



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DE LA VITAMINA C SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA  
EN REPRODUCTORES MACHO DE CAMARÓN ROJO DEL CARIBE  
(*Farfantepenaeus brasiliensis*, Latreille 1817)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

**RODRIGO ELOY MORONES GARCÍA**

Asesora principal:

**Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés**

Co-Asesor:

**Dr. Martín Alberto Arenas Pardo**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA.**

Esta tesis se la dedico a mis hermanos que siempre han estado conmigo, apoyándome en mis decisiones, corrigiéndome en las cosas que hago mal y por todo lo que me han dado y hecho por mí en la vida. Ellos son mi modelo a seguir.

A mis padres que sacrificaron muchas cosas para que mis hermanos y yo pudiéramos tener la mejor educación. A mi papá que apoyó mi decisión de dedicarme a los organismos acuáticos y por todo lo que me brindó durante la carrera y en mi estancia en Sisal. Gracias por todo, te amo.

Ma, han pasado 4 años de tu partida, me hubiera encantado que estuvieras presente durante este proceso, que nos vieras cumpliendo nuestras metas. Espero que te sientas orgullosa de mi en donde quiera que estés. Quédate tranquila que estaremos bien. Estoy seguro de que nos volveremos a ver, esto va por ti. Te amo.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por haber financiado el proyecto de investigación: Requerimientos de vitaminas antioxidantes para los machos de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei*, con clave de proyecto IN220819.

Al Programa Grupo Camarón: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, Dr. Juan Carlos Maldonado Flores, M. en C. Miguel Arévalo López, Dra. Gabriela Palomino Albarrán, Ing. Adriana del Carmen Paredes Medina, Dr. Manuel Valenzuela Jiménez.

A la Dra. Gaxiola por haberme brindado su confianza y la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación y por apoyarme durante mi estancia en Sisal.

A Martín por estar con nosotros desde el primer día que pisamos la UMDI, por estar al pendiente durante todo este trayecto y por enseñarnos lo mucho que aprendimos acerca de acuacultura en Sisal. Eternamente agradecido.

Al Dr. Maldonado por habernos aceptado a Lalo y a mí para realizar el servicio social en el Grupo Camarón, por habernos brindado su apoyo y facilidades en las cosas que necesitábamos.

Al M. en C. Miguel Arévalo por su paciencia y por todo lo que nos enseñó acerca de la reproducción de los camarones peneidos.

A Barreto por apoyarme con las clases y estadísticos en R Studio y durante el muestreo del experimento; a Xurxo por enseñarme a evaluar la calidad espermática de los camarones y por apoyarme durante el muestreo final; a Zazueta por enseñarme y apoyarme en el muestreo final a caracterizar hemocitos.

A mis sinodales de tesis que me brindaron de su tiempo para leer mi trabajo y hacerme los comentarios, observaciones y correcciones pertinentes.

A Lalo por haber emprendido esta travesía conmigo, vivimos un montón de experiencias, unas buenas y otras no tan buenas, pero me siento feliz de vernos crecer en este ámbito.

A mi familia sisaleña: Doña Gaby, Marco y Dael por habernos recibido en su casa, no pudimos haber encontrado un mejor lugar donde vivir durante toda esta aventura, nos hicieron sentir como en casa.

A Elizabeth, por haber vivido estos años y gran parte este proceso conmigo, me ayudaste cuando sentía que colapsaba. Por esto y muchas cosas más, gracias de corazón.

A mis valedores del Consejo: Samu, Velázquez, Ozzy, Vaquero y Eze que gracias a ustedes la carrera se pasó volando de una forma muy divertida y amena.

A mis amigas de la facultad Rubí, Abril, Brenda y Sahian que compartimos muchas experiencias a lo largo de la carrera y espero que se cumplan todas sus metas.

A mis amigos de la prepa Samuel, Fer, Paco y Lalo que a pesar de no poder vernos como antes, seguimos compartiendo esta amistad que ha perdurado por años.

A mis tías, tíos, primas y primos por su apoyo y por estar al pendiente de mi durante todo este proceso. De verdad, muchas gracias.

## CONTENIDO

Índice de figuras.....	VI
Índice de cuadros.....	VIII
RESUMEN .....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	5
2.1 Biología del camarón rojo del Caribe.....	5
2.2 Clasificación taxonómica (Cuadro 2).....	7
2.3 Distribución geográfica y económica del camarón rojo del Caribe. ....	7
2.4 Alimentación. ....	8
2.5 Calidad reproductiva de machos.....	8
2.6 Sistema inmune de los camarones peneidos.....	9
2.7 Sistema Profenoloxidasa (proFO). ....	10
2.8 Vitamina C. ....	12
2.9 Indicadores nutricionales en hemolinfa. ....	15
3. Justificación.....	17
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares .....	19
5. Material y Métodos.....	20
5.1 Animales y diseño experimental. ....	20
5.2 conteo de espermatozoides, bioquímica de hemolinfa y sistema inmune. .....	27
5.3 Supervivencia.....	29
5.4 Análisis estadístico. ....	29
6. Resultados.....	30
6.1 Supervivencia.....	30
6.2 Calidad espermática. ....	30
6.3 Caracterización de hemocitos. ....	33
6.3 Indicadores nutricionales e inmunológicos en hemolinfa. ....	36
7. Discusión .....	41
8. Conclusiones.....	45
9. Referencias.....	46

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Reproductor macho de camarón rojo del Caribe (Foto: Morones, 2021). 6	6
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica del camarón rojo del Caribe (WoRMS, 2021). ... 8	8
<b>Figura 3.</b> Unidad Académica Yucatán, UNAM (Foto: Morones, 2021). .... 20	20
<b>Figura 4.</b> Laboratorio de Reproducción de Camarón, UNAM-Yucatán (Foto: Morones, 2021). .... 21	21
<b>Figura 5.</b> Iglú de Cría Larvaria de Camarón, UNAM-Yucatán (Foto: Morones, 2021). .... 22	22
<b>Figura 6.</b> Flujo del agua dentro del sistema de recirculación: a) filtro ultravioleta, b) filtro biológico, c) reservorio de 1,000 L, d) tinas, e) espumador (Morones, 2021).25	25
<b>Figura 7.</b> Sistema experimental de recirculación, UNAM-Yucatán (Foto: Morones, 2021). .... 26	26
<b>Figura 8.</b> Concentración de células espermáticas totales (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. .... 31	31
<b>Figura 9.</b> Concentración de células espermáticas normales (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. .... 31	31
<b>Figura 10.</b> Concentración de células espermáticas anormales (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. .... 32	32
<b>Figura 11.</b> Concentración de células espermáticas muertas (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. .... 32	32
<b>Figura 12.</b> Concentración de hemocitos totales (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. .... 33	33
<b>Figura 13.</b> Concentración de hemocitos hialinos (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. .... 34	34

<b>Figura 14.</b> Concentración de hemocitos semigranulosos (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	35
<b>Figura 15.</b> Concentración de hemocitos granuloso (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	36
<b>Figura 16.</b> Concentración de FO total en hemolinfa (media $\pm$ ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. ....	37
<b>Figura 17.</b> Concentración de FO en hemolinfa (media $\pm$ ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. ....	37
<b>Figura 18.</b> Concentración de proFO en hemolinfa (media $\pm$ ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. ....	38
<b>Figura 19.</b> Concentración de glucosa en hemolinfa (media $\pm$ ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. ....	38
<b>Figura 20.</b> Concentración de proteína soluble en hemolinfa (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	39
<b>Figura 21.</b> Concentración de triglicéridos (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	40
<b>Figura 22.</b> Concentración de colesterol (media $\pm$ ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión	



de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos. .... 40

### Índice de cuadros.

<b>Cuadro 1</b> Variables fisicoquímicas del agua óptimas para reproductores macho de camarón rojo del Caribe según Flor <i>et al.</i> (2016) y Braga <i>et al.</i> (2018).....	5
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica del camarón rojo del Caribe según Pérez-Farfante & Kensley (1997). ....	7
<b>Cuadro 3.</b> Formulación de las dietas experimentales (% peso seco).....	23
<b>Cuadro 4.</b> Composición proximal de las dietas experimentales (% peso seco). ..	24
<b>Cuadro 5.</b> Valores de las variables fisicoquímicas del agua (Media $\pm$ desviación estándar, DE) durante el cultivo de los reproductores macho de camarón rojo del Caribe, dentro del sistema de recirculación de agua durante 30 días.....	27
<b>Cuadro 6.</b> Supervivencia (%) de los reproductores macho de camarón rojo del Caribe alimentados con diferente nivel de inclusión de vitamina C.....	30

## RESUMEN

MORONES GARCÍA RODRIGO ELOY. Efecto de la vitamina C sobre la calidad espermática en reproductores macho de camarón rojo del Caribe (*Farfantepenaeus brasiliensis*, Latreille 1817) (bajo la dirección de: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Dr. Martín Alberto Arenas Pardo).

El camarón rojo del Caribe (*Farfantepenaeus brasiliensis*) es una especie con importancia económica en el Golfo de México, pero en estado de sobreexplotación. Esta especie presenta potencial acuícola, por lo que es importante generar su tecnología de cultivo. La reproducción es uno de los aspectos más importantes en el cultivo de organismos acuáticos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la vitamina C (VC) sobre la calidad espermática e indicadores de nutrición y salud en reproductores macho de *F. brasiliensis*. Se formularon con 4 dietas para contener 40% proteína, 11% lípidos, 32% carbohidratos y 0.33 (Tratamiento basal), 0.44 (A), 0.48 (B), 0.53% (C) de VC. Los reproductores macho (~15 g) se alimentaron por 30 días, cada tratamiento fue por triplicado (n=6). Para el conteo total y caracterización de células espermáticas, se utilizó el criterio de células normales, anormales y muertas. En el conteo total y caracterización de células sanguíneas, se utilizó el criterio de hemocitos hialinos, semigranulosos y granuloso. Colesterol, glucosa y triglicéridos en plasma se evaluó con un kit comercial, mientras que para proteínas solubles se utilizó el método de Bradford (1976). El sistema fenoloxidasa se evaluó acorde a Hernández-López (2001). La calidad espermática y el sistema fenoloxidasa no fueron afectados por la VC, pero los hemocitos semigranulosos y granuloso incrementaron en el tratamiento A y B, respectivamente. Triglicéridos incrementó en el tratamiento B, proteínas solubles en A, mientras que colesterol en A, B y C. La VC estimuló el sistema inmune y modificó el metabolismo de los lípidos.

## 1. Introducción.

La acuicultura es el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de organismos acuáticos (p. ej. Peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas). En el 2018, la acuicultura contribuyó con el 46% de la producción mundial de pescado para consumo, respecto a la pesca comercial. La producción de crustáceos representó 9.4 millones de toneladas (FAO, 2020).

La camaronicultura es una rama de la acuicultura que se centra en el cultivo de especies de camarón que pertenecen a la familia Penaeidae. En la actualidad, los camarones son el producto marino más valioso que se comercializa en el mundo, debido a esto, la producción de camarón crece a una tasa aproximada del 10% anual, una de las tasas de crecimiento más altas en la acuicultura (WWF, 2021). El camarón cultivado representa el 55% del camarón total producido a nivel mundial. La mayor parte de la producción de camarón por acuicultura es en China, seguida de Tailandia, Indonesia, India, Vietnam, Brasil, Ecuador y Bangladesh (WWF, 2021).

En 2016, en México se cultivaron 129,049 toneladas de camarón, esta cifra representa la tercera parte del volumen total de la producción acuícola nacional (388,967 toneladas). Mientras que, en valor, el camarón de cultivo superó con 11,479 millones de pesos a otras especies comerciales como la tilapia, atún, ostión y trucha (CONAPESCA, 2018). La especie de camarón más cultivada en México es el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), sin embargo, existen un gran número de especies de camarón nativas con potencial para ser cultivadas.

El camarón rojo del Caribe (*Farfantepenaeus brasiliensis*) es una especie con potencial acuícola en el Golfo de México (Anguiano, 1999). Las tasas de crecimiento en condiciones de cultivo son relativamente buenas y los adultos llegan a tener un mayor tamaño en comparación con otras especies de camarones peneidos (Cruz, 2017; Gaxiola *et al.*, 2010; Magaña-Gallegos *et al.*, 2018).

Investigaciones para el desarrollo de una tecnología de cultivo para esta especie en cuestión de aspectos biológicos y de alimentación en etapas tempranas se han llevado a cabo en los últimos años. Brito, Chimal & Rosas (2000) evaluaron el efecto de diferentes salinidades en la supervivencia, el crecimiento y la capacidad osmótica de juveniles de camarón rojo del Caribe, además Gaxiola *et al.* (2010) establecieron en esta especie un régimen alimenticio óptimo para el estadio protozoa hasta post-larva I con microalgas (*Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis chuii*) y Artemia. Por otra parte, Cruz (2017) estableció en post-larvas del camarón rojo del Caribe un requerimiento de proteína de 45% en condiciones de cultivo de agua clara y 35% en condiciones de cultivo utilizando tecnología de biofloc.

Por otro lado, también se han realizados estudios acerca de la reproducción, particularmente en hembras. Recientemente, Magaña-Gallegos *et al.* (2018) reportaron en el camarón rojo del Caribe que reproducir hembras con ablación ocular mejora la frecuencia de desove, pero reproducir hembras sin ablación ocular incrementa la calidad de las post-larvas. Sin embargo, existe poca información o estudios sobre la maduración sexual en reproductores macho en comparación con hembras. Generar este nuevo conocimiento en esta especie, complementará el paquete tecnológico, el cual podrá transferirse a los pobladores de las comunidades

costeras del Golfo y Caribe mexicano, generando nuevas oportunidades de empleo, y permitiendo a la población acceder a un alimento de calidad que forme parte de su dieta.

## 2. Antecedentes.

### 2.1 Biología del camarón rojo del Caribe.

Es un crustáceo que pertenece al orden Decápodo; tiene un cuerpo que consiste de dos regiones: 1) El cefalotórax, que se origina en la parte anterior (rostrum) y deriva en apéndices como las anténulas, las antenas, las piezas bucales y en cinco pares de patas (pereiópodos); 2) El abdomen, formado por seis segmentos, los primeros cinco tienen cada uno un par de apéndices natatorios (pleópodos), el sexto segmento termina en una cola denominada telson, que se une con los urópodos (Pérez-Farfante, 1988).

El camarón rojo del Caribe ha sido identificado de igual forma que *F. duorarum* y *F. aztecus* como una especie de camarón eurihalina limitada (Zein-Eldin & Renaud, 1986; Wenner & Beatty, 1993). Estudios han demostrado que el camarón rojo del Caribe es una especie con capacidad limitada para tolerar bajas salinidades y presenta mayor crecimiento en salinidades superiores a su punto isosmótico (25%) (Brito, Chimal & Rosas, 2000). Las variables fisicoquímicas de la calidad del agua que requiere el camarón rojo del Caribe se observan en el siguiente cuadro (**Cuadro 1**).

<b>Cuadro 1</b> Variables fisicoquímicas del agua óptimas para reproductores macho de camarón rojo del Caribe según Flor <i>et al.</i> (2016) y Braga <i>et al.</i> (2018).	
<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
Temperatura (°C)	27 ± 1
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.7 ± 0.9
pH	8.09 ± 0.11
Salinidad (ups)	33 ± 1
NH <sup>+</sup> <sub>4</sub> (mg/L)	0.03 ± 0.06
NO <sup>-</sup> <sub>2</sub> (mg/L)	0.40 ± 0.19

El ciclo de vida del camarón rojo del Caribe es similar a la de los demás camarones peneidos. Su reproducción se lleva a cabo en el océano, a profundidades entre 30 y 100 metros. Los huevos son bentónicos, las fases larvianas y las primeras post-larvas son plantónicas y oceánicas. A partir del 6° subestadio de post-larva, los camarones migran a las zonas estuarinas, donde existe una menor profundidad, mayor temperatura y comienzan a desarrollar hábitos bentónicos. En el estuario, las post-larvas se desarrollan en juveniles y pre-adultos. Su ciclo de vida se completa cuando los juveniles y pre-adultos migran al océano para terminar su desarrollo y posteriormente se puedan reproducir (Iwai, 1973; Valentini *et al.*, 1991; Isaac Díaz-Neto & Damasceno, 1992) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Reproductor macho de camarón rojo del Caribe (Foto: Morones, 2021).

## 2.2 Clasificación taxonómica (Cuadro 2).

<b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica del camarón rojo del Caribe según Pérez-Farfante & Kensley (1997).	
<b>Reino</b>	<i>Animalia</i>
<b>Phylum</b>	<i>Artropoda</i>
<b>Superclase</b>	<i>Crustacea</i>
<b>Clase</b>	<i>Malacostraca</i>
<b>Orden</b>	<i>Decapoda</i>
<b>Suborden</b>	<i>Dendobranchiata</i>
<b>Superfamilia</b>	<i>Penaeoidea</i>
<b>Familia</b>	<i>Penaeidae</i>
<b>Género</b>	<i>Farfantepenaeus</i>
<b>Especie</b>	<i>F. brasiliensis</i> (Latreille, 1817)

## 2.3 Distribución geográfica y económica del camarón rojo del Caribe.

El camarón rojo del Caribe se distribuye desde Carolina del Norte, Estados Unidos hasta Río Grande do Sul, Brasil (Pérez Farfante & Kensley, 1997). En México, el camarón rojo del Caribe tiene una gran actividad pesquera en la Península de Yucatán durante todo el año, principalmente en el noroeste de la Isla Contoy (Arreguín-Sánchez, 1981), y en menor proporción en el Golfo de México hacia Cabo Catoche (Silva Neto, Cruz & Araujo, 1982). La Carta Nacional Pesquera señala que la pesquería de camarón rojo del Caribe se encuentra sobreexplotada, ya que los



niveles de producción pesquera se encuentran históricamente más bajos desde 1997 (DOF, 2012) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Distribución geográfica del camarón rojo del Caribe (WoRMS, 2021).

#### **2.4 Alimentación.**

Se ha demostrado que los camarones peneidos son omnívoros, y que algunas especies presentan tendencias hacia la carnivoría o herbivoría (Mc Tighe & Zimmerman, 1991), pero en general las especies del género *Farfantepenaeus* (*F. duoramun*, *F. aztecus*, *F. brasiliensis*) presentan hábitos omnívoro-carnívoros, estas tendencias están asociadas con diferentes proporciones de materia de origen animal o vegetal en la dieta, evidenciando distintos requerimientos nutricionales.

#### **2.5 Calidad reproductiva de machos.**

La domesticación del camarón rojo del Caribe es de vital importancia para el desarrollo de su paquete tecnológico y sostenibilidad, ya que el éxito o el fracaso de la producción de cualquiera especie de camarón, está determinado en gran medida por la calidad de la progenie obtenida en cautiverio (Arévalo, 2008; Alfaro-Montoya, 2010). Una adecuada maduración sexual en reproductores machos de camarón es

indispensable para una producción de larvas de calidad (Racotta, Palacios & Ibarra, 2003).

La evaluación de la calidad espermática es una herramienta de gran utilidad para evaluar la calidad reproductiva en los machos adultos de camarones peneidos (Arévalo, 2008; Alfaro-Montoya, 2010). La calidad reproductiva en machos incluye: peso del espermátforo, conteo de células espermáticas, conteo de células vivas, conteo de células anormales y muertas (Leung-Trujillo & Lawrence, 1987; Sánchez *et al.*, 2001; Arévalo, 2010; Alfaro-Montoya 2010).

El deterioro del espermátforo por melanización es uno de los principales problemas en los reproductores machos de camarón en cautiverio (Vázquez, 2014). La melanización del espermátforo es originada por diversos factores como estrés nutricional (Braga *et al.*, 2010; Goimier *et al.*, 2006); patológico (*Vibrio alginolyticus* y *Pseudomonas putrefaciens*) (Alfaro, Lawrence & Lewis, 1993); y ambiental (altas temperaturas) (Pascual *et al.*, 2003; Perez-Velazquez *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2001), lo cual genera una disminución en la calidad espermática debido a una reducción progresiva del número total de espermatozoides y un aumento en la cantidad de espermatozoides anormales y muertos (Díaz *et al.*, 2001).

## **2.6 Sistema inmune de los camarones peneidos.**

El sistema inmunológico de los camarones peneidos está compuesto por varios tipos de células llamadas hemocitos que proporcionan inmunidad innata ante la infección por patógenos y lesiones (Sun *et al.*, 2020). Los hemocitos son indicadores de salud de los camarones, ya que tiene la capacidad de reconocer y neutralizar

moléculas extrañas que pueden venir del ambiente o de otras fuentes (Valenzuela, 2013).

En los crustáceos, los hemocitos se clasifican en tres tipos de células distintas: hialinos, semigranulosos y granulosos. Su apariencia varía según la presencia y el tamaño de los gránulos en el citoplasma de estos (Hose, Martin & Gerard, 1990; Tsing, Arcier & Brehélin, 1989). Los hemocitos hialinos son de citoplasma delgado, con un núcleo central. Se adhieren y extienden con facilidad, no contienen gránulos, pero tienen inclusiones citoplasmáticas. Tienen la capacidad de fagocitar, e intervienen en la coagulación.

Los hemocitos semigranulosos, tienen gránulos pequeños, de forma redondeada con núcleo redondo o en forma de herradura. Intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa (proFO); además, sintetizan y liberan las peneidinas y péptidos antimicrobianos. Los hemocitos granulosos, son células grandes, con núcleo excéntrico y tienen inclusiones citoplasmáticas. Almacenan las enzimas que constituyen el sistema proFO a un nivel más alto que los semigranulosos. Al igual que los hemocitos semigranulosos sintetizan y almacenan las peneidinas e intervienen en la encapsulación (Pascual, 2007; Ruiz, 2007; Rodríguez, 1995).

### **2.7 Sistema Profenoloxidasa (proFO).**

La producción exitosa de camarón a gran escala requiere el uso de estrategias efectivas de prevención de enfermedades, para lo cual es indispensable una buena comprensión de las funciones inmunológicas básicas (Tassanakajon *et al.*, 2010).

Los camarones cuentan con un mecanismo inmune fijo no específico para prevenir la entrada y propagación de patógenos, el cual involucra barreras estructurales para prevenir la entrada de estos, como una cutícula dura, glándulas tegumentales, podocitos branquiales, inmunidad epitelial, regeneración de apéndices, cicatrización para evitar la pérdida de hemolinfa y sellar la herida. Sin embargo, si los mecanismos anteriores fallan, los camarones desarrollan una respuesta inmune innata múltiple inmediata para defenderse de manera eficiente contra la aparición de patógenos (Hoffmann *et al.*, 1999).

Uno de los mecanismos inmunes más eficaces de los invertebrados contra los agentes extraños es la melanización. La compleja cascada de melanización requiere la combinación de hemocitos circulantes y varias proteínas asociadas del sistema activador de la proFO (Cerenius, Lee & Söderhäll, 2008). El sistema activador de la proFO desempeña un papel importante como un sistema de reconocimiento no propio que participa en las respuestas inmunitarias innatas al acompañar las respuestas celulares a través de la atracción de hemocitos e inducir la fagocitosis, la melanización, la producción de reactivos citotóxicos, la encapsulación de partículas y la formación de nódulos y cápsulas (Cerenius, Lee & Söderhäll, 2008; Kanost & Gorman, 2008; Nappi & Christensen, 2005).

La activación de la proFO hacia la enzima activa o fenoloxidasa (FO), ocurre por la acción de serino-proteasas denominadas enzimas activadoras de la proFO (del inglés, proPO-activating-cascade enzymes o PPAEs), iniciando una cascada proteolítica cuyo producto final es la melanina. En crustáceos, una PPAE llamada ppA fue purificada (Aspán & Söderhäll, 1991) y posteriormente clonada (Wang *et*

al., 2001) a partir de los hemocitos de *P. leniusculus*. La ppA es sintetizada y mantenida como un zimógeno (pro-ppA) en los hemocitos, siendo activada luego de su exocitosis, como consecuencia de una lesión o infección microbiana.

La FO es una enzima óxido-reductasa que cataliza dos reacciones sucesivas: la primera, de hidroxilación de un monofenol a o-difenol (actividad monofenoloxidásica) y, la segunda, de oxidación del o-difenol a o-quinona (actividad difenoloxidásica). La producción de o-quinonas resulta en la síntesis de la melanina a través de una cascada de reacciones químicas intermedias, siendo la mayoría espontánea, no mediadas por enzimas (Söderhäll & Cerenius, 1992).

Con relación al papel inmunológico del sistema proFO, se conoce que esta vía genera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como las quinonas, hemiquinonas y radicales libres de oxígeno, una vez que ocurre consumo de oxígeno molecular y que llevan a una destrucción de los patógenos invasores. La melanina parece tener una actividad fungistática (Cerenius & Söderhäll, 2004) y puede todavía funcionar como secuestrante de radicales libres (Nappi & Vass, 1993; Nappi & Ottaviani, 2000), minimizando así los efectos adversos de estas moléculas altamente tóxicas para el organismo.

## **2.8 Vitamina C.**

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble y es un micronutriente esencial para primates, cobayos, peces y crustáceos. Esto debido a que estas especies no tienen la capacidad de sintetizar vitamina C por la ausencia de la L-gulonolactona oxidasa, que es una enzima fundamental para transformar el ácido

L-gulónico en vitamina C (Dabrowski, 2001). El ácido ascórbico es la vitamina más sensible a la degradación durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos. La utilización de formas químicamente estable como el L-ascorbil-2 sulfato, L-ascorbil-2 fosfato y L-ascorbil-2 polifosfato, reduce en gran medida la pérdida y el requerimiento de este nutriente en la dieta (Conklin, 1995).

En peces, la vitamina C juega un papel importante en el crecimiento y en el mantenimiento fisiológico de la homeostasis de los organismos (Saleh *et al.* 2021). La suplementación de vitamina C en la dieta de los peces mejora las funciones hematológicas y bioquímicas del plasma, participa en el metabolismo de proteínas (Tewary & Patra, 2008) y en el intestino, favorece la absorción de hierro mejorando la función de la hemoglobina (Zafar & Khan, 2020). Además, la vitamina C tiene un papel importante en la síntesis de colágeno, matriz ósea, tejido conectivo y vasos sanguíneos (Harsij *et al.*, 2020). La deficiencia de vitamina C en peces puede causar reducción de la tasa de crecimiento, hemorragias internas y externas, deformación de la columna vertebral, erosión de las aletas, exoftalmia y coloración oscura de la piel (Tewary & Patra, 2008).

En camarones peneidos, la deficiencia de vitamina C en la dieta se ha caracterizado por un bajo crecimiento, una conversión alimenticia deficiente, una frecuencia de muda reducida o una muda incompleta, poca resistencia al estrés, una cicatrización de heridas deteriorada, lesiones con melanización en el exoesqueleto y una alta mortalidad (He & Lawrence, 1993). La vitamina C es necesaria para la hidroxilación de prolina y lisina en la formación de colágeno. Muchos de los signos de deficiencia de vitamina C descritos anteriormente para los camarones peneidos, están

relacionados con el mal funcionamiento de la síntesis de colágeno, como el síndrome de muerte negra (Lightner *et al.*, 1979).

Por otro lado, la vitamina C es un importante agente antioxidante para eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS en inglés reactive oxygen species) como el peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo, y mantiene el equilibrio antioxidante con los ROS (Yadav *et al.*, 2013) donde el exceso de ROS induce estrés oxidativo como la oxidación del ADN, proteínas y lípidos (Chowdhury & Saikia, 2020).

Otro mecanismo antioxidante donde participa la vitamina C es jugando un papel sinérgico con antioxidantes no enzimáticos, como el  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) y los carotenoides. El radical  $\alpha$ -tocoferilo, generado en la membrana celular como consecuencia de la acción del  $\alpha$ -tocoferol como antioxidante, reacciona con el ácido ascórbico regenerando el  $\alpha$ -tocoferol transfiriendo así el daño oxidativo a la fase acuosa de la célula. El radical ascorbilo es la molécula que se produce a partir de la reacción entre el ácido ascórbico con las ROS y el radical  $\alpha$ -tocoferilo, este radical ascorbilo se regenera a ácido ascórbico por la acción de las enzimas semidehidroascorbato reductasa dependiente de NADPH (donador esencial de electrones), eliminando el daño oxidativo de la membrana (Konigsberg, 2008).

La vitamina C ha sido sugerida como un micronutriente esencial para la fisiología reproductiva de peces y crustáceos (Nguyen *et al.*, 2012). En los camarones peneidos, los estudios previos que se han realizado acerca del efecto de la vitamina C sobre la reproducción se han enfocado principalmente en hembras y aunque los

mecanismos directos no han sido bien establecidos, la suplementación de vitamina C en dietas de maduración mejoró el desarrollo ovárico en el langostino japonés (*Marsupenaeus japonicus*) (Alava *et al.*, 1993a, 1993b), y la eclosión de huevos en el camarón blanco de la India (*Penaeus indicus*) (Cahu, Cuzanand & Quazuguel, 1995) y en el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (Du, Hu & Shen, 2004; Sangha *et al.*, 2000).

Además, la vitamina C influye en los indicadores sanguíneos de los camarones peneidos. La vitamina C contribuye para mantener la integridad de los hemocitos a través de protección intracelular contra la oxidación y modula la producción de péptidos antimicrobianos provocando una mayor resistencia a infecciones (Trichet, 2010). Por otro lado, la vitamina C estimula la producción de carnitina, la cual favorece la movilización y metabolismo de triglicéridos (Levine *et al.*, 1996; Burri & Jacob, 1997) y también la vitamina C participa en la biosíntesis de hormonas esteroideas (Hilton *et al.*, 1979).

### **2.9 Indicadores nutricionales en hemolinfa.**

El desarrollo del cultivo de camarones y las necesidades de control del estado fisiológico de los organismos cultivados aumentan constantemente. Algunos metabolitos sanguíneos se han utilizado para controlar las condiciones fisiológicas de las especies de camarones silvestres o cultivados (Pascual *et al.*, 2003).

Las proteínas son un nutriente esencial para los crustáceos en general y para los camarones peneidos en particular, dado que son básicas para el crecimiento (Andrews & Sick, 1972; Djangmah, 1970), la regulación de la presión osmótica del



medio interno (Charmantier & Soyes, 1994; Lignot *et al.*, 1999; Lignot, Spanings-Pierrot & Charmantier, 2000), la gluconeogénesis (Rosas *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2002) y el sistema inmune (Johansson *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2001; Sritunyalucksana & Söderhall, 2000). Según Harrison (1990), la demanda de proteína es mayor durante la maduración y la reproducción de los animales en comparación con las etapas no reproductivas, dada la intensa biosíntesis que tiene lugar durante estos procesos.

La glucosa sanguínea es un indicador del metabolismo de carbohidratos y del nivel de este nutriente en la dieta (Rosas *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2002). Así mismo se ha observado que los niveles de glucosa sanguínea suelen elevarse rápidamente cuando los camarones son sometidos a estrés (Racotta & Palacios, 1998).

Los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre están directamente relacionados con el tipo de alimentación y con las condiciones reproductivas (Palacios 2000; Palacios *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2003). El colesterol forma parte de las membranas celulares, estructuras subcelulares y participa como precursor de las hormonas esteroideas y de las hormonas de muda (Teshima 1997).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la vitamina C sobre la calidad espermática, indicadores nutricionales e inmunológicos en hemolinfa en reproductores machos de camarón rojo del Caribe.

### **3. Justificación.**

La situación pesquera del camarón rojo del Caribe en la Sonda de Campeche (Campeche y Yucatán) se encuentra en estado de sobrepesca. Esto se debe al incremento en el esfuerzo pesquero, la sobrepesca de juveniles en la zona costera y al deterioro de la calidad de las áreas de crianza (Wakida *et al.*, 2016).

La captura del camarón rojo del Caribe es considerada como una actividad alternativa a la pesca tradicional u otras actividades. En Yucatán, en las localidades de Río Lagartos y Las Coloradas la captura de camarón se realiza durante la temporada de nortes, cuando los puertos están cerrados y la pesca en altamar no es posible. Por otro lado, en Progreso la captura de camarón la realizan personas cuya actividad principal no es la pesca y resulta ser una actividad complementaria que genera ingresos a las familias (Wakida *et al.*, 2016).

En acuicultura, la diversificación representa una opción para alcanzar un desarrollo sostenible. En México, la diversificación de la acuicultura es imprescindible para potencializar y fortalecer el crecimiento de esta industria y sectores asociados, y evitar la sobreexplotación de los recursos naturales. El camarón rojo del Caribe presenta potencial acuícola, sin embargo, los avances en el desarrollo de una tecnología de cultivo para esta especie se han enfocado en manejo larvario y nutrición, particularmente en reproductores hembras (Gaxiola *et al.* 2010; Cruz, 2017; Magaña-Gallegos *et al.* 2018). Una adecuada nutrición en reproductores machos de camarón es imprescindible para la producción de espermatozoides de alta calidad, lo cual afecta de forma directa la producción de larvas.

En reproductores machos de camarón del rojo del Caribe se ha reportado una patología: la melanización del aparato reproductor masculino, este síndrome se asocia a la presencia de patógenos como *Vibrio alginolyticus* y *Pseudomonas putrefaciens*, los cuales provocan inflamación y melanización de diferentes regiones del aparato reproductor (Alfaro, Lawrence & Lewis, 1993; Braga *et al.* 2018). La vitamina C es un micronutriente que actúa como antioxidante, debido a que protege a las células contra los daños causados por radicales libres. Por lo anterior, es importante evaluar el efecto de la vitamina C como agente antioxidante sobre la calidad espermática en reproductores machos de camarón rojo del Caribe.

## **4. Objetivos.**

### **4.1 Objetivo general.**

- Evaluar el efecto de diferentes niveles de inclusión de vitamina C en el alimento sobre la calidad espermática e indicadores sanguíneos de salud y nutrición en reproductores macho de camarón rojo del Caribe (*Farfantepenaeus brasiliensis*).

### **4.2 Objetivos particulares**

- Evaluar la calidad espermática en reproductores macho de camarón rojo del Caribe (*F. brasiliensis*).
- Caracterizar los hemocitos (Hialinos, semigranulosos y granulosos) en reproductores macho de camarón rojo del Caribe (*F. brasiliensis*).
- Evaluar la profenoloxidasa (proFO) en células sanguíneas (hemocitos) en reproductores macho de camarón rojo del Caribe (*F. brasiliensis*).
- Evaluar colesterol, glucosa, proteína total y triglicéridos en el plasma en reproductores macho de camarón rojo del Caribe (*F. brasiliensis*).

## 5. Material y Métodos.

### 5.1 *Animales y diseño experimental.*

Los reproductores de camarón rojo del Caribe que se utilizaron para el experimento se obtuvieron del Laboratorio de Reproducción de Camarón y Área de Engorda de Camarón ubicados dentro de las instalaciones de la Unidad Académica Yucatán, Facultad de Ciencias, Sisal (**Figuras 3 y 4**).



**Figura 3.** Unidad Académica Yucatán, UNAM (Foto: Morones, 2021).



**Figura 4.** Laboratorio de Reproducción de Camarón, UNAM-Yucatán (Foto: Morones, 2021).

Los reproductores macho de *F. brasiliensis* (F1) fueron obtenidos por reproducción en cautiverio de organismos silvestres siguiendo la metodología descrita por Gaxiola *et al.* (2010) y Magaña-Gallegos *et al.* (2018). El experimento se llevó a cabo en el Iglú de Camarón ubicado dentro de las instalaciones de la Unidad Académica Yucatán, Sisal. Un total de 90 camarones machos de camarón rojo del Caribe con un peso promedio de 15 g. fueron trasladados al Iglú de Camarón una semana antes del inicio del experimento para su aclimatación al sistema experimental (**Figura 5**).



**Figura 5.** Iglú de Cría Larvaria de Camarón, UNAM-Yucatán (Foto: Morones, 2021).

En total se utilizaron 4 tratamientos: Basal (Control), A, B y C. La designación de los tratamientos se realizó de manera aleatoria, se asignaron tres tinas por cada tratamiento, con 6 animales por tina. La duración del periodo experimental fue de 30 días. Se formuló un alimento para contener 42% proteína, 11% lípidos y 32% carbohidratos, la cual se combinó con tres niveles de vitamina C (ROVIMIX® STAY-C® 35): 0.035 (700 UI por cada 100 g), 0.07 (1400 UI por cada 100 g) y 0.105 (2100 UI por cada 100 g). Para su confección, las harinas fueron primeramente tamizados a un tamaño de partícula de 250  $\mu\text{m}$ , posteriormente los ingredientes se mezclaron en el siguiente orden: 1) Ingredientes secos por 15 minutos; 2) Mezcla de aminoácidos por 10 minutos; 3) Aceites por 10 minutos; 4) Aglutinante por 10 minutos. Para mezclar los ingredientes se utilizó una mezcladora convencional (Blazer-Modelo SSD-20<sup>a</sup>). Para la elaboración de los pellets se utilizó un molino convencional para moler carne (Torrey M-22 R), con un cedazo de tamaño de poro de 2.4  $\mu\text{m}$ . Los pellets se secaron en una estufa a 60°C por 18 horas, posteriormente

fueron almacenados a una temperatura de 4°C hasta su utilización. La formulación de las dietas se observa en el siguiente cuadro (**Cuadro 3**).

<i><b>Ingrediente</b></i>	<b>Basal</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Harina de Sardina <sup>a</sup>	40.45	40.45	40.45	40.45
Harina de Calamar <sup>a</sup>	4.6	4.6	4.6	4.6
Harina de Trigo <sup>b</sup>	18	17.9	17.8	17.7
Suero de Leche <sup>d</sup>	12	12	12	12
Concentrado Proteico de Soya <sup>e</sup>	10	10	10	10
Levadura de Cerveza <sup>f</sup>	5	5	5	5
Aceite de pescado <sup>a</sup>	4	4	4	4
Lecitina de Soya <sup>g</sup>	2	2	2	2
Mezcla Aminoácidos <sup>c i</sup>	2.35	2.35	2.35	2.35
ROVIMIX® PREMIX <sup>c</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
ROVIMIX® STAY-C® 35 <sup>c</sup>	0	0.1	0.2	0.3
Alginato de Sodio <sup>h</sup>	1.5	1.5	1.5	1.5

<sup>a</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V. Jalisco, MX. <sup>b</sup>Casa Santos Lugo S.A. de C.V. Mérida, MX. <sup>c</sup>DMS Nutritional Products México S.A. de C. V. <sup>d</sup>Ralco Agriculture. <sup>e</sup>Invivo Mix de México S.A. de C.V. Jalisco, MX. <sup>f</sup>Comercializadora MEXPORT S.A. de C.V. Estado de México, MX. <sup>g</sup>Proteínas y Oleicos S.A. de C.V., Mérida, Yucatán, MX. <sup>h</sup>Productos de Comercialización S.A. de C.V. <sup>i</sup>Lisina + leucina + hidroxiprolina.

Los camarones fueron alimentados cuatro veces por día (9:00, 12:00, 16:00 y 19:00 horas) a razón del 4% de la biomasa total por tina en cada alimentación. El alimento no consumido se retiró 1 hora después de cada alimentación.

La proteína se determinó con un analizador elemental (Costech ECS-4010), el nitrógeno fue convertido a proteína usando un factor de conversión de 6.38. Los lípidos totales se determinaron por el método de Goldfish (Nielsen & Carpenter, 2017), se usó hexano como solvente. La humedad se calculó con una balanza eléctrica marca Ohaus (MB45). Las cenizas se calcularon por combustión a 550 °C



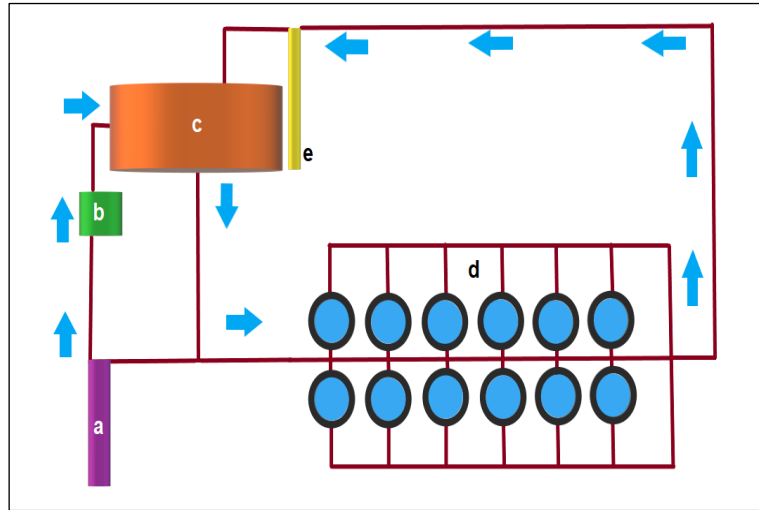
por 6 horas en una mufla (AOAC, 1997). El contenido energético de las dietas se midió en una bomba calorimétrica (PARR, Moline, IL, USA).

La concentración de vitamina C en el producto purificado (ROVIMIX® Stay-C® 35, L-ascorbato 2-monofosfato), la premezcla de vitaminas (ROVIMIX® premezcla para camarones) y las dietas se calculó de acuerdo con la metodología descrita por Zeng, Martinuzz & MacGregor (2005). Se transfirió una muestra de 10 mg de producto purificado y 30 mg de premezcla y dietas a un matraz marrón calibrado de 50 ml y se añadieron 50 ml de metanol de grado HPLC (9093-03, SIGMA). A continuación, el matraz se colocó en vibración ultrasónica durante 40 minutos a 24°C. Se filtró la mezcla a través de una membrana de nailon de 0.45 µm de tamaño de poro (Z290815, SIGMA). Las muestras se midieron a 245 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ND-ONE-W, ThermoFisher Scientific). Se utilizó una curva de L-ascorbil-2-fosfato de sodio (49752, SIGMA) para calcular la concentración de vitamina C. La composición proximal de las dietas experimentales se observa en el siguiente cuadro (**Cuadro 4**).

<b>Cuadro 4.</b> Composición proximal de las dietas experimentales (% peso seco).				
<b><i>Análisis proximal</i></b>	<b>Basal</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Humedad	6.27	8.57	8.26	8.33
Proteína	42.0	42.0	42.0	42.0
Lípidos	11.61	11.24	11.79	11.03
Concentración de vitamina C	0.33	0.44	0.48	0.53
Cenizas	14.28	14.30	14.43	14.54
Carbohidratos totales <sup>a</sup>	32.19	32.46	31.78	32.43
Energía (kJ)	18.0	18.0	18.0	18.0

<sup>a</sup>Carbohidratos totales = 100 - (proteína + lípidos + cenizas).

Se utilizó un sistema de recirculación para llevar a cabo el experimento, el cual estuvo compuesto por 12 tinas circulares (0.63 m<sup>2</sup>) con capacidad de 500 L, un espumador fabricado en la Unidad Académica Yucatán, un reservorio de 1000 L de capacidad, un filtro biológico (Bioballs-Anillos de cerámica) (Resun EF-1600) y un filtro ultravioleta (Purikor R-PLAT18) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Flujo del agua dentro del sistema de recirculación: a) filtro ultravioleta, b) filtro biológico, c) reservorio de 1,000 L, d) tinas, e) espumador (Morones, 2021).

Se utilizó una bomba de agua (Pentair WF-26) con 1.5 HP de potencia, pero el flujo de agua en cada tina se ajustó a 2.2 L/minuto a través de una tubería de 2 pulgadas de diámetro, para lograr lo anterior se utilizó una llave de retorno al reservorio que permitió ajustar el flujo de agua en el sistema. La aireación se suplió a través de piedras difusoras utilizando un soplador eléctrico (Baldor 3710) con 1.5 HP de

potencia. Las tinas fueron cubiertas con malla plástica (luz de malla 5 mm) para evitar el escape de los camarones durante el experimento (**Figura 7**).



**Figura 7.** Sistema experimental de recirculación, UNAM-Yucatán (Foto: Morones, 2021).

La temperatura del agua del sistema de recirculación se mantuvo a través de la regulación ambiental de temperatura (26 °C) del iglú con aires acondicionados. La temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/L) se monitorearon con un oxímetro (YSI Pro-20) dos veces al día. La salinidad (ups) se midió dos veces al día con un refractómetro (Marine Sources) y el pH se monitoreó una vez al día con un potenciómetro (Ohaus Starter 3100). Amonio y nitrito (mg/L) se midieron una vez por semana, con el método de azul de indofenol (Hernández & Vargas, 2003) y diazotación (Rodier, 1981), respectivamente. El fotoperiodo consistió en 12:12 horas (Luz-oscuridad). Las variables fisicoquímicas del agua evaluadas durante el periodo experimental se muestran en el siguiente cuadro (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5.** Valores de las variables fisicoquímicas del agua (Media  $\pm$  desviación estándar, DE) durante el cultivo de los reproductores macho de camarón rojo del Caribe, dentro del sistema de recirculación de agua durante 30 días.

Variable	Valor
Temperatura (°C)	26.3 $\pm$ 1.00
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.05 $\pm$ 0.20
pH	8.01 $\pm$ 0.09
Salinidad (ups)	34 $\pm$ 0
NH <sup>+</sup> <sub>4</sub> (mg/L)	0.065 $\pm$ 0.13
NO <sup>-</sup> <sub>2</sub> (mg/L)	0.42 $\pm$ 0.44

### ***5.2 Conteo de espermatozoides, bioquímica de hemolinfa y sistema inmune.***

Al inicio del periodo experimental, se realizó un conteo espermático y análisis de indicadores sanguíneos de 10 camarones al azar en estadio C de muda con la finalidad de contar con una línea base. Por otro lado, al final del periodo experimental se realizó un conteo espermático y análisis de indicadores sanguíneos de la hemolinfa de 4 camarones por contenedor al azar en estadio C de muda.

Para la obtención de hemolinfa y espermátóforo, los camarones fueron sedados por un descenso en la temperatura del agua de 26 a 15°C por 20 minutos (Ross & Ross, 2008) y con una jeringa de 3 mL, previamente cargada con SIC-EDTA, se obtuvo la hemolinfa por punción a través de la arteria abdominal. Inmediatamente, se insensibilizaron a los animales por un corte del cordón nervioso central a la altura del seno ventrolateral del abdomen y posteriormente se realizó la matanza de los organismos con otro corte en el cefalotórax, dorsal al corazón, con unas tijeras de disección. Posteriormente, se retiró el ámpula terminal, la cual se pesó y suspendió en un tubo eppendorf con 1 mL de agua libre de calcio para realizar el conteo de células espermáticas.

Para realizar el conteo de células espermáticas, el espermatóforo se homogeneizó en solución salina libre de calcio, posteriormente se tiñeron con solución trypan blue al 0.1% en solución salina libre de calcio. Para realizar el conteo se utilizó un microscopio óptico compuesto (AmScope B100B-MS 4x,10x,40x,100x) y una cámara Neubauer (Brand). El criterio de caracterización de espermatozoides normales, anormales y muertos fue de acuerdo con la metodología descrita por Leung-Trujillo & Lawrence (1987) y Ramos *et al.* (1994).

Para el conteo y caracterización de hemocitos, se suspendió 20 µL de hemolinfa en 0.2 mL de solución alsever (1:10). Para realizar el conteo se utilizó un microscopio óptico compuesto (AmScope B100B-MS 4x,10x,40x,100x) y una cámara Neubauer (Brand) (Rosas *et al.*, 2007).

Para la evaluación de la bioquímica en la hemolinfa, se suspendió 0.2 mL de hemolinfa en 0.4 mL de SIC EDTA, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos en una centrífuga (Eppendorf AG 5428). Posteriormente el plasma se retiró (0.55 mL) y se utilizó para evaluar proteínas totales por el método de Bradford (1976), la concentración de proteínas totales se determinó mediante una curva de albúmina sérica a 590 nm. Colesterol, glucosa y triglicéridos se evaluaron con un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (ELITechGroup).

En el paquete celular restante, se adicionaron 0.55 mL de ácido cacodílico y se incubó por 5 minutos, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm a 4°C. La actividad de la enzima profenoloxidasa se evaluó de acuerdo con la

metodología descrita por Hernández-López (2001). En una microplaca se colocaron 10 µL de muestra y 0.25 mL de L-DOPA (D9628-SIGMA) suspendida en agua destilada (3 mg/mL) y, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leyó a 490 nm. En una segunda microplaca se colocó 10 µL y 10 tripsina bovina (T8003-SIGMA) suspendida en agua destilada (1 mg/mL), se incubó por 10 minutos, posteriormente se agregó 0.25 mL de L-DOPA y se incubó nuevamente por 20 minutos, posteriormente se leyó a 490 nm. La profenoloxidasas se calculó por la diferencia de la placa 2 (fenoloxidasas total) menos la placa 1 (fenoloxidasas).

### **5.3 Supervivencia.**

Al final del experimento se obtuvo el porcentaje de supervivencia (S) por tratamiento:  $S = (n^{\circ} \text{organismos finales} / n^{\circ} \text{organismos iniciales}) * 100$ .

### **5.4 Análisis estadístico.**

Los resultados fueron expresados de acuerdo con su media aritmética y error estándar. Los resultados se analizaron utilizando un ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ), cuando el ANOVA de una vía resulte significativo, se utilizó la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Previo al análisis estadístico se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza de los residuales utilizando las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y Bartlett, respectivamente.

## 6. Resultados.

### 6.1 Supervivencia

Los valores de la supervivencia de los reproductores macho de camarón rojo del Caribe obtenidos al final del experimento se muestran en el **Cuadro 6**. El tratamiento B presentó una supervivencia de 94.4%, mientras que en el resto de los tratamientos no se presentó mortalidad.

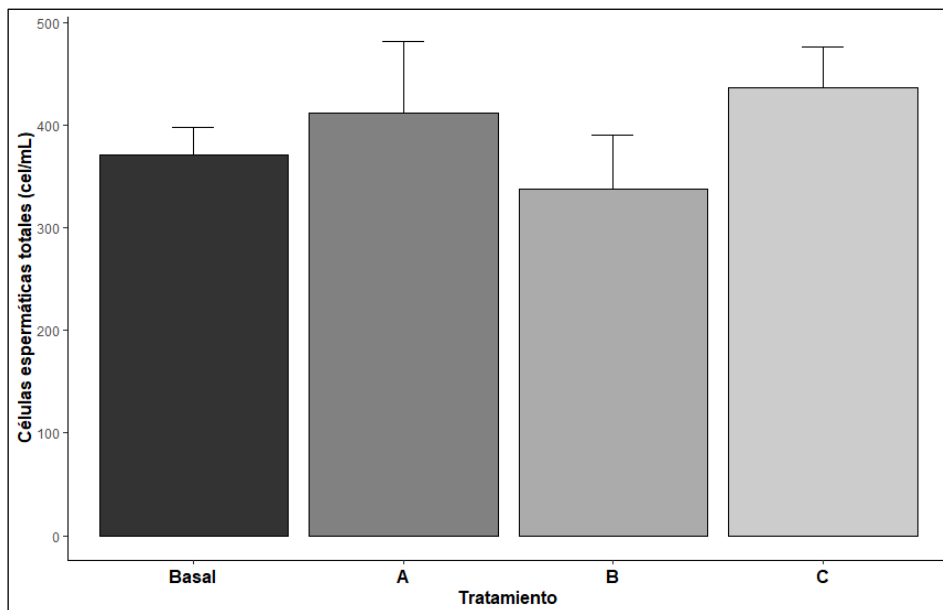
<b>Cuadro 6.</b> Supervivencia (%) de los reproductores macho de camarón rojo del Caribe alimentados con diferente nivel de inclusión de vitamina C.	
<b>Tratamiento</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
Basal	100 <sup>a</sup>
A	100 <sup>a</sup>
B	94.4 <sup>a</sup>
C	100 <sup>a</sup>

\*Valores con diferente superíndice por columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

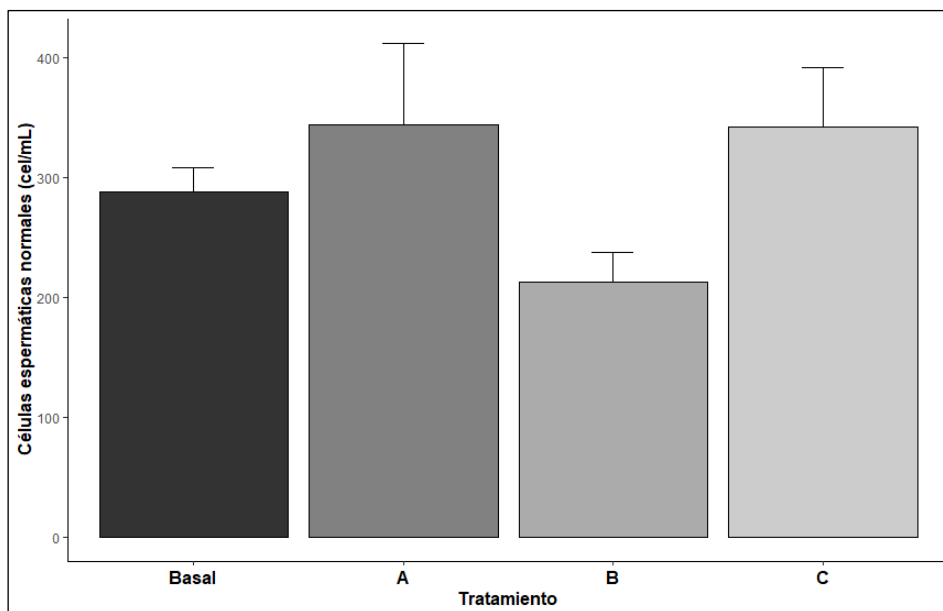
### 6.2 Calidad espermática.

La concentración total de células espermáticas y la caracterización de estas (normales, anormales y muertas), no presentaron diferencias entre los reproductores macho de camarón rojo del Caribe alimentados con los diferentes niveles de vitamina C en la dieta ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observaron patrones en la concentración de las células espermáticas en los diferentes tratamientos. La concentración total de células espermáticas, así como la concentración de células normales, anormales y muertas fue numéricamente menor en los organismos alimentados con la dieta B, mientras que aquellos organismos alimentados con la

dieta C, presentaron numéricamente un mayor contenido de células espermáticas totales, células normales, anormales y muertas ( $p > 0.05$ ) (Figura 8, 9, 10, 11).

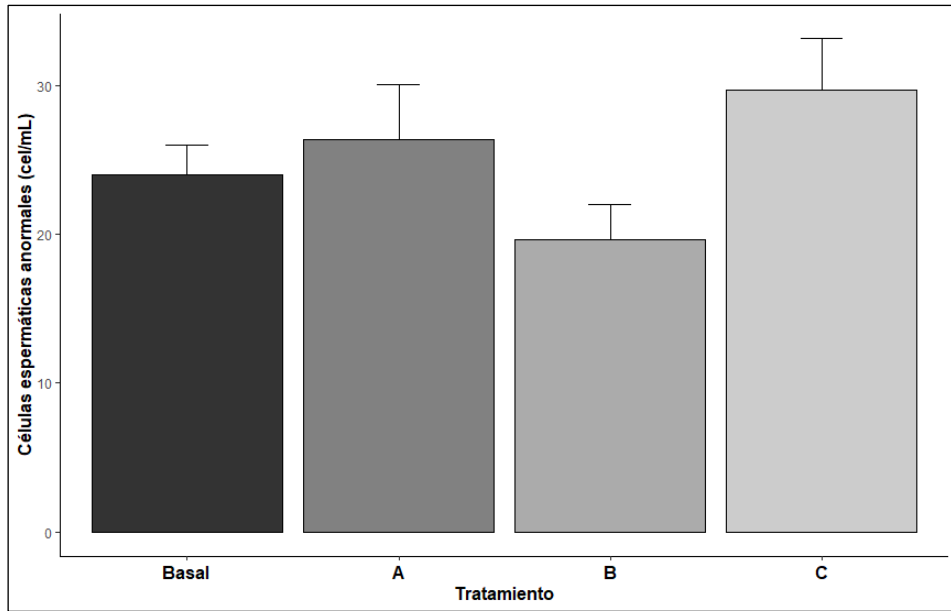


**Figura 8.** Concentración de células espermáticas totales (media  $\pm$  ES,  $n = 3$ ) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.

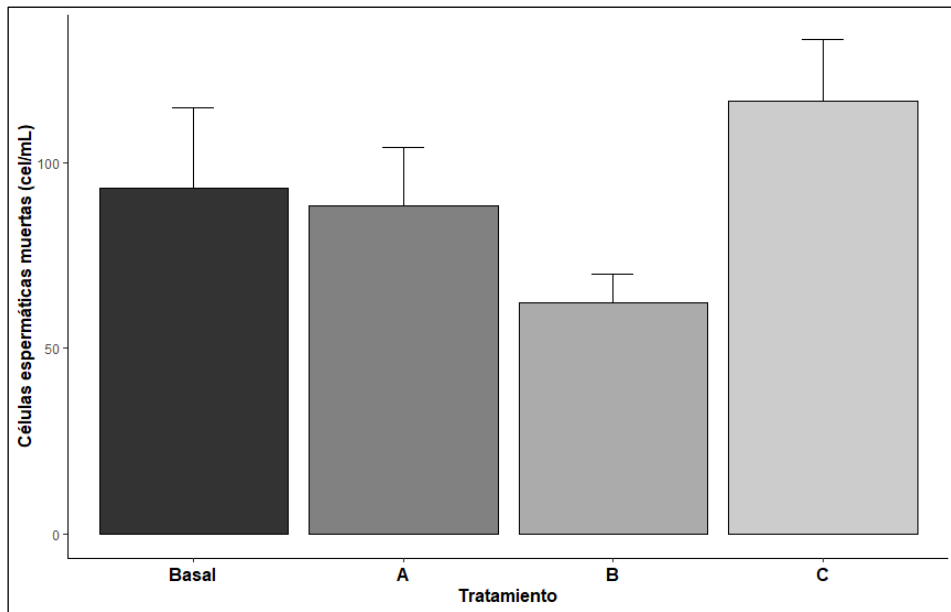


**Figura 9.** Concentración de células espermáticas normales (media  $\pm$  ES,  $n = 3$ ) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.





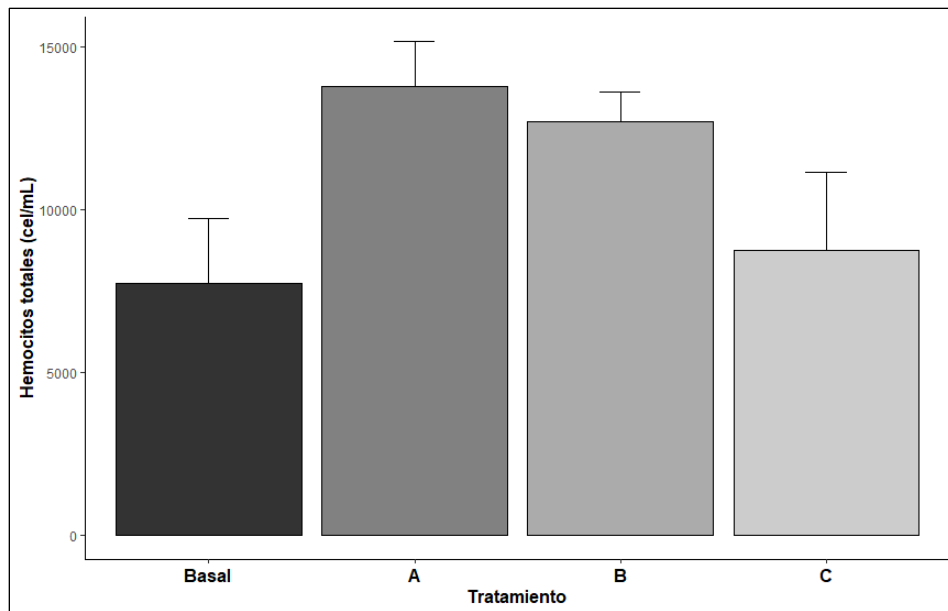
**Figura 10.** Concentración de células espermáticas anormales (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.



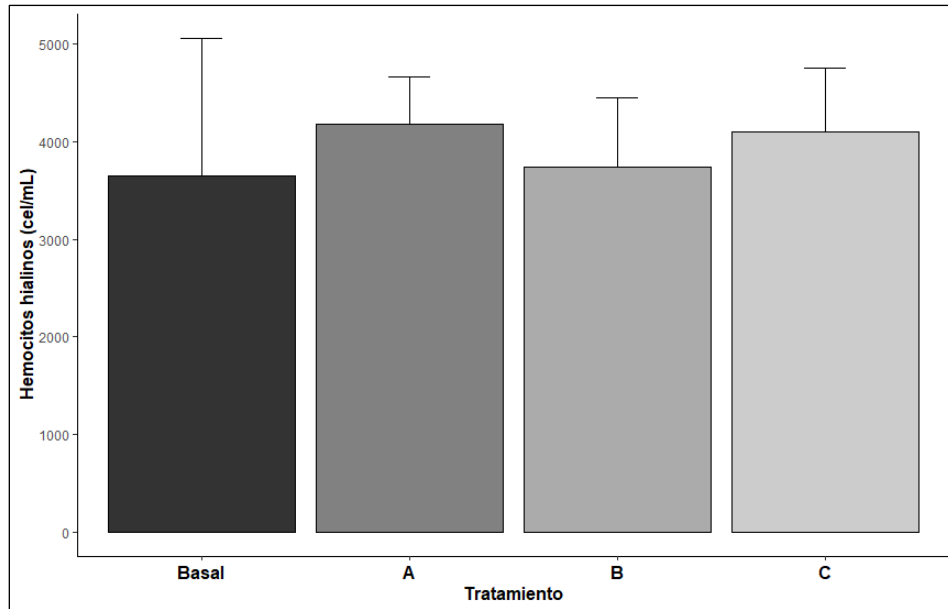
**Figura 11.** Concentración de células espermáticas muertas (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.

### 6.3 Caracterización de hemocitos.

La concentración celular total de hemocitos en hemolinfa y de hemocitos hialinos, no presentó diferencias estadísticas en reproductores macho de camarón rojo del Caribe alimentados con diferente nivel de inclusión de vitamina C en la dieta ( $p > 0.05$ ) (**Figura 12 y 13**).

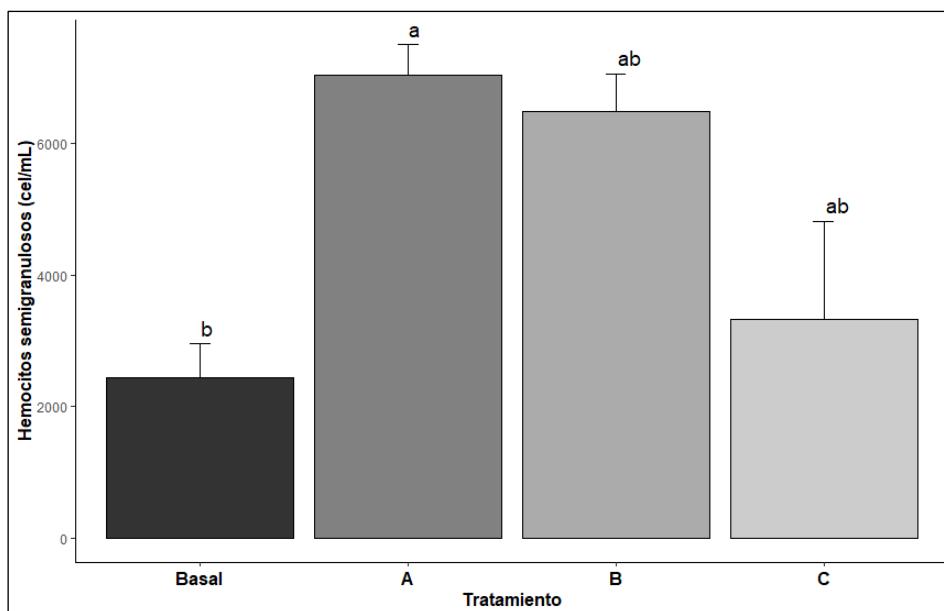


**Figura 12.** Concentración de hemocitos totales (media  $\pm$  ES,  $n = 3$ ) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.



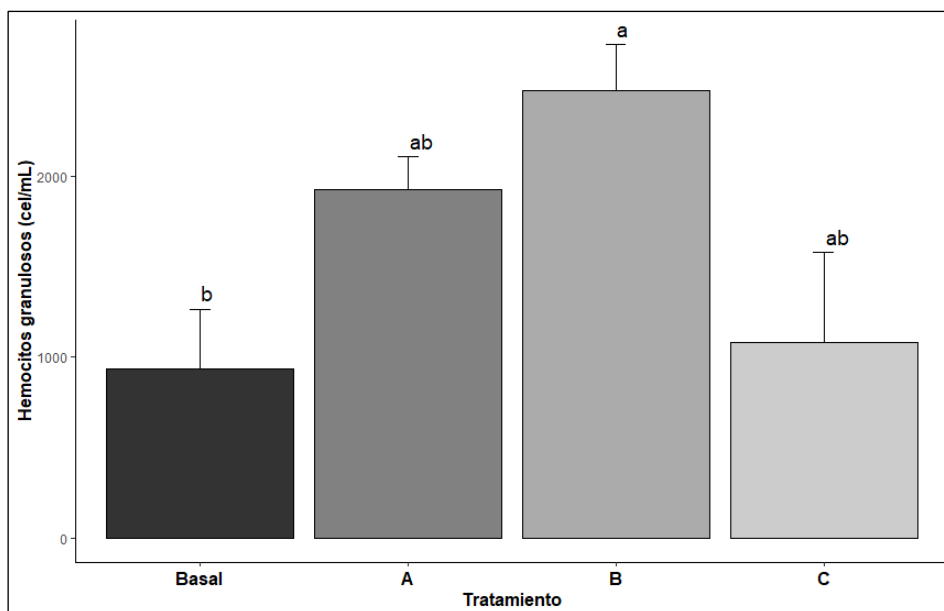
**Figura 13.** Concentración de hemocitos hialinos (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.

Sin embargo, la concentración de hemocitos semigranulosos y granulosos difirió entre tratamientos. En hemocitos semigranulosos, la mayor concentración celular se registró en el tratamiento A, mientras que la menor concentración se registró en el tratamiento Basal ( $p < 0.05$ ). La concentración de hemocitos semigranulosos en los tratamientos B y C fueron similares a los valores de concentración registrados en los tratamientos A y basal ( $p < 0.05$ ) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Concentración de hemocitos semigranulosos (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

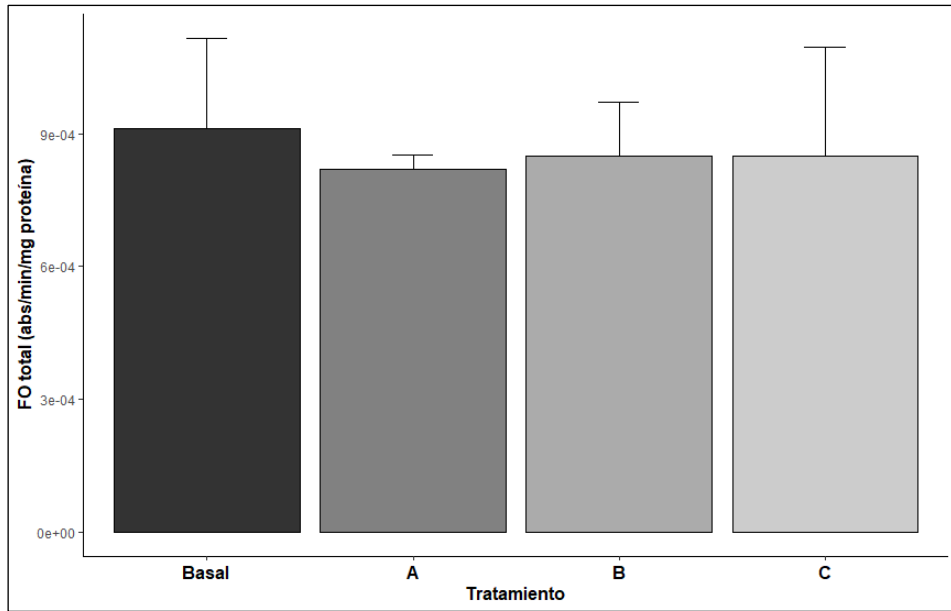
Por otra parte, en hemocitos granulosos, la mayor concentración celular se presentó en el tratamiento B, mientras que la menor concentración celular se presentó en el tratamiento Basal ( $p < 0.05$ ). La concentración de hemocitos granulosos en los tratamientos A y C presentaron valores de concentración similares a los tratamientos Basal y B ( $p > 0.05$ ) (**Figura 15**).



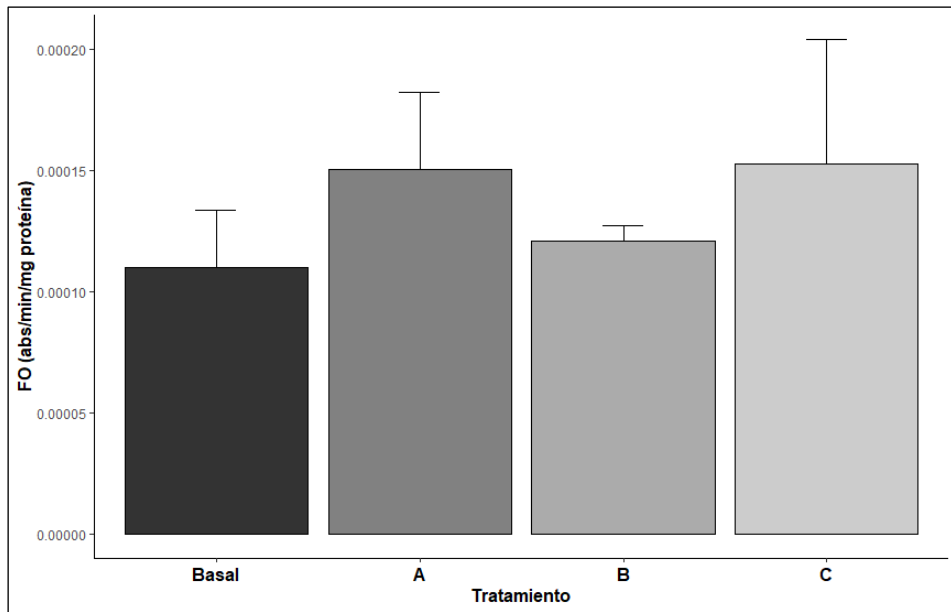
**Figura 15.** Concentración de hemocitos granulosos (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

#### **6.4 Indicadores nutricionales e inmunológicos en hemolinfa.**

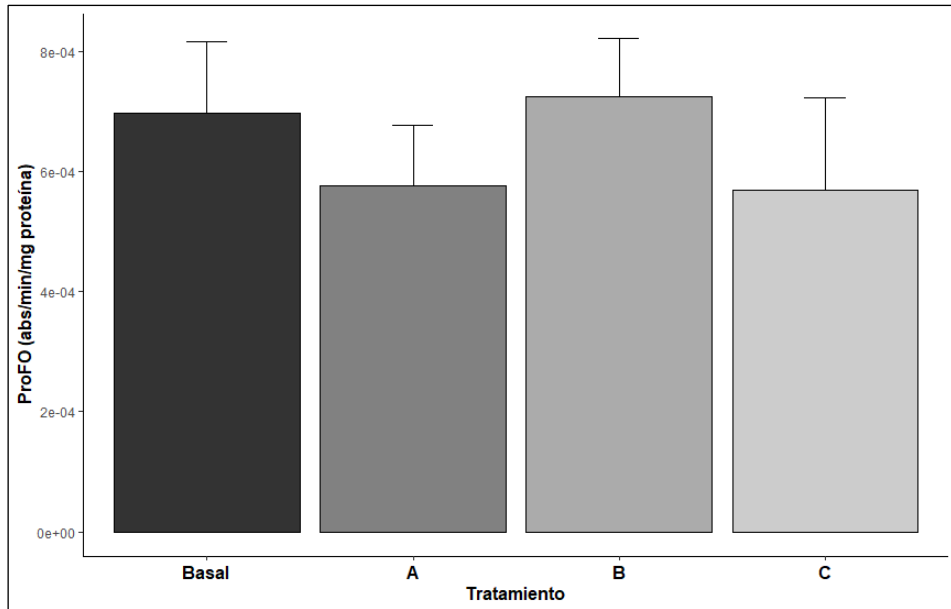
La concentración de glucosa, FO total, FO y ProFO en hemolinfa no presentó diferencias estadísticamente en los reproductores macho de camarón rojo del Caribe alimentado con diferente inclusión de vitamina C en la dieta ( $p > 0.05$ ) (Figura 16, 17, 18 y 19).



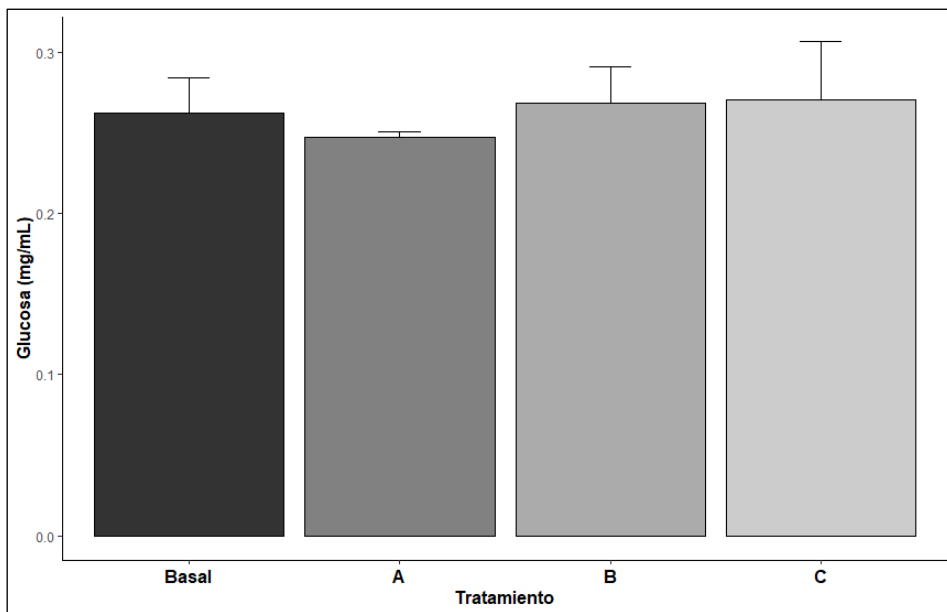
**Figura 16.** Concentración de FO total en hemolinfa (media  $\pm$  ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C.



**Figura 17.** Concentración de FO en hemolinfa (media  $\pm$  ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C.

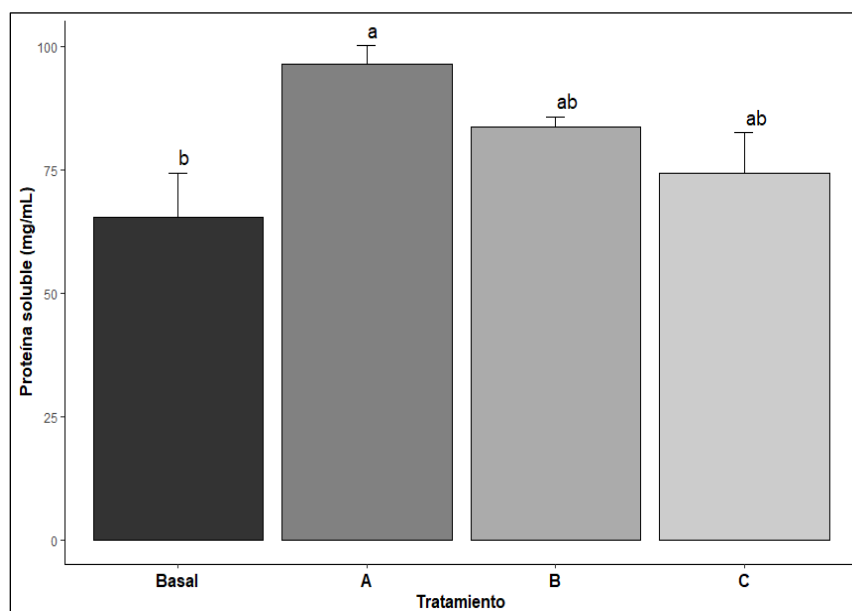


**Figura 18.** Concentración de proFO en hemolinfa (media  $\pm$  ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C.



**Figura 19.** Concentración de glucosa en hemolinfa (media  $\pm$  ES, n = 3) de reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C.

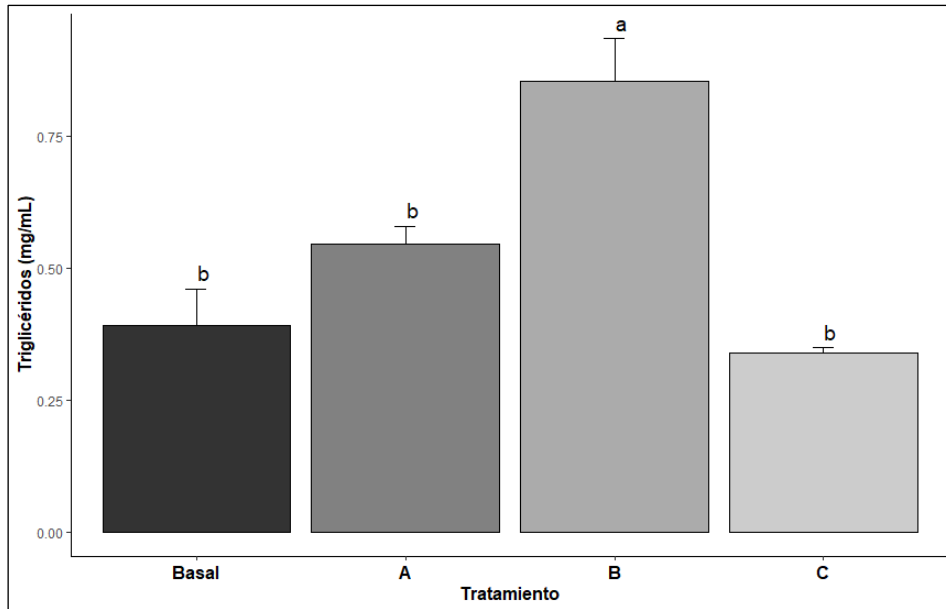
Por otro lado, la concentración de proteínas solubles en hemolinfa difirió entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). La mayor concentración de proteína soluble se registró en el tratamiento A, mientras que los valores más bajos de este nutriente se registraron en el tratamiento Basal ( $p < 0.05$ ). La concentración de proteína soluble para los tratamientos B y C fue similar a los tratamientos A y Basal ( $p > 0.05$ ) (**Figura 20**).



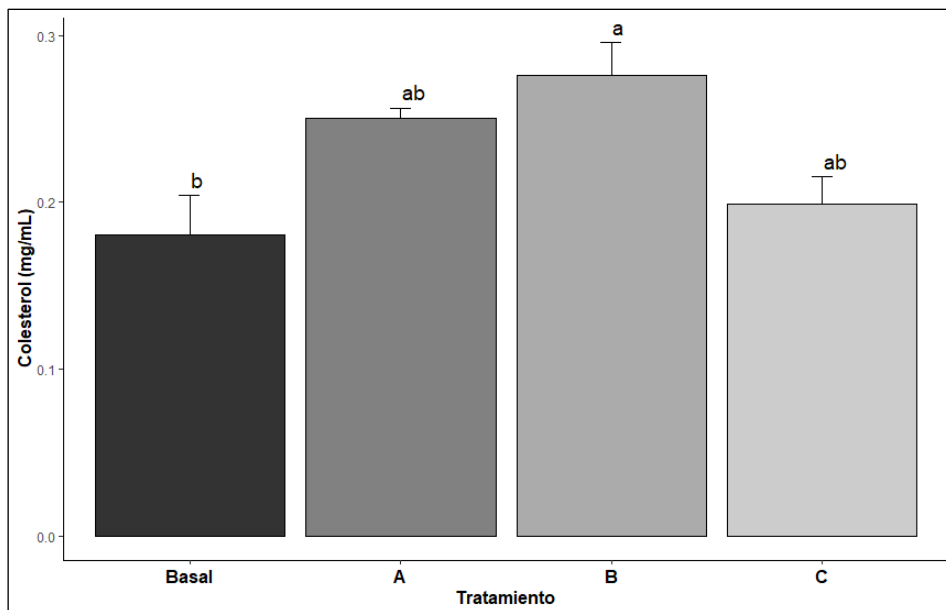
**Figura 20.** Concentración de proteína soluble en hemolinfa (media  $\pm$  ES,  $n = 3$ ) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

La concentración de colesterol y triglicéridos en hemolinfa difirió entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). El comportamiento de estos nutrientes fue similar, su concentración incrementó con la concentración de vitamina C en el alimento y descendió en aquellos organismos alimentados con la dieta C. La mayor concentración de triglicéridos y colesterol en hemolinfa se registró en tratamiento B, mientras que en el resto de los tratamientos fueron estadísticamente similares entre sí (**Figura 21 y 22**).





**Figura 21.** Concentración de triglicéridos (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos.



**Figura 22.** Concentración de colesterol (media  $\pm$  ES, n = 3) en reproductores machos de camarón rojo del Caribe alimentados con diferentes niveles de inclusión de vitamina C. Columnas con diferente superíndice indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

## 7. Discusión

Estudios previos sobre reproducción en camarones peneidos han pasado por alto la importancia de la nutrición en la calidad reproductiva de los machos (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003).

El estudio del efecto antioxidante de la vitamina C sobre la calidad espermática en camarones peneidos no había sido de interés anteriormente. Sin embargo, en algunos peces, como en la perca amarilla (*Perca flavescens*) se encontró que la inclusión de vitamina C mejoró la calidad espermática produciendo mayores tasas de fertilización (Lee & Dabrowski, 2004). En tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) niveles entre 599 - 942 mg/kg de vitamina C mejoró la calidad espermática y el rendimiento reproductivo (Sarmiento *et al.*, 2016). Por otro lado, en el pez dorado (*Carassius auratus*) la inclusión de vitamina C en el alimento mejoró el porcentaje de motilidad espermática (Hanaee *et al.*, 2011). En el presente estudio, el incremento en la concentración de vitamina C en el alimento no afectó la cantidad y calidad espermática en los machos de camarón rojo del Caribe (**Figuras 8, 9, 10 y 11**). Lo anterior sugiere que la concentración de vitamina C en la dieta basal es adecuada para los reproductores machos de camarón rojo del Caribe. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que la ausencia de un efecto de la vitamina C sobre la calidad espermática en *F. brasiliensis* en este estudio pudo ser resultado de una limitada concentración de este nutriente en la dieta.

Se ha demostrado que la vitamina C, además de funcionar como un potente agente antioxidante (Block & Langseth 1994; Morel & Barouki 1999), actúa como inmunoestimulante en peces y crustáceos (Merchie, Lavens & Sorgeloos, 1997; Lee

& Shiau 2002; Maggioni *et al.* 2004). En este estudio, la concentración de hemocitos semigranulosos y granulosos incrementó en los tratamientos A, B y C, este incremento celular podría estar asociado a un efecto inmunoestimulante por parte de la vitamina C. Similar al presente estudio, Lee & Shiau (2002) reportaron un incremento en la concentración total de hemocitos en *Penaeus monodon* al suministrar vitamina C en el alimento respecto a una dieta control desprovista de vitamina C. En otro estudio, Asaikkutti *et al.*, (2016) reportaron un incremento en el conteo total y diferencial de hemocitos en *M. malcolmsonii* alimentados con vitamina C en la dieta en comparación con una dieta libre de vitamina C.

El sistema fenoloxidasa es un mecanismo de defensa inmunológica, clave en la melanización, el cual se encuentra almacenado en el interior de los gránulos en los hemocitos semigranulosos y granulosos (Bauchau, 1981; Hose *et al.*, 1990; Söderhäll & Cerenius, 1992; Gargioni & Barracco, 1998). En el presente estudio, el sistema fenoloxidasa (FO, FO total y proFO) no difirió entre los distintos tratamientos a pesar de que la concentración de hemocitos semigranulosos y granulosos fue mayor en los tratamientos A y B respecto al resto (Basal y C) (**Figuras 14 y 15**). La relación entre la cantidad de células sanguíneas (hemocitos semigranulosos y granulosos) y el sistema profenoloxidasa no siempre presenta un comportamiento lineal en camarones peneidos (Sánchez *et al.*, 2001, Pascual *et al.*, 2003). Pascual *et al.*, (2003) mencionan que esta relación no lineal se encuentra asociada a una migración de hemocitos hacia los diferentes tejidos como una respuesta humoral a la presencia de un agente patógeno, dejando una relación no proporcional y/o lineal entre los hemocitos y el sistema fenoloxidasa. Lo anterior posiblemente explique la

relación no lineal entre las células sanguíneas y sistema fenoloxidasa reportados en este estudio.

Indicadores bioquímicos en la hemolinfa tales como proteína soluble, glucosa, triglicéridos y colesterol pueden reflejar el estado fisiológico y nutricional de los camarones (Rosas *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2003; Lee & Shiau 2003; López *et al.* 2003). Las proteínas y péptidos antimicrobianos juegan un papel importante en los mecanismos de defensa contra agentes extraños en los crustáceos (Fredrick & Ravichandran, 2012). Rodríguez & Le Moullac (2000) reportaron una alta correlación entre el nivel de proteína y el estado inmunológico de los camarones, concluyendo que los niveles de proteína podrían ser utilizados como un fuerte indicador del estado de salud de los camarones. En el presente estudio, la concentración de proteína soluble incrementó en los tratamientos A, B y C respecto al tratamiento basal (**Figura 20**). Lo anterior podría deberse al efecto inmunoestimulante que provocó la inclusión de vitamina C en las dietas, incrementando la concentración de proteína y péptidos antimicrobianos presentes en hemolinfa.

De acuerdo con Mourente *et al.*, (1994) los triglicéridos son la mayor fuente de energía y representan la molécula de almacenamiento de esta en camarones. La vitamina C es necesaria para la actividad máxima de dos enzimas dioxigenasas necesarias para la biosíntesis de la L-carnitina (Rebouche, 1999). La carnitina es esencial para el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria para su  $\beta$ -oxidación (Levine *et al.*, 1996; Burri & Jacob, 1997). En el presente estudio, la concentración de triglicéridos en hemolinfa de los reproductores de camarón del

Caribe del tratamiento B registraron los valores más altos entre los tratamientos (**Figura 21**). Lo anterior podría deberse a que la concentración de vitamina C del tratamiento B desencadenó una estimulación en la síntesis de carnitina, siendo este aminoácido responsable de aumentar la movilización de triglicéridos hacia los diferentes tejidos. Se sugiere realizar otro experimento donde también se evalúe los niveles de carnitina con las distintas concentraciones de vitamina C en la dieta.

El colesterol es esencial para los camarones peneidos debido a que es un precursor de hormonas esteroideas y de muda (Teshima, 1997). Sin embargo, estos organismos no son capaces de sintetizar colesterol a partir del acetato como los vertebrados (Kumar *et al.* 2018). En este estudio, la concentración de colesterol en plasma incrementó con la inclusión de vitamina C en el alimento (**Figura 22**). La relación entre la vitamina C y el metabolismo del colesterol no es muy clara en los camarones peneidos (NRC, 2011). Sin embargo, en vertebrados acuáticos como la trucha arcoíris, se ha sugerido que la absorción del colesterol es dependiente de la vitamina C en el alimento (Deng *et al.* 2019). En este estudio, el incremento del colesterol en el plasma pudo deberse a dos causas: 1) El incremento de vitamina C mejoró la absorción del colesterol; 2) El incremento de vitamina C afectó negativamente el catabolismo del colesterol. Se sugiere realizar futuras investigaciones sobre el efecto de la vitamina C en el metabolismo del colesterol.

## 8. Conclusiones

- El conteo total y caracterización de las células espermáticas en reproductores macho de camarón rojo del Caribe fue similar en todos los tratamientos, indicando que un incremento en la concentración de vitamina C en el alimento no mejoró la calidad espermática.
- La vitamina C desempeñó un papel inmunoestimulante aumentando la concentración de hemocitos semigranulosos (A), hemocitos granulosos (B) y proteína soluble (A).
- La vitamina C afectó el metabolismo de los lípidos. Aparentemente mejoró el catabolismo de los triglicéridos, sin embargo, no es muy claro el efecto de esta vitamina sobre el metabolismo del colesterol.
- El camarón rojo del Caribe es una especie con potencial para la acuicultura, se sugiere seguir realizando investigaciones sobre la calidad reproductiva de machos para lograr obtener la tecnología óptima para su cultivo.

## 9. Referencias

1. Alava, V.R., Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S. Effect of dietary L-ascorbyl-2-phosphate magnesium on gonadal maturation of *Penaeus japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi. 1993a; 59, 691–696.
2. Alava, V.R., Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S. Effect of dietary vitamins A, E and C on ovarian development of *Penaeus japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi. 1993b; 59, 1235–1241.
3. Alfaro, J., Lawrence, A., Lewis, D. Interaction of bacteria and male reproductive system blackening disease of captive *Penaeus setiferus*. Aquac. 1993; 117:1–8.
4. Alfaro-Montoya, J. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (Open thelyca penaeoid shrimps): A review. Aquaculture. 2010; 300(1-9).
5. Andrews, J. W., Sick, L. V., B. G. J. The influence of dietary proteins and energy levels on growth and survival of penaeid shrimp. Aquaculture. 1972; 1, 341-347.
6. Anguiano, O. Algunos aspectos preliminares del potencial del camarón rojo del caribe mexicano *Farfantepenaeus brasiliensis* (maduración, desarrollo larval, y engorda) [tesis de licenciatura]. Campeche (MX), Universidad Autónoma del Carmen; 1999.
7. Arévalo, L.M. Prácticas para la “Reproducción de camarón”. In: Manual de prácticas para estudiantes del bachillerato con Especialidad en Acuicultura. UNAM-CETMAR. 2008.

8. Arévalo L. Avaliação reprodutiva de machos de camarão rosa *Farfantepenaeus duorarum* cultivados em sistema BFT “Bio-Floc Technology” [tesis de maestría]. FURG, Brasil; 2010.
9. Arreguín-Sánchez, F. Diagnósis de la pesquería de camarón rojo (*Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817) de Contoy, Quintana Roo. An. Esc. Nal. Cienc. Biol., México. 1981; 25: 39-77.
10. Asaikkutti, A., Bhavan, P. S., Vimala, K., Karthik, M., Cheruparambath, P. Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant, and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. Aquaculture Reports 3. 2016; 229–236.
11. Aspán, A., Söderhäll, K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activating by an endogenous serine proteinase. Insect Biochemistry. 1991; 21: 363-373.
12. Association of the Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. AOAC. Washington, DC. 1997.
13. Bauchau, A.G. Crustaceans. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (eds.) Invertebrate Blood Cells. v. 2. Academic Press Inc. 1981; pp. 385-420.
14. Block, G. & Langseth, L. Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Technol. 1994; 48, 80–84.
15. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72, 248–254.



16. Braga, A., Nakayama, C., Martins, J., Colares, E., Wasielesky, W. Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendrobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. *Aquaculture*. 2010; 307: 44–48.
17. Braga A., Lopes D., Magalhães V., Klosterhoff M., Romano L., Poersch L., Wasielesky W. Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture*. 2018; 486: 64-67.
18. Brito, R., Chimal, M.E., Rosas, D. Effect of salinity in survival, growth, and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda: penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2000; 244(2), 253-263.
19. Burri, B.J., and Jacob, R.A. Human Metabolism, and the Requirement for Vitamin C, in *Vitamin C in Health and Disease* (Packer, L., and Fuchs, J., eds.). 1997; pp. 341-366, Marcel Dekker, New York.
20. Cahu, C.L., Cuzanand, G., Quazuguel, P. Effect of highly unsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1995; 112, 417–424.
21. Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* 2008; 29: 263-71.
22. Cerenius, L., Söderhäll, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*. 2004; 198: 116-126.

23. Charmantier, G., Soyés, C., Aquacop. Effect of moult stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Ecol. 1994; 178, 223-246.
24. Chowdhury, S., Saikia, S.K. Oxidative stress in fish: a review. J. Sci. Res. 2020; 12 (1), pp. 145-160.
25. CONAPESCA Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Cultivo de camarón, producción acuícola de calidad. 2018.
26. Conklin, D.E. Digestive physiology, and nutrition. In: Biology of the lobster *Homarus americanus*. Academic Press. 1995; 16, 441-463.
27. Cruz, S. Determinación del nivel óptimo de inclusión de proteína en postlarvas de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) cultivados en biofloc y agua clara [tesis de maestría]. Yucatán (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
28. Dabrowski, K. History, present and future of vitamin C research in aquatic organism. In: Dabrowski, K. (Ed.), Vitamin C in Aquatic Organisms Status and Perspectives. CRC Press, Boca Raton, FL. 2001; pp. 255–277.
29. Deng, Jun-Ming; Zhang, Xin-Dang; Zhang, Jian-Wei; Bi, Bao-Liang; Wang, Heng-Zhi; Zhang, Lu; Mi, Hai-Feng. Effects of dietary ascorbic acid levels on cholesterol metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Nutrition. 2019; 00:1–9.
30. Díaz, A., Gimenez, A., Harán, N., Fenucci, J. Reproductive performance of male argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. J. World Aquacult. Soc. 2001; 32: 236–242.

31. Djangmah, J. S. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 1970; 32, 709-731.
32. DOF (Diario Oficial de la Federación). Acuerdo por el que se da a conocer la Actualización de la Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. México. 24 de agosto de 2012.
33. Du, S.B., Hu, C.Q., Shen, Q. Effect of dietary ascorbic acid levels on reproductive performance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), broodstock. *Journal of Shellfish Research.* 2004; 23, 251–255.
34. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.
35. Flor, H., Oshiro, L., Costa, T., Fugimura, M., Rodrigues, F., Mattos, L. Efeito da proporção sexual sobre o desempenho reprodutivo do camarão-rosa *farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda: penaeoidea). *Bol. Inst. Pesca, São Paulo.* 2016; 42(2): 343-351.
36. Fredrick, W.S., Ravichandran, S. Hemolymph proteins in marine crustaceans. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2012; 496-502.
37. Gaxiola, G., Gallardo, P., Simões, N., Cuzon, G. A red shrimp, *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817), larvae feeding regime based on live food. *J World Aquac Soc.* 2010; 41: 402-410.
38. Gargioni, R.; Barracco, M.A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *Journal of Morphology.* 1998; 236: 209-221.

39. Goimier, Y., Pascual, C., Sánchez, A., Gaxiola, G., Sánchez, A., Rosas, C. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 92:193–208.
40. Hanaee, Z., Imanpoor, M., Shabani, A., Gorgin, S. Effect of vitamin C and highly unsaturated fatty acids on sperm quality of goldfish (*Carassius auratus*). *AAFL Bioflux.* 2011; 4 (3):329-333.
41. Harrison, K.E. The role of nutrition in maturation, reproduction, and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 1990; 9 (9), 1–28.
42. Harsij, M., Kanani, H.G., Adineh, H. Effects of antioxidant supplementation (nanoselenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. *Aquaculture.* 2020; 734942.
43. He, H., Lawrence, A. L. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 1993; 114(3-4), 305–316.
44. Hernández-López, J. Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón [tesis de doctorado]. La Paz (MX): Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2001.
45. Hernández-López, J, Vargas-Albores, F. A microplate technique to quantify nutrients (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> and PO<sub>4</sub>) in seawater. *Aquaculture Research*, 2003; 34, 1201–1204.
46. Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999; 284:1313-8.

47. Hose, J.E.; Martin, G.G.; Gerard, A.S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*. 1990; 178: 33-45.
48. Isaac, V. J., Días-Neto, J., Damasceno, F. G. Camarão-rosa da costa norte: biologia e administração pesqueira. IBAMA. Brasília, Brasil. Coleção Meio Ambiente, Série Estudos-Pesca. 1992; 1: 187.
49. Iwai, M. Pesca Exploratória e Estudo Biológico sobre o Camarão na Costa Centro-Sul do Brasil do N/O "Prof. W. Besnard" em 1969-1971. Relatório de Pesquisa, Inst. Oceanogr., São Paulo. 1973.
50. Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhall, K. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 2000; 191, 45-52.
51. Kanost MR, Gorman MJ. Phenoloxidases in insect immunity. In: Beckage NE, editor. *Insect immunology*. San Diego: Academic Press Inc; 2008. p. 69-96.
52. Konigsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. 1a ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2008.
53. Kumar, V., Sinha, A. K., Romano, N., Allen, K. M., Bowman, B. A., Thompson, K. R., & Tidwell, J. H. Metabolism and Nutritive Role of Cholesterol in the Growth, Gonadal Development, and Reproduction of Crustaceans. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 2018; 26(2), 254–273.
54. Lee, K. J., & Dabrowski. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*. 2004; 230(1-4): 377–389.

55. Lee, M.H. & Shiau, S.Y. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 12, 119–129.
56. Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture.* 1987; 65:363 – 370.
57. Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R.W., Washko, P.W., Dhariwal, K.R., Park, J.B., Lazarev, A., Graumlich, J.F., King, J., and Cantilena, L.R. Vitamin C Pharmacokinetics in Healthy Volunteers: Evidence for a Recommended Dietary Allowance, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; USA 93, 3704–3709.
58. Lightner, D.V., Hunter, B., Magarelli, P.C., Jr. and Colvin, L.B. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. World Maricult. Soc.* 1979; 10: 513-528.
59. Lignot, J. H., Cochard, J. C., Soyeux, C., Lemaire, P., Charmantier, G. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture.* 1999; 170, 79-92.
60. Lignot, J. H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture.* 2000; 191, 209-245.
61. López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary 1–3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture.* 2003; 224:223–243

62. Magaña-Gallegos E, Bautista-Bautista M, González-Zúñiga LM, Arévalo M, Cuzon G, Gaxiola G. Does unilateral eyestalk ablation affect the quality of the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae) J Crustac Biol. 2018; 38:401-406.
63. Maggioni, D.S., Andreatt, E.R., Hermes, E.M. & Barracco, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. Aquaculture. 2004; 241, 501–515.
64. McTigue, T. A., Zimmerman, R. J. Carnivory versus herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ives). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 1991; 151, 1-16.
65. Merchie, G., Lavens, P. & Sorgeloos, P. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. Aquaculture. 1997; 155, 165–181.
66. Morel, Y. & Barouki, R. Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem. J. 1999; 342, 481–496.
67. Mourente G, Medina A, González S, Rodríguez A. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodidae) during maturation. Mar Biol. 1994; 121:187–197.
68. Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2005; 35:443-59.

69. Nappi, A.J., Ottaviani, E. Cytotoxicity, and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioassays*. 2000; 22:469-480.
70. Nappi, A.J., Vass, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research*. 1993; 6: 117-126.
71. Nguyen, B. T., Koshio, S., Sakiyama, K., Harakawa, S., Gao, J., Mamauag, R. E., Ishikawa, M., Yokoyama, S. Effects of dietary vitamins C and E and their interactions on reproductive performance, larval quality and tissue vitamin contents in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*. 2012; 334-337, 73–81.
72. Nielsen, S.S. & Carpenter, C.E. Food Content Determination. In S.Suzanne Nielsen (Ed.), *Food Analysis (Food Science and Text Series)*, Springer. 2017; pp. 117–119.
73. NRC (National Research Council). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press. Washington, DC. 2011.
74. Palacios, E. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. 2000; vol.185, no.3 4, 185, 353-371, 25.
75. Palacios, E., Carreño, D., Rodriguez-Jaramillo, M. C., Racotta, I. S. Effect of Eyestalk Ablation on Maturation, Larval Performance, and Biochemistry of White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, Broodstock. *Journal of Applied Aquaculture*, vol.9, no.3.1999.



76. Pascual, C. Bases teórico-prácticas para el conteo de células sanguíneas en camarones cultivados, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de México (UNAM). 2007.
77. Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*. 2003; 142: 735–745.
78. Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. 2003; 218: 637–650.
79. Pérez Farfante, I. Illustrated key to Penaeid Shrimps of Commerce in the Americas. NOAA Technical Report NMFS. 1988; 64, U.S.A. 32 p.
80. Perez Farfante, I. Kensley, B. Penaeoid and segestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle Tome 175 Zoologie*, Paris. 1997; 225 pp.
81. Perez-Velazquez, M., Bray, W., Lawrence, A., Gatlin, D., González-Félix, M. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. 2001; 198:209–218.
82. Perez-Velazquez, M., González-Félix, M. L., Lawrence, A. L., Bray, W. A., & Gatlin, D. M. Dietary Effects on Sperm Quality of *Litopenaeus vannamei* Broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2003; 34(1), 92–98.
83. Racotta, I.S., Palacios, E. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 1998; 29, 351-356.

84. Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 2003; 227, 107–130.
85. Ramos, L., Molina, M., Pérez, L., Torres, B. Producción de nauplios de *Penaeus schmitti* en instalaciones comerciales de maduración en Cuba. *Rev. Investig. Mar.* 1994; 15: 28 – 38.
86. Rebouche, C.J. Modern Nutrition in Health and Disease (Chapter 31: Carnitine), 9th edn. (Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., and Ross, A.C., eds.) Williams & Wilkins, Baltimore. 1999; pp. 505–512.
87. Rodier J. Análisis de las aguas. Omega. Barcelona. 1981; 504 pp.
88. Rodriguez, J. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies, *Journal of Cell Science* magazine. 1995; 108, pp 1043-1050.
89. Rodríguez, J.; Le Moullac, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 2000; 191: 109-119.
90. Rosas C., Cooper EL., Pascual C., Brito R., Gelabert R., Moreno T., Sánchez A. Physiological and immunological conditions of wild populations of *Farfantepenaeus duorarum* from the campeche sound (Crustacea, Penaeidae). *Mar Biol* 2007; 152:929–938.
91. Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., LePriol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sánchez, A., Van Wormhoudt, A. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 2001; 259, 1- 22.
92. Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., VanWormhoudt, A. An energetic and conceptual model of the physiological role

- of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2002; 268, 47-67.
93. Ross, L., Ross, B. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 3a. ed. Escocia: Blackwell Publishing; 2008.
94. Ruiz, U. Citospin, una alternativa para el estudio y caracterización morfológica de Hemocitos de camarones Peneidos, revista Ciencia y Mar XI. 2007; (31), PP 33-38.
95. Saleh, N. E., Wassef, E. A., Kamel, M. A., El-Haroun, E. R., & El-Tahan, R. A. Beneficial effects of soybean lecithin and vitamin C combination in fingerlings gilthead seabream (*Sparus aurata*) diets on; fish performance, oxidation status and genes expression responses. Aquaculture. 2021; 546, 737345.
96. Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Moullac, G., Rosas, C. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. 2001; 198 (13-28).
97. Sangha, R.S., Sánchez, M.C.C., Palacios, C.A.M., Rodríguez, I.E.M. Effect of supplementing ascorbic acid (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in broodstock diet of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 2000; 31, 134–144.
98. Sarmiento, N., Martins, E., Costa, D., Silva, W., Mattioli, C., Luz, M., & Luz, R. Effects of supplemental dietary vitamin C on quality of semen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeders. Reproduction in Domestic Animals. 2016; 52(1):144–152.
99. Silva-Neto, G., Cruz J., Araujo A. Proceso productivo de post-larvas de camarones Penaeideos. EMPARN. Boletín Técnico, 11. Brasil. 1982; 89 pp.

100. Söderhäll, K.; Cerenius, L. Crustacean Immunity. Annual Review of Fish Disease. 1992; 2: 3-23.
101. Sritunyalucksana, K., Söderhall, K. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 2000; 191, 53-69.
102. Sun, M., Li, S., Zhang, X., Xiang, J., & Li, F. Isolation, and transcriptome analysis of three subpopulations of shrimp hemocytes reveals the underlying mechanism of their immune functions. Developmental & Comparative Immunology. 2020; 103689.
103. Tassanakajon, A., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Supungul, P. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. Marine Biotechnology (NY) 2010;12: 487-505.
104. Teshima, S. Phospholipids and sterols. In: D'Abramo L, Conklin DE, Akiyama DM (eds) Crustacean nutrition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge. 1997; pp 85–107.
105. Tewary, A., Patra, B.C. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). Fish Physiol Biochem. 2008; 34, 251–259.
106. Trichet, V. V. Nutrition, and immunity: an update. Aquaculture Research. 2010; 41 (3), 356–372.
107. Tsing, A., Arcier, J.-M., & Brehélin, M. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. Journal of Invertebrate Pathology. 1989; 53(1), 64–77.

108. Valentini, H., Dincao, F., Rodrigues, F. L., Neto, J. E. R., Rhan, E. Análise da pesca do camarão-rosa, *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Atlântica, Rio Grande. 1991; 13: 143-157.
109. Valenzuela, J. Efecto de la modulación inmunológica en la supervivencia del cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* [tesis de maestría]. Guayaquil (ECU): Universidad de Guayaquil, 2013.
110. Vázquez G. 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-lag, así como en el balance energético del espermátforo, concomitantes con el ciclo de muda [tesis de doctorado]. La Paz (MX): Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2014.
111. Wakida, A.T., Rojas, R.I., Toro, A., Medina H.A., Cruz, J.L., Santana, L.D., Carrillo, I. Caracterización de la pesca de camarón en la zona costera de Campeche y Yucatán. Ciencia Pesquera. 2016; 24(1): 3-13.
112. Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L., Söderhäll, K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. European Journal of Biochemistry. 2001; 268: 895-902.
113. Wenner, E.L., Beatty, H.R. Utilization of shallow estuarine habitats in South Carolina, USA, by postlarval and juvenile stages of *Penaeus* spp (Decapoda: Penaeidae). J. Crust. Biol. 1993; 13 (2), 280–295.
114. WoRMS (World Register of Marine Species). Editorial Board. World Register of Marine Species. 2021.
115. WWF (World Wildlife Fund). Farmed shrimp, Farmed seafood, Sustainable seafood, WWF. 2021.

116. Yadav, S.S., Kumar, R., Khare, P., Tripathi, M. Oxidative stress biomarkers in the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to sodium fluoride: antioxidant defense and role of ascorbic acid. *Toxicol. Int.* 2013; 22 (1), p. 71.
117. Zafar, N., Khan, M.A. Effects of dietary iron on growth, haematology, oxidative stress and hepatic ascorbic acid concentration of stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture*. 2020; 516, p. 734642.
118. Zein-Eldin, Z.P., Renaud, M.L. Inshore environmental effects on brown shrimp, *Penaeus aztecus*, and white shrimp, *Penaeus setiferus*, populations in coastal waters, particularly of Texas. *Mar. Fish. Rev.* 1986; 48 (3), 9–19.
119. Zeng W., Martinuzzi F., MacGregor A. Development, and application of a novel UV method for the analysis of ascorbic acid. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; Jan 4;36(5):1107-11.