculture Reports* (Vol. 27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101422>
- Ohs, C. L., D'Abramo, L. R., Petrie-Hanson, L., & Kelly, A. M. (2006). Apparent control of sexual differentiation of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, through dietary administration of dopamine hydrochloride. *Journal of Applied Aquaculture*, 18(4), 19–32. https://doi.org/10.1300/J028v18n04_02
- Okimura, T. (2004). Perspectives on Hormonal Manipulation of Shrimp Reproduction. *JARQ*, 38(1), 49–54. <http://www.jircas.affrc.go.jp>
- Okuno, A., Hasegawa, Y., Ohira, T., Katakura, Y., & Nagasawa, H. (1999). Characterization and cDNA Cloning of Androgenic Gland Hormone of the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 264). <http://www.idealibrary.comon>
- Okutsu, T., Kang, B. J., Miwa, M., Yoshizaki, G., Maeno, Y., & Wilder, M. N. (2010). Molecular cloning and characterization of Dmc1, a gene involved in gametogenesis, from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science*, 76(6), 961–969. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0295-6>
- ONU. (2015). *Objetivos de desarrollo sostenible*. Naciones Unidas. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B.,

- & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>
- Paital, B., & Chainy, G. B. N. (2010). Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 151(1), 142–151.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.007>
- Pal, B. Y. (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. In *REVIEWS* (Vol. 74, Issue 1). www.physiology.org/journal/physrev
- Palacios, E., Carrefio, D., Rodríguez-Jaramillo, M. C., & Racotta, I. S. (1999). Effect of Eystalk Ablation on Maturation, Larval Performance, and Biochemistry of White Pacific Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Broodstock. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(3), 1–23.
https://doi.org/10.1300/J028v09n03_01
- Pan, L., Liu, N., Zhang, H., Wang, J., & Miao, J. (2011). Effects of heavy metal ions (Cu²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺) on DNA damage of the gills, hemocytes and hepatopancreas of marine crab, *Charybdis japonica*. *Journal of Ocean University of China*, 10(2), 177–184.
<https://doi.org/10.1007/s11802-011-1809-2>
- Paran, B. C., Fierro, I. J., & Tsukimura, B. (2010). Stimulation of ovarian growth by methyl farnesoate and eyestalk ablation in penaeoidean model shrimp, *Sicyonia ingentis* Burkenroad, 1938. *Aquaculture Research*, 41(12), 1887–1897.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02612.x>

- Parnes, S., Mills, E., Segall, C., Raviv, S., Davis, C., & Sagi, A. (2004). Reproductive readiness of the shrimp *Litopenaeus vannamei* grown in a brackish water system. *Aquaculture*, 236(1–4), 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.040>
- Parnes, S., Raviv, S., Shechter, A., & Sagi, A. (2006). Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *Journal of Experimental Biology*, 209(24), 4974–4983. <https://doi.org/10.1242/jeb.02586>
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L. A., & Rosas, C. (1998a). Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Litopenaeus setiferus* adult males. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(4), 477–484. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00672.x>
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L. A., & Rosas, C. (1998b). Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Litopenaeus setiferus* adult males. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(4), 477–484. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00672.x>
- Peixoto, S., Cavalli, R. O., Krummenauer, D., Wasielesky, W., & D’Incao, F. (2004). Influence of artificial insemination on the reproductive performance of *Farfantepenaeus paulensis* in conventional and unisex maturation systems. *Aquaculture*, 230(1–4), 197–204. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00431-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00431-9)
- Peréz Farfante, I. (1975). Spermatophores and thelyca of the America white shrimp, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. *Fishery Bulletin*, 73(3), 463–486. <http://books.google.com>

- Pérez Rodríguez, J. C., Gómez Gutiérrez, J., López Greco, L. S., & Cortés Jacinto, E. (2019). Spermatophore production and sperm quality of the river prawn *Macrobrachium americanum* Spence Bate, 1868 fed with different diets. *Aquaculture Research*, *50*(11), 3117–3129. <https://doi.org/10.1111/are.14265>
- Perez Velazquez, M., Bray, W. A., Lawrence, A. L., Gatlin Iii, D. M., & Gonzalez Felix, M. L. (2001). Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus Vannamei* broodstock. *Aquaculture*, *198*, 209–218. www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- Perez Velazquez, M., Gonzalez Felix, M. L., Lawrence, A. L., Bray, W. A., & Gatlin, D. M. (2003). Dietary Effects on Sperm Quality of *Litopenaeus vannamei* Broodstock. *Journal of the world aquaculture society* *34*(1).
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. L. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. In *Biotechnology Letters* (Vol. 26). <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>
- Phoungpetchara, I., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Chotwiwatthanakun, C., Vanichviriyakit, R., Sroyraya, M., Hanna, L. J., & Sobhon, L. (2011). Cells producing insulin-like androgenic gland hormone of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, proliferate following bilateral eyestalk-ablation. *Tissue and Cell*, *43*(3), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.02.001>
- Pimentel, O. A. L. F., Roy, L. A., dos Santos, E. P., de Oliveira, V. Q., & Brito, L. O. (2022). *Litopenaeus vannamei* inland farming: Perspectives and opinions. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12782>

- Pinho, G. L. L., Moura Da Rosa, C., Maciel, F. E., Bianchini, A., Yunes, J. S., Proença, L. A. O., & Monserrat, J. M. (2005). Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.11.014>
- Poljaroen, J., Tinikul, Y., Phoungpetchara, I., Kankoun, W., Suwansa-ard, S., Siangcham, T., Meeratana, P., Cummins, S. F., Sretarugsa, P., Hanna, L. J., & Sobhon, L. (2011). The effects of biogenic amines, gonadotropin-releasing hormones and corazonin on spermatogenesis in sexually mature small giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquaculture*, 321(1–2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.022>
- Ponce Palafox, J. T., Ruiz Luna, A., Castillo Vargasmachuca, S., García Ulloa, M., & Arredondo Figueroa, J. L. (2011). Technical, economics and environmental analysis of semi-intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Sonora, Sinaloa and Nayarit states, at the east coast of the Gulf of California, México. *Ocean and Coastal Management*, 54(7), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2011.03.008>
- Pratoomchat, B., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., & Fast, A. W. (1993). Sperm Quality of Pond-Reared and Wild-Caught *Penaeus monodon* in Thailand'. In *Journal of the world aquaculture society* (Vol. 24).
- Quackenbush, L. S. (1986). Crustacean Endocrinology, A Review. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 2271–2282. www.nrcresearchpress.com

- Quintaneiro, C., Ranville, J., & Nogueira, A. J. A. (2015). Effects of the essential metals copper and zinc in two freshwater detritivores species: Biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.006>
- Reddy, L. R., Purna, G., Nagaraju, C., & Reddy, L. S. (2004). Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex*. In *Journal of crustacean biology*, 24(3), 511 – 515. <https://doi.org/10.1651/C-2478>
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S., & Woo, H. A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 17, Issue 2, pL. 183–189). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.02.004>
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., & Lawrence, A. L. (1990). Structure and Function of the Vas Deferens in the Shrimp *Litopenaeus setiferus*: Segments 1. In *Source: Journal of Crustacean Biology* (Vol. 10, Issue 3). <http://www.jstor.org>URL:<http://www.jstor.org/stable/1548335>http://www.jstor.org/stable/1548335?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents
- Roch, L. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. In *Aquaculture* (Vol. 172).
- Rodríguez, E. M., López Greco, L. S., Medesani, D. A., Laufer, H., & Fingerman, M. (2002). Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 125(1), 34–40. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7724>

- Rodriguez, J., & Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. In *Aquaculture* (Vol. 191). www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- Rosas, C., Sanchez, A., Chimal, M. A. E., Saldafia, G., Ramos, L., & Soto, L. A. (1993). The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp *Litopenaeus setiferus*. *Aquat. Living Resources*, 6, 139–144.
- Rotllant, G., Takac, P., Liu, L., Scott, G. L., Laufer, H., & Laufer, H. (2000). Role of ecdysteroids and methyl farnesoate in morphogenesis and terminal moult in polymorphic males of the spider crab *Libinia emarginata*. In *Aquaculture* (Vol. 190). www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., Boyd, C. A., Pine, H. J., & Boyd, C. E. (2010). Shrimp culture in inland low salinity waters. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 2, Issue 4, pL. 191–208). <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01036.x>
- Sagi, A., & Aflalo, E. D. (2005). The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man): A biotechnological perspective. *Aquaculture Research*, 36(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01238.x>
- 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), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.002>
- Salvador, J. A., Jaramillo, B., Romero, Z., Lucien-Brun, H., & Lee, D. O. C. (1988). A comparative analysis of sperm quality, between wild caught males and unilaterally

- eyestalk ablated regenerated males in a commercial *Litopenaeus vannamei* maturation facility. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19, 61A.
- Sandifer, L. A., Lawrence', A. L., Harris', S. G., Chamberlain, G. W., Stokes', A. D., & Bray, W. A. (1984). Amsterdam-Printed in The Netherlands 181. In *Aquaculture*. Elsevier Science Publishers B.V.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Devi, M., & Fingerman, M. (1995). Dopaminergic inhibition of 5-Hydroxytryptamine-stimulated testicular maturation in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *ComL. Biochem. Physiol. LIIC*, 1(2), 287–292.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. (1993). In vivo evaluation of 5-Hydroxytryptamine stimulation of the testes in the fiddler crab, *Uca pugilator*: a presumed action on the neuroendocrine system. *Biochem. Physiol*, 106(2), 321–325.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. (1994). 5-hydroxytryptaminergic control of testes development through the androgenic gland in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 26(2), 127–132. <https://doi.org/10.1080/07924259.1994.9672409>
- 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*. *Reference: Biol. Bull*, 189(3), 340–346.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. (1995b). Mode of Action of the Neurotransmitter 5-Hydroxytryptamine in Stimulating Ovarian Maturation in the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*: An In Vivo and In Vitro Study. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY*, 271, 395–400.

- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. (1996). In vitro inhibition by dopamine of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Experientia*, 52, 707–709.
- Schwarz, K. B. (1996). OXIDATIVE STRESS DURING VIRAL INFECTION: A REVIEW. In *Radical Biology & Medicine* (Vol. 21, Issue 5).
- Seminario Ch., T., & Saldarriaga Y., D. E. (2013). Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre el tiempo de maduración de los ovocitos y fecundidad de *Litopenaeus vannamei*. In C. Vásquez (Ed.), *Memorias del II Congreso Binacional de investigación, ciencia y tecnología de las universidades* (pL. 95–103). Abya-Yala/UPS.
- Sherwood, N. M., & Adams, B. A. (2015). Gonadotropin-Releasing Hormone in Fish: Evolution, Expression and Regulation of the GnRH Gene. In *GnRH Evolution and Regulation in Fish* (L. 139). www.worldscientific.com
- Shin, H. S., Montachana Chimborazo, M. E., Escobar Rivas, J. M., Lorenzo-Felipe, Á., Martínez Soler, M., Zamorano Serrano, M. J., Fernández Martín, J., Ramírez Artilles, J. S., Peñate Sánchez, A., Lorenzo Navarro, J., Intriago Díaz, W., Torres, R., Reyes Abad, E., & Afonso López, J. M. (2023). Genetic parameters for growth and morphological traits of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* from a selective breeding programme in the industrial sector of Ecuador. *Aquaculture Reports*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101649>
- Siangcham, T., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Sroyraya, M., Changklungmoa, N., Phoungpetchara, I., Kankuan, W., Sumpownon, C., Wanichanon, C., Hanna, L. J., & Sobhon, L. (2013). The effects of serotonin, dopamine, gonadotropin-releasing hormones, and corazonin, on

the androgenic gland of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, 193, 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.028>

SIAP, S. de información agroalimentaria y pesquera. (2020). *Panorama agroalimentario 2020*. Secretaria de agricultura y desarrollo rural .
https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020

Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>

Simeó, C. G., Kurtz, K., Chiva, M., Ribes, E., & Rotllant, G. (2010). Spermatogenesis of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Journal of Morphology*, 271(4), 394–406. <https://doi.org/10.1002/jmor.10805>

Singaram, G., Harikrishnan, T., Chen, F. Y., Bo, J., & Giesy, J. L. (2013). Modulation of immune-associated parameters and antioxidant responses in the crab (*Scylla serrata*) exposed to mercury. *Chemosphere*, 90(3), 917–928.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.031>

Song, D., Shi, B., Ding, L., Jin, M., Sun, P., Jiao, L., & Zhou, Q. (2019). Regulation of dietary phospholipids on growth performance, antioxidant activities, phospholipid metabolism and vitellogenesis in prereproductive phase of female swimming crabs, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 511. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734230>

- Sookruksawong, Suchonma, Pongsombon, Tassanakajon Anchalee. (2013). Genomic organization of the cytosolic manganese superoxide dismutase gene from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its response to thermal stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1395 – 1405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.003>
- Spitzer, N., Edwards, D. H., & Baro, D. J. (2008). Conservation of structure, signaling and pharmacology between two serotonin receptor subtypes from decapod crustaceans, *Panulirus interruptus* and *Procambarus clarkii*. *Journal of Experimental Biology*, 211(1), 92–105. <https://doi.org/10.1242/jeb.012450>
- Staib, J. L., Quindry, J. C., French, J. P., Criswell, D. S., & Powers, S. K. (2007). Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), R432-R439. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00895.2005>
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Mechanisms in the toxicity of metal ions. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 18, Issue 2).
- Subramoniam, T. (2017a). Accessory Reproductive Glands. In *Sexual Biology and Reproduction in Crustaceans* (pL. 369–389). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809337-5.00013-7>
- Subramoniam, T. (2017b). Spermatogenesis. In *Sexual Biology and Reproduction in Crustaceans* (pL. 293–324). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809337-5.00011-3>

- Subramoniam, T. (2017c). Spermatophore and Sperm Transfer Mechanisms. In *Sexual Biology and Reproduction in Crustaceans* (pL. 325–368). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809337-5.00012-5>
- Subramoniam, T. (1995). Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeiodean shrimp, *Sicyonia ingentis*. In *J. Biosci* (Vol. 20).
- Talbot, P., Howard, D., Leung-trujillo, J., Lee, T., & Lawrence, A. (1989). Characterization of Male Reproductive Tract Degenerative Syndrome in Captive Penaeid Shrimp (*Litopenaeus setiferus*). In *Aquaculture* (Vol. 78).
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(4), 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>
- Thiel, M., Breithaupt, T., Wyatt, T. D., Hay, M. E., Weissburg, M. J., Koehl, M. A. R., Skog, M., Hallberg, E., Schmidt, M., Mollon, D. M. Jr., Hansson, B. S., Harzsch, S., Knaden, M., Stensmyr, M., Yen, J., Lasley, R., Mead, K., Caldwell, R., Aggio, J., ... Baker, T. C. (2011). *Chemical Communication in Crustaceans* (T. Breithaupt & M. Thiel, Eds.). Springer.
- Tinikul, Y., Joffre Mercier, A., Soonklang, N., & Sobhon, L. (2008). Changes in the levels of serotonin and dopamine in the central nervous system and ovary, and their possible roles in the ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, 158(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.07.009>
- Tinikul, Y., Mercier, A. J., & Sobhon, L. (2009). Distribution of dopamine and octopamine in the central nervous system and ovary during the ovarian maturation cycle of the giant

freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Tissue and Cell*, 41(6), 430–442.

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.05.001>

Tinikul, Y., Poljaroen, J., Kornthong, N., Chotwiwatthanakun, C., Anuracpreeda, P., Poomtong, T., Hanna, L. J., & Sobhon, L. (2011). Distribution and changes of serotonin and dopamine levels in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during ovarian maturation cycle. *Cell and Tissue Research*, 345(1), 103–124. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1176-8>

Tinikul, Y., Poljaroen, J., Tinikul, R., Anuracpreeda, P., Chotwiwatthanakun, C., Senin, N., Poomtong, T., Hanna, L. J., & Sobhon, L. (2014). Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development. *Aquaculture*, 420–421, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.036>

Tinikul, Y., Poljaroen, J., Tinikul, R., Chotwiwatthanakun, C., Anuracpreeda, P., Hanna, L. J., & Sobhon, L. (2015). Alterations in the levels and distribution of octopamine in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its possible role in ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 210, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.018>

Tinikul, Y., Soonthornsumrith, B., Phoungpetchara, I., Meeratana, P., Poljaroen, J., Duangsuwan, P., Soonklang, N., Mercier, A. J., & Sobhon, L. (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), 1007–1022. <https://doi.org/10.1163/156854009X448844>

- Tomy, S., Saikrithi, P., James, N., Balasubramanian, C. P., Panigrahi, A., Otta, S. K., Subramoniam, T., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.003>
- Treerattrakool, S., Boonchoy, C., Urtgam, S., Panyim, S., & Udomkit, A. (2014). Functional characterization of recombinant gonad-inhibiting hormone (GIH) and implication of antibody neutralization on induction of ovarian maturation in marine shrimp. *Aquaculture*, *428–429*, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.009>
- Tsai, L. S. (2006). Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: Structure, function, and evolution. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 148, Issue 1, pL. 48–53). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.09.016>
- Tsukimura, B., & Kamemoto I., F. (1991). In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, *92*, 59–66.
- Tudge, C. C., Scheltinga, D. M., Jamieson, B. G. M., Guinot, D., & Richer de Forges, B. (2014). Comparative ultrastructure of the spermatozoa of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica*, *95*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/azo.12005>
- Uawisetwathana, U., Leelatanawit, R., Klanchui, A., Prommoon, J., Klinbunga, S., & Karoonuthaisiri, N. (2011). Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp. *PLoS ONE*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024427>

- Uberti, M. F., Vieira, F. D. N., Salência, H. R., Vieira, G. D. S., & Vinatea, L. A. (2014). Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3), 374–380. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000013>
- Vaca, A. A., & Alfaro, J. (2000). Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by serotonin injection. In *Aquaculture* (Vol. 182). www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, ilip, Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, rank. (2002). *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>Correspondence:.rankSpeleman.
- Vázquez-Islas, G., Garza-Torres, R., Guerrero-Tortolero, D. A., & Campos-Ramos, R. (2014). Histology of the androgenic gland and expression of the insulin-like androgenic gland hormone precursor gene in the genital organ of pacific white shrimp *Litopeaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 34(3), 293–299. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002232>
- Vázquez-Islas, G., Racotta, I. S., Robles-Romo, A., & Campos-Ramos, R. (2013). Energy balance of spermatophores and sperm viability during the molt cycle in intact and bilaterally eyestalk ablated male Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 414–415, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.020>
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E. D., Weil, S., Raviv, S., Glazer, L., & Sagi, A. (2009). Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender

differences and spermatogenesis. *Endocrinology*, 150(3), 1278–1286.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0906>

Ventura-López, C., Galindo-Torres, L. E., Arcos, F. G., Galindo-Sánchez, C., Racotta, I. S., Escobedo-Fregoso, C., Llera-Herrera, R., & Ibarra, A. M. (2017). Transcriptomic information from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ovary and eyestalk, and expression patterns for genes putatively involved in the reproductive process. *General and Comparative Endocrinology*, 246, 164–182.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.12.005>

Von Rintelen, K., & Cai, Y. (2009). Radiation of endemic species flocks in ancient lakes: systematic revision of the freshwater shrimp caridina H. Milne Edwards, 1837 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) atyidae) from the ancient lakes of Sulawesi, Indonesia, with the description of eight new species. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 57(2), 343–452.

Wang, L., Xu, T., Lei, W. W., Liu, D. M., Li, Y. J., Xuan, R. J., & Ma, J. J. (2011). Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE*, 6(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027853>

Wang, L., Zuo, D., Lv, W., Li, J., Wang, Q., & Zhao, Y. (2013). Effects of dietary soybean lecithin on gonadal development and vitellogenin mRNA expression in the female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) at first maturation. In *Aquaculture Research* (Vol. 44, Issue 8, pp. 1167–1176). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03128.x>

- Wang, W. N., Zhou, J., Wang, P., Tian, T. T., Zheng, Y., Liu, Y., Mai, W. jun, & Wang, A. L. (2009). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 150(4), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.06.010>
- Wikramanayake, A. H., Uhlinger, K. R., Griffin, F. J., & Clark, W. H. (1992). Sperm of the Shrimp *Sicyonia ingentis* Undergo a Bi-Phasic Capacitation Accompanied by Morphological Changes. In *DeveloL. Growth & Differ* (Vol. 34, Issue 3).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.044>
- Xiaolong, G., Xian, L., Mo, Z., Fucun, W., Ce, S., & Ying, L. (2017). Effects of flow velocity on growth, food intake, body composition, and related gene expression of *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, 481, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.023>
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Xu, Z., Regenstein, J. M., Xie, D., Lu, W., Ren, X., Yuan, J., & Mao, L. (2018). The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.016>

- Yamaguchi, S., Celino, F. T., Ito, A., Agusa, T., Tanabe, S., Tuyen, B. C., Miura, C., & Miura, T. (2008). Effects of arsenic on gonadal development in freshwater crab, *Somanniathelphusa pax*, in Vietnam and *Geothelphusa dehaani* in Japan. *Ecotoxicology*, 17(8), 772–780. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0228-7>
- Yano, I., Tsukimura, B., Sweeney, J. N., & Wyban, J. A. (1988). Induced Ovarian Maturation of *Litopenaeus vannamei* by Implantation of Lobster Ganglion. *Journal of the world aquaculture society*, 19(4).
- Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What Is Oxidative Stress? In *JMAJ* (Vol. 45, Issue 7).
- Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., & Zhao, Y. (2018). Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquatic Toxicology*, 200, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.015>
- Zacharia, S., & Kakati, V. S. (2004). Ovarian maturation in the banana shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* (De Man) by Serotonin (5-hydroxytryptamine) injection. *Indian Journal Fisheries*, 51(1), 11–15.
- Zapata, V., López Greco, L. S., Medesani, D., & Rodríguez, E. M. (2003). Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. *Aquaculture*, 224(1–4), 339–352. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00226-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00226-6)
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis* (5th ed.). Prentice Hall.
- Zhang, H., Pan, L., Miao, J., & Xu, C. (2009). Effects of mercuric chloride on antioxidant system and DNA integrity of the crab *Charybdis japonica*. *Journal of Ocean University of China*, 8(4), 416–424. <https://doi.org/10.1007/s11802-009-0416-y>

Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W. N., He, W. Y., Wang, A. L., & Liu, Y. (2010). Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology*, 35(6), 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.06.004>

Zoon Chae, H., ROBISONt, K., Pooleo, L. B., CHURCHt, G., Storz, G., & Goo RHEE, S. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. In *Biochemistry* (Vol. 91). <https://www.pnas.org>

Anexo 1: Instalaciones



Fotografía 1. Sistema utilizado para la ejecución del experimento.

El sistema contó con cuatro unidades cuadrangulares de 1 m³ cada uno, con acceso a un flujo de agua de mar filtrada y aire.

Representación gráfica

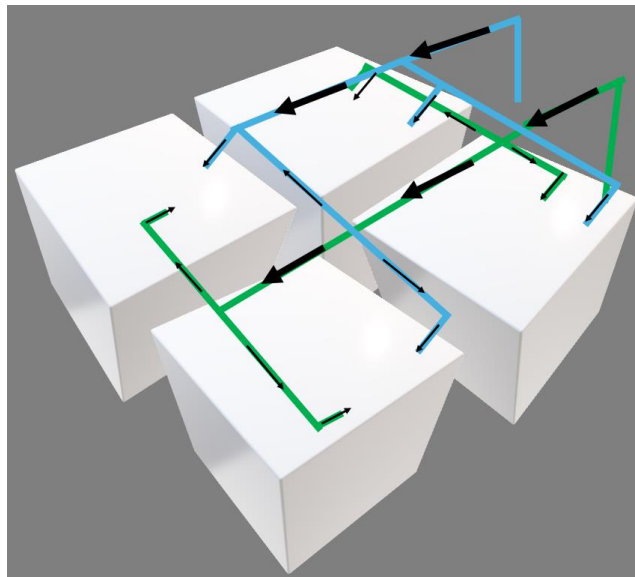


Figura 7. Representación gráfica de la disposición de las tuberías y los flujos de agua (verde) y de aire (azul) en el sistema utilizado en el experimento.

Anexo 2: Aplicación de inyección



Fotografía 2. Sujeción y aplicación de una inyección intramuscular lateral en el segundo segmento abdominal de un macho adulto *Litopenaeus vannamei*.