



Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Marinas

**“Efectos de la aplicación del neurotransmisor serotonina
y antagonista de dopamina (espiperona) en la calidad
espermática del camarón blanco del Pacífico
(*Litopenaeus vannamei*)”**

TESIS

Para obtener el grado de

BIOTECNOLOGO EN ACUACULTURA

Presenta

Jorge Vladimir Alvarez Montoya

Ensenada Baja California, Junio del 2023



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA**



“Efectos de la aplicación del neurotransmisor serotonina y antagonista de dopamina (espiperona) en la calidad espermática del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA:

**Jorge Vladimir Alvarez Montoya
355090**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:


Dr. André Luiz Braga de Souza
DIRECTOR


Mtro. Raúl Claro de los Santos
SINODAL


Dra. Laura Lilliana López Galindo
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

AGRADECIMIENTOS

Sin duda han sido muchas las personas que han dejado una huella importante en mí durante esta etapa universitaria y que han sido parte esencial en la conclusión de este trabajo. Les quiero agradecer a ...

... mis padres, que me enseñaron a esforzarme todos los días por mis metas a pesar de los días grises. Gracias por creer siempre en mí y por permitirme abrir estas alas, ¡estoy volando!

... mis hermanos, de los cuales siempre aprendo y admiro el esfuerzo por alcanzar sus objetivos. Deseo que este trabajo y mi persona sea un ejemplo de dedicación, responsabilidad y esfuerzo

... a mis abuelos que siempre han festejado mis logros por más pequeños que estos sean

... Pabis, Rubí, Troncoso, Octavio, Eunice, Saul, Dani y Fanny por hacer de la vida universitaria, un instante de memorias que viven en mi mente y en mi corazón. Un gusto haber coincidido en esta vida

... todo el club de Tobis, Peña, Carmelo (Miguel), Mati, Iván y Beto, por seguir cuidándome y apoyarme en mis decisiones, gracias por siempre permitirme soñar, ahora les entrego uno de ellos

... mi padre académico y director de tesis Dr. André Braga por guiarme siempre con sabiduría, hablarme con la verdad y creer en mí, este trabajo también es suyo

... mi hermana de tesis Aketzali, por la confianza, disciplina y cariño. Sin ti, esto no sería posible

... mi comité de tesis, Dra. Laura López y Mtro. Raúl Claro por confiar en este trabajo y su apoyo cuando lo he necesitado

... todo el Laboratorio de Producción de Camarón por enseñarme que el trabajo en equipo siempre da buenos resultados

... el Dr. Jorge López por ser mi mentor académico, por siempre recibirme en su cubículo para platicar, por educarme siempre desde la ética y por inspirarme a compartir el conocimiento

.... la Dra. Natalie Millán por aceptarme como su becario de posgrado y por recibirme cada miércoles en su cubículo, sin duda siguió inspirando aún más mi interés por la docencia

... la Dra. Alicia Abadía por su interés en mi formación universitaria y estar siempre que lo necesité

... la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por compartir el conocimiento a partir de grandes investigadores

.... el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por permitirme desarrollar el proyecto dentro de sus instalaciones

... el Laboratorio Maricultura Vigas por la donación de postlarvas que permitieron la realización de este trabajo

... todos ustedes que están leyendo esta tesis

... GRACIAS POR HACER POSIBLE ESTE SUEÑO.

DEDICATORIA

Para Pabis, por ser *sinónimo de amor*,

sinónimo de mar,

sinónimo de vida.

Gracias por permitirme ser libre.

“Crear y crear son dos palabras que se parecen tanto porque en realidad están cerca,
muy cerquita. Tan cerquita que, si crees, se crea”

-Albert Espinosa *El mundo amarillo*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
LISTADO DE TABLAS	viii
LISTADO DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	12
Ciclo de vida	12
Obtención de reproductores y reproducción	13
Endocrinología en la reproducción	14
Espermatogénesis	15
Calidad espermática	17
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Origen de los animales	23
2. Diseño experimental	24
3. Calidad espermática	29
4. Análisis estadísticos	30
RESULTADOS	31
1. Calidad de agua	31
2. Calidad espermática	32
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Descripción de la etapa desarrollo en el proceso de espermatogénesis de machos de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	16
Tabla II. Composición química para la preparación de 100 mL de solución salina (pH 7.4).	24
Tabla III. Ingredientes (g/Kg) utilizados para enriquecer el dieta comercial formulado con 35% de proteína cruda (SI-35, Zeigler Bros., Inc., EE. UU.).....	28
Tabla IV. Valores promedios (\pm DE, desviación estándar), mínimos y máximos de las variables de la calidad agua durante los 45 días de experimento con machos de <i>Litopenaeus vannamei</i>	31

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> . Fuente: López-Martínez <i>et al.</i> (2010).....	13
Figura 2. Sistema reproductivo de machos de <i>Litopenaeus vannamei</i> . LT: Lóbulos testiculares, VDP: Vaso deferente proximal, VDM: Vaso deferente medio, VDD: Vaso deferente distal y AT: Ampolla terminal. Fuente: Braga (2013).....	15
Figura 3. Identificación de los machos acorde con los grupos experimentales. A. grupo experimental sin tratamiento (control). B. grupo experimental con solución salina. C. grupo experimental serotonina-espiperona.	25
Figura 4. Tanques experimentales. a. Sistema experimental compuesto por cuatro tanques de 1,000 L. b. Vista área del sistema experimental. c. Componentes del sistema. 1, entrada de aire al sistema; 2, parte del sistema de aireación equipado con manguera difusora de aire; 3, Sistema airlift; 4, filtro mecánico para sólidos utilizando relleno sintético.	26
Figura 5. Muestras realizadas cada 15 días. a. Inyección de espiperona en el costado derecho de los ejemplares del tratamiento SE. b. Extracción manual de espermátforo.	27
Figura 6. Enriquecimiento de alimento. a. Baño del alimento con la mezcla de ingredientes. b. Secado de alimento.....	28
Figura 7. Cuadrantes de un hematocitómetro. Azul. Área 1 mm ² . Rojo. Área 0.625 mm ² . Verde. Área 0.04 mm ² . Negro. Área 0.0025 mm ²	30
Figura 8. Variación de la temperatura en tanques experimentales respecto al tiempo.....	32
Figura 9. Calidad espermática de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> durante sucesivas renegaciones del espermátforo tras su extracción cada 15 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras desiguales sobre ellas indican diferencias significativas (P<0.05).....	33

RESUMEN

En los crustáceos, la espermatogénesis es un proceso sistemático continuo, iniciando a partir de la fase juvenil de *Litopenaeus vannamei* influenciada por la glándula androgénica y complejo órgano X - glándula del seno, este último ubicado en el pedúnculo ocular. En hembras, la ablación del pedúnculo ha sido utilizada como principal técnica para la inducción de la maduración gonadal; sin embargo, se sabe que la extirpación de dicho órgano resulta un desbalance del sistema endocrino propiciando un desgaste biológico que culmina en la muerte de los ejemplares. Una alternativa a la ablación es la aplicación de serotonina y espiperona, como lo han demostrado estudios anteriormente. Dicha técnica ha sido considerada promisoría también para machos, por estimular el aumento de espermatozoides. Es por ello que es necesario evaluar el potencial de la técnica durante el proceso de regeneraciones sucesivas de los espermatóforos, esperando pérdida progresiva de la calidad espermática. Así que el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de SE en la calidad espermática del camarón *L. vannamei* durante sucesivas regeneraciones de los espermatóforos extraídos mediante extracción manual. Para ello, se realizó un experimento en las instalaciones del Laboratorio de Producción de Camarón del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC) con 45 días de duración y tres grupos experimentales: (1) inyección intramuscular 25 µg de serotonina/g peso corporal y 5 µg espiperona/g peso corporal (SE); (2) inyección intramuscular de solución salina (SS); (3) sin inyección (control). Sesenta machos (32 ± 1 g) contando con todos los apéndices y espermatóforos y libres de melanosis fueron seleccionados y distribuidos en cuatro tanques experimentales (15 camarones m⁻²) con recambio de agua de aproximadamente 400% al día. Los machos fueron mantenidos a un fotoperiodo natural de 14:10 horas luz:oscuridad, salinidad de 35 ppm, temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y salinidad a 35 ± 1 g /L. Los organismos fueron alimentados a 4% de la biomasa cuatro veces al día con una dieta comercial de 35% de proteína cruda (SI-35, Zeigler Bros., Inc., EE. UU.) enriquecida con calamar, mejillón, paprika, lecitina de soya y vitamina C. Las variables de calidad espermática: tasa de espermatóforos melanizados (%), peso del espermatóforo (g), número de espermatozoides totales ($\times 10^6$) y tasa de espermatozoides muertos (%) fueron evaluadas cada 15 días tras la extracción manual del espermatóforo. Posteriormente, los espermatóforos fueron macerados en frascos de vidrio con 1.8 mL de solución salina, añadiendo 200 µL de tinción azul de tripano. Fue tomada 1 mL de la muestra y colocada en un hematocitómetro, llevando a cabo la observación bajo microscopio. Las diferencias significativas entre tratamientos fueron dadas a partir del análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizando una prueba *post-hoc* de Fisher cuando se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Para todos los grupos experimentales, la presencia de melanosis se observó a partir de la primera regeneración, encontrando diferencias significativas en la segunda regeneración para el tratamiento SS, seguido de un aumento gradual en las siguientes regeneraciones con diferencias significativas en el tratamiento SS y SE. El peso del espermatóforo presentó un aumento significativo en la primera regeneración en comparación con el muestro inicial; dicha diferencia se mantuvo en la segunda apenas para SS y control, siendo observada una tendencia de reducción del peso en la tercera regeneración para todos los grupos. No existieron diferencias significativas en el número de espermatozoides totales, sin embargo, SE fue el único que presentó una tendencia al aumento durante las sucesivas regeneraciones. Como se hipotetizó, la tasa de espermatozoides muertos aumentó a lo largo de las regeneraciones, pero en SE hubo una tendencia de menores promedios durante la segunda y tercera regeneraciones en comparación con los otros grupos.

Se concluye que la manipulación de neurotransmisores mediante la aplicación de serotonina y espiperona no comprometió la calidad espermática; al contrario, mitigó la pérdida de calidad espermática esperada tras sucesivas regeneraciones del espermatóforo, como demostrado por la tendencia de aumento de número de espermatozoides total y reducción del número de muertos al final del experimento. Los resultados de este trabajo corroboran el potencial de la aplicación de SE como una técnica promissora para optimizar la reproducción inducida también de machos de *L. vannamei*, presentando las bases para el desarrollo de técnicas más eficientes para dicha aplicación, e.g. por medio de la alimentación, que logren influir en ambos sexos brindando una técnica libre de crueldad animal ante las políticas actuales de bienestar animal dentro del sector acuícola.

Palabras claves: *Litopenaeus vannamei*, neurotransmisores, serotonina y espiperona, regeneración espermatóforo, calidad espermática.

INTRODUCCIÓN

La actividad acuícola ha crecido exponencialmente en los últimos años, lo que ha permitido la explotación de numerosas especies de manera sostenible (CONAPESCA, 2018). En 2020, la producción mundial acuícola de animales acuáticos alcanzó un valor de 87.5 millones de toneladas lo que representó un aumento del 31.4% de la producción acuícola mundial según los valores registrados en 2010 figurando una ventaja competitiva ante otros sectores de producción animal a escala global (FAO, 2022). De este modo, México se ha posicionado como el 7º productor de camarón a nivel mundial (SADER, 2018). Según los valores registrados por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2018), México logró una producción total de 223 mil 965 toneladas en 2016, donde los principales estados productores de camarón blanco son Sinaloa y Sonora ocupando el 40.3 y 39.7 % de la producción nacional respectivamente.

La camaronicultura representa una actividad económica muy importante para México, llevándose a cabo principalmente en el Pacífico norte del país, así como en el Golfo de México (Bortolini y Torres, 2004). El cultivo de camarón ha requerido de mejoras tecnológicas desde su introducción en el país en los 70's, con el fin de ser una actividad rentable para los productores. De esta manera se han logrado establecer mecanismos de acción para el diseño y creación de dietas especie-específicas, medidas de control y prevención de enfermedades, mejora genética y eficiencia en los sistemas de producción que logren controlar los aspectos biológicos en el ciclo de vida del camarón (Martínez-Córdova, 2002). Actualmente el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es la especie más cultivada, representando el 51.7% de la producción de crustáceos en 2020 a escala mundial (FAO, 2022), distribuyéndose desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú.

Ciclo de vida

Litopenaeus vannamei es considerada una especie eurihalina dada su alta capacidad de tolerancia a distintas salinidades. Lo anterior permite dividir su ciclo de vida en 2 tipos de ambientes: marino y costero. En los camarones peneidos al alcanzar su madurez sexual, desovan y pasan por sus estadios larvales (nauplio, zoea y mysis) en aguas oceánicas costeras.

Posterior a la fase larval, las postlarvas se desarrollan en ambientes estuarinos hasta un tamaño de 4 y 10 cm de longitud, regresando finalmente al océano como juveniles donde completan su ciclo de vida (Fig. 1) (López-Martínez *et al.*, 2010; INAPESCA, 2018).

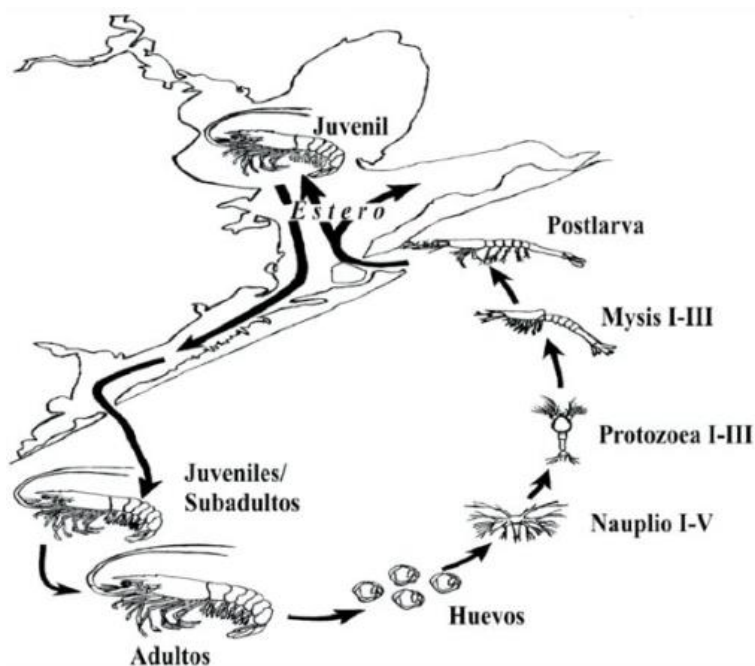


Figura 1. Ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Fuente: López-Martínez *et al.* (2010).

Obtención de reproductores y reproducción

La obtención de reproductores de camarón blanco anteriormente era dada por la obtención de ejemplares del medio silvestre, sin embargo, ahora la obtención es por medio de la selección de ejemplares certificados en bancos de reproductores. Estos son seleccionados de forma selectiva buscando ejemplares con todas sus partes estructurales integras, con ausencia de manchas en el exoesqueleto y deformaciones. La maduración comienza a partir de los 20 g en machos y a partir de los 28 g en hembras en un tiempo aproximado de 7 meses según el método de cultivo. Posterior a ello, los ejemplares son sexados y mantenidos en tanques de maduración con fondo oscuro y agua de mar filtrada, con el suministro de alimento enriquecido y/o fresco (Sánchez, 2006; Leal, 2019).

La reproducción de *L. vannamei* está dada a partir de una cópula natural o de una inseminación artificial. La primera comprende un proceso de cópula dentro del tanque, donde el macho maduro transfiere sus espermatozoides por medio del petasma al tégico abierto de la hembra madura que se encuentra entre el cuarto y quinto par de pereopodos (Yambay y Alvarez, 2017). Del mismo modo, la inseminación artificial comprende la extracción de los espermatozoides de los machos y colocándose sobre el tégico abierto de las hembras (Moreno *et al.*, 2000).

Endocrinología en la reproducción

En los camarones peneidos, la maduración gonadal requiere de factores nutricionales, ambientales y endocrinos (Oliveira y Correa, 1999). Este es un proceso cíclico regulado por el sistema endocrino que secreta neurohormonas a partir de las células neurosecretoras en las glándulas endocrinas (Vázquez, 2014). Como parte del sistema están el complejo neurosecretor órgano X - glándula del seno -OX-GS-, glándula androgénica -GA-, órgano Y, órgano mandibular, ganglio torácico y los ovarios (en el caso de las hembras) que llevan a cabo la modulación de los factores metabólicos y fisiológicos, resultando en la síntesis de hormonas que estimulan o inhiben la maduración gonadal (Garza, 2011; Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza, 1995; Vázquez, 2014). Aunado a ello, en machos la regulación de la espermatogénesis está influenciada específicamente por el complejo OX-GS-GA, sin embargo, el complejo OX-GS sintetiza la hormona inhibidora de la muda (MIH, por sus siglas en inglés) y la hormona inhibidora de la gónada (GIH, por sus siglas en inglés) promoviendo un efecto negativo en ambos procesos. A pesar de esto, aún no se conocen en su totalidad las hormonas involucradas en los procesos reproductivos en decápodos (Vázquez, 2014).

Espermatogénesis

La formación de espermatozoides en *L. vannamei* es consecuencia de la espermatogénesis como producto de un proceso sistemático y continuo, iniciando a partir de la fase juvenil de los machos. La diferenciación de las células espermáticas se lleva a cabo a lo largo de un sistema reproductor compuesto por: seis lóbulos testiculares (LT); vaso deferente divididos en tres secciones, proximal (VDP), medio (VDM) y distal (VDD); y una ampolla terminal (AT) (Fig. 2), donde se concentran los espermatozoides maduros compactados dentro de una estructura de material acelular llamado espermatóforo, cuyas principales funciones son proteger y prevenir la pérdida de espermatozoides durante la cópula y la competencia mediante la inseminación por parte de otro macho (Braga, 2009; Braga, 2013; Peralta *et al.*, 2013).

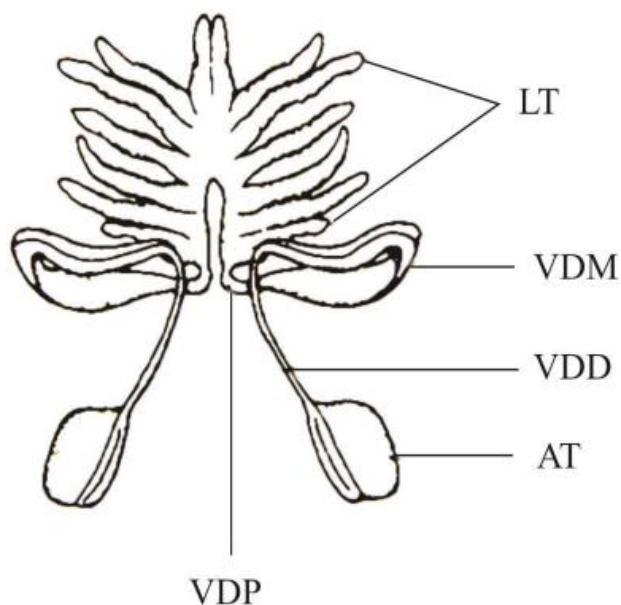


Figura 2. Sistema reproductivo de machos de *Litopenaeus vannamei*. LT: Lóbulos testiculares, VDP: Vaso deferente proximal, VDM: Vaso deferente medio, VDD: Vaso deferente distal y AT: Ampolla terminal. Fuente: Braga (2013).

Del mismo modo, Alfaro-Montoya *et al.* (2017) demostraron que durante la maduración sexual y espermatogénesis de *L. vannamei* los machos presentan un desarrollo asincrónico de grupo a lo largo de los lóbulos testiculares con diferentes estadios de desarrollo en cada uno de ellos. La descripción de este proceso se presenta en la tabla I.

Tabla I. Descripción de la etapa desarrollo en el proceso de espermatogénesis de machos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

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

Calidad espermática

La calidad espermática comprende el estudio de una serie de parámetros biológicos que indican la calidad reproductiva en la que se encuentran los organismos. Estos parámetros han sido revisados Alfaro-Montoya *et al.* (1993), Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003, Alfaro-Montoya y Vega, 2011 y Braga *et al.*, 2018, destacando el estudio de la tasa de melanización, peso de espermatóforo, tasa de ausencia de espermatóforos, tiempo de regeneración del espermatóforo, número de espermatozoides totales, tasa de mortalidad espermática, índice gonadosomático, peso del testículo, entre otros. Es en este sentido que estos parámetros son importantes ya que la calidad del lote producido no corresponde únicamente a la calidad que la hembra presente, sino también de la calidad espermática de los machos a utilizar, logrando los objetivos deseados para la obtención de postlarvas.

ANTECEDENTES

Una de las técnicas de reproducción inducida de camarones a nivel industrial es la ablación unilateral y/o bilateral del pedúnculo ocular (APO). Esta técnica consiste en la extirpación del órgano por diferentes métodos: incisión o cauterización (Sainz, 1999). Mediante la ablación unilateral, el complejo neuroendocrino de uno o de los dos pedúnculos oculares es descartado, disminuyendo directamente los niveles de la hormona inhibidora de la gónada (GIH, por su sigla en inglés) (Sainz, 1999). Como resultado, se puede acelerar el proceso de maduración gonadal de manera indirecta ya que la reducción de GIH en la hemolinfa tiene una influencia directa en los procesos metabólicos desencadenando la secreción de la hormona estimulante de la gónada (GHS, por sus siglas en inglés) por el ganglio torácico iniciando con el proceso reproductivo (Pérez, 2005). Del mismo modo, la ablación tiene como efecto adicional un desbalance endocrino que afecta dos de los procesos biológicos más costosos energéticamente para el camarón: la muda y la maduración gonadal, lo que resulta en la muerte de los ejemplares ablacionados por agotamiento reproductivo, por lo que un reto actual es la búsqueda y desarrollo de nuevas técnicas que sean igualmente eficientes y que al mismo tiempo logren salvaguardar el bienestar de los animales.

En este sentido, una de las alternativas más prometedoras es la modulación del sistema neuroendocrino mediante la manipulación de neurotransmisores. Alfaro-Montoya *et al.* (2004) encontraron una respuesta positiva en la maduración ovárica de hembras de *L. stylirostris* y *L. vannamei* por medio de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona. Del mismo modo, Alfaro-Montoya y Vega (2011) encontraron que el ambiente en el que se desarrollan los organismos juega un rol importante en la modulación de los neurotransmisores demostrando que tras la aplicación única de serotonina hay una influencia en el número de espermatozoides totales en los espermátóforos extraídos de *L. vannamei*.

Por otro lado, Farhadi *et al.* (2020) encontró esta respuesta en el cangrejo de río *Pontastacus leptodactylus* donde observaron un aumento en el número de espermatozoides a partir de la inyección de serotonina y espiperona, esto siendo atribuido a la influencia que tiene este neurotransmisor en el proceso de espermatogénesis. A pesar de lo anterior, actualmente se sigue sin conocer los efectos de la modulación de la serotonina y espiperona

en la calidad espermática de *Litopenaeus vannamei* después de sucesivas regeneraciones del espermatóforo por el método de extracción manual.

JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* representa la especie de crustáceo más explotada y con mayor derrame económico en México. Es por ello que ante el incremento de la actividad camaronícola, en la mayoría de los laboratorios de producción larval se ha empleado la ablación del pedúnculo ocular (APO) como técnica para la aceleración de la maduración gonadal. Sin embargo, hoy en día, no es aceptable la implementación de técnicas crueles como es la ablación. Es por lo anterior que es prioritario buscar alternativas que permitan satisfacer esta demanda y que, de manera simultánea, logre salvaguardar la integridad de los organismos cultivados.

Así mismo, la calidad espermática en el camarón blanco *L. vannamei* después de la aplicación de serotonina y espiperona, ha sido estudiada por diversos autores, sin embargo, se desconocen los efectos después de sucesivas regeneraciones del espermátforo. Esta es una práctica común en laboratorios que mantienen lotes de machos para inseminación artificial, a los cuales les son extraídos los espermátforos para llevar a cabo la transferencia de esta masa espermática a hembras maduras, por medio de una inseminación artificial. Además, se sabe que después de sucesivas regeneraciones del espermátforo existe una pérdida de la calidad espermática, especialmente representada por un aumento de melanosis, pérdida del peso del espermátforo, reducción del número de espermatozoides y aumento espermatozoides muertos, debido a un agotamiento reproductivo. Así que probar la aplicación de serotonina y espiperona a lo largo de sucesivas regeneraciones del espermátforo permitirá evaluar el potencial de la técnica para influir en el proceso reproductivo de machos para mitigar o evitar el agotamiento reproductivo.

De acuerdo con estudios previos, la aplicación de serotonina y espiperona se ha posicionado como una alternativa promisor a la ablación en *L. vannamei*, por lo que es importante generar conocimiento básico de los efectos de la manipulación de neurotransmisores en machos con el fin de descartar efectos adversos que pudiesen comprometer la calidad espermática. A partir de estas bases sería posible desarrollar tecnologías más eficientes para dicha manipulación, como podría ser la implementación de este compuesto por medio de la alimentación en tanques de producción que logren influir en la respuesta de machos y hembras (que son colocados en los mismos tanques de producción)

brindando una técnica libre de crueldad animal ante las políticas actuales de bienestar animal dentro del sector acuícola.

HIPÓTESIS

La aplicación de serotonina y el antagonista de dopamina (espiperona) permite a los machos del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) mejorar la calidad espermática después de sucesivas regeneraciones de los espermátóforos por medio de su extracción manual.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar los efectos de la inyección intramuscular de serotonina y espiperona (SE) en la calidad espermática de *L. vannamei* durante sucesivas regeneraciones de los espermátóforos mediante extracción manual.

Objetivos específicos

1. Determinar los efectos de la SE en la ocurrencia de melanosis en los espermátóforos regenerados.
2. Evaluar los efectos de la SE en el peso de los espermátóforos regenerados.
3. Analizar los efectos de la SE en el número de espermatozoides totales y muertos en los espermátóforos regenerados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen de los animales

Por medio del laboratorio comercial “Maricultura Vigas” ubicado en Campeche, México, fueron obtenidas postlarvas ($n = 5,000$) de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* de una línea genética de rápido crecimiento producidas a partir de inducción gonadal natural (sin ablación). En el Laboratorio de Producción de Camarón del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC, Ensenada), los ejemplares fueron aclimatados y cultivados en un sistema de biofloc en un tanque circular de 8,000 L durante 6 meses hasta alcanzar la fase adulta.

El tanque fue equipado con una línea de aireación circular conectado a un soplador de 2 HP con el fin de mantener los sólidos en suspensión, asimismo la concentración de oxígeno disuelto arriba de los 4.5 mg/L. Además, el tanque se mantuvo cubierto con hule y se equipó con un calentador de 800 W acoplado a un regulador para mantener la temperatura del agua a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. La calidad del agua fue monitoreada por medio de un oxímetro YSI 550A-12 (YSI®, EE. UU.) que midió la temperatura y el oxígeno disuelto del sistema dos veces al día. Dos veces por semana, se midió el pH con un potenciómetro portátil KT1 (Ketotek®, China), alcalinidad siguiendo una modificación de la metodología descrita por APHA (2012), donde se utilizó ácido sulfúrico 0.05 N y una solución indicadora compuesta de 100 mg de verde de bromocresol y 20 mg de rojo de metilo en 100 mL de alcohol etílico para la titulación, el amoníaco total ($\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$) y nitrito (NO_2^-) mediante un kit colorimétrico comercial (API®, EE. UU.) y salinidad a partir de un refractómetro portátil RF18 (Extech®, EE. UU.). Semanalmente, se adicionó agua dulce para compensar la pérdida por evaporación y, así, mantener la salinidad a 35 ± 1 g/L.

Durante la etapa de producción de reproductores, los camarones fueron alimentados inicialmente con una dieta comercial para postlarva formulada con 40% de proteína cruda (PC), siendo posteriormente cambiada por otra para juveniles con 35% PC (PL Raceways 40-9 and SI-35, Zeigler Bros., Inc., EE. UU., respectivamente), cuatro veces al día (8:00, 11:00, 14:00 y 16:30). Las raciones iniciales fueron basadas en la tabla de alimentación propuesta por Jory *et al.* (2001). Cada 15 días se realizaron biometrías parciales en los cuales se llevó registro del peso. Los animales fueron pesados en seco sobre una balanza digital

Uline y regresados al tanque en el menor tiempo posible para minimizar el estrés por manipulación. Este procedimiento fue realizado por triplicado para la obtención de una media muestral. Las raciones diarias fueron ajustadas también a cada 15 días con base en las observaciones del estado de salud aparente y los pesos obtenidos mediante las biometrías.

2. Diseño experimental

Se realizó un experimento con 45 días de duración compuesto por tres grupos experimentales: (1) inyección intramuscular 25 µg de serotonina/g peso corporal y 5 µg espiperona/g de peso total (SE) (Alfaro *et al.*, 2004); (2) inyección intramuscular de solución salina (SS) (Tabla II); (3) sin inyección (control). Para el tratamiento SE, la solución de serotonina fue previamente preparada por medio del pesado de 0.0093 g de serotonina y disuelto en 10 mL de solución salina, mientras que para la solución de espiperona se pesó 0.0037 g de espiperona disuelto en 1 mL de etanol al 95%. Una vez preparadas, las soluciones fueron almacenadas a 4°C hasta que se inició el experimento.

Tabla II. Composición química para la preparación de 100 mL de solución salina (pH 7.4).

Compuesto	Fórmula	Cantidad (g)
Cloruro de sodio	NaCl	2.163
Cloruro de potasio	KCl	0.112
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.053
Hidróxido de sodio	NaOH	0.019
Sulfato de manganeso heptahidratado	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.493

Una vez que los ejemplares alcanzaron un peso promedio de 32 ± 1 g fueron sexados, siendo seleccionados 60 machos que contaron con la presencia de todos los apéndices y espermatóforos, con ausencia de necrosis en estos y exoesqueleto. Del mismo modo, se tomó una muestra aleatoria de 11 machos a los cuales se les extrajo ambos espermatóforos para registrar el peso y estudios de calidad espermática inicial.

Posterior a ello, los machos seleccionados fueron identificados individualmente mediante corte en sus urópodos con una tijera estéril acorde con el grupo experimental que fueron

asignados de manera aleatoria: SE, corte de las dos ramas (endopodito y exopodito) derechas de los urópodos; SS, corte del exopodito izquierdo de los urópodos; Control, sin corte (Fig. 3).

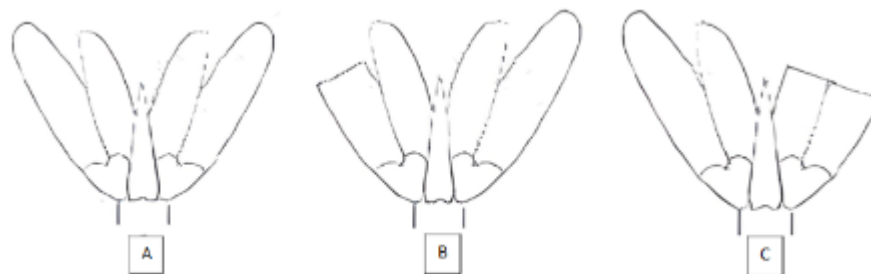


Figura 3. Identificación de los machos acorde con los grupos experimentales. A. grupo experimental sin tratamiento (control). B. grupo experimental con solución salina. C. grupo experimental serotonina-espiperona.

Los 60 machos fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro tanques cuadrados de 1,000 L llenados a 800 L de agua de mar, para un total de 15 animales por tanque, cinco de cada uno de los grupos experimentales. El sistema experimental estuvo previsto de calentones, manguera difusora de aire y filtros con relleno sintético (Fig. 4), realizando un recambio diario del 40% del volumen total de cada tanque, así como la limpieza de los filtros una vez a la semana, con el fin de mantener la calidad del agua recomendada para cultivo de camarón (Van Wyk *et al.*, 1999).



Figura 4. Tanques experimentales. a. Sistema experimental compuesto por cuatro tanques de 1,000 L. b. Vista área del sistema experimental. c. Componentes del sistema. 1, entrada de aire al sistema; 2, parte del sistema de aireación equipado con manguera difusora de aire; 3, Sistema airlift; 4, filtro mecánico para sólidos utilizando relleno sintético.

Los machos fueron mantenidos a un fotoperiodo natural de aproximadamente 14:10 horas luz:oscuridad, con una salinidad de 35 ppm y temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Para eso, la calidad de agua se monitoreó acorde con la metodología descrita anteriormente en el apartado 1.

Cada 15 días fueron realizados muestreos, llevando un registro del peso y el conteo de organismos vivos. Durante estos muestreos, a los machos del tratamiento SE, se les inyectó la solución de serotonina en el costado izquierdo del segundo segmento abdominal, y la solución de espiperona en el lado opuesto (Fig. 3a). Los volúmenes aplicados de cada solución dependieron del peso individual de cada macho acorde a la concentración deseada para el tratamiento ($25 \mu\text{g}$ de serotonina/g peso corporal y $5 \mu\text{g}$ espiperona/g de peso total; Alfaro *et al.*, 2004). En los machos del tratamiento SS, se le inyectó 0.075 mL de solución salina del mismo modo que los ejemplares del tratamiento SE, suministrando un total de 0.15 mL. En adición a lo anterior, fueron extraídos ambos espermatozoides de los machos de todos

los grupos experimentales mediante el método manual que consistió en aplicar una compresión ventrolateral en la región de la coxa del quinto par de pereiópodos con el fin de promover su regeneración hasta el siguiente muestreo (Fig. 5B). Los espermátóforos extraídos fueron utilizados para los análisis de calidad espermática, cuya metodología es descrita en el apartado tres.

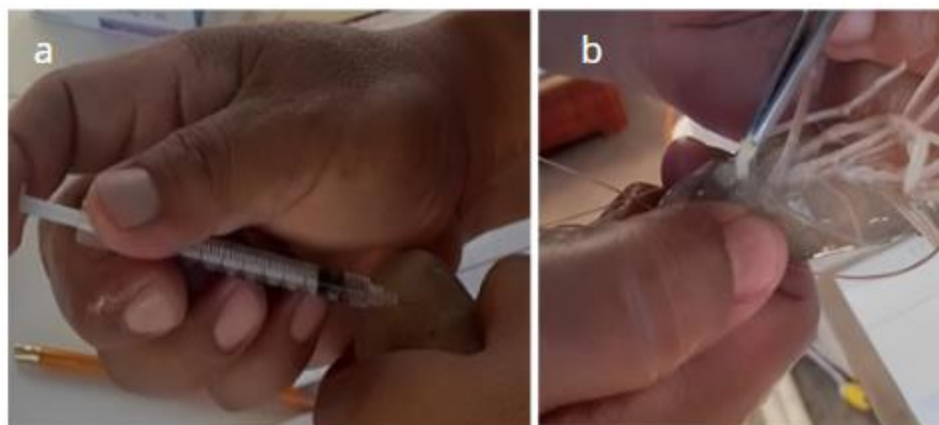


Figura 5. Muestras realizadas cada 15 días. a. Inyección de espiperona en el costado derecho de los ejemplares del tratamiento SE. b. Extracción manual de espermátóforo.

Durante el periodo experimental, se utilizó una dieta comercial formulado con 35% de PC (SI-35, Zeigler Bros., Inc., EE. UU.) enriquecida con calamar, mejillón, paprica, lecitina de soya y vitamina C acorde con la Tabla III, para ello, los ingredientes fueron incorporados dentro de una licuadora hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, la dieta comercial fue bañada con la mezcla hasta impregnar la totalidad del alimento (Fig. 6). Finalmente, la dieta comercial enriquecida fue almacenada en un congelador hasta el inicio del experimento.

Con la dieta enriquecida, los machos fueron alimentados al 5% de la biomasa cuatro veces al día bajo el siguiente horario: 8:00, 11:00, 14:00 y 17:00.

Tabla III. Ingredientes (g/Kg) utilizados para enriquecer el dieta comercial formulado con 35% de proteína cruda (SI-35, Zeigler Bros., Inc., EE. UU.).

Ingredientes	g/Kg de la dieta
Calamar	100
Mejillón	50
Paprica	10
Lecitina de soya	10
Vitamina C	1



Figura 6. Enriquecimiento de alimento. a. Baño del alimento con la mezcla de ingredientes. b. Secado de alimento.

3. Calidad espermática

La calidad espermática de los machos fue evaluada cada 15 días por los parámetros: tasa de espermátóforos melanizados (%), peso del espermátóforo (g), número de espermatozoides totales ($\times 10^6$) y tasa de espermatozoides muertos (%). Para eso, la presencia de melanosis en los espermátóforos extraídos fue evaluada mediante observación visual y posteriormente se determinó la tasa de espermátóforos melanizados para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de espermátóforos melanizados (\%)} = \left(\frac{\text{número de espermátóforos melanizados}}{\text{número total de espermátóforos}} \right) \times 100.$$

Los espermátóforos melanizados fueron descartados, y solo fueron tomados en cuenta para los demás parámetros aquellos libres de melanosis. De estos, uno de los espermátóforos extraídos de un mismo macho fue acondicionado de manera aleatoria e individual en navcillas de plástico, siendo pesado en una balanza analítica modelo METTLER PM 400. Mientras que el otro espermátóforo con apoyo de pinzas estériles se maceró en 1.8 mL de solución salina contenidos en un frasco de vidrio. Una vez macerado, se adicionaron 200 μL de tinción azul de tripano al frasco y la solución fue homogenizada con el apoyo de una pipeta de plástico. Las muestras preparadas se dejaron reposar por cinco minutos de tal manera que se tiñeran los espermatozoides muertos de color azul. Posteriormente, fue tomado 1 mL de la muestra con una pipeta automática y se colocó en un hematocitómetro, dejando reposar cinco minutos después del montaje. El conteo de espermatozoides totales y muertos fue efectuado bajo el microscopio Zeiss Modelo Axioskop-2 MOT partiendo del cuadrante central (1 mm^2) realizando el conteo de cinco cuadrantes (0.0025 mm^2) de uno de los cuadros de 0.04 mm^2 (Fig. 7).

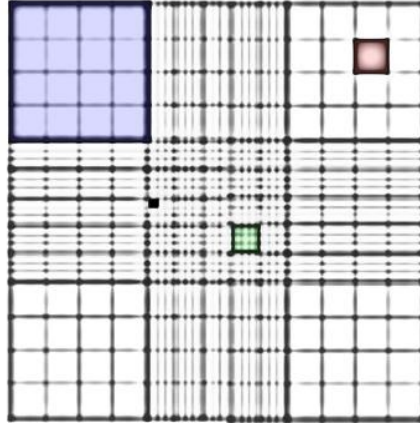


Figura 7. Cuadrantes de un hematocitómetro. Azul. Área 1 mm^2 . Rojo. Área 0.625 mm^2 . Verde. Área 0.04 mm^2 . Negro. Área 0.0025 mm^2 .

4. Análisis estadísticos

Las premisas de normalidad y homocedasticidad de los datos fueron verificadas por las pruebas Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Del mismo modo, fue realizado un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el fin de verificar la existencia de diferencias estadísticas entre los grupos experimentales. Por otro lado, se realizó la prueba *post-hoc* de Fisher cuando se presentaron diferencias significativas. En los casos donde no se cumplió con la normalidad se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se empleó la prueba *post-hoc* de Dunn's. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

1. Calidad de agua

En la Tabla IV se describen las variables de la calidad de agua de los tanques experimentales. La temperatura presentó variación menor a cinco grados a lo largo del periodo experimental con dos eventos independientes de ascenso y descenso de temperatura: 29.1 y 24.7 ° C respectivamente (Fig. 8). El oxígeno disuelto y salinidad se mantuvieron estables, siendo la variación de apenas una unidad para los dos parámetros a lo largo de todo el periodo experimental. El nitrógeno amoniacal total no sobrepasó los 0.50 mg L⁻¹ y la alcalinidad fue mantenida arriba de los 100 mg L⁻¹.

Tabla IV. Valores promedios (\pm DE, desviación estándar), mínimos y máximos de las variables de la calidad agua durante los 45 días de experimento con machos de *Litopenaeus vannamei*.

	Promedio (\pm DE)	Mínimo	Máximo
Temperatura (° C)	27.5 \pm 0.7	24.7	29.1
Oxígeno disuelto (mg l⁻¹)	6.31 \pm 0.25	5.75	6.77
Salinidad (ppt)	34.42 \pm 0.4	34	35
Nitrógeno amoniacal total (mg l⁻¹)	0.15 \pm 0.17	0	0.50
Alcalinidad (mg l⁻¹)	146.25 \pm 8.5	135	160

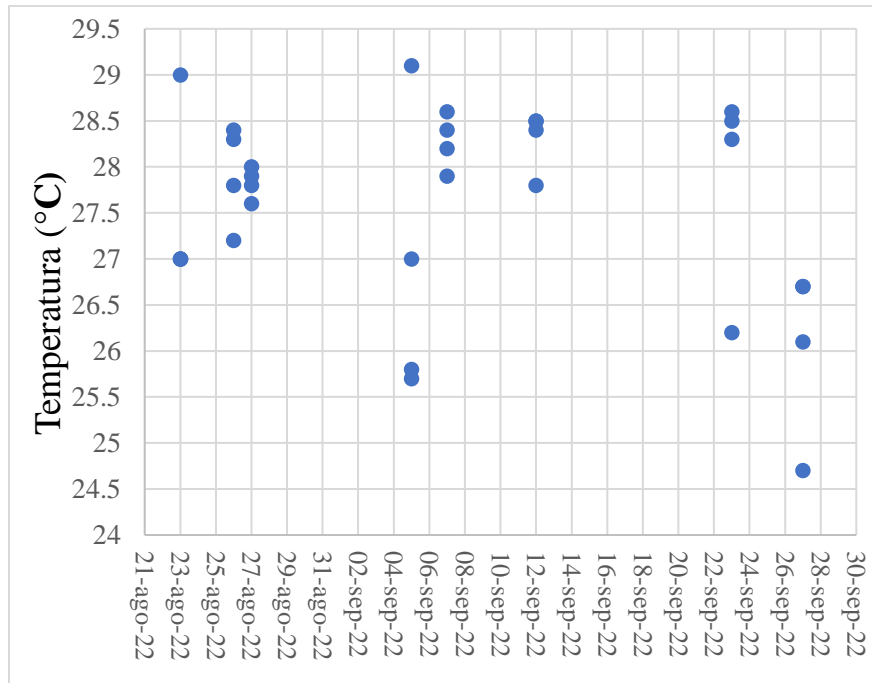


Figura 8. Variación de la temperatura en tanques experimentales respecto al tiempo.

2. Calidad espermática

Todos los tratamientos presentaron una tendencia de aumento progresivo de la tasa de espermátóforos melanizados a lo largo del periodo experimental, siendo encontrados valores significativamente mayores en la regeneración 2 para el tratamiento SS y en la regeneración 3 para los tratamientos SS y SE en comparación con el muestro inicial. Al comparar los grupos experimentales, no se observó diferencias estadísticas entre ellos en ninguna de las regeneraciones (Fig. 9A)

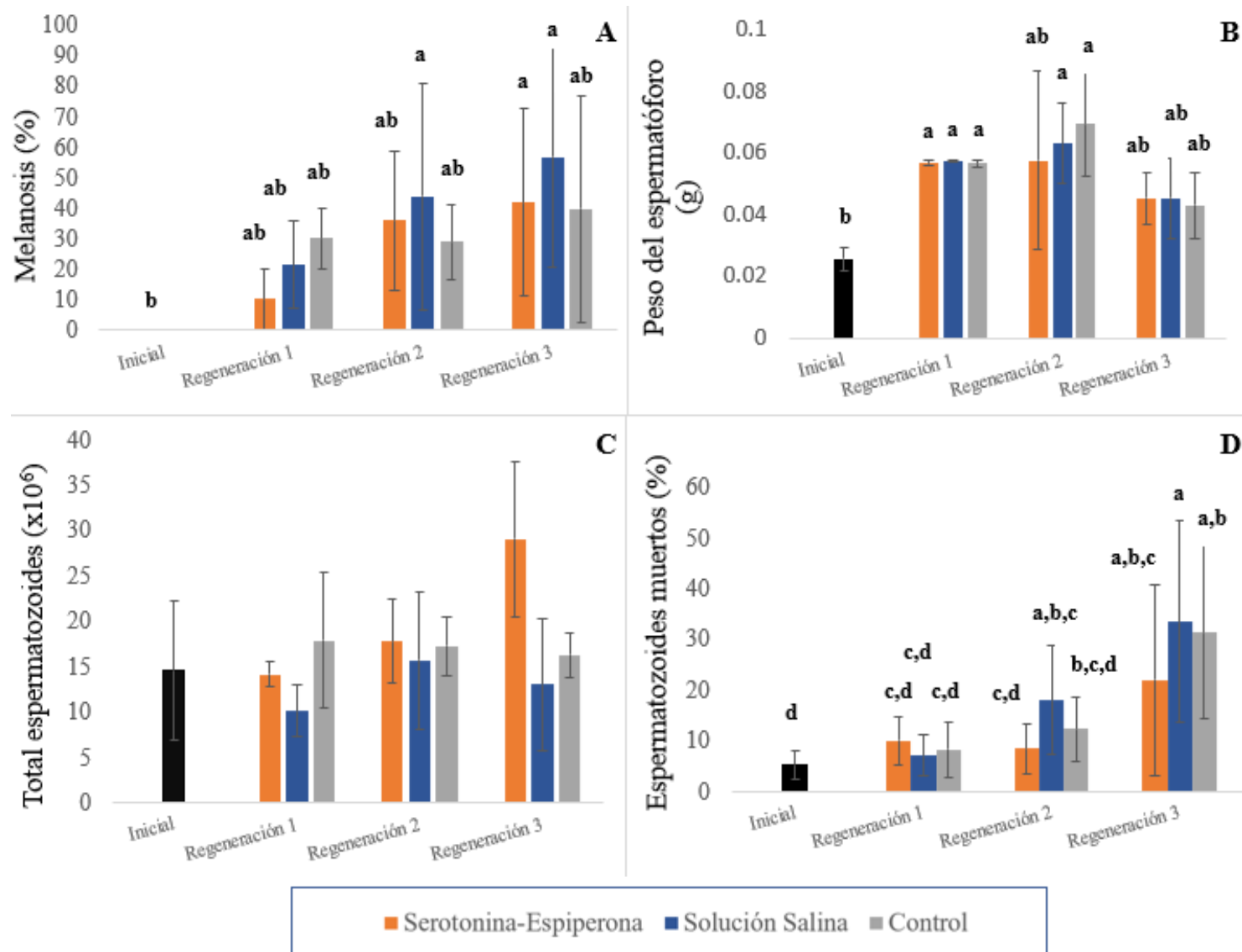


Figura 9. Calidad espermática de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante sucesivas renegeaciones del espermátforo tras su extracción cada 15 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras desiguales sobre ellas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

El peso inicial del espermátforo fue de 0.025 g, siendo observado un incremento en los tres tratamientos a partir de la primera regeneración reflejando valores estadísticamente significativos en comparación con el muestro inicial. Este aumento significativo con relación a los valores iniciales se mantuvo en la regeneración 2 para SS y control, mientras el peso de los espermátforos en el tratamiento SE se mantuvo estable, sin presentar diferencias estadísticas entre los demás grupos experimentales y el muestro inicial. Por otro lado, en la última regeneración, se observó una tendencia de pérdida de peso de los espermátforos para los tres grupos experimentales, sin presentar diferencias estadísticas con el muestro inicial y las dos regeneraciones anteriores (Fig. 9B).

Con respecto al número de espermatozoides totales, se registró un valor inicial de 14.5×10^6 observando una tendencia al incremento en la primera regeneración en el control con una producción de 17.84×10^6 espermatozoides totales, mientras los tratamientos SS y SE presentaron promedios menores, 10.07 y 14.06×10^6 , respectivamente. A partir de la segunda regeneración, esta tendencia se invirtió, siendo observada una reducción mínima en el control, mientras que los tratamientos SS y SE presentaron valores crecientes, alcanzando SE el pico más alto tras la tercera regeneración con 28.98×10^6 espermatozoides, sin presentar diferencia estadísticamente significativa en comparación con los demás grupos experimentales y regeneraciones (Fig. 9C).

Para la tasa de espermatozoides muertos, inicialmente se registró un valor de 5.05%. En cada conteo se observó un aumento progresivo en este proceso. En la primera regeneración, hubo una tendencia de incremento en el número de espermatozoides muertos para todos los grupos experimentales en comparación con el muestro inicial; sin embargo, sin presentar diferencia estadística. Después de la segunda regeneración, se mantuvo la tendencia de aumento para todos los grupos, pero se observó una tasa significativamente mayor para el tratamiento SE en comparación con el muestro inicial. Entre cada grupo, no se encontró diferencias para ningún de ellos al comparar las regeneraciones 1 y 2. La misma tendencia de aumento se observó para los tres grupos experimentales después de la tercera regeneración. Sin embargo, los grupos SS y control presentaron valores significativamente mayores en la regeneración 3 en comparación con las anteriores, siendo, así, SE el único que no presentó diferencias estadísticas entre las regeneraciones (Fig. 9D).

DISCUSIÓN

La calidad de agua es uno de los factores que garantizan el éxito en el cultivo de *L. vannamei* (Alfaro-Montoya, 1998; Van Wyk *et al.*, 1999; Paredes y Rodríguez, 2020). Autores como Cavalli *et al.* (2008), Alfaro-Montoya y Vega (2011) y Nakayama *et al.* (2020) han descrito que factores como la temperatura y compuestos nitrogenados influyen en procesos de maduración y calidad espermática de camarones peneidos. Es por lo anterior que, García *et al.* (2007) establecen parámetros idóneos para la engorda de juveniles basados en una recopilación de información de distintos autores, mencionando que un rango de temperatura 20 a 30 °C, oxígeno disuelto entre 6 y 10 mg l⁻¹, alcalinidad no inferior a 100 mg l⁻¹, salinidad de 20 a 35 ppt y amonio no superior a 0.1 mg l⁻¹ son variables fisicoquímicas que favorecen la calidad la calidad de agua para el buen desarrollo de *L. vannamei*. En este trabajo, los parámetros de calidad de agua durante el periodo experimental se mantuvieron dentro de las especificaciones señaladas por Van Wyk *et al.*, (1999), Pérez-Velázquez *et al.* (2001), García *et al.* (2007) y Nakayama *et al.* (2020) para el mantenimiento óptimo de reproductores y estudios de calidad espermática.

Por otro lado, el estudio de la tasa de melanización fue realizado por medio de la observación de las regiones donde se realizó la inyección intramuscular (tratamiento SS y SE) y la extracción de los espermátóforos por compresión manual durante cada regeneración. De este modo, Peña-Navarro y Varela-Mejías (2015) destacan que la melanosis es un proceso biológico en los crustáceos producto de una respuesta inespecífica del sistema inmune ante órganos y tejidos con algún tipo de daño. De manera complementaria, Alfaro-Montoya *et al.* (1993) y Díaz *et al.* (2001) mencionan que la presencia de melanosis en los espermátóforos conlleva una reducción de la calidad espermática viéndose influenciado este proceso principalmente por 4 factores: agentes patógenos, estrés por condiciones de cultivo no adecuadas, falta de transferencia de espermátóforo y extracción manual del espermátóforo (Braga, 2009 y Braga *et al.*, 2018).

Basado en los resultados de este experimento, se observó que la tasa de espermátófos melanizados comenzó a partir de la primera regeneración, encontrando diferencias únicamente en los tratamientos solución salina y serotonina y espiperona con un aumento progresivo hasta la conclusión del experimento. Del mismo modo, la melanosis estuvo

focalizada únicamente en los espermatóforos y de manera progresiva en estos tras cada regeneración. Sin embargo, faltaron análisis complementarios para descartar la posibilidad de una afectación por un agente infeccioso (Peña-Navarro y Varela-Mejías, 2015; Peña-Navarro y Varela-Mejías, 2016). Pese a que en este trabajo se mantuvieron las recomendaciones mencionadas por Braga (2009) y la temperatura recomendada por Nakayama *et al.* (2020) para retardar la activación del sistema polifenol oxidasa, se observó el proceso de melanización como un proceso biológico influenciado por la extracción manual y de manera continua. En la finalización del experimento no se observó una mejora en este proceso por parte de ningún tratamiento, sino que se observó un daño progresivo en la región ventral de los organismos a los que se les extrajo el espermatóforo viéndose reflejado en el aumento de espermatóforos melanizados. Este aspecto también fue reportado por Braga *et al.* (2018) en *Farfantepenaeus brasiliensis* tras la extracción manual del espermatóforo que produjo una melanosis hemocítica.

En adición a ello, se estudió el peso del espermatóforo durante cada regeneración. Diversos autores han demostrado que el peso del espermatóforo se asocia con el peso del organismo, edad y partes estructurales que presentan (Díaz *et al.*, 2001). Durante el periodo experimental se observaron valores significativos en el incremento en el peso de los espermatóforos durante la primera regeneración pudiéndose atribuir a la adecuada densidad poblacional por tanque (15 camarones m⁻²), tipo de alimento suministrado (alimento comercial y enriquecido con alimento fresco) y condiciones de la calidad de agua presente en los tanques experimentales más que a los tratamientos per se (Araneda *et al.*, 2008; Braga, 2009; Braga *et al.*, 2013). La tendencia de pérdida del peso de los espermatóforos observados en todos los ejemplares se atribuye a un proceso natural y esperado dado el deterioro y agotamiento reproductivo al que se sometieron los ejemplares y mismo que también fue reportado por Rendón *et al.* (2007) en *L. vannamei*.

Los valores iniciales obtenidos para el número total de espermatozoides en este trabajo, se encontraron por encima de lo reportado por Wang *et al.* (1995), Ceballos-Vázquez *et al.* (2003) y Ceballos-Vázquez *et al.* (2004), atribuyéndose a la calidad de agua donde los ejemplares de mantuvieron en óptimas condiciones, así como la alimentación recibida (Pérez-Velázquez *et al.*, 2001; Alfaro-Montoya, 2010; Braga *et al.*, 2013). Aunado a estos

factores, Alfaro-Montoya y Vega (2011) estudiaron el efecto del ambiente y de neurotransmisores en machos silvestres *L. vannamei* en condiciones de cautiverio utilizando una relación de serotonina y espiperona de 25 y 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso del organismo respectivamente, y siendo inyectado intramuscularmente 4 veces durante un proceso de 7 semanas. Los autores encontraron un efecto reproductivo favorecedor en la cantidad de espermatozoides producidos en los ejemplares expuestos a la combinación de serotonina y antagonista de la dopamina espiperona, con respecto a los ejemplares control y aquellos expuestos únicamente con únicamente serotonina. Lo anterior logró ser observado únicamente en los machos que fueron inyectados con serotonina y espiperona registrando una tendencia de aumento en el número de espermatozoides tras sucesivas regeneraciones del espermatóforo. Del mismo modo, la dosis empleada de espiperona para este trabajo fue mayor a la empleada por Alfaro-Montoya y Vega (2011) empleando una relación de espiperona a 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso del organismo. A su vez, Farhadi *et al.* (2020) encontraron este mismo efecto estimulante en la producción de espermatozoides con el neurotransmisor serotonina en machos de cangrejo del río *Pontastacus leptodactylus* el cual tuvo un efecto directo en el órgano mandibular favoreciendo la síntesis de la hormona metil farnesoato (MF por sus siglas en inglés) promoviendo la estimulación en la maduración de los ejemplares. En este trabajo, el incremento de la producción de espermatozoides durante cada extracción se atribuye a la aplicación del neurotransmisor serotonina que estimuló el complejo neuroendocrino encargado de la síntesis de hormonas encargadas del proceso de espermatogénesis de los ejemplares que fueron inyectados con este neurotransmisor. Por otro lado, este efecto no fue observado en los ejemplares control y del tratamiento SS, ya que en ellos se presentó una tendencia de descenso a partir de la segunda regeneración del espermatóforo.

Inicialmente la tasa de espermatozoides muertos presentó valores que se encontraron por debajo de lo registrado por Ceballos-Vázquez *et al.* (2003) y Ceballos-Vázquez *et al.* (2004), registrando un incremento en sus valores en cada extracción para cada uno de los tratamientos y control hasta la conclusión de este trabajo. Talbot *et al.* (1989) estudiaron la caracterización de los daños en machos sexualmente maduros de camarón blanco del Atlántico *Penaeus setiferus* en cautiverio, mostrando que existe pérdida en la calidad reproductiva a partir del día 35 observando espermatozoides muertos en el espermatóforo en algunos machos. De este modo, Peña-Navarro y Varela-Mejías (2015) y Pérez (2005)

describen que la mortalidad espermiática en camarón es producto de un proceso biológico tras el agotamiento reproductivo de los ejemplares. Al finalizar el estudio de mortalidad espermiática se observó como este proceso fue en aumento, sin embargo, se observaron valores estadísticamente menores de espermatozoides muertos en el tratamiento SE en la tercera regeneración con respecto a los ejemplares control y del tratamiento solución salina que mostraron un alza en sus valores. Es por ello que las causas de mortalidad espermiática en este estudio no se atribuyen directamente al manejo en cautiverio, peso de los ejemplares o tratamientos utilizados (SS y SE) ya que en todos los ejemplares fue observando un incremento en la tasa de mortalidad espermiática, logrando atribuirlo principalmente a un agotamiento reproductivo tras la extracción continua del espermatóforo.

CONCLUSIONES

- La aplicación del neurotransmisor serotonina y antagonista de la dopamina (espiperona) no comprometió los parámetros de calidad espermática mitigando la pérdida de calidad espermática esperada tras sucesivas regeneraciones del espermatóforo.
- El método de extracción manual del espermatóforo posiblemente fue el factor causante del proceso de melanosis en los ejemplares.
- La inyección intramuscular en los ejemplares del tratamiento solución salina y serotonina-espiperona no llevó a cabo la producción de melanosis en las regiones donde se realizó las aplicaciones.
- El declive del peso del espermatóforo y tasa de mortalidad espermática fue resultado de un agotamiento reproductivo por parte de los ejemplares tras múltiples extracciones del espermatóforo.
- Únicamente los ejemplares del tratamiento serotonina-espiperona mostraron una tendencia de aumento en el número de espermatozoides en cada regeneración del espermatóforo, atribuido al potencial estímulo que ejerce la serotonina en el proceso de espermatogénesis.
- Los resultados de este trabajo presentan bases para el empleo del neurotransmisor serotonina y de la espiperona como una técnica promisoras para optimizar la reproducción inducida también de machos de *L. vannamei*.

REFERENCIAS

- Alfaro, J., Zúñiga, G., y Komen, J. (2004). Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 236 (1-4), 70-87.
- Alfaro-Montoya, J. (1998). Control de la reproducción de camarones marinos (ING). *Uniciencia* 15 (1), 87-92.
- 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).
- Alfaro-Montoya, J. y Vega, L. A. (2011). The effect of environmental cues and neurotransmitters on male sexuality of the Eastern Pacific *Penaeus (Litopenaeus)* species. *Aquaculture* (316), 60-67.
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., Vargas, M. y Umaña-Castro, R. (2017): Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoal capacitation, *Invertebrate. Reproduction & Development* 61(1), 9-17.
- Alfaro-Montoya, J., Lawrence, A.L. y Lewis, D., (1993). Interaction of bacteria and male reproductive system blackening disease of captive *Penaeus setiferus*. *Aquaculture* (117), 1-8.
- APHA. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
- Araneda, M., Eduardo P. Pérez, Eucario Gasca-Leyva. (2008). White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight, *Aquaculture* (283), 13-18.
- Bortolini Rosales, J. L. y Torres García, M. P. (2004). La camaronicultura en México. *Ciencias* (76), 58-61.

- Braga de Souza, A. L. (2009). Ultraestructura do espermatozóide e efeito da alimentacao na qualidade espermática do camarao-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. Tesis Maestría en Oceanografía Biológica. Universidad Federal de Rio Grande. Brasil.
- Braga de Souza, A. L. (2013). Aspectos morfológicos e evolutivos dos espermatozoides e espermatóforos de *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Tesis Doctorado en Oceanografía Biológica. Universidad Federal de Rio Grande. Brasil.
- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M. C., Romano, L.A., Poersch, L. H. y Wasielesky, W. (2018). Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture* (486), 64-67.
- Braga, A., Lopes, D., Poersch, L. y Wasielesky Jr, W. (2013). Spermatophore and sperm quality of the Pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed with fresh food supplemented with pollen and paprika. *Aquaculture* (380-383), 29-32.
- Cavalli, R., Peixoto, S. y Wasielesky, W. (2008). Performance of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante) broodstock under long-term exposure to ammonia. *Aquaculture Research*. 29 (11). 815-822.
- 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.
- Ceballos-Vázquez, B. P., C. Rosas, y I. S. Racotta. (2003). Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* (228), 141-151.
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura CONAPESCA. (2018). Crecen anualmente más de 10 por ciento pesca y acuicultura en México en los últimos seis años: SAGARPA. Gobierno de México.
- 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. *J. World Aquacult. Soc.* (32), 236–242.
- Farhadi, A., Harlioğlu, M. M., y 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), 155-163.

- García Sánchez, S., Juárez Agis, A., Olivier Salome, B., Rivas González, M. y Zeferino Torres, J. (2007). Variables fisicoquímicas ambientales que inciden en el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*, en Coyuca de Benítez, Guerrero, México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* (5), 135-155.
- Garza Torres, R. (2011). Estudio sobre el órgano genital del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone), con énfasis en la glándula androgénica. Tesis Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México.
- Gendrop-Funes, V. y Valenzuela-Espinoza, E. (1995). UNILATERAL ABLATION OF *Penaeus stylirostris* (STIMPSON). *Ciencias Marinas* 21 (4), 401-403.
- Instituto Nacional de Pesca INAPESCA. (2018). Acuicultura comercial. Gobierno de México.
- Jory, D. E., Cabrera, T. R., Dugger, D. M., Fegan, D., Lee, P. G., Lawrence, A. L., Jackson, C.J. y McIntosh, R.P. (2001). A global overview of current shrimp feed management: status and perspectives. En: *Aquaculture Society*, 104-152.
- Leal Salguero, S. A. (2019). Determinación de la talla de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) más comercializada manejada por productores independientes en Guatemala durante el año 2018. Tesis Maestría en Administración Industrial y de Empresas de Servicios. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- López-Martínez, J., Hernández Vázquez, S., Herrera Valdivia, E., Rodríguez Romero, J. y A. Chávez, E. (2010). Influencia ambiental en la pesquería de camarón. *Variabilidad Ambiental y Pesquerías de México*. 111-123.
- Martínez-Córdoba, L. R. (2002). Camaronicultura: avances y tendencias. AGT EDITOR.S.A. México. 180 pp.
- Moreno, C., Graziani, C. y Orta, T. (2000). Reproducción natural y artificial del camarón de río *Macrobrachium carcinus* (L.). *Interciencia* (5), 249-253.
- Nakayama, C.L., Lopes, D., Braga, A., Wasielesky, W. y O. Cavalli, R. (2020). Does temperature affect the occurrence of penaeid spermatophore melanization related to successive manual extrusions? A case study with the closed thelycum *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquacult Int.* (20), 1657-1663.

- Oliveira, P. S. P. y Correa, A. M. A. (1999). AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SEROTONINA (5-HT) E DA MONOABLAÇÃO DO PEDÚNCULO OCULAR NA INDUÇÃO DA MATURAÇÃO OVARIANA DE *Penaeus penicillatus* (ALCOCK, 1905). Rev. Bras. Biol. 59 (2), 351-359.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO. (2022). Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO.
- Paredes Mendoza, J. R. y Rodríguez Romero, J. S. (2020). Monitoreo de los parámetros de temperatura y pH para evaluar su efecto en la producción de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) en San Luis La Herradura, La Paz. Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Peña-Navarro, N. & Varela-Mejías, A. (2015). Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Agronomía Mesoamericana, 26 (1), 44-53.
- Peña-Navarro, N. y Varela-Mejías, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Revista de biología marina y oceanografía 51(3), 553-564.
- Peralta Martínez, M., Martínez Morales, I., Unzueta Bustamante, M. L., Montaldo, H., y Castillo-Juárez, H. (2013). Morfología del sistema reproductor y del espermatóforo de *Litopenaeus vannamei*, camarón blanco del Pacífico. Hidrobiológica 23 (3), 313-319.
- Pérez Jar, L. (2005). Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio. Tesis Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México.
- Pérez-Velázquez, M., A. Bray, W., L. Lawrence, A., M. Gatlin III, D. y Gonzalez-Felix, M. L. (2001). Effect of temperatura on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aquaculture. 198. 209-218.
- Rendón Rodríguez, Sergio, Macías Regalado, Emilio, Calderón Pérez, José Antonio, Núñez Pastén, Arturo, & Solís Ibarra, Rafael. (2007). Comparison of some reproductive characteristics of

farmed and wild white shrimp males *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical*, 55(1), 199-206.

Sainz Hernández, J. C. (1999). Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol, glucosa, lactato, proteína, profenoloxidasa y fenoloxidasa en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. México.

Sánchez Cortez, K. A. (2006). Procedimientos técnicos para producción de nauplios de la empresa TEXCUMAR S.A., Ecuador. Tesis de Grado Ing. Agr. Escuela Agrícola Zamorano. Honduras.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural SADER. (2018). Camarón, producción en crecimiento. Gobierno de México.

Talbot, P., Howard, D., Leung-Trujillo, J., Lee, T. W., Li, W.-Y., Ro, H., & Lawrence, A. L. (1989). Characterization of male reproductive tract degenerative syndrome in captive penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture* 78(3-4), 365–377.

Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., L. Main, K., Mountain, J. & Scarpa, J. (1999). Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Division of Aquaculture. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. 50-80.

Vázquez Islas, G. (2014). Aspectos reproductivos en machos del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* enfocados en la fisiología de la glándula androgénica y en la expresión del gen Lv-IAG, así como en el balance energético del espermátforo, contaminantes en el ciclo de muda. Tesis Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México.

Wang, Q., M. Misamore, C. Q. Jiang, and C. L. Browdy. 1995. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. *Journal of the World Aquaculture Society* (26), 261- 271.

Yambay Rueda, R. E. y Alvarez Alvarado, M. E. (2017). Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en sistemas cerrados de recirculación. Tesis de Grado Biólogo. Universidad de Guayaquil. Ecuador.