



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Efecto de la dieta y el sistema de cultivo durante la
premaduración sobre la condición nutricional y la calidad
espermática de los machos de *Litopenaeus setiferus* y
Litopenaeus vannamei.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
XURXO BARRAL PINTOS

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
(FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DRA. CRISTINA PASCUAL JIMÉNEZ
(FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV
(CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE)

DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES
(FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

DRA. ROSSANNA DEL PILAR RODRÍGUEZ CANUL
(CINVESTAV, MÉRIDA)

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2023



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.



**Efecto de la dieta y el sistema de cultivo durante la
premaduración sobre la condición nutricional y la calidad
espermática de los machos de *Litopenaeus setiferus* y
Litopenaeus vannamei.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
XURXO BARRAL PINTOS

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
(FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DRA. CRISTINA PASCUAL JIMÉNEZ
(FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV
(CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE)

DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES
(FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

DRA. ROSSANNA DEL PILAR RODRÍGUEZ CANUL
(CINVESTAV, MÉRIDA)

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2023

Esta tesis fue desarrollada en las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias de la UNAM. Se realizó bajo la supervisión de la Dra. Gabriela Gaxiola con el apoyo económico de los proyectos PAPIIT IN221316 e INN220819 financiados por la DGAPA.

Por su colaboración para la elaboración de esta tesis se agradece a:

- a) Conahcyt por la beca otorgada para la realización del doctorado CVU 747423.
- b) La Dra. Gaxiola por su guía en todo el proceso.
- c) Zenón, Meko y Andrés por su apoyo para obtener los reproductores de *Litopenaeus setiferus*.
- d) Al Tecnológico de Lerma por ceder sus instalaciones para lograr la reproducción de *Litopenaeus setiferus*.
- e) Al M. en C. Miguel Arévalo por las enseñanzas y el apoyo en la reproducción de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei*.
- f) A la Ing. Adriana del Carmen Paredes por el apoyo en el cultivo larvario.
- g) A la M. en C. Iveth Gabriela Palomino y la Ing. Agr. Patricia Balam por el apoyo en la producción de alimento vivo para las larvas.
- h) Al Dr. Manuel Valenzuela por el apoyo en el mantenimiento de los camarones durante la fase de crecimiento. Igualmente se agradece por esta labor a Moisés Cab Marín, Concepción Uc Burgos y Rudy Canché.
- i) A la M. en C. Karla Susana Escalante Herrera por su apoyo general en el laboratorio y en concreto para analizar la expresión génica.
- j) A la Dra. Cristina Pascual y la Dra. Laida Ramos por la capacitación en el conteo espermático.
- k) A la Dra. Maite Mascaró y el Dr. Edlin Guerra por sus enseñanzas estadísticas.
- l) Al Dr. Juan Carlos Maldonado por su apoyo en la elaboración de la dieta experimental.
- m) Finalmente, a mi estimado comité tutorial por sus consejos, apoyo y correcciones: la Dra. Cristina Pascual Jiménez, la Dra. Elena Palacios Mechetnov, la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes y la Dra. Rossanna del Pilar Rodríguez Canul.

Agradecimientos

A mis padres por darme la vida y apoyarme en cada decisión que he tomado, incluso cuando eso me ha llevado a estar más de 7 años a 5000 km de distancia. Gracias por la paciencia a lo largo de toda mi vida, sobre todo en la formación académica, aguantasteis expulsiones, cambios de carrera, pero siempre tuvisteis fe en que encontraría el camino, creo que ya casi.

A toda mi familia por todo el cariño y el apoyo a lo largo de mi vida, con especial énfasis a mis abuelas Teresita y Lola, aunque ya no puedan ver esto sé que se alegrarán por mí.

A la artífice mínimo del 50% de esta tesis, a mi compañera de vida Fernanda Nava Islas, que siempre me consigue animar cuando asoman las pensamientos feos. Mil gracias por todo el amor e inteligencia que me aportas, sin ti nada de esto sería posible. Gracias por estar en las buenas y en las malas, de corazón.

Gracias a mi familia mexicana, los Nava Islas, gracias por hacerme sentir uno más y por todo el cariño que me dan.

Gracias a mis amigos por todo el apoyo y ánimo, espero que una vez finalizado este trabajo poder socializar más.

Gracias a Chucho y Ede, por abrirme las puertas de su casa y enseñarme la generosidad yucateca.

Gracias a mis perrhijos por el amor incondicional, que me regalan su alegría cuando pierdo la fe en la humanidad.

Gracias a los médicos e investigadores por su labor durante la pandemia, a los que muchos debemos la vida y gracias a los que ahora hemos casi recuperado la normalidad. Espero que como sociedad aprendamos de este oscuro capítulo.

Gracias a los periodistas y activistas por la peligrosa labor que realizan, gracias por mantenernos informados y permitirnos conocer la realidad.

Gracias a Gaby (Gaxiola) por creer en mis posibilidades, gracias por la oportunidad de hacerme científico. No voy a intentar ser el investigador más citado de la historia, pero sí voy a trabajar para hacer del mundo un lugar mejor.

Gracias a quién siendo niño me regaló un libro de 100 experimentos caseros, me encantó entonces y hasta ahora me doy cuenta de que pudo ser el principio de este camino.

Gracias a Mari, la profe de primaria que me dijo que iba a acabar limpiando parabrisas en los semáforos.

Resumen

La alta demanda unida al avance de la tecnología de cultivo ha posicionado al camarón *Litopenaeus vannamei* como el crustáceo más cultivado del mundo. Las mejoras sus procesos productivos son una constante, así como la investigación acerca de posibles especies alternativas de cultivo, como *Litopenaeus setiferus*. Igualmente, se han desarrollado sistemas de cultivo amigables con el medio como el sistema biofloc, el cual mejora el estado nutricional y reproductivo de las hembras de camarón. Los efectos del biofloc sobre los machos y la premaduración de los mismos no se han investigado en profundidad. El presente estudio tiene como finalidad evaluar los efectos del alimento y el sistema de cultivo durante la premaduración sobre la calidad espermática, indicadores bioquímicos y marcadores de estrés oxidante en dos especies de camarones peneidos con diferente grado de domesticación. En un primer experimento se estudió el efecto del sistema de cultivo (agua clara vs biofloc) y el tipo de alimento (comercial vs fresco) durante la premaduración de machos de la generación F₀ de *Litopenaeus setiferus*. Los tratamientos fueron: agua clara y alimento comercial (AC), agua clara y alimento fresco (AF), biofloc y alimento comercial (BC) y biofloc con alimento fresco (BF). La mayor cantidad de espermatozoides y la mayor concentración de colesterol en el hepatopáncreas se obtuvo en los tratamientos AC y BF. La actividad de la profenoloxidasas en la hemolinfa fue mayor en los tratamientos AF y BC. El alimento fresco promovió una mayor actividad de las enzimas antioxidantes. En el segundo experimento se evaluó el efecto del sistema de cultivo (agua clara vs biofloc) y la dieta (alimento fresco vs pellet experimental) sobre la calidad espermática de machos de *Litopenaeus vannamei*. La supervivencia, el índice hepatosomático, la concentración de nutrientes en el hepatopáncreas y la actividad de las enzimas antioxidantes del tracto reproductivo fueron mayores en los tratamientos alimentados con pellet experimental. La calidad espermática fue similar entre todos los tratamientos, por lo que el pellet experimental puede sustituir al alimento fresco sin afectar este parámetro. Los resultados obtenidos en esta tesis ayudarán a la reproducción y conservación de *L. setiferus* y harán más eficiente y económica la producción de *L. vannamei*.

Abstract

The high demand, coupled with advances in cultivation technology, has positioned *Litopenaeus vannamei* shrimp as the most cultivated crustacean in the world. Continuous improvements in their production processes and research on potential alternative cultivation species, such as *Litopenaeus setiferus*, are ongoing. Additionally, environmentally friendly cultivation systems, such as the biofloc system, have been developed, enhancing nutritional and reproductive status of female shrimp. However, the effects of biofloc on males and their pre-maturation have not been thoroughly investigated. The present study aims to evaluate the effects of food and cultivation systems during pre-maturation on sperm quality, biochemical indicators, and oxidative stress markers in two species of penaeid shrimp with different levels of domestication.

In the first experiment, the effect of the cultivation system (clear water vs. biofloc) and the type of food (commercial vs. fresh) during the pre-maturation of F₀ generation males of *Litopenaeus setiferus* was studied. The treatments were: clear water and commercial food (AC), clear water and fresh food (AF), biofloc and commercial food (BC), and biofloc with fresh food (BF). The highest sperm count and cholesterol concentration in the hepatopancreas were obtained in the AC and BF treatments. Prophenoloxidase activity in the hemolymph was higher in the AF and BC treatments. Fresh food promoted higher antioxidant enzyme activity.

In the second experiment, the effect of the cultivation system (clear water vs. biofloc) and diet (fresh food vs. experimental pellet) on the sperm quality of *Litopenaeus vannamei* males was evaluated. Survival, hepatosomatic index, nutrient concentration in the hepatopancreas, and antioxidant enzyme activity in the reproductive tract were higher in the treatments fed with experimental pellets. Sperm quality was similar across all treatments, indicating that the experimental pellet can substitute for fresh food without affecting this parameter.

The results obtained in this thesis will contribute to the reproduction and conservation of *L. setiferus* and make the production of *L. vannamei* more efficient and economical.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
Resumen	2
Antecedentes.....	3
Justificación e importancia.....	20
Preguntas de investigación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	22
CAPÍTULO II	23
Calidad espermática y condición nutricional de los machos de <i>Litopenaeus setiferus</i> (F ₀) en relación con su manejo durante la premaduración	23
Resumen	24
Introducción	24
Materiales y métodos.....	26
Resultados.....	32
Discusión	39
Conclusión	45
CAPÍTULO III.....	46
Calidad espermática de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado con un pellet experimental o alimento fresco en dos sistemas de cultivo.....	46
Resumen	47
Introducción	47
Materiales y métodos.....	48
Resultados.....	56
Discusión	64
Conclusiones	70
CAPÍTULO IV	71
Discusión general, conclusiones y recomendaciones para estudios futuros.....	71

Discusión general	72
Recomendaciones para estudios futuros.....	74
Conclusión	75
CAPÍTULO V (EXTRA)	76
Al camarón le falta salsa.	76
México, un país camaronero.....	77
El calor, enemigo de la fertilidad.....	78
Rumbo a la extinción.....	79
¿Es el final?	79
¿Y qué se dice en los laboratorios?.....	80
Nuestras responsabilidades.....	81
REFERENCIAS	82
ANEXO I- Obtención de postlarvas de <i>Litopenaeus setiferus</i>	97
ANEXO II- Preparación del pellet experimental.....	99
ANEXOIII- Portadas de los artículos científicos	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las especies del género <i>Litopenaeus</i>	3
Figura 2. Ciclo vital de los camarones <i>Litopenaeus</i> ,	4
Figura 3. Producción mundial de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el S. XXI	6
Figura 4. Componentes del biofloc: microalgas, ciliados, ácaros, nemátodos y gastrotricos.....	8
Figura 5. Espermátforo de <i>L. setiferus</i> y <i>L. vannamei</i>	11
Figura 6. Interacción obtenida en la cantidad espermática de <i>L. setiferus</i> al realizar un ANOVA bifactorial 2x2.....	33
Figura 7. Interacciones observadas en la concentración de colesterol en el hepatopáncreas (A) y de la actividad de la ProFO (B) en la hemolinfa	¡Error! Marcador no definido.5
Figura 8. Análisis de componentes principales de los biomarcadores de estrés oxidantes de <i>L. setiferus</i> tras 30 días de experimento de premaduración.	37
Figura 9. Porcentaje de contribución de cada biomarcador del estrés oxidante al componente principal 1 y 2 del análisis de componentes principales	38
Figura 10. Análisis de componentes principales de la composición bioquímica del hepatopáncreas.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11. Porcentaje de contribución de cada metabolito al componente principal 1 y 2 del análisis de componentes principales.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Análisis de componentes principales de los biomarcadores de estrés oxidante del tracto reproductivo.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Porcentaje de contribución de cada biomarcador de estrés oxidante al componente principal 1 y 2.....	63
Figura 14. Expresión relativa de los diferentes genes (A-F) en el tracto reproductivo de los machos de <i>L. vannamei</i>	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas de melanización en <i>L. setiferus</i> y <i>L. vannamei</i>	12
Tabla 2. Datos de los parámetros fisicoquímicos del agua de los diferentes tratamientos de premaduración de <i>L. setiferus</i> tras 30 días de experimento	34
Tabla 3. Datos de supervivencia, peso, calidad espermática e índice gonadosomático de los diversos tratamientos de machos de <i>L. setiferus</i> tras 30 días de experimento de premaduración.	34
Tabla 4. Datos de la composición bioquímica del hepatopáncreas y la hemolinfa de los diferentes tratamientos de <i>L. setiferus</i> tras 30 días de experimento.	36
Tabla 5. Datos de los biomarcadores de estrés oxidante de los diferentes tratamientos del experimento tras 30 días de premaduración de los machos de <i>L. setiferus</i>	38
Tabla 6. Composición del pellet experimental y análisis proximal de los alimentos	50
Tabla 7. Secuencias de nucléotidos de los primers empleados para la amplificación de los genes del sistema inmune y enzimas antioxidantes en la RT-qPCR.	55
Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos del agua tras 30 días de premaduración de los machos de <i>L. vannamei</i> en dos sistemas de cultivo con dos regímenes alimenticios.	57
Tabla 9. Datos biológicos, calidad espermática y sistema inmune de los machos de <i>L. vannamei</i> tras 30 días de premaduración en dos sistemas de cultivo y bajo dos regímenes alimenticios.	57
Tabla 10. Datos bioquímicos de la composición de la hemolinfa, el hepatopáncreas y el tracto reproductivo de los machos de <i>L. vannamei</i> tras 30 días de premaduración en dos sistemas de cultivo y bajo dos regímenes alimenticios.	59
Tabla 11. Biomarcadores de estrés oxidante del hepatopáncreas y del tracto reproductivo de los machos de <i>L. vannamei</i> tras 30 días de premaduración en dos sistemas de cultivo y bajo dos regímenes alimenticios.	62
Tabla 12. Composición del pellet experimental.	99

Capítulo I

Estructura general de la tesis

Antecedentes, justificación, preguntas de investigación, hipótesis y objetivo general

Resumen

Este capítulo tiene como propósito mostrar la estructura de esta tesis a la par que introducir al lector a conceptos claves de la biología de los camarones *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei*, con un enfoque dirigido a la maduración reproductiva de los machos. Esta tesis está conformada por un total de cuatro capítulos. El **primer capítulo** tiene como nombre “*Estructura general de la tesis*” y contiene información introductoria a los temas que se abordan a lo largo de la tesis. El **segundo capítulo** tiene como finalidad dilucidar el mejor sistema de cultivo (agua clara y biofloc) y alimento (comercial y fresco) para la fase de premaduración de los machos de *L. setiferus* generación F₀ y se titula “*Calidad espermática y condición nutricional de los machos de Litopenaeus setiferus (F₀) en relación con su manejo durante la premaduración*”. En el segundo capítulo se utilizaron indicadores de calidad espermática (p. ej. cantidad de células espermáticas), técnicas de análisis bioquímico (p. ej. metabolitos) y se analizaron diversos indicadores del sistema antioxidante en el hepatopáncreas. El **tercer capítulo** tiene como título “*Calidad espermática de Litopenaeus vannamei alimentado con un pellet experimental o alimento fresco en dos sistemas de cultivo*”. En este capítulo se analiza el efecto del sistema de cultivo (agua clara y biofloc) y el alimento entregado durante la premaduración sobre la calidad espermática y la condición nutricional de los machos de *L. vannamei*. Los indicadores utilizados fueron los del segundo capítulo junto con la expresión diferencial de genes implicados en el sistema antioxidante (p. ej. catalasa). El **cuarto capítulo** está compuesto por una discusión general, recomendaciones para experimentos futuros y conclusiones. Por último, el **quinto capítulo (extra)** es un artículo de divulgación científica titulado “*Al camarón le falta salsa*” en el que se aborda desde un ámbito coloquial los problemas reproductivos que la temperatura elevada desencadena a los machos de ciertas especies de camarón. A raíz de lo cual se explican aspectos interesantes de la biología de estos crustáceos y se debate acerca de efectos del cambio climático en su capacidad reproductiva.

Antecedentes

Los camarones del género *Litopenaeus*

La amplia familia de los camarones peneidos engloba multitud de especies de camarones (también conocidos como langostinos o gambas) cuyas pesquerías tienen una gran importancia comercial a nivel global. Cabe mencionar al género *Litopenaeus*, conformado por cinco especies, *Litopenaeus occidentalis*, *Litopenaeus schmitti*, *Litopenaeus setiferus*, *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei*. Esta última especie es conveniente destacarla debido a que más allá de la importancia de su pesquería, su producción acuícola la convierte en la especie de crustáceo más cultivada del mundo (FAO, 2020).

Los camarones del género *Litopenaeus* se distribuyen de manera natural en el continente americano, en el océano Pacífico *L. vannamei* y *L. stylirostris* se encuentran desde el norte de la costa mexicana hasta Perú, mientras que *L. occidentalis* se distribuye desde la costa de Chiapas hasta Perú (Figura 1). En la costa atlántica *L. schmitti* está presente desde Cuba a Guadalupe y en el continente desde Belice hasta el sur de Brasil, mientras que *L. setiferus* se encuentra desde Nueva Jersey, EEUU, hasta Campeche, México (Pérez-Farfante, 1969).



Figura 1. Distribución de las especies del género *Litopenaeus*. Modificado de FAO.

Este género presenta un ciclo vital complejo que se desarrolla en dos lugares diferenciados, una fase marina relativamente cerca de la costa (<30 metros de profundidad) y otra fase en estuarios, marismas o lagunas costeras (López-Martínez *et al.*, 2008). Su ciclo vital comienza en el mar con la liberación de los huevos en la columna de agua por parte de las hembras ovígeras (Dall *et al.*, 1990). Tras la liberación de los huevos, estos eclosionarán en 12-14 horas dando lugar a los nauplios, la primera fase larvaria, los cuales serán transportados a la deriva por corrientes como parte del plancton. Durante los siguientes 12-15 días las larvas sufrirán diversas metamorfosis a lo largo de sus fases larvarias mientras son transportadas por las corrientes hacia los estuarios. Una vez alcanzado el estadio de postlarva, los camarones cambiarán sus hábitos, volviéndose bentónicos. En el estuario vivirán los próximos 3-4 meses hasta que migren nuevamente hacia el mar ya como adultos, dónde madurarán sexualmente hasta que tenga lugar la cópula y comience nuevamente el ciclo (Gracia *et al.*, 1997; Rosas *et al.*, 2004).

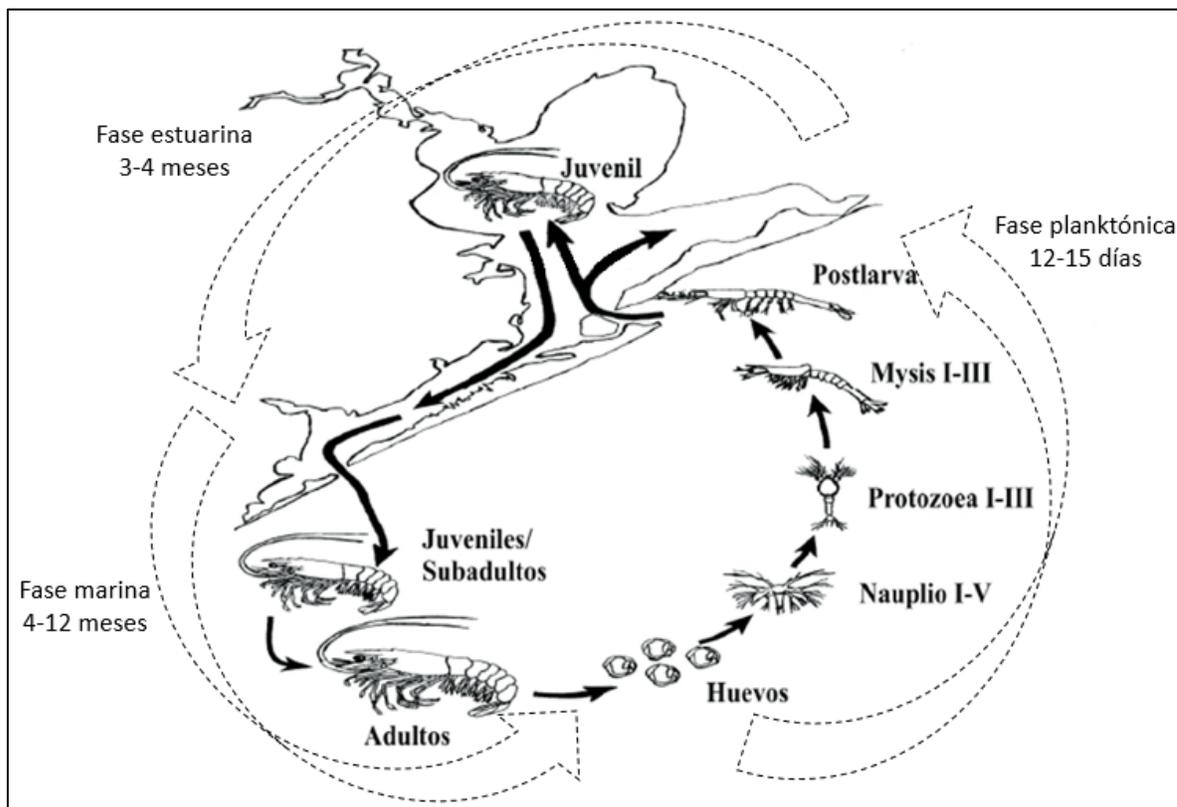


Figura 2. Ciclo vital de los camarones *Litopenaeus*, modificado de López-Martínez et al. (2008).

Debido a que realizan parte de su ciclo vital en estuarios, dónde las condiciones fisicoquímicas del agua difieren del agua marina, los camarones presentan una serie de adaptaciones a este hábitat. Son animales eurihalinos ya que están adaptados para realizar las fases juveniles de su ciclo vital en un ambiente diluido con una salinidad inferior a la de su medio interno, mientras que las otras fases de su ciclo vital las realizan en el océano, dónde la salinidad es mayor que la de su medio interno. La capacidad de mantener su medio interno con una concentración diferente a la del medio circundante se conoce cómo osmorregulación y varía a lo largo de su ciclo vital, siendo mayor en los estadios juveniles que en los adultos o las fases larvarias (Charmantier, 1998; Chong-Robles *et al.*, 2014; Palacios *et al.*, 2004).

Además de la salinidad, es reseñable la capacidad de los camarones para adaptarse a variaciones bruscas en la concentración de oxígeno, temperatura y pH del medio, las cuales se dan de manera natural a lo largo de los complejos estuarinos (Rivera-Velázquez *et al.*, 2008; Rozas & Minello, 2011; Torres *et al.*, 2020). Más allá de los mecanismos fisiológicos que les permiten afrontar estas variaciones, usan mecanismos conductuales, ya que los camarones evitan las zonas con bajas concentraciones de oxígeno o aquellos lugares dónde la temperatura no les resulta agradable (González *et al.*, 2010; Renaud, 1986).

Cultivo de camarón

El cultivo de camarón es una actividad productiva que genera empleos y mueve enormes cantidades de dinero a lo largo de todo el planeta. La especie más cultivada es *L. vannamei*, la cual lleva siendo la especie mayoritaria en la industria acuícola desde comienzos del Siglo XXI (Kumar & Engle, 2016). En la actualidad nos encontramos en un periodo de aumento constante de la producción mundial de camarón, la producción de *L. vannamei* supone casi el 52% de la producción de crustáceos a nivel mundial (FAO, 2022). Algunas muestras del implacable aumento del volumen de cultivo de esta especie es que del 2010 a 2020 se duplicó su volumen de producción de 2.6 a 5.8 millones de toneladas, lo que la ha llevado del séptimo al primer puesto en volumen de producción en el lapso de 2016 a 2020 (FAO, 2020, 2022).

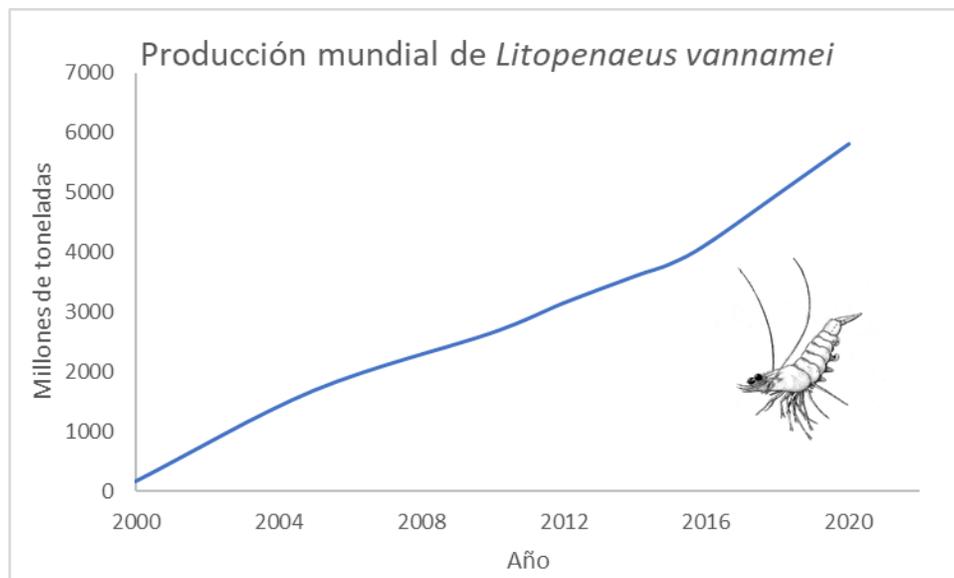


Figura 3. Producción mundial de *Litopenaeus vannamei* en el S. XXI, datos de FAO.

Otras especies del género *Litopenaeus* han sido objeto de estudio para su cultivo en acuicultura, pero no se ha logrado que las tasas de crecimiento y supervivencia sean comparables a las de *L. vannamei*. Durante la década de los 90's *L. stylirostris* se cultivó a nivel productivo en las granjas del noroeste de México, pero a comienzos del siglo XXI se abandonó esta especie por la alta sensibilidad de esta especie a diversas enfermedades (Ibarra, 2015).

En EEUU se cultivó *L. setiferus* en estanques de 0.1 ha durante la década de los 80's, obteniéndose buenas supervivencias con cosechas de hasta 7 ton/ha en 145 días (Sandifer *et al.*, 1993). El principal problema del cultivo de esta especie fue la ausencia de un proveedor de postlarvas para poder sostener una producción industrial (Browdy *et al.*, 1996). Esta dificultad de obtener postlarvas persiste hasta la actualidad y se debe los problemas de esterilidad que presentan los machos de esta especie en cautiverio (Chamberlain, 1983; Leung-Trujillo & Lawrence, 1987; Talbot *et al.*, 1989).

Litopenaeus schmitti se cultivó en Cuba hasta el año 2000, momento en que *L. vannamei* fue introducido a la isla, abandonándose la especie que se había cultivado hasta ese entonces. Al igual que con las otras especies de *Litopenaeus*, su crecimiento y supervivencia no fue equiparable al de *L. vannamei*, por lo cual

quedó descartado para su cultivo en explotaciones acuícolas a escala industrial (Ramos *et al.*, 2019).

Algunos factores que han contribuido al aumento del volumen de cultivo de *L. vannamei* han sido el aumento y constante mejora de la calidad del alimento y la selección genética que ha obtenido cepas de crecimiento rápido y libres y/o resistentes a patógenos (Ibarra *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2019). Sin embargo, para lograr un crecimiento sostenido y un volumen de producción tan elevado, la industria camaronera ha tenido que pagar un alto costo ambiental. Se ha perdido una gran cantidad de ecosistemas costeros por la colocación de granjas de gran extensión, muchas de estos ecosistemas afectados eran humedales y zonas de manglar de gran importancia biológica por ser criaderos de diversas especies. Los efluentes resultantes de las granjas de producción junto con un mal diseño de la colocación de la granja y sus tomas de agua han provocado la eutrofización de grandes cuerpos de agua (Primavera, 2006).

Nutrición del camarón

Los camarones presentan hábitos omnívoros oportunistas; se alimentan de crustáceos, poliquetos, larvas de otros organismos, cadáveres, restos vegetales y materia orgánica particulada (Beseres & Feller, 2007; Porchas-Cornejo *et al.*, 2012; Winemiller *et al.*, 2007).

A lo largo de su ontogenia los únicos cambios en sus hábitos alimenticios ocurren en las fases larvarias, ya que las “protozoas” solo se alimentan de fitoplancton. Es tras la metamorfosis a “misis” cuando se amplían sus hábitos alimenticios comenzando a depredar pequeños crustáceos en la columna de agua. Una vez finalizadas las fases larvarias, las “postlarvas” al volverse bentónicas amplían el número de sus posibles alimentos, de los cuales se nutrirá a lo largo de su ciclo vital (Le Vay *et al.*, 2001).

Desde que se comenzó su cultivo a escala industrial, uno de los tópicos más estudiados ha sido la mejora de la conversión de alimento de los camarones, buscando un mayor crecimiento en el menor tiempo posible (Kumar & Engle, 2016). Por otro lado, la gran demanda de harina y aceite de pescado para los alimentos de camarón ha repercutido negativamente en las poblaciones de las especies de

pescados empleadas para su elaboración, incrementando la presión pesquera y mermando sus poblaciones (Primavera, 2006; Tacon & Metian, 2008). Diversas investigaciones se han enfocado en la sustitución parcial o total de las harinas de pescado por otras alternativas, entre las que destaca la harina de soya. La sustitución total de las harinas de pescado no se ha logrado todavía, sin embargo si se ha logrado reducir las cantidades incluidas en los alimentos sin afectar al crecimiento y la supervivencia (Barreto-Altamirano *et al.*, 2020; Sookying *et al.*, 2013).

Con la finalidad de disminuir la contaminación del agua, reciclar nutrientes y mejorar la eficiencia de conversión de alimento, se desarrolló la tecnología de cultivo en biofloc. Este sistema de cultivo consiste en la ausencia o disminución sustancial en el recambio de agua, oxidación de los compuestos nitrogenados y el reciclado de nutrientes gracias a una gran comunidad bacteriana heterótrofa y nitrificadora. Para promover la comunidad bacteriana se fertiliza el agua de cultivo con fuentes ricas en carbono como melaza, salvado de trigo o arroz (Avnimelech, 1999). Los bioflóculos que se forman están compuestos por agregados bacterianos, pequeños crustáceos y fitoplancton que proveen de alimento a los camarones las 24 horas del

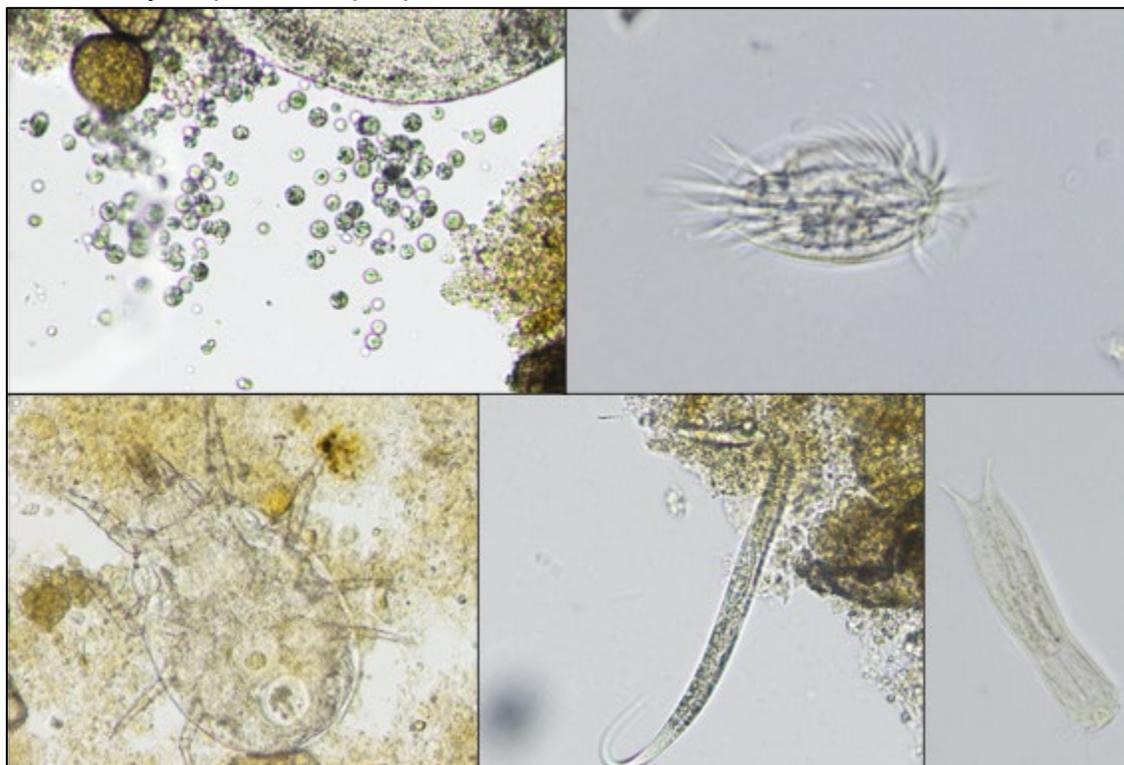


Figura 4. Componentes del biofloc: microalgas, ciliados, ácaros, nemátodos y gastrotricos.

día (Figura 4). El biofloc es de fácil asimilación por parte de los camarones, cuya contribución relativa al músculo es del 85-97% en juveniles de *L. vannamei* y *Farfantepenaeus brasiliensis* (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018b; 2018c).

Indicadores bioquímicos del estado nutricional

Se ha observado que cuando los reproductores de camarón están bien alimentados, estos proveen de buen vitelo a sus huevos y se logran altas tasas de fertilización y eclosión de los huevos, afectando incluso la supervivencia al final de las fases larvarias (Racotta *et al.*, 2003).

Diversos autores han coincidido en establecer la concentración de ciertos indicadores bioquímicos en hemolinfa, hepatopáncreas y ovario como reflejo del estado nutricional de los camarones. Estos indicadores han sido la proteína total soluble (PTS), el colesterol (C), los acilglicéridos (AG) y la glucosa (G), igualmente los índices AG/PTS y AG/C son considerados índices bioenergéticos (Emerenciano *et al.*, 2013, 2012; Magaña-Gallegos *et al.*, 2018a; Pascual *et al.*, 2003).

La proteína total soluble es una herramienta útil ya que se ha establecido que las proteínas y su metabolismo son el eje central del metabolismo del camarón, participando en la digestión, sistema inmune, osmorregulación o como reserva energética (Rosas *et al.*, 2004). El colesterol es la base para la formación de membranas, participa en la síntesis de colágeno y es precursor de diversas hormonas entre las que se encuentra la ecdisona y la testosterona (Corral-Rosales *et al.*, 2020; Rosas *et al.*, 2004). Los acilglicéridos conforman la reserva energética más eficiente en términos de energía por gramo, altas cantidades de esta molécula en los huevos de crustáceos están relacionados con buena supervivencia de las larvas; si estos huevos pertenecen al primer desove es igualmente indicador de que esa hembra desovará en repetidas ocasiones (Arcos *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 1998). La glucosa es utilizada como fuente de energía en gran cantidad de procesos metabólicos y de reserva de energía en forma de glucógeno, su movilización es más rápida que las otras biomoléculas para obtención de energía (Palacios *et al.*, 1998).

Reproducción

El género *Litopenaeus* posee un modelo reproductivo de télico abierto, una de las características distintivas de este género. El télico es la estructura corporal

de la hembra que recibe el espermátforo (paquete espermático). Las especies de tético abierto no poseen una cámara espermática en la hembra para alojar el paquete espermático que le transfiere el macho durante la cópula, es por este motivo que los espermátforos poseen estructuras complejas y sustancias adhesivas para asegurar su correcta adherencia externa al tético de la hembra. Las especies de tético abierto se reproducen durante la intermuda, es decir, el periodo en el que están más activos y su exoesqueleto está duro. En contraparte, las especies de tético cerrado copulan tras la muda, es decir, cuando su exoesqueleto está blando; tal es el caso de *Farfantepenaeus brasiliensis* y *Penaeus monodon* (Alfaro-Montoya, 2010; Bauer & Cash, 1991).

La cópula se da al final de la tarde cuando comienza a anochecer, durante el nado, los machos comienzan a perseguir a las hembras maduras, un macho perseguirá a cada hembra durante unos minutos y finalmente se acercará por debajo para revisar el tético de la hembra con las anténulas a la par que esta disminuye su actividad natatoria. Posteriormente el macho rota 180° quedando enfrenteado ventralmente con la hembra, como si se abrazaran, para posteriormente rotar 90° y engancharse envolviendo a la hembra, tras esto, mediante una rápida contracción abdominal, el macho transferirá el espermátforo al tético de la hembra (Misamore & Browdy, 1996).

Los camarones del género *Litopenaeus* comparten el modelo reproductivo de tético abierto, sin embargo, la morfología de los espermátforos varía en función de la especie, cómo se puede observar en la Figura 5. En el caso de *L. vannamei*, su espermátforo tiene una morfología semicilíndrica, la cual permite su extrusión mediante una presión suave en la zona circundante al área del ámpula terminal (Arce *et al.*, 2000). La extrusión de los espermátforos se lleva a cabo para realizar la inseminación artificial de las hembras ovígeras, la cual es una práctica muy común en los laboratorios de producción de postlarvas (Caballero-Zamora *et al.*, 2015). Gracias a la inseminación artificial los criadores pueden realizar cruces entre familias buscando rasgos fenotípicos concretos como un rápido crecimiento, gran tamaño, tolerancia al frío o resistencia a ciertas patologías (Ren *et al.*, 2020). La selección genética ha sido un factor clave para lograr que *L. vannamei* sea la especie de crustáceo más cultivada del mundo (Kumar & Engle, 2016).

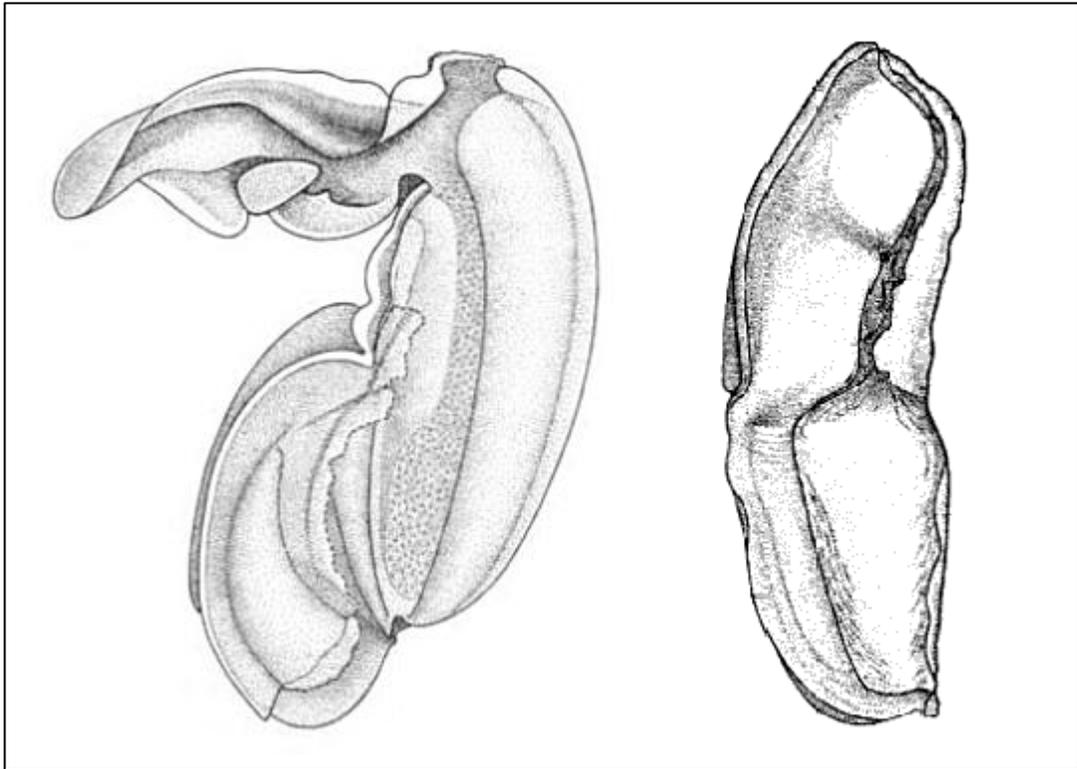


Figura 5. Espermatóforo de *L. setiferus* (izquierda) y *L. vannamei* (derecha), tomado de Farfante (1975).

El espermatóforo de *L. setiferus*, a diferencia del de *L. vannamei*, presenta una mayor complejidad en su estructura debido a la presencia del ala y la paleta lateral (“blade”)(Farfante, 1975). Debido a su compleja morfología, la extrusión de los espermatóforos de *L. setiferus* no se puede llevar a cabo con una suave presión en el área circundante al ámpula, sino que se realiza mediante electroeyaculación (Leung-Trujillo & Lawrence, 1991). Esta técnica se realiza con ayuda de una pila alcalina de 9 Volts, se sitúan los electrodos de la pila a los lados del ámpula terminal provocando una contracción muscular del camarón en la que se extruye una parte del espermatóforo, la extrusión se completa con ayuda de unas pinzas de punta fina (Miguel Arévalo com. pers.). Esta metodología se utiliza para realizar inseminaciones artificiales, desafortunadamente cuando los machos sometidos a electroeyaculación regeneran el espermatóforo este posee una menor calidad

espermática. Rosas *et al.* (1993b) registraron una disminución de células espermáticas viables al 50% del total inicial tras realizar esta maniobra de extrusión.

Calidad espermática

La calidad de los espermátóforos de los camarones peneidos se ha medido a través del peso del espermátóforo, del conteo de espermatozoides total y diferencial, es decir, registrar el número de células normales, anormales y muertas (Braga *et al.*, 2015; Leung-Trujillo & Lawrence, 1987).

En numerosas especies de peneidos se ha reportado la dificultad de llevar a cabo la reproducción en cautiverio, la causa que se ha observado ha sido la mala calidad espermática, un número muy bajo de células espermáticas junto con altas proporciones de células anormales y muertas (Alfaro-Montoya, 2010).

La melanización del sistema reproductivo de los machos (MRSM por sus siglas en inglés), fue acuñada por Chamberlain (1983) y afecta a diversas especies de peneidos y también de langostinos (Harris & Sandifer, 1986). La sintomatología es una acumulación progresiva de melanina (color café) en el espermátóforo hasta volverse completamente negro, puede extenderse hacia el ámpula y todo el vaso deferente. En la Tabla 1 se recogen las principales causas de melanización, la cual se desencadena por diversas infecciones bacterianas (Alfaro & Lozano, 1993; Braga *et al.*, 2018; Chamberlain, 1983), por alteraciones del sistema de regulación de la profenoloxidasa (ProFO) debido al estrés del cautiverio (Sánchez *et al.*, 2001), como resultado de la exposición a altas temperaturas (Corral-Rosales *et al.*, 2020; Pascual *et al.*, 1998, 2003), por un desbalance hormonal (Alfaro-Montoya, 2010) o como parte de un proceso natural de degeneración/regeneración del espermátóforo (Parnes *et al.*, 2006).

Tabla 1. Causas de melanización en *L. setiferus* y *L. vannamei*.

Especie	Causa	Referencia
<i>L. setiferus</i>	Temperatura elevada 30°C	Pascual <i>et al.</i> , 1998
<i>L. setiferus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> y <i>Pseudomonas putrefaciens</i>	Alfaro <i>et al.</i> , 1993
<i>L. setiferus</i>	Estrés nutricional e inducido por cautiverio	Sanchez <i>et al.</i> , 2001
<i>L. vannamei</i>	Temperatura elevada >29°C	Perez-Velazquez <i>et al.</i> , 2001
<i>L. vannamei</i>	Regeneración durante la muda	Parnes <i>et al.</i> , 2006
<i>L. vannamei</i>	Mycobacteria y edad	Braga <i>et al.</i> , 2018

En el caso de *L. setiferus*, además del problema de la melanización del espermatóforo, este se ve afectado por la degeneración del tracto reproductivo (MRTDS, male reproductive tract degenerative syndrome). Esta sintomatología descrita por Talbot *et al.* (1989) solo es perceptible al realizar el conteo espermático de los espermatóforos, pues estos no muestran ningún tipo de coloración extraña, sin embargo, a los 35 días de aclimatación al cautiverio no quedan células espermáticas vivas en los espermatóforos. Los autores apuntan a que una infección bacteriana es la causa de esta sintomatología, sin embargo, durante el proceso infectivo no se activa el proceso de melanización.

Para prevenir la degeneración y/o decaimiento de la calidad espermática de *L. setiferus* y *L. vannamei*, se determinó que la temperatura del agua óptima para los machos es de 26°C (Bray *et al.*, 1985; Pascual *et al.*, 1998; Perez-Velazquez *et al.*, 2001).

Factores ambientales

Se ha observado en condiciones naturales cómo la temperatura desencadena la maduración gonadal y los desoves de los camarones, estos detectarían que en el medio existen condiciones favorables que favorecen la supervivencia de su progenie (Aragón-Noriega *et al.*, 2012). La temperatura óptima de crecimiento de los adultos de *L. vannamei* (>15 g) es de 27°C y su preferencia térmica es de 26°C (>20 g) (González *et al.*, 2010; Wyban *et al.*, 1995).

Esta preferencia térmica de 26°C coincide con la temperatura óptima para la maduración reproductiva de los machos, desarrollando espermatóforos blancos con gran número de células espermáticas y bajas proporciones de células anormales y muertas (Perez-Velazquez *et al.*, 2001). Se ha comprobado en diversas especies de camarones peneidos el efecto pernicioso de las temperaturas altas sobre la calidad espermática de los machos. Cuando los machos son mantenidos a temperaturas de 29°C o superiores, aparece una gran cantidad de espermatóforos melanizados, en los que disminuye la cantidad de espermatozoides y aumenta la proporción de células espermáticas anormales y muertas, llegando en ocasiones a la esterilización completa del camarón (Pascual *et al.*, 1998; Perez-Velazquez *et al.*, 2001). En los laboratorios de producción de larvas comerciales que no poseen

control de temperatura del agua, se ha reportado una evidente correlación entre el aumento de la temperatura, el descenso de huevos fértiles y el aumento de machos con espermátóforos melanizados (Corral-Rosales *et al.*, 2020).

En relación con el ambiente de cultivo, se han realizado algunos experimentos de premaduración de reproductores en sistema biofloc, cultivo sin recambio de agua en el que se promueve el crecimiento de bacterias heterotróficas. El cultivo en biofloc ha mejorado el desempeño reproductivo, aumentando la fecundidad y la producción de nauplios (Emerenciano *et al.*, 2012, 2014). Si se toman en cuenta únicamente a los machos, Braga *et al.* (2015) realizaron un experimento de premaduración de machos de *L. vannamei* con cuatro tratamientos, uno de agua clara con alimento fresco, otro de biofloc con alimento fresco y dos más de biofloc con alimento peletizado de juveniles y reproductores. Pese a no existir diferencias significativas en la cantidad espermática, el mayor porcentaje de células normales se obtuvieron en el tratamiento de biofloc alimentado con pellet para juveniles. Lamentablemente, el diseño experimental no fue simétrico, por tanto, no se puede valorar el efecto del sistema de cultivo y de la dieta por separado.

Recientemente, Braga *et al.* (2018) reportaron que machos cultivados en biofloc con los espermátóforos melanizados estaban infectados por una micobacteria. Este descubrimiento si bien es novedoso, no es necesariamente extensible a todos los cultivos en biofloc ya que la edad de los camarones era de 2 años, lo cual dista mucho de la edad óptima reproductiva.

Factores biológicos

Tanto para la fecundidad de las hembras como para la cantidad de espermatozoides de los machos, los dos factores biológicos más importantes son el peso y la edad (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2010). Al aumentar el peso a lo largo de la vida de los camarones, existe una correlación positiva entre el peso de los camarones y el número de huevos y espermatozoides. No obstante, a partir de cierta edad, aunque el peso continúe en aumento, el desempeño reproductivo comienza a decaer, por este motivo se ha establecido los 12 meses como la edad óptima reproductiva tanto de machos como de hembras de *L. vannamei* (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003; 2010).

En el caso de los machos, una vez pasada su edad óptima reproductiva, el número total de células espermáticas comienza a decrecer, a la par que la proporción de células muertas aumenta, disminuyendo así las tasas de fertilización y eclosión de los huevos. Shi *et al.* (2018) demostraron mediante el análisis de machos de *L. vannamei* de 11 y 16 meses que el decaimiento espermático está relacionado con una disminución del calcio intracelular del espermátforo. Estos autores comprobaron que los camarones de 16 meses presentaban una mayor expresión de los genes que codifican proteínas relacionadas con la apoptosis, por el contrario, los camarones de 11 meses presentaron una mayor expresión de genes que codifican proteínas que inhiben la apoptosis. Finalmente, los autores infieren que la acumulación de especies radicales de oxígeno puede interferir en ciertas proteínas ligadas al calcio, produciendo así una disminución progresiva de este elemento en el espermátforo.

Factores nutricionales

La calidad de las larvas de los camarones está directamente relacionada con el estado nutricional de sus progenitores: si los reproductores están bien alimentados, proveerán de un vitelo de calidad a los huevos, el cual consumirá el embrión y el nauplio durante su desarrollo (Racotta *et al.*, 2003).

La nutrición de los reproductores en el medio natural es muy variada; si bien los mayores conocimientos sobre su dieta son basados en experimentos en cautiverio, diversos autores coinciden en alimentar con calamar, poliquetos, mejillón y biomasa de artemias (Corral-Rosales *et al.*, 2018b; Magaña-Gallegos *et al.*, 2018a; Zacarias *et al.*, 2019), obteniendo cuantiosos desoves con altas tasas de fertilización.

En la mayoría de los trabajos realizados con nutrición de reproductores, sus indicadores están centrados en la fecundidad, remaduraciones de las hembras, porcentaje de maduración, porcentaje de eclosión, y tamaño del huevo (Corral-Rosales *et al.*, 2018b; Emerenciano *et al.*, 2013; Magaña-Gallegos, *et al.*, 2018a; Zacarias *et al.*, 2019). Comparativamente, no existe demasiada literatura en la que se aborden los requerimientos nutricionales específicos de los machos. Tomando en cuenta que se ha reportado el mismo desempeño reproductivo en experimentos

con tanques unisexuales y mixtos, un alimento específico para machos podría ahorrar cuantiosas cantidades de dinero a los laboratorios de producción de postlarvas (Browdy *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2019).

Perez-Velazquez *et al.* (2003) probaron diferentes dietas sobre la calidad espermática de los machos. Estas consistieron en una ración de calamar en combinación con una dieta formulada enriquecida con vitaminas, colesterol y astaxantina, de esta se hicieron 3 variantes a las que se le retiraba uno de los aditivos. El tratamiento al que se le suministró calamar y el alimento con todos los aditivos mostró un aumento sustancial del número de espermatozoides. Por el contrario, a los camarones que se les proveyó de calamar y alimento experimental sin vitaminas presentaron un decremento en el conteo espermático y un aumento de las células anormales. Evidenciaron así, la importancia de las vitaminas en la dieta de los camarones y el efecto positivo de su inclusión.

Más recientemente, Braga *et al.* (2013) probaron los efectos de adicionar polen y paprika a una dieta basada en productos frescos clásica para reproductores machos de *Farfantepenaeus paulensis*. Los resultados en el tratamiento adicionado con polen fueron excelentes, triplicando la cantidad de espermatozoides de los otros dos tratamientos. Los autores dedujeron que la gran cantidad de sustancias antioxidantes presentes en el polen de las plantas debe haber sido el responsable de la exitosa premaduración de ese tratamiento.

El biofloc se ha abordado anteriormente en el apartado de factores ambientales, si bien no hay que olvidar la gran importancia que tiene desde el punto de vista nutricional ya que provee de proteína nativa, aminoácidos y ácidos grasos a los reproductores, se almacena en la glándula digestiva y es utilizado en maduración gonadal de los reproductores, por ejemplo, acortando el tiempo entre la ablación y el primer desove (Emerenciano *et al.*, 2012, 2013).

Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que tienen roles clave en el metabolismo, la mayoría no son sintetizados por el organismo, sino que se absorben a través de la dieta. Se encuentran de manera natural como componentes de los alimentos y son esenciales, en pequeñas cantidades, para el

correcto funcionamiento del organismo. Las vitaminas actúan como antioxidantes, efectores de la transcripción genética, donantes/aceptores de H^+/e^- , hormonas y coenzimas (Combs & McClung, 2016).

Unas pocas son sustancias únicas, la mayoría son familias de compuestos químicamente similares que comparten actividad biológica, estos isómeros reciben el nombre de vitámeros, los cuales varían en su biopotencia (Combs & McClung, 2016). Algunas vitaminas tienen precursores metabólicos, los cuales reciben el nombre de provitaminas. Por otro lado, las familias de las diferentes vitaminas son químicamente heterogéneas; por tanto, es conveniente clasificarlas de acuerdo con sus propiedades físicas en vitaminas hidrosolubles y liposolubles. Las vitaminas hidrosolubles son la vitamina C y el complejo B (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, biotina, ácido pantoténico, folato y B12), las cuales suelen presentar al menos un grupo polar ionizable en su estructura. Por otro lado, las vitaminas liposolubles comprenden la A, D, E y K, presentando mayormente estructuras aromáticas y alifáticas. Estas características determinan sus mecanismos de absorción, transporte, distribución por los tejidos y su función metabólica.

Vitamina A

La vitamina A es una vitamina liposoluble que engloba a numerosas sustancias con actividad biológica de retinol, comprende al retinol, retinal y ácido retinoico. Los carotenos, pigmentos de origen vegetal, son poliisoprenoides con una estructura similar y a través del metabolismo pueden dar lugar a retinoides (Combs & McClung, 2016). Estos carotenoides provitamina A incluyen al β -caroteno y a la astaxantina, siendo esta última el carotenoide mayoritario en camarones, la cual se acumula en integumento, ovario y glándula digestiva (Liñan-Cabello, 2001).

Es una vitamina que a mayores de su función como antioxidante, participa en la respuesta del sistema inmune, tiene una gran importancia en la visión de los organismos, es un factor clave en la expresión de genes implicados en la diferenciación celular, lo cual involucra desde el desarrollo epitelial hasta las funciones de maduración de los gametos sexuales (National Council Research, 2011). En camarones se ha observado la gran importancia de estos compuestos en la maduración gonadal y procesos reproductivos, formando parte del sistema

neuroendocrino. Se ha observado una movilización significativa de retinoides durante los diferentes grados de maduración ovárica de las hembras de camarón (Liñan-Cabello & Paniagua-Michel, 2004). La ingesta dietética recomendada para las hembras de *Litopenaeus vannamei* es de 4.8 mg/Kg de all-trans-retinol, con esa inclusión se logra que maduren sexualmente y se obtengan puestas numerosas con huevos de calidad (Liñan-Cabello & Paniagua-Michel, 2004).

Vitamina C

La vitamina C es el nombre genérico que reciben aquellas sustancias que exhiben cualitativamente a la actividad biológica del ácido ascórbico (Combs & McClung, 2016). Es una vitamina hidrosoluble que la mayoría de los animales pueden sintetizar a través de la D-glucosa. En el caso de los humanos, la vitamina C es obtenida únicamente a través de la dieta, por contra los camarones sí tienen la capacidad de sintetizarla, aunque esta es limitada y debe ser complementada con la dieta (National Council Research, 2011). Su función principal es como antioxidante ya que posee un gran poder reductor, ayuda a la absorción del hierro, está envuelta en el crecimiento, la reproducción y el sistema inmune. Es esencial para la regeneración de la vitamina E, y en conjunto con esta minimizan la peroxidación de lípidos en diferentes tejidos (National Council Research, 2011).

La comparación de la cantidad de ácido ascórbico presente en el hepatopáncreas y gónadas de hembras silvestres y cultivadas de *L. vannamei* mostró que los animales en cautiverio poseían una menor concentración de esta vitamina en dichos tejidos (Sangha *et al.*, 2000). Tras este descubrimiento, se formularon dietas con inclusiones mayores de ácido ascórbico para intentar paliar esta carencia y lograr un buen desempeño reproductivo.

Recientemente, Montalvo *et al.* (2022b) mostraron que la cantidad de vitamina C óptima para los machos de *L. brasiliensis* es de 13.9 g/Kg. Los autores probaron diferentes concentraciones de vitamina C en sus pellets experimentales (4.9, 7.4, 12.3 y 13.9 g/Kg), las cuales no tuvieron efecto evidente en la calidad espermática pero sí en la fisiología de los camarones, por lo que se determinó la cantidad óptima.

Vitamina E

La vitamina E es una vitamina liposoluble que comprende 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles, de los cuales el α - tocoferol es el de mayor actividad biológica (National Council Research, 2011). Su función antioxidante consiste en proteger las membranas con componentes lipídicos, previniendo el ataque de los radicales libres de oxígeno sobre los ácidos grasos insaturados. La carencia de esta vitamina en la dieta de camarones y peces afecta de manera negativa su crecimiento (Darvishpour *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012; He *et al.*, 1992). Las dietas de camarón suplementadas con esta vitamina proveyeron de un mayor crecimiento, y en el caso de los juveniles, les otorgó también una mayor capacidad de respuesta del sistema antioxidante frente a un cambio abrupto de salinidad (Liu *et al.*, 2007).

Esta vitamina es muy importante en la dieta de los reproductores de *Litopenaeus vannamei*, la cantidad óptima es de 350 mg de α -tocoferol por Kg de alimento, de acuerdo a lo observado por Du *et al.* (2006). Con dicha inclusión de vitamina E se asegura la obtención de numerosas puestas, con alta tasa de fertilización y de eclosión. En ese experimento se registró también la calidad espermática de los machos de los cuatro tratamientos (Control, 115 mg/kg, 350 mg/Kg y 522 mg/Kg), sin encontrarse diferencias en el número de espermatozoides. Sin embargo, se observó una mejora significativa en la tasa de fertilización con una inclusión de 350 y 522 mg/Kg de vitamina, de lo cual se podría inferir que la calidad espermática de estos tratamientos habría sido superior la de los otros tratamientos. En la misma línea de investigación, Arshadi *et al.*, (2020) probaron el efecto positivo de la inclusión de vitamina E sobre el desempeño reproductivo de hembras de *L. vannamei*. A los diferentes tratamientos se les suministró alimento fresco, poliqueto, calamar e hígado de pollo, y un alimento peletizado. Este alimento presentó 4 variantes, un control sin vitamina y tres alimentos experimentales con 100, 300 y 500 mg/Kg de vitamina E. Los mejores resultados en términos de fecundidad se obtuvieron en el tratamiento de 300 mg/Kg, lo cual estuvo en concordancia con una mayor expresión del gen de la vitelogenina, precursor de la vitelina, la cual es el componente principal de las reservas energéticas del ovocito.

Justificación e importancia

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* es la especie más cultivado en el mundo y el camarón blanco del Atlántico *Litopenaeus setiferus* es la especie nativa alternativa al cultivo del primero en la zona del golfo de México. Si bien *L. vannamei* es una especie domesticada, y *L. setiferus* aún presenta un cuello de botella en la reproducción debido al deterioro de la calidad espermática, ambas presentan ciertos paralelismos en los factores que determinan la cantidad y la proporción de células espermáticas viables.

En el caso de *L. vannamei*, los procesos reproductivos están en una búsqueda constante de optimización, por ello, determinar cuál es el mejor sistema para la premaduración de los machos de esta especie es un tema de capital interés. Igualmente determinar qué alimento es el óptimo para este proceso puede suponer un ahorro de costos tanto económicos como operativos, en comparación a un alimento fresco. Siendo el fin último comprobar los efectos del sistema de cultivo y dieta sobre la calidad espermática, se analizarán una serie de indicadores nutricionales, oxidantes e inmunológicos con la finalidad de lograr un entendimiento mayor de las funciones y las interacciones de estos sistemas durante la premaduración de los machos.

Si bien *L. setiferus* es una especie nativa que no se cultiva industrialmente, la necesidad de diversificar las especies de cultivo de camarón convierte a esta especie en un potencial candidato para su cultivo. El primer paso para lograr el cultivo de esta especie es determinar el mejor método para que la premaduración de los machos sea exitosa, en términos de calidad espermática (número y porcentaje de células espermáticas viables). Con esta finalidad se probará el efecto del sistema de cultivo, alimento entregado y la interacción de ambos. Así mismo, se analizarán una serie de indicadores nutricionales, oxidantes e inmunológicos con la finalidad de generar un conocimiento más integral de las funciones e interacciones de estos sistemas.

Preguntas de investigación

¿Tendrá la dieta entregada durante la premaduración de los machos generación F₀ de *L. setiferus* algún efecto sobre su desempeño nutricional y calidad espermática (número y proporción de células espermáticas normales)?

¿Promoverá el sistema de cultivo durante la premaduración de los machos generación F₀ de *L. setiferus* algún efecto sobre su desempeño nutricional y calidad espermática (número y proporción de células espermáticas normales)?

¿Tendrá la dieta entregada durante la premaduración de los machos de *L. vannamei* algún efecto sobre su sistema antioxidante, influyendo en el nivel de estrés oxidante tisular del tracto reproductivo, consecuentemente afectando a la calidad espermática (número y proporción de células espermáticas normales)?

¿Promoverá el sistema de cultivo durante la premaduración de los machos de *L. vannamei* algún efecto sobre su sistema antioxidante, influyendo en el nivel de estrés oxidante tisular del tracto reproductivo, consecuentemente afectando a la calidad espermática (número y proporción de células espermáticas normales)?

Hipótesis

-Hipótesis 1: Los machos de una generación F₀ de *Litopenaeus setiferus* mantenidos en sistema biofloc alimentados con alimento comercial presentarán una mejor condición nutricional debido al aporte de proteína nativa del biofloc que complementará el alimento comercial, lo cual se verá plasmado en una buena calidad espermática.

-Hipótesis 2: Los machos de *Litopenaeus vannamei* alimentados con pellet formulado experimentalmente con inclusión óptima de vitaminas antioxidantes (Carophyll Pink, ácido ascórbico y dl- α -tocoferol) desarrollada en las instalaciones de la UMDI Sisal y cultivados en biofloc presentarán una mejor calidad espermática debido a la interacción y el efecto sinérgico del biofloc y el pellet experimental. El biofloc proveerá a los camarones de un buen estatus nutricional y los antioxidantes incluidos en el pellet experimental minimizarán el daño tisular causado por el estrés oxidante en el tracto reproductivo, permitiendo a los camarones desplegar su máximo potencial reproductivo en términos de calidad espermática

Objetivo general

Evaluar durante la premaduración de los machos de *L. vannamei* y *L. setiferus* el efecto de dos sistemas de cultivo (biofloc y agua clara) y dos dietas (comercial y fresco para *L. setiferus*, experimental y fresco para *L. vannamei*) sobre la condición nutricional y la calidad espermática.

Capítulo II

Calidad espermática y condición nutricional de los machos de *Litopenaeus setiferus* (F₀) en relación con su manejo durante la premaduración

Traducción del artículo: "Sperm quality and nutritional condition related to management during prematuration of *Litopenaeus setiferus* (F₀) males". Publicado en la revista científica "Aquaculture Research" en agosto de 2022.

Resumen

El objetivo de este estudio fue comparar las estrategias de manejo durante la premaduración de los machos de *Litopenaeus setiferus* generación F₀ a través de la combinación de dos factores, el sistema de cultivo y el tipo de alimento. Los efectos de los diferentes tratamientos se midieron en términos de calidad espermática y de estado nutricional del camarón. El experimento se configuró en cuatro tratamientos en función del sistema de cultivo y el tipo de alimento, con cinco réplicas cada uno. Los tratamientos fueron: pellet comercial en cultivo de agua clara (AC), alimento fresco en cultivo de agua clara (AF), pellet comercial en cultivo de biofloc (BC) y alimento fresco en cultivo de biofloc (BF). Al final del experimento, se evaluaron la supervivencia, la calidad espermática, los metabolitos circulantes, la profenoloxidasa (ProFO) como indicador del sistema inmune y las enzimas del sistema antioxidante. La cantidad de esperma mostró una interacción entre el sistema de cultivo y el alimento suministrado, mostrando valores más altos en los tratamientos AC y BF y valores más bajos en el tratamiento AF. Se detectó una interacción en la ProFO, que mostró una mayor actividad en AF y BC. El análisis PERMANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en los biomarcadores de estrés oxidante en relación con la dieta ofrecida, alimento fresco y comercial. Los datos recabados en este estudio muestran que para obtener la mayor calidad espermática de los machos de *L. setiferus*, la premaduración debe realizarse en agua clara y alimentar con pellet comercial o bien en biofloc y suministrando alimento fresco.

Introducción

El camarón blanco, *Litopenaeus setiferus*, se ha considerado desde la década de los 80's del siglo pasado como una especie de cultivo alternativa al camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Valenzuela-Jiménez et al., 2020). A pesar de que posee tasas de crecimiento aceptables para su cultivo (0.75 g/semanas y rendimiento de cosecha de 7.9 ton/ha), la ausencia de un suministro comercial de postlarvas no permitió el desarrollo comercial del cultivo de *L. setiferus*. El motivo por el cual no se logró una producción masiva de postlarvas son los problemas reproductivos que desarrollan los machos silvestres de esta especie una

vez que son mantenidos en cautiverio, tema que ha sido abordado en varios estudios (Alfaro-Montoya, 2010; Pascual *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001). El desempeño reproductivo y la calidad larvaria están directamente relacionados con el estado nutricional de los reproductores; sin embargo, los requerimientos nutricionales de machos y hembras no son los mismos (Corral-Rosales *et al.*, 2018; Pérez-Velázquez *et al.*, 2003; Racotta *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes y el éxito reportado en la cría con tanques monosexuales (Browdy *et al.*, 1996), una dieta específica adecuada para cada sexo podría mejorar el rendimiento reproductivo y ahorrar dinero en alimentos caros e inadecuados (Ortiz-Guillén *et al.*, 2022).

Goimier *et al.* (2006) determinaron que el nivel óptimo de inclusión de proteína en la dieta de los machos de *L. setiferus* es del 45%, obteniendo una mayor calidad espermática que los tratamientos alimentados con otros niveles de proteína.

Se ha evidenciado que los camarones criados y premadurados en sistema biofloc poseen un mejor desempeño reproductivo que los de agua clara (Emerenciano *et al.*, 2014; Magaña-Gallegos *et al.*, 2021). El biofloc se ha descrito como un sistema de cultivo sostenible que proporciona a los camarones proteína nativa y un medio probiótico, lo que conlleva una mejora del estado nutricional e inmune de los camarones y finalmente se traduce en un óptimo desempeño reproductivo (Aguilera-Rivera *et al.*, 2019; Emerenciano *et al.*, 2017; Mugwanya *et al.*, 2021).

Estudios recientes han demostrado la adaptabilidad de *L. setiferus* al cultivo en biofloc, tanto de animales silvestres como nacidos en cautiverio (Valenzuela-Jiménez *et al.*, 2021a, 2021b). Estos autores obtuvieron un mayor crecimiento y un mejor estado antioxidante cuando cultivaron los camarones a 35 ups.

Únicamente Braga *et al.* (2015) han estudiado la calidad espermática de los machos de *L. vannamei* tras la premaduración en biofloc y agua clara. Los autores encontraron que los camarones mantenidos en biofloc con alimento comercial (40% de proteína cruda) obtuvieron mayores (no significativos) conteos espermáticos que aquellos mantenidos en agua clara provistos de alimento fresco, mientras que los camarones en biofloc con alimento fresco mostraron la menor calidad espermática (Braga *et al.*, 2015).

Hasta la fecha no se han realizado estudios acerca de la premaduración en biofloc de los machos de *L. setiferus* nacidos en cautiverio. El objetivo de este estudio fue comparar las estrategias de manejo durante la premaduración de los machos de *L. setiferus* (F0) a través de la combinación de dos sistemas de cultivo y dos regímenes alimenticios, medido en términos de calidad espermática y la condición nutricional de los camarones.

Materiales y métodos

Origen de los animales

Un lote de reproductores silvestres de *Litopenaeus setiferus* fue capturado en la costa frente a Ciudad del Carmen, Campeche, México. Los animales fueron transportados a las instalaciones del Instituto Tecnológico de Lerma, Campeche, donde se aclimataron y fueron mantenidos con alimento fresco por un mes. A través de la inseminación artificial se obtuvieron dos puestas viables, de las cuales se obtuvieron 35,000 nauplios. Una vez eclosionados, los nauplios fueron transferidos a las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la UNAM en Sisal, Yucatán, siendo ubicados en el área de cultivo larvario.

Al término del cultivo larvario, 19,500 postlarvas fueron transferidas al área de engorde, la cual se encuentra en el exterior de las instalaciones y está provista de tanques circulares de 20 m² forrados con liner de PVC. Las postlarvas se sembraron en seis tanques a una densidad aproximada de 150 camarones/m². Los tanques se llenaron con agua marina de pozo 15 días previo a la siembra de los camarones, durante este periodo se fertilizaron los estanques diariamente con pellet pulverizado y melaza para promover el desarrollo del biofloc. La fase de crecimiento duró 12 meses y se desarrolló en sistema biofloc, los animales fueron alimentados con pellet comercial (35% de proteína cruda, El Pedregal, Toluca, México) y la ración fue ajustada semanalmente en función del crecimiento. Se alimentó a los camarones 5 veces al día en raciones iguales, previo a la alimentación se midieron el oxígeno disuelto y la temperatura de cada estanque. La salinidad y los compuestos nitrogenados se midieron tres veces por semana, añadiendo agua dulce o aplicando melaza cuando fuera necesario, de acuerdo a lo descrito por (Emerenciano *et al.*, 2012).

Condiciones experimentales

Al terminar la fase de engorda, cuya duración fue de 12 meses, 60 individuos fueron seleccionados de acuerdo a su estado de salud, peso promedio, presencia de todos sus apéndices y ausencia de melanización en los espermátóforos. Los camarones fueron trasladados al iglú de nutrición, dónde se realizó el experimento, y se emplazaron de manera aleatoria en 20 tanques de 100 L (al 90% de su capacidad) a una densidad de 3 camarones/tanque. Los tanques se dividieron en dos sistemas de cultivo, el primer sistema fue de agua clara, en el que los tanques estuvieron conectados a un sistema de recirculación con 3 reservorios de 1,000 L, el agua del sistema se recambió 3 veces por semana. El segundo sistema de cultivo fue el biofloc, en el que los tanques se dispusieron aislados entre sí y se llenaron con 20 L de biofloc de los estanques de engorda, completándose el volumen con agua de mar. Los tanques de biofloc se llenaron 15 días antes del comienzo del experimento, durante este periodo se añadió alimento comercial en polvo y melaza a cada tanque para promover la maduración del biofloc. Los tanques de cada sistema de cultivo fueron divididos de manera aleatoria en dos tratamientos diferenciados por la dieta, alimento comercial (El Pedregal, 35% de proteína cruda) o una mezcla de alimentos frescos. La mezcla de alimentos frescos consistió en mejillones, *Mytilus californianus*, poliquetos, *Nereis virens*, y calamar, *Loligo opalescens*. La ración diaria de comida fresca fue equivalente al 20% de la biomasa de cada tanque dividida en tres dosis iguales. El alimento comercial fue ofrecido a una ración diaria equivalente al 5% de la biomasa del tanque dividida en tres porciones iguales (se instalaron comederos para retirar los excedentes de los alimentos). La temperatura del agua se mantuvo en 27°C con la ayuda del aire acondicionado de la instalación y la adición de calentadores a cada tanque. El experimento fue configurado en cuatro tratamientos, los cuales se caracterizaron por el sistema de cultivo y el alimento (5 réplicas por tratamiento). Los tratamientos fueron cultivo en agua clara con alimento comercial (AC), cultivo en agua clara con alimento fresco (AF), cultivo en biofloc alimento comercial (BC), cultivo en biofloc con alimento fresco (BF). Todos los camarones fueron manipulados siguiendo las pautas de ARRIVE (Investigación Animal: Reporte de Experimentos in Vivo, de acuerdo con sus siglas en inglés).

Supervivencia, crecimiento y muestreo de los camarones

Al término del experimento de 30 días se registró el número de camarones vivos en cada tanque, se calculó la supervivencia como un porcentaje. El peso de cada camarón fue registrado con una balanza con una precisión de 0.0001g.

Únicamente se muestrearon 7 machos en estadio de muda C en cada tratamiento, al menos un camarón por tanque. La hemolinfa se extrajo del seno ventral localizado en la base del primer par de patas nadadoras con una jeringuilla fría de 3 mL, una vez extraída, la hemolinfa se colocó en un tubo Eppendorf en una proporción 2:1 de SIC-EDTA:hemolinfa. Los tubos fueron centrifugados a 800 g y 4 °C por 10 minutos, tras este lapso el sobrenadante se separó para los análisis bioquímicos del plasma, mientras que las células del fondo se resuspendieron en buffer de cacodilatos (100 mM cacodilatos, 10 mM CaCl₂, pH 7) para el análisis de actividad de ProFO. El sistema reproductivo se diseccionó, y una ámpula terminal se extruyó aleatoriamente. El espermátforo extruido se pesó con una precisión de 0.0001 g y se guardó en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de solución libre de calcio (Leung-Trujillo & Lawrence, 1987) para análisis de calidad espermática. El hepatopáncreas fue diseccionado e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido, se almacenó a -80 °C para posteriores análisis bioquímicos y de estrés oxidante.

Calidad espermática

Un espermátforo de cada camarón fue homogenizado manualmente en 2 mL de solución libre de calcio. Una vez homogenizado, una alícuota de 900 µL se colocó en un tubo Eppendorf junto con 0.1 mL de azul de tripano (1% p/v en solución libre de calcio). Tras 10 minutos se realizó el conteo espermático y la caracterización de las células espermáticas con ayuda de una cámara Neubauer Improved® (A. Braga *et al.*, 2015; Leung-Trujillo & Lawrence, 1987). Las células muertas fueron reconocidas por su coloración azul o por el contorno de su membrana una vez se han lisado, las células anormales se reconocieron por malformaciones en el cuerpo principal o la ausencia de *spike* (o presencia de más de uno). El índice gonadosomático se calculó como el porcentaje del peso del sistema reproductivo completo dividido entre el peso total del camarón.

Condición nutricional

La condición nutricional de los camarones fue medida a través de los metabolitos de la hemolinfa y el hepatopáncreas. Se homogenizó el hepatopáncreas en buffer TRIS pH 7.4 frío con ayuda del homogeneizador de tejido UltraTurrax (IKA Works Inc., USA) siguiendo una proporción de 100 mg de tejido por 2 mL de buffer. Una vez homogenizado, las muestras fueron divididas en seis alícuotas para análisis bioquímicos y de estrés oxidante. Las muestras destinadas al análisis de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y análisis bioquímicos fueron centrifugadas a 10,000 g y 4 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante fue almacenado a -80 °C para su posterior análisis.

Los metabolitos analizados en hemolinfa y hepatopáncreas fueron proteína total soluble (Bradford, 1976), glucosa (Kit Ellitech Diagnosis, GPSL-0507), colesterol (Kit Ellitech Diagnosis, CHSL-0507) y acilglicéridos (Kit Ellitech Diagnostics, TGML-0427). Los análisis fueron realizados midiendo la absorbancia en un lector de microplacas (Biorad Laboratories, Richmond, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de cada kit. Los índices nutricionales que se calcularon en el hepatopáncreas fueron acilglicéridos/proteína total soluble (AGP) y acilglicéridos/colesterol (AGC) (Palacios *et al.*, 1998; Emerenciano *et al.*, 2014). Para evaluar la concentración de la hemocianina se tomaron 10 µL de hemolinfa y se diluyeron en 990 µL de agua destilada, se leyó la absorbancia a 335 (Genesys 10UV, Thermo Scientific, USA). La concentración de hemocianina se calculó dividiendo la absorbancia entre el coeficiente de extinción ($\epsilon = 17.26$) y luego multiplicando por el factor de dilución empleado. El índice hepatosomático se calculó como el porcentaje del peso del hepatopáncreas dividido en el peso total del camarón.

La actividad de la fenoloxidasa total fue medida en microplaca poniendo 10 µL de células degranuladas a cada pozo junto con 10 µL de tripsina (1 mg/mL) e incubando 10 minutos a 25°C. A continuación, se añadieron 250 µL de L-DOPA (3 mg/mL) y se incubó durante 20 minutos para finalmente leer la absorbancia a 490 nm (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). La actividad de la fenoloxidasa se midió poniendo 10 µL de células degranuladas junto con 250 µL de L-DOPA, se incubó por 20 minutos y se leyó la absorbancia a 490 nm. La actividad de la

profenoloxidasa se calculó como la diferencia de la fenoloxidasa total menos la fenoloxidasa.

Estrés oxidante

Se analizaron las muestras del hepatopáncreas: las muestras centrifugadas se utilizaron para los análisis de SOD, Cat y GSH-Px, mientras que aquellas no centrifugadas se emplearon para las lecturas de peroxidación de lípidos (LPO) y carboxilación de proteínas. La actividad de SOD se determinó a través de un kit comercial (19160 SOD determination kit, Sigma–Aldrich), usando el protocolo adaptado para microplaca de 96 pozos. La actividad de la Cat se evaluó con el método reportado por Hadwan & Abed (2016), en el cual se realiza el análisis en dos microplacas, en una se colocan 10 μL de muestra con 100 μL de buffer y en la otra se colocan 10 μL de muestra y se adicionan 100 μL de buffer con H_2O_2 . Tras 3 minutos de incubación la reacción se detiene con la adición de 100 μL de molibdato de amonio en ambas microplacas y se lee la absorbancia en el lector de microplacas (Bio–Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). La actividad de GSH-Px se midió con una adaptación de la técnica del kit comercial (Sigma CGP1 Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay kit). En cada pozo de la microplaca se añadieron 20 μL de muestra junto con 120 μL de solución de trabajo (0.1 mM EDTA, 0.14 mM NADPH, 1 mM glutatión reducido y 1 U glutatión reductasa) y 16 μL de TBOOH (0.2mM). La medida se realizó a partir de la reducción de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm durante 10 minutos con lecturas en intervalos de 30 segundos. La actividad de la GSH-Px se expresó como μM NADPH/min/mg proteína. La LPO se determinó utilizando el método FOX adaptado a microplaca, en el cual los peróxidos de la muestra oxidan el hierro en pH ácido, y el ión Fe^{3+} se une al naranja de xilenol formando un aducto con coloración. Tras una incubación de 1 hora se midió la absorbancia a 565nm. Para la cuantificación de los peróxidos lipídicos se realizó una curva de calibración con hidroperóxido terbutílico en lugar de trifenilfosfina (Banerjee *et al.*, 2003). La cuantificación de carbonilos en proteínas oxidadas (PO) fue realizada empleando el método descrito por Mesquita *et al.* (2014), en el que a 200 μL de muestra en un tubo Eppendorf se le añadió el mismo volumen de DNPH (10 mM en HCl 2N), se mezcló con ayuda de un Vortex y se incubó durante 10

minutos. Tras este lapso se añadieron 50 µl de NaOH (6N) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 10,000 g. Finalmente, se tomaron 150 µL de cada tubo Eppendorf y se colocaron en un pozo de microplaca y se midió la absorbancia a 450 nm.

Calidad del agua

La temperatura y el oxígeno disuelto fueron medidos tres veces al día con un oxímetro (YSI Pro 20, Xylem Inc., USA) antes de cada alimentación. Los sólidos suspendidos, pH, nitrógeno amoniacal total (NAT) nitritos y salinidad fueron medidos tres veces a la semana (lunes, miércoles y viernes). Los sólidos suspendidos se midieron con un cono Imhoff de una muestra de 1 L de agua de cada tanque, tras esperar 45 minutos se midió el volumen de sólidos sedimentados de acuerdo con la NMX-AA-004-SCFI-2013 (2013). El pH se midió con un potenciómetro de mesa (Orion 3 Star, Thermo Scientific, USA). El NAT se midió a través de la técnica de azul de indofenol (Ringuet *et al.*, 2011) y la concentración de nitrito se midió con el método de diazotación (Sreekumar *et al.*, 2003) modificado para microplaca. Cuando el NAT o la concentración de nitrito alcanzaron el valor de seguridad de 1 mg/mL, se añadió melaza para mantener una relación C:N en 6:1 (Emerenciano *et al.*, 2017). La melaza seca está compuesta aproximadamente del 50% de C, suponiendo una concentración de NAT de 1.5 mg/mL en un tanque de 90 L, $0.0015 \times 90 \text{ L} = 0.135 \text{ g}$ de NAT; $0.135 \times 6 = 0.810 \text{ g}$ de C para mantener una relación C:N en 6:1; finalmente considerando la composición de la melaza 0.810 g de C representaría 1.62 g de melaza seca. Si la humedad de la melaza fuera del 25%, entonces se tendría que añadir 2.16 g de melaza al tanque. La salinidad fue medida con un refractómetro (Master-S/Mill, Atago Co., Japan) y se añadió agua dulce a los tanques para compensar la evaporación y mantener la salinidad en 36 ups.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa estadístico R versión 3.3.1. A los datos expresados como porcentajes se les realizó la transformación arcoseno previo al análisis. Se realizó un ANOVA (análisis de varianza, por sus siglas en inglés) bifactorial para comparar la calidad espermática, los parámetros bioquímicos de la hemolinfa y del hepatopáncreas. Se realizó un

ANOVA de una vía para analizar los parámetros fisicoquímicos del agua. Antes de realizar los análisis se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos. Cuando se encontraron interacciones, se realizó un análisis post hoc de Tukey para ponderar las diferencias entre los tratamientos. Los datos que no presentaron normalidad u homogeneidad de varianza fueron procesados con una extensión del análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis llamado Scheirer-Ray-Hare (Dong *et al.*, 2004). En caso de encontrar interacción, se realizó un análisis post hoc de Dunn para evaluar las diferencias entre tratamientos (Liu *et al.*, 2020). Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia $P < 0.05$.

La actividad de las enzimas antioxidantes y los indicadores de daño oxidante fueron examinados con un análisis de varianza permutacional de dos vías (PERMANOVA) basado en distancias euclidianas normalizadas. El valor de P fue estimado tras 9999 permutaciones de los datos crudos. Cuando se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para representar los biomarcadores de estrés oxidante en un espacio multivariado. Permitiendo así determinar cuáles de las variables explicaron la mayoría de la variabilidad en cada tratamiento (Magaña-Gallegos *et al.*, 2021).

Resultados

Calidad del agua

La temperatura del agua, la concentración de oxígeno y pH registraron valores similares entre tratamientos, con valores promedio de 27.5 °C, 4.5 mg/mL y 8, respectivamente (Tabla 2). Los tratamientos de biofloc registraron una concentración promedio de NAT de 0.13 mg/mL, la concentración de nitrito fue de 0.19 mg/mL y los sólidos suspendidos registraron un volumen de 21 mL/L; no se encontraron diferencias en estos indicadores en los tratamientos de biofloc. Se apreciaron diferencias inherentes al sistema de cultivo; los tanques pertenecientes al sistema de agua clara mantuvieron su concentración de NAT, nitrito y sólidos suspendidos por debajo del límite de detección de las técnicas.

Supervivencia, peso y calidad espermática.

Se detectó una alta supervivencia al final del experimento en todos los tratamientos, 80-93%, de manera similar, el peso de los camarones se mantuvo parejo en los diversos tratamientos (Tabla 3). La cantidad espermática total mostró una interacción entre el sistema de cultivo y el alimento, además se encontraron diferencias significativas relacionadas con la dieta (Figura 6). Los mayores valores de cantidad espermática se detectaron en los tratamientos AC y BF, por el contrario, los valores menores se encontraron en el tratamiento AF. La proporción de células normales, anormales y muertas se mantuvo similar entre tratamientos. El peso del espermátforo mostró una interacción con la misma tendencia que la cantidad espermática, aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

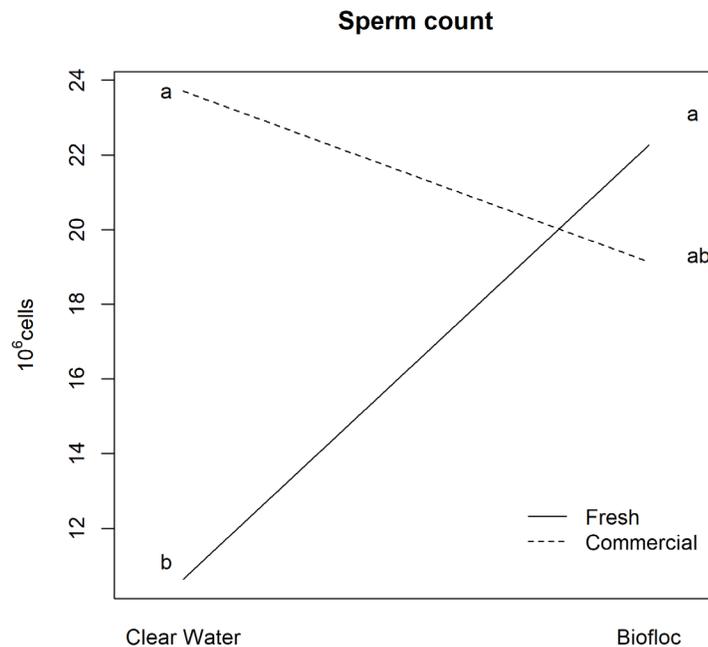


Figura 6. Interacción obtenida en la cantidad espermática de *L. setiferus* al realizar un ANOVA bifactorial 2x2 seguido por una prueba de Tukey.

Tabla 2. Datos de los parámetros fisicoquímicos del agua (promedio \pm ES) de los diferentes tratamientos de premaduración de *L. setiferus* tras 30 días de experimento

Variable	Agua clara		Biofloc		ANOVA†
	Comercial	Fresco	Comercial	Fresco	
Temperatura (°C)	27.29 \pm 0.15		27.66 \pm 0.14	27.58 \pm 0.14	ns
Oxígeno disuelto (mg/L)	4.58 \pm 0.13		4.54 \pm 0.11	4.62 \pm 0.13	ns
pH	7.92 \pm 0.07		8 \pm 0.06	7.96 \pm 0.08	ns
Amonio (mg/L)	nd		0.14 \pm 0.05	0.11 \pm 0.03	ns
Nitrito (mg/L)	nd		0.11 \pm 0.1	0.19 \pm 0.17	ns
SS (mL/L)	nd		23.8 \pm 6.78	18.8 \pm 3.03	ns

†ANOVA de una vía, ns, no significativo; SS, sólidos sedimentables; nd, no detectado.

Tabla 3. Datos de supervivencia, peso, calidad espermática e índice gonadosomático (promedio \pm ES) de los diversos tratamientos de machos de *L. setiferus* tras 30 días de experimento de premaduración.

Variable	Agua clara		Biofloc		ANOVA†		
	Comercial	Fresco	Comercial	Fresco	Sistema	Dieta	S x D
Supervivencia (%)	80 \pm 10.53	93.33 \pm 8.60	80 \pm 10.54	86.67 \pm 7.21	ns	ns	ns
Peso del camarón (g)	13.62 \pm 0.27	14.21 \pm 0.75	15.01 \pm 0.25	14.71 \pm 0.75	ns	ns	ns
Espermatóforo (mg)	16.03 \pm 1.75	11.58 \pm 2.72	14.14 \pm 1.11	18.49 \pm 0.89	ns	ns	*
Esperma total (10 ⁶)	23.71 \pm 2.1 ^a	10.64 \pm 3.28 ^b	19.14 \pm 1.61 ^{ab}	22.26 \pm 1.56 ^a	ns	*	**
Esperma normal (%)	52.71 \pm 9.97	47.11 \pm 13.3	40.46 \pm 11.42	51.62 \pm 3.99	ns	ns	ns
Esperma muerto (%)	37.82 \pm 7.1	41.7 \pm 13.03	46.05 \pm 6.96	42.37 \pm 2.82	ns	ns	ns
Esperma anormal (%)	9.47 \pm 3.1	11.19 \pm 7.79	13.49 \pm 4.87	6.01 \pm 1.95	ns	ns	ns
IG (%)	1.7 \pm 0.15	1.47 \pm 0.23	1.45 \pm 0.09	1.89 \pm 0.15	ns	ns	ns

† ANOVA de dos vías donde, *=P<0.05; **=P<0.01; ns= no significativo. Diferentes superíndices indican diferencias significativas en caso de interacción (test post hoc de Tukey. P=0.05). IG, índice gonadosomático.

Condición nutricional

El índice hepatosomático mostró diferencias significativas relacionadas con la dieta, con valores mayores en los tratamientos de alimento comercial (Tabla 4). Una tendencia similar se encontró con la concentración de acilglicéridos y glucosa del hepatopáncreas, con mayores valores en los tratamientos de alimento comercial. Al ser los acilglicéridos el dividendo de los índices bioenergéticos AGP y AGC, estos siguieron la misma tendencia, con mayores valores en los tratamientos de alimento comercial. Se detectó una interacción en el colesterol del hepatopáncreas, con mayores concentraciones en los tratamientos AC y BF, aunque sin diferencias significativas (Figura 7A).

El colesterol de la hemolinfa mostró una interacción entre los factores experimentales y también se detectaron diferencias entre los sistemas de cultivo, con mayores concentraciones en los tratamientos de agua clara (Tabla 4). La actividad de la ProFO mostró una interacción entre los factores experimentales, pero no se llegaron a detectar diferencias significativas entre tratamientos (Figura 7B).

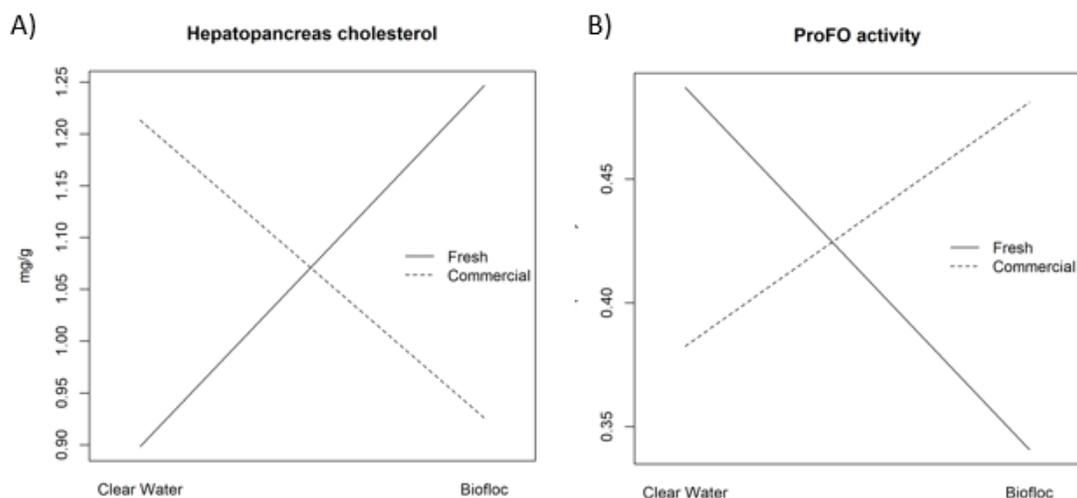


Figura 7. Interacciones observadas en la concentración de colesterol en el hepatopáncreas (A) y de la actividad de la ProFO (B) en la hemolinfa tras realizarse un ANOVA bifactorial 2x2 seguido por una prueba de Tukey.

Tabla 4. Datos de la composición bioquímica del hepatopáncreas y la hemolinfa (promedio \pm SE) de los diferentes tratamientos de *L. setiferus* tras 30 días de experimento.

Variable	Agua clara		Biofloc		ANOVA doble vía†		
	Comercial	Fresco	Comercial	Fresco	Sistema	Dieta	S x D
<i>Hepatopáncreas</i>							
IH (%)	2.88 \pm 0.16	2.21 \pm 0.13	3.33 \pm 0.08	2.65 \pm 0.18	ns	**	ns
Acilglicéridos (mg/g)	27.43 \pm 5.93	10.36 \pm 3.4	25.93 \pm 3.85	12.34 \pm 4.99	ns	**	ns
Colesterol (mg/g)	1.21 \pm 0.18	0.9 \pm 0.03	0.93 \pm 0.14	1.25 \pm 0.15	ns	ns	*
Glucosa (mg/g)	1.66 \pm 0.45	0.69 \pm 0.17	1.74 \pm 0.38	1.18 \pm 0.23	ns	*	ns
PTS (mg/g)	23.42 \pm 1.73	23.19 \pm 1.81	26.72 \pm 1.99	23.52 \pm 1.16	ns	ns	ns
AGP	1.19 \pm 0.27	0.49 \pm 0.19	0.96 \pm 0.09	0.54 \pm 0.24	ns	*	ns
AGC	24.53 \pm 7.01	11.62 \pm 3.85	29.7 \pm 3.91	9.03 \pm 2.44	ns	**	ns
<i>Hemolinfa</i>							
Hemocianina (mMol/L)	1.42 \pm 0.07	1.14 \pm 0.11	1.58 \pm 0.21	1.52 \pm 0.21	ns	ns	ns
Acilglicéridos (mg/mL)	0.49 \pm 0.08	0.3 \pm 0.04	0.5 \pm 0.08	0.38 \pm 0.11	ns	ns	ns
Colesterol (mg/mL)	0.26 \pm 0.04 ^a	0.26 \pm 0.02 ^a	0.21 \pm 0.03 ^{ab}	0.14 \pm 0.01 ^b	**	ns	*
Glucosa (mg/mL)	0.22 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02	0.19 \pm 0.03	ns	ns	ns
PTS (mg/mL)	182.6 \pm 8.09	171.04 \pm 3.47	204.51 \pm 12.17	183.72 \pm 17.17	ns	ns	ns
ProFO (DO)	0.382 \pm 0.071	0.487 \pm 0.046	0.481 \pm 0.026	0.341 \pm 0.045	ns	ns	*

† ANOVA de doble vía donde *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$; ns= no *significativo*. Diferentes superíndices indican diferencias significativas en caso de interacción (test post hoc de Tukey. $P = 0.05$). IH, índice hepatosomático; PTS, proteína total soluble, ProFO, profenoloxidasa; DO, densidad óptica; AGP, índice bioenergético calculado como acilglicéridos/ proteína; AGC, índice bioenergético calculado como acilglicéridos/ colesterol.

Estrés oxidante

Los biomarcadores de estrés oxidante mostraron en el PERMANOVA diferencias significativas ($P < 0.01$) relacionadas con la dieta, alimento fresco y alimento comercial (Tabla 5). La SOD y la GSH-Px mostraron una tendencia de mayor actividad en aquellos tratamientos provistos de alimento fresco. Por otro lado, la actividad de la Cat y la concentración de LPO mostraron mayores valores en los tratamientos de alimento comercial, mientras que PO mostró valores similares en todos los tratamientos (Figura 8). Las variables que contribuyeron a la mayor variabilidad en los biomarcadores de estrés oxidante fueron SOD, GSH-Px y LPO en el PCA, el cual explicó en sus dos dimensiones el 65.1% de la variabilidad total (Figura 9 A y B).

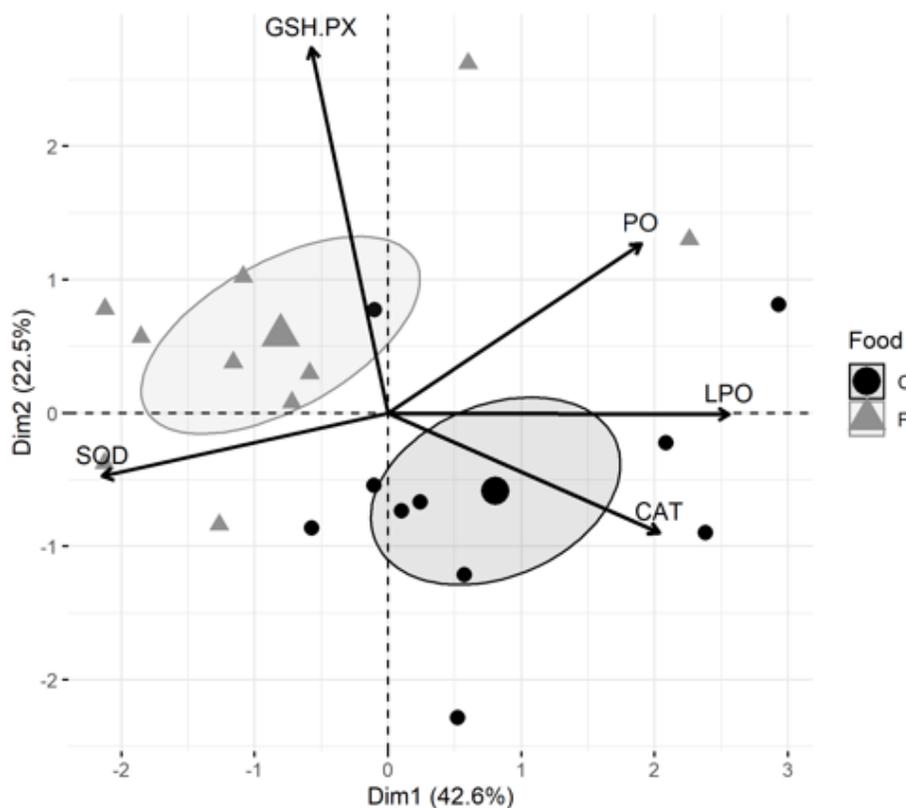


Figura 8. Análisis de componentes principales de los biomarcadores de estrés oxidante de *L. setiferus* tras 30 días de experimento de premaduración. C, alimento comercial; F alimento fresco; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa, GSH-Px, glutatión peroxidasa; LPO, peroxidación de lípidos; PO, proteínas oxidadas.

Tabla 5. Datos de los biomarcadores de estrés oxidante (promedio \pm ES) de los diferentes tratamientos del experimento tras 30 días de premaduración de los machos de *L. setiferus*.

Variable	Agua clara		Biofloc		PERMANOVA†		
	Comercial	Fresco	Comercial	Fresco	Sistema	Dieta	S x D
SOD (U/mg prot.)	16.57 \pm 4.2	18.32 \pm 2.76	14.3 \pm 2.92	21.78 \pm 5.08			
CAT (U/mg prot.)	1.33 \pm 0.11	1.12 \pm 0.11	1.63 \pm 0.25	1.07 \pm 0.07			
GSH-Px (μ M/min/mg prot.)	5.89 \pm 0.83	7.98 \pm 0.65	5.42 \pm 0.37	7.01 \pm 0.31	ns	**	ns
LPO (μ M/mg)	9.09 \pm 2.17	2.11 \pm 0.1	6.34 \pm 1.85	3.89 \pm 2.32			
PO (nM/mg)	0.62 \pm 0.07	0.52 \pm 0.18	0.67 \pm 0.07	0.67 \pm 0.15			

PERMANOVA de doble vía donde *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$; ns= no significativa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH-Px, glutatión peroxidasa; LPO, peroxidación de lípidos; PO, proteínas oxidadas; prot., proteína.

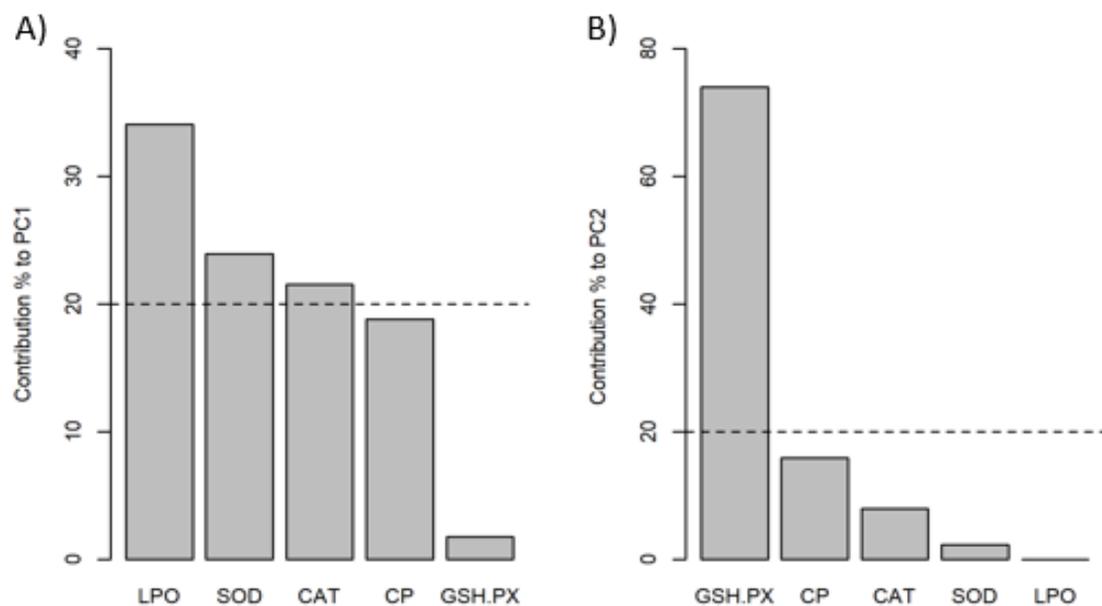


Figura 9. Porcentaje de contribución de cada biomarcador del estrés oxidante al componente principal 1 y 2 (A y B, respectivamente) del análisis de componentes principales. La línea punteada indica la contribución promedio esperada. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH-Px, glutatión peroxidasa; LPO, peroxidación de lípidos; PO, proteínas oxidadas

Discusión

Calidad del agua

La temperatura es considerada un factor con influencia directa en la calidad espermática de *L. setiferus*, esta se mantuvo por debajo de los 28 °C en todos los tratamientos. Esta temperatura se consideraría adecuada para prevenir la melanización del espermátforo de acuerdo a Pascual *et al.* (1998) y Sánchez *et al.* (2001). La concentración de oxígeno se mantuvo por encima de los 4 mg/mL en todos los tratamientos y el pH cercano a 8, estos valores son considerados como correctos para el desarrollo del cultivo de camarones en biofloc (Emerenciano *et al.*, 2017). En un experimento reciente de crecimiento de *L. setiferus* generación F₀ en biofloc, Valenzuela-Jiménez *et al.* (2021b) reportaron mayores concentraciones de oxígeno, probablemente debido a que los tanques eran exteriores, dónde la luz solar aumenta la producción primaria. La concentración de NAT y nitrito se mantuvo baja durante todo el experimento, sin alcanzar en ningún momento el valor de seguridad de 1 mg/mL establecido por Emerenciano *et al.* (2017). Valenzuela-Jiménez *et al.* (2021b) registraron unos valores de nitrito mucho mayores que los reportados en este trabajo, incluso en baja salinidad, dónde los nitritos se vuelven más tóxicos debido a la ausencia del ion cloruro (Furtado *et al.*, 2016). La resistencia de los camarones a los factores ambientales está relacionada con su estadio ontogénico, es por ello que las postlarvas pueden lidiar con cambios radicales en los parámetros fisicoquímicos del agua (Chong-Robles *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 1998). Los sólidos suspendidos presentaron valores de 23.8 y 18.8 mL/L en los tratamientos BC y BF, los cuales se encuentran ligeramente superiores al máximo recomendado por Emerenciano *et al.* (2017), establecido en 15 mL/L. La cantidad de sólidos suspendidos registrados en este trabajo son tres veces mayores que los registrados por Valenzuela-Jiménez *et al.* (2021b), sin embargo no parece haber afectado a los parámetros que se discuten a continuación.

Supervivencia, peso y calidad espermática

Se observaron interacciones entre el alimento y el sistema de cultivo en el peso del espermátforo y la cantidad de células espermáticas. Los tratamientos AC

y BF mostraron el mayor número de células espermáticas y los espermátóforos más pesados. La correlación entre el peso del espermátóforo y la cantidad de células espermáticas fue determinada en *L. vannamei* (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003), y los datos del presente trabajo concuerdan con los publicados por Leung-Trujillo & Lawrence (1991), lo cual podría sugerir que *L. setiferus* presenta el mismo patrón.

Todos los tratamientos, excepto el AF, mostraron aproximadamente 20 millones de células espermáticas, cantidad superior a lo reportado para individuos silvestres de *L. setiferus* (Pascual *et al.*, 1998; Rosas *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2001). Esta cantidad espermática es muy elevada teniendo en cuenta que el peso promedio de los camarones fue de 14g. Si se compara con el modelo logístico publicado por Rosas *et al.* (1993b), los camarones de este experimento tuvieron seis veces más espermatozoides que animales silvestres del mismo peso. Una explicación podría ser que la edad de los individuos silvestres es indeterminada, probablemente hayan sido animales más jóvenes que los camarones de este estudio (13 meses). En la naturaleza, los animales más pequeños son considerados más jóvenes, mientras que los animales más pesados se consideran mayores (Mace & Rozas, 2017). En contraste con el alto conteo espermático, la baja proporción de células espermáticas normales y el alto porcentaje de células muertas (entre 38-46%) podría estar relacionado al bajo peso de los camarones del experimento. Cuando *L. vannamei* de la misma edad fueron cultivados en diversas condiciones, los individuos de menor tamaño (22 g) mostraron el doble de células muertas que los animales más pesados (38 g) (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003); este patrón podría extenderse a *L. setiferus*, explicando así la gran proporción de células muertas encontradas.

En lo relativo a la proporción de células espermáticas normales, los tratamientos AC y BF mostraron los valores más altos, coincidiendo con la mayor cantidad espermática. De manera interesante, los valores más bajos de células espermáticas viables se encontraron en el tratamiento BC, el cual a pesar de poseer un número similar de células espermáticas que AC y BF, mostró un 10% menos de células espermáticas normales. El porcentaje de células espermáticas normales en este experimento es sensiblemente menor que el 95% reportado por Pascual *et al.* (1998) para ejemplares silvestres de *L. setiferus*. Por otro lado, algunos trabajos han

mostrado que los ejemplares silvestres de *L. setiferus* poseían únicamente un 60% de células espermáticas viables (Sánchez *et al.*, 2001), estas diferencias se pueden explicar por la variabilidad estacional de las poblaciones silvestres de *L. setiferus* (Rosas *et al.*, 2004).

A excepción de este estudio, el único experimento realizado con la calidad espermática de machos generación F₀ de *L. setiferus* fue el reportado por Goimier *et al.* (2006). Los autores determinaron que una inclusión del 45% de proteína en un pellet experimental era la cantidad óptima de este nutriente para lograr una buena calidad espermática. En ese tratamiento registraron 23.6 millones de células espermáticas con un 57% de células normales, cantidades muy similares a las obtenidas en nuestro estudio en los tratamientos AC y BF. Los camarones del tratamiento AC fueron alimentados con un pellet con un 35% de proteína, mientras que los camarones de BF fueron alimentados con una mezcla de alimentos frescos los cuales poseen en promedio un 65% de proteína cruda (Corral-Rosales *et al.* 2018) más la proteína nativa del biofloc (Emerenciano *et al.* 2012). Estas diferencias en la cantidad de proteína dietética no se vieron reflejadas en las concentraciones de proteína en la hemolinfa ni en el hepatopáncreas. Estos resultados sugieren que la cantidad de proteína no sería el factor clave de la dieta que promueve una mejor calidad espermática.

Únicamente se ha realizado un experimento previo de premaduración de machos de camarón en biofloc y agua clara, en el que se buscaba qué sistema y alimento promovían una mejor calidad espermática en *L. vannamei* (Braga *et al.*, 2015). Los autores encontraron que tanto los animales mantenidos en agua clara con alimento fresco como los cultivados en biofloc con pellet comercial presentaban una alta calidad espermática, mientras que los mantenidos en biofloc con alimento fresco mostraron los peores resultados (Braga *et al.*, 2015). En el experimento actual, *L. setiferus* mostró la tendencia opuesta, con la mejor calidad espermática en los tratamientos AC y BF, lo cual nos indicaría que el mejor sistema de cultivo y alimento para la premaduración son especie-específicos. Tanto los camarones del experimento de Braga *et al.* (2015) como los del presente trabajo realizaron su fase de crecimiento previa al experimento en sistema biofloc.

Condición nutricional

La condición nutricional se vio afectada por la dieta suministrada, proveyendo a los camarones de un mayor índice hepatosomático, una mayor concentración de acilglicéridos, glucosa e índices AGP y AGC en los tratamientos alimentados con pellet comercial. El hepatopáncreas es el principal órgano de almacenamiento de nutrientes en los camarones, mientras que los acilglicéridos son las reservas energéticas más eficientes por unidad de peso y la glucosa puede ser empleada rápidamente para obtener energía (Palacios *et al.*, 1998; Rosas *et al.*, 1993a). La concentración de acilglicéridos ha sido empleada como un factor de condición en larvas de diversas especies, por lo que los índices bioenergéticos AGP y AGC son comúnmente aplicados en estudios de reproducción para checar la migración de ciertos nutrientes en las hembras de camarón, del hepatopáncreas hacia el ovario, el huevo y los nauplios (larvas) (Emerenciano *et al.*, 2014; Magaña-Gallegos *et al.*, 2021; Palacios *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2003). En el experimento actual, las diferencias en estos índices bioenergéticos estuvieron relacionadas con las variaciones de concentración de acilglicéridos en el hepatopáncreas y no tuvieron un efecto directo sobre la calidad espermática. Finalmente, el colesterol del hepatopáncreas mostró concentraciones mayores, pero no de manera significativa, en los tratamientos AC y BF, siguiendo la misma tendencia que el peso del espermátforo y la cantidad espermática.

La concentración de colesterol de la hemolinfa mostró una interacción entre los factores experimentales, con mayores concentraciones en los tratamientos de agua clara y la menor observada en el tratamiento BF. Esta tendencia no coincide con la concentración de colesterol observada en el hepatopáncreas y podría estar relacionada con las 18 horas de ayunas previas al muestreo. Si la concentración de nutrientes en la hemolinfa está relacionada con el tiempo transcurrido tras la alimentación y el biofloc provee una fuente de alimento constante, se vuelve complicado realizar una comparación adecuada entre los sistemas de cultivo en este tejido (Emerenciano *et al.*, 2014; Rosas *et al.*, 2001). De los metabolitos analizados en este estudio, la hemocianina, el colesterol y la proteína total soluble presentaron menores concentraciones que las observadas por Rosas *et al.* (2004) en poblaciones silvestres de *L. setiferus*.

La ProFO mostró una interacción entre los factores experimentales, mostrando una tendencia inversa a la observada en la cantidad espermática. La ProFO posee un importante rol en la respuesta inmune contra los patógenos, ya que esta desencadena la biosíntesis de melanina, la cual encapsula y produce sustancias citotóxicas contra los invasores (Amparyup *et al.*, 2013). La infertilidad en machos de *L. setiferus* ha sido relacionada con dos patologías diferentes; el síndrome degenerativo del tracto reproductivo de los machos (MRTDS por sus siglas en inglés) y la melanización del sistema reproductivo de los machos (MRSM, por sus siglas en inglés) (Chamberlain, 1983; Talbot *et al.*, 1989). Los síntomas del MRTDS son únicamente observables al diseccionar el vaso deferente o el espermatóforo y observando en el microscopio todas las células espermáticas muertas. Por el contrario, el MRSM es detectable con una observación ventral de los machos, caracterizado por un oscurecimiento marrón en el área del espermatóforo. La melanización ha sido reportada en diversas especies de peneidos, la explicación principal es que algún tipo de estrés (alta temperatura, cautiverio, mala alimentación o bacterias oportunistas) conduce a un desbalance del sistema de regulación de la ProFO. La melanina es producida en exceso y se acumula en los espermatóforos y los vasos deferentes (incluso llegando a los testículos en casos extremos) causando un aumento del número de células espermáticas anormales y muertas (Bray *et al.*, 1985; Leung-Trujillo & Lawrence, 1987; Pascual *et al.*, 1998, 2003). Sin embargo, una ligera melanización puede estar relacionada con un espermatóforo viejo que será renovado tras la muda (Parnes *et al.*, 2006). Aunque no se detectó melanización en este experimento, la interacción de la ProFO de la hemolinfa mostró la tendencia opuesta a la observada en la cantidad espermática. Podría así inferirse que la mayor calidad espermática está relacionada con una baja actividad de la ProFO en la hemolinfa, siguiendo la misma tendencia que la reportada por Sánchez *et al.* (2001) en *L. setiferus* silvestres.

Los valores de actividad de la ProFO encontrados en este experimento fueron mayores que los reportados por (Rosas *et al.*, 2004) para machos silvestres de *L. setiferus* y ligeramente menores que los observados por Sánchez *et al.* (2001) al establecer su línea base (cerca de 0.5 DO a 490 nm). Nuestros resultados se

encontrarían por tanto dentro de los valores previamente reportados para machos silvestres de *L. setiferus* no melanizados.

Estrés oxidante

La SOD exhibió una tendencia de mayor actividad en aquellos tratamientos sustentados con una mezcla de alimentos frescos, siendo el rol principal de esta enzima el reducir los radicales de oxígeno en peróxidos (Cárdenas & Pedraza, 2006). La Cat presentó mayor actividad en los tratamientos alimentados con pellet comercial, mientras que la GSH-Px mostró la tendencia opuesta, con mayor actividad en los tratamientos de alimento fresco, similar a la SOD. La Cat transforma peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua, teniendo una función similar a la GSH-Px; la mayor diferencia entre estas dos enzimas es su magnitud de acción (Cárdenas & Pedraza, 2006). La Cat trabaja a una mayor concentración de peróxido, mientras que la GSH-Px actúa a menores concentraciones debido a su mayor afinidad por el peróxido (Duan *et al.*, 2016; Martín & Matés, 1999). El alimento fresco promovió un mejor desempeño del sistema antioxidante, la alta actividad de la SOD y la GSH-Px debería indicar una baja concentración de peróxido, lo cual se confirmó con el bajo nivel de LPO en estos tratamientos. Los indicadores anteriormente mencionados mostraron la tendencia opuesta en los tratamientos provistos con pellet comercial, por lo que este tipo de alimento promovió una menor defensa frente a los agentes oxidantes.

Los resultados de este estudio mostraron que el sistema de cultivo no fue un factor determinante para el estado del sistema antioxidante de los camarones. Sin embargo, recientemente Valenzuela-Jiménez *et al.* (2021a) encontraron que los juveniles silvestres de *L. setiferus* mantenidos en biofloc presentaron un mejor estado del sistema antioxidante en comparación a los cultivados en agua clara. Otras especies de camarones peneidos, tales como *L. stylirostris* y *L. vannamei*, mostraron la misma tendencia, ya que cuando fueron cultivados en biofloc mostraron una mayor actividad del sistema antioxidante (Aguilera-Rivera *et al.* 2019; Cardona *et al.* 2016). En dichos estudios el mejor estado del sistema antioxidante promovió una mejora en el desempeño reproductivo y una mayor resistencia frente a *Vibrio*, respectivamente (Aguilera-Rivera *et al.* 2019; Cardona *et al.* 2016).

Los desbalances en el equilibrio oxidante/antioxidante en el sistema reproductivo han sido identificados como una de las causas principales de la infertilidad de los machos en mamíferos e invertebrados (Mansour *et al.*, 2006; Sabeti *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018).

En un estudio reciente, Montalvo *et al.* (2022a) demostraron que cuando *L. vannamei* fue alimentado con una cantidad óptima de vitamina E, la calidad espermática fue mayor, mientras que la actividad y la expresión génica de ProFO, GSH-Px y SOD en el tracto reproductivo fueron menores. Los resultados obtenidos en el presente estudio no muestran una conexión entre el estado oxidante del hepatopáncreas y la calidad espermática, lo cual se debería a que el hepatopáncreas es un órgano relacionado con diversas funciones fisiológicas (metabolismo de diferentes nutrientes, degradación y almacenamiento, muda y metabolismo hormonal, reproducción, sistema inmune y osmorregulación) (Nagai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019). Los estudios futuros deberían analizar el estado oxidante del sistema reproductivo y el hepatopáncreas para obtener un modelo integrador del estado nutricional-antioxidante-reproductivo de los camarones machos. El análisis de la expresión génica en ambos tejidos proveería de información importante para el entendimiento de estos procesos.

Conclusión

Los datos recabados en este trabajo de investigación mostraron que la mejor calidad espermática de los machos de *L. setiferus* es obtenida cuando la premaduración se realiza en agua clara con alimento comercial o en sistema biofloc con alimento fresco. Una alta concentración de colesterol en el hepatopáncreas estuvo relacionada con una mayor calidad espermática y una menor actividad de la ProFO en la hemolinfa. La dieta influyó sobre el estado del sistema antioxidante del hepatopáncreas, sin embargo, no se observó una relación de éste con la calidad espermática.

Capítulo III

Calidad espermática de *Litopenaeus vannamei* alimentado con un pellet experimental o alimento fresco en dos sistemas de cultivo.

Traducción del artículo: “Sperm quality of *Litopenaeus vannamei* fed fresh or experimental food in two culture systems”. Publicado en la revista científica “Journal of the World Aquaculture Society” en septiembre de 2023.

Resumen

El aumento de la producción de camarón a través de la acuicultura se ha llevado a cabo gracias a la optimización de procesos como la nutrición en las fases de premaduración y reproducción de los camarones. En este trabajo se buscó el mejor sistema de cultivo y alimento durante la fase de premaduración para mejorar las características reproductivas de los machos de *Litopenaeus vannamei*; se comparó el sistema biofloc con agua clara y un pellet experimental con una mezcla de alimentos frescos. Se midieron la supervivencia, la calidad espermática, parámetros del sistema inmune como la profenoloxidasa (ProFO) y el conteo de hemocitos, la condición nutricional medida a través de los metabolitos en la hemolinfa, el hepatopáncreas y el tracto reproductivo, los biomarcadores de estrés oxidante en el hepatopáncreas y el tracto reproductivo y la expresión relativa de los genes de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, ProFO, alfa2-macroglobulina y caspasa en el tracto reproductivo.

La supervivencia fue mayor en los tratamientos alimentados con pellet experimental (100%) que los de alimento fresco (87%). Los camarones alimentados con pellet experimental mostraron un mayor índice hepatosomático, mayor concentración de nutrientes y mayor actividad antioxidante en el tracto reproductivo. La calidad espermática fue similar en todos los tratamientos, independientemente del alimento o del sistema de cultivo. Estos prometedores resultados deberían ser ratificados con un estudio bioeconómico en un criadero de camarones con tanques monosexuales, alimentando a los machos con los pellets experimentales.

Introducción

La industria camaronera está creciendo rápidamente, siendo *Litopenaeus vannamei* la especie más cultivada; su producción se ha duplicado en una década, pasando de 2.6 a 5.8 millones de toneladas en el periodo de 2010 a 2020 (FAO, 2022). La base de este crecimiento han sido la gran demanda del producto y las mejoras en la tecnología de su producción (Emerenciano *et al.*, 2022).

Los esfuerzos de mejorar los procesos reproductivos de *L. vannamei* se enfocaron principalmente en las hembras, sin embargo, en la actualidad está aumentando el interés en la condición reproductiva de los machos (Alfaro-Montoya

et al., 2019). Si la condición nutricional de los reproductores es óptima, la calidad de la descendencia será buena (Racotta *et al.*, 2003). Durante la premaduración de los reproductores, los requerimientos nutricionales de los machos y las hembras no son los mismos; por lo que se busca un alimento óptimo para los machos (Perez-Velazquez *et al.*, 2003). En los últimos años nuestro equipo de trabajo ha estado desarrollando un pellet experimental formulado con ingredientes de alta calidad y una inclusión óptima de vitaminas (Montalvo *et al.*, 2022a,2022b; Ortiz-Guillén *et al.*, 2022).

El uso del biofloc puede ser benéfico en las diversas fases del cultivo de camarón, cuando la maduración es realizada en biofloc se logra un aumento en la producción de nauplios. Sin embargo, no se han evidenciado claramente los beneficios del biofloc sobre la condición reproductiva de los machos (Braga *et al.*, 2015, 2018; Emerenciano *et al.*, 2022). El objetivo de este estudio fue comparar un pellet experimental con una mezcla de alimentos frescos en dos sistemas de cultivo durante la premaduración de los machos de *L. vannamei*. Esta comparación se realizó a través de la medición de la calidad espermática, la condición nutricional, los indicadores del sistema inmune y el estado oxidante del hepatopáncreas y el tracto reproductivo.

Materiales y métodos

Origen de los camarones

Los camarones fueron obtenidos del área de producción del Programa Camarón de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias, UNAM. Los camarones fueron criados en los tanques externos desde postlarva 10 hasta alcanzar una edad de 10 meses. Los camarones se sembraron a una densidad de 200 camarones/m² y fueron alimentados con pellet comercial Malta Cleyton Api-Camarón 35%. La ración diaria fue ajustada durante el crecimiento de acuerdo con las instrucciones del fabricante; la cantidad diaria se dividió en 5 raciones iguales. Al alcanzar los 10 meses de edad, sesenta machos fueron seleccionados para el experimento de acuerdo con la integridad de sus apéndices. Todos los camarones fueron manipulados de acuerdo con las guías de

ARRIVE (siglas en inglés de la organización Investigación Animal: Reporte de Experimentos In Vivo).

Condiciones experimentales

El experimento presentó un diseño bifactorial: el primer factor fue el sistema de cultivo empleado, biofloc o agua clara (AC); el segundo factor fue el alimento proporcionado, pellet experimental (PE) o una mezcla de alimentos frescos (calamar, mejillón y poliqueto, dieta típica ofrecida en los laboratorios de reproducción; MAF). El pellet fue formulado con cantidades óptimas de vitamina A, C y E de acuerdo con los resultados de experimentos previos del proyecto PAPIIT INN220819. El experimento quedó configurado en cuatro tratamientos experimentales surgidos de la combinación de los dos factores; cultivo en biofloc con alimento fresco (BF), cultivo en biofloc con pellet experimental (BP), cultivo en agua clara con alimento fresco (AF) y cultivo en agua clara con pellet experimental (AP). Cada tratamiento tuvo tres réplicas y el tanque fue considerado la unidad experimental. El área experimental contó con 12 tanques cilíndricos de 500 L, en cada tanque se ubicaron 5 camarones de manera aleatoria. La alimentación se realizó tres veces al día (0800, 1300 y 1900 h); la ración ofrecida a los tanques de los tratamientos PE fue del 5% de la biomasa del tanque y a los tratamientos MAF se entregó un 20% de la biomasa del tanque (40% calamar, 40% mejillón y 20% poliqueto). Se utilizaron bandejas de alimentación para facilitar la remoción de restos de comida. Los tanques de agua clara estuvieron conectados a un sistema de recirculación conectado a un reservorio de 1200 L, el 30% del volumen de agua de este sistema se renovó diariamente. Los tanques en sistema biofloc se llenaron 20 días antes del inicio del experimento y a cada tanque se le añadió pellet comercial pulverizado junto con melaza para promover el desarrollo de la comunidad microbiana y la formación de biofloc.

El pellet experimental fue preparado mezclando los ingredientes (Tabla 6) en una mezcladora Hobart y se le añadió agua para formar una masa. Con ayuda de un molino de carne se formaron espaguetis con un diámetro de 4 mm, estos se pusieron en una bandeja y fueron secados durante seis horas en un horno a 60°C. Posteriormente, los pellets se empacaron y almacenaron a 2°C hasta su uso.

Se analizaron los contenidos de proteína, lípidos y humedad de los alimentos utilizados (Tabla 6). El contenido en nitrógeno fue medido con un analizador elemental ECS 4010 (Costech Analytical Technologies Inc., USA) y el resultado fue multiplicado por 6.25 para obtener la cantidad de proteína. El contenido de lípidos se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Folch *et al.* (1957). La humedad se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito en (AOAC, 2005)

Tabla 6. Composición del pellet experimental y análisis proximal de los alimentos

Ingrediente	Pellet experimental (g/100g)	Poliquetos	Mejillón	Calamar
Harina de pescado (sardina)	40			
Harina de calamar ¹	4.6			
Harina de trigo ²	17.54			
Suero de leche	12			
Concentrado proteico de soya	10			
Levadura de cerveza ²	5			
Aceite de hígado de bacalao ³	4			
Lecitina de soya	2			
Colesterol	0.5			
Lisina ⁴	0.4			
Leucina ⁴	0.3			
Hidroxiprolina ⁴	0.2			
Grenetina	1.45			
Alginato de sodio	1.5			
Micro Rovimix Camarón ⁵	0.1			
Stay-C ⁵	0.3			
dl- α -tocoferol ⁵	0.1			
Carophyll Pink ⁵	0.01			
Humedad	3.5	78.2	74.9	76.2
Proteína	45.9	72.5	49.6	64.9
Lípidos	9.8	13.2	5.8	6.1

¹ Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco, México. ² MYN Distribuidora S.A. de C.V. Mérida, Yucatán, México. ³ Drogas Tacuba S.A. de C.V. Ciudad de México, México. ⁴ Future Foods S.A. de C.V. Tlalnepantla, Estado de México, México. ⁵ DSM, Heerlen, Holanda.

Calidad del agua

La temperatura del agua y el oxígeno disuelto se midieron tres veces al día con un oxímetro (YSI PRO 20, Xylem Inc., USA) antes de la alimentación. Las concentraciones de sólidos sedimentables (SS), pH, salinidad, nitrógeno amoniacal total (NAT) y nitritos se midieron tres veces por semana. Los sólidos sedimentables

se analizaron tomando 1 L de agua de cada tanque en un cono Imhoff y dejando decantar un periodo de 40 minutos. El pH se registró con un potenciómetro (Orion 3 Star, Thermo Scientific, USA). La salinidad se midió con un refractómetro (Master-S/Mill, Atago Co., Japón) y se añadió agua dulce a los tanques para mantener la salinidad en 36 ups. Las concentraciones de nitrógeno amoniacal total y nitrito se midieron según la técnica de Rodier (1981), adaptada para lector de microplacas. Cuando la concentración de NAT o nitrito alcanzó 1 mg/mL, se añadió melaza para mantener una relación C:N de 6:1, tal como se describe en Barral-Pintos & Gaxiola (2022).

Parámetros zootécnicos y muestreo de los camarones

Al final del ensayo, se comprobó la supervivencia en cada tanque y se pesaron los camarones con una balanza con precisión de 0.001 g. Se muestrearon 4 cuatro camarones en intermuda (estadio C) por tanque, con una jeringa de 3 mL previamente refrigerada se extrajo la hemolinfa del seno ventral en la base del primer par de pereopodos. Una vez extraída, se tomó una muestra para el recuento de hemocitos y el resto de la hemolinfa se colocó en un tubo Eppendorf en una proporción 2:1 SIC-EDTA:hemolinfa y se centrifugó a 800 g por 10 min a 4°C. El plasma sobrenadante se colocó en un nuevo tubo Eppendorf para el análisis bioquímico y el botón celular se utilizó para analizar la actividad de la profenoloxidasas (ProFO). Antes de la disección se comprobó visualmente la presencia de melanización en ambos espermatóforos. El aparato reproductor se diseccionó y separó en dos mitades: la primera mitad se conservó en RNA later para análisis genéticos. El espermatóforo de la segunda mitad del tracto reproductivo se extruyó para el análisis de calidad espermática mientras que el tejido restante se colocó en un tubo Eppendorf, se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C para análisis de estrés oxidante y bioquímico. El hepatopáncreas se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C para los análisis de estrés oxidante y bioquímico.

Calidad espermática.

Los espermatóforos extruidos se homogeneizaron manualmente en 2 mL de solución libre de calcio. Una vez homogeneizados, se colocó una alícuota de 900 µL en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añadieron 0.1 mL de azul de tripano (1%

p/v en solución libre de calcio). Después de 10 minutos, se realizó el conteo diferencial de los espermatozoides en una cámara Neubauer Improved®: las células muertas se reconocieron por su coloración azul o por la forma de la membrana una vez la célula se ha lisado, las células anormales se reconocieron por malformaciones en el cuerpo principal, por ausencia de *spike* o por la presencia de más de uno. El índice gonadosomático (IGS) se calculó como el porcentaje del peso de todo el sistema reproductor (testículos, conductos deferentes, ámpulas terminales y espermatóforos) dividido entre el peso total del camarón.

Análisis del sistema inmunitario.

El botón celular obtenido tras centrifugar la hemolinfa centrifugada se lisó con buffer de cacodilatos (100 mM ácido cacodílico, 10 mM CaCl₂, pH 7). Para la actividad de la fenoloxidasa, se incubaron 10 µL de células degranuladas y 250 µL de L- DOPA (3 mg/mL) a 25°C durante 20 min en una microplaca de 96 pozos por triplicado, y se leyó la absorbancia a 490 nm (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Para la actividad de la fenoloxidasa total, se añadieron 10 µL de células degranuladas a cada pozo con 10 µL de tripsina (1 mg/mL) y se incubaron durante 10 min a 25 °C; a continuación, se añadieron 250 µL de L- DOPA y, tras incubar durante 20 min, se leyó la absorbancia a 490 nm. La actividad de la ProFO se calculó restando la fenoloxidasa de la fenoloxidasa total.

Para el recuento diferencial de hemocitos, se diluyeron 15 µl de hemolinfa en un tubo Eppendorf en una proporción 1:10 de hemolinfa:solución Alsever (113 mM de glucosa, 27.2 mM de citrato sódico, 2.8 mM de ácido cítrico, 71.9 mM de NaCl, 10% de formaldehído (v/v)). Los hemocitos se contaron en una cámara de Neubauer y se clasificaron de acuerdo a su tamaño, forma y contenido granular de acuerdo a lo indicado por Le Moullac *et al.* (1997).

Análisis bioquímico

Se juntaron los hepatopáncreas y los sistemas reproductores de los camarones de cada tanque (un pool por tanque), con ayuda de una UltraTurrax (IKA Works Inc., USA) se homogeneizaron 100 mg de tejido en 2mL de buffer TRIS pH 7.4 frío. Una vez homogeneizados, las alícuotas no centrifugadas se separaron para el análisis de peroxidación de lípidos (LPO), mientras que los homogeneizados

restantes se centrifugaron a 10,000 g a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se dividió en 4 alícuotas para el análisis bioquímico y de biomarcadores de estrés oxidante.

Los metabolitos analizados en la hemolinfa, el tracto reproductivo y el hepatopáncreas fueron la proteína soluble total (Bradford, 1976), la glucosa (ELITech, GPSL-0507), el colesterol (ELITech, CHSL-0507) y los acilglicéridos (ELITech, TGML-0427) y se analizaron con kits comerciales. La absorbancia se leyó en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante de cada kit. Los índices nutricionales que se calcularon para el hepatopáncreas y el tracto reproductivo fueron acilglicéridos/proteína soluble total (AGP) y acilglicéridos/colesterol (AGC) (Emerenciano *et al.*, 2014; Palacios *et al.*, 1998). El índice hepatosomático (IHS) se calculó como el porcentaje del peso del hepatopáncreas en el peso total del camarón.

Biomarcadores de estrés oxidante

Las muestras no centrifugadas se utilizaron para cuantificar la peroxidación de lípidos (LPO), mientras que las centrifugadas se utilizaron para analizar la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la catalasa (CAT). La peroxidación de lípidos se determinó mediante el método FOX modificado para microplaca, en el que los peróxidos de la muestra oxidan el hierro a pH ácido, y el ion Fe^{3+} forma un aducto con el naranja de xilenol. Tras una hora de incubación, se midió la absorbancia a 565 nm. Para cuantificar la peroxidación de lípidos, se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas de hidroperóxido terbutílico en lugar de trifenilfosfina (Banerjee *et al.*, 2003).

Se cuantificó la SOD (Sigma-Aldrich 19160 SOD assay kit) utilizando el protocolo del fabricante adaptado a microplaca de 96 pozos. La actividad de la catalasa se determinó en dos microplacas (Hadwan & Abed, 2016), en una se pusieron 10 μ L de muestra por triplicado más 100 μ L de buffer y la otra con 10 μ L de muestra más 100 μ L de buffer con H_2O_2 ; tras 3 min de incubación a 25°C, se detuvo la reacción mediante la adición de 100 μ L de molibdato de amonio en cada microplaca, y se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Bio-Rad

Laboratories, Richmond, CA, EE. UU.). La GSH-Px se determinó por triplicado (adaptación de Sigma CGP1); cada pozo de la microplaca se llenó con 20 μ L de muestra más 120 μ L de solución de trabajo (0.1 mM de EDTA, 0.14 mM de NADPH, 1 mM de glutatión reducido y 1 U de glutatión reductasa) y 16 μ L de TBOOH (0.2 mM) y se midió la reducción de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm durante 10 min a intervalos de 30 s; la actividad de la GSH-Px se expresó como μ M de NADPH/min/mg de proteína.

Expresión génica.

Se realizó la extracción del ARN del tracto reproductor con un kit comercial (TRIzol®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); la calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel y la concentración del mismo se midió con un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 260-280 nm. Las muestras se trataron con DNase I® (ThermoFisher Scientific) para eliminar impurezas de ADN. El ADNc se obtuvo mediante un kit de transcriptasa inversa (High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ThermoFisher Scientific). La expresión de ARNm de los genes SOD, CAT, GSH-Px, ProFO, alfa2-macroglobulina (α 2M) y caspasa (CAS) se midió mediante RT-qPCR con primers (Tabla 7) de Sigma-Aldrich® (Toluca, México). Cada muestra se corrió por triplicado con el gen *β -actina* como control interno.

La RT-qPCR se realizó en un termociclador de fluorescencia IQ5 (Bio-Rad®, Hércules, CA, USA) utilizando SYBR Green Supermix (Bio-Rad®, Hércules, CA, USA). El volumen total de la reacción fue de 15 μ l, con 2 μ l de ADNc de muestra, 0.5 μ l de cada primer (forward y reverse), 7.5 μ l de SYBR y 4.5 μ l de agua libre de pirógenos. La eficiencia de los primers empleados en cada gen se analizaron a través de curvas estándar con diluciones en serie (1:5) a partir de un pool de ADNc. La expresión relativa de cada gen se calculó con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) donde Ct es el número de ciclo en el que se generó la fluorescencia.

Tabla 7. Secuencias de nucleótidos de los primers empleados para la amplificación de los genes del sistema inmune y enzimas antioxidantes en la RT-qPCR.

Gene	Secuencia Forward/Reverse	Accesion number
β-Actin	5'-TGTGTGACGACGAAGTAGCC-3'	AF300705
	5'-TGGTCGTGAAGGTGTAACCA-3'	
proFO	5'-ACCGTACAAGGAAGAGGAAC-3'	AY723296
	5'-TCTCGCAGGTCGTTGTTGAT-3'	
α2M	5'-GTTTCCATCACCGCCTCA-3'	EF182745
	5'-ACCTTATCCTGCGGTGCCA-3'	
SOD	5'-AGCTTACATCTCCATCCTGG-3'	DQ298207
	5'-ATCTGAGGACTGACTGTGC-3'	
CAT	5'-ACTCCCATTGCTGTTCGT-3'	JX162772
	5'-ATCCCAATTTCTTCTTCTG-3'	
GSH-Px	5'-AGTCGATGTCAACGGGTCAAC-3'	AY973252
	5'-GCTGAACCTCTTAAACGGCTG-3'	
CAS	5'-GCACTGCCAGCACGACGGAGAA-3'	DQ988351
	5'-CACCGCTCAGCCGTGAAGTTTA-3'	

Análisis estadístico

La temperatura del agua, el oxígeno disuelto, los parámetros zootécnicos, la calidad del esperma y la expresión relativa de los genes se analizaron en un ANOVA de dos vías, el primer factor fue la dieta ofrecida y el segundo fue el sistema de cultivo. Cuando se detectó interacción, se realizó una prueba post hoc de Tukey para ponderar diferencias entre tratamientos. El NAT, la concentración de nitritos, los SS y el pH se analizaron en un ANOVA de una vía, ya que los parámetros fisicoquímicos de los tratamientos de agua clara formaban parte del mismo sistema de recirculación. Previo al análisis, los datos expresados en porcentajes se transformaron en la raíz cuadrada del arcoseno. Antes del análisis, se comprobó la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos, y aquellos que no se ajustaron a estos requisitos se procesaron con una extensión de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la prueba de Scheirer-Ray-Hare (Dong *et al.*, 2004). Cuando se detectó una interacción, se realizó una prueba post hoc de Dunn para evaluar las diferencias entre tratamientos (Barral-Pintos & Gaxiola, 2022). En todos los análisis estadísticos se utilizó un nivel de significación de $P < 0.05$.

La composición bioquímica y los biomarcadores de estrés oxidante de cada tejido se sometieron a un análisis de varianza permutacional de dos vías

(PERMANOVA). El *valor p* se estimó tras 9999 permutaciones de los datos brutos. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para representar cada variable en un espacio multivariado y determinar qué variable explicaba la mayor parte de la variabilidad en cada tejido. El análisis PERMANOVA se realizó en PRIMER-e V.7 y la extensión PERMANOVA+ (Clarke & Gorley, 2018), para el resto de los análisis estadísticos y la elaboración de figuras se utilizó el software R 3.6.3 (R Core Team, 2020).

Resultados

Calidad del agua

Los valores de oxígeno disuelto se mantuvieron próximos a 6 mg/mL en todos los tratamientos. Las temperaturas se mantuvieron entre 27-28°C y difirieron significativamente entre tratamientos, los valores de temperatura de los tratamientos de biofloc fueron 0.35°C más bajos que los de agua clara (Tabla 8). El valor de pH fue significativamente más alto en el sistema AC, intermedio en el tratamiento BP y menor en el tratamiento BF. La concentración de NAT, nitrito y los SS se mantuvieron por debajo del límite de detección en los tratamientos de sistema AC y entre los tratamientos de biofloc no mostraron diferencias significativas.

Supervivencia, peso húmedo y calidad del esperma.

La supervivencia difirió significativamente en función del alimento: 100% en los tratamientos PE, 80% en el tratamiento BF y 93% en AF, en el que sólo murió un camarón en tres réplicas (Tabla 9). El peso de los camarones (33.6 g de media) fue similar entre los tratamientos. El peso del espermatóforo osciló entre 30.7 y 45 mg. El recuento total de espermatozoides osciló entre 21.5 y 26 millones de células por espermatóforo y la proporción de células viables se situó entre el 78.5% y el 84.3%, no se detectaron diferencias entre tratamientos en las diversas categorías de células espermáticas. La melanización fue del 6.7% en el tratamiento BF, del 13.3% en el tratamiento AF y del 20% en los tratamientos PE, pero la elevada dispersión de los datos impidió encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. El índice gonadosomático (1.57% en promedio) fue similar en todos los tratamientos.

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos del agua (promedio \pm ES) tras 30 días de premaduración de los machos de *L. vannamei* en dos sistemas de cultivo con dos regímenes alimenticios.

Variable	Biofloc		Agua Clara		ANOVA		
	Fresco	Pellet	Fresco	Pellet	Sistema	Dieta	S x D
Oxígeno (mg/mL)	5.89 \pm 0.14	5.88 \pm 0.03	6.16 \pm 0.15	5.87 \pm 0.04	ns	ns	ns
Temperatura (°C)	27.41 \pm 0.09	27.30 \pm 0.13	27.60 \pm 0.12	27.82 \pm 0.18	0.0254	ns	ns
pH	7.66 \pm 0.05 ^a	7.88 \pm 0.01 ^b	8.10 \pm 0.01 ^c		0.0014		
NAT (mg/L)	0.10 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	nd		ns		
Nitrito (mg/L)	5.80 \pm 1.31	3.52 \pm 0.47	nd		ns		
SS (mL/L)	6.98 \pm 1.19	4.31 \pm 0.67	nd		ns		

ANOVA dónde ns= no significativo; nd, no detectado; NAT, nitrógeno amoniacal total; SS, sólidos sedimentables.

Tabla 9. Datos biológicos, calidad espermática y sistema inmune (promedio \pm ES) de los machos de *L. vannamei* tras 30 días de premaduración en dos sistemas de cultivo y bajo dos regímenes alimenticios.

Variable	Biofloc		Agua clara		ANOVA dos vías		
	Fresco	Pellet	Fresco	Pellet	Sistema	Dieta	S x D
Supervivencia (%)	80	100	93.33 \pm 6.67	100	ns	0.019	ns
Peso camarón (g)	33.07 \pm 1.54	34.71 \pm 0.73	33.86 \pm 1.15	32.81 \pm 1.13	ns	ns	ns
Espermatóforo (mg)	36.28 \pm 2.22	36.08 \pm 3.35	45.92 \pm 3.1	30.72 \pm 6.14	ns	ns	ns
Esperma total (10 ⁶)	25.98 \pm 5.02	22.54 \pm 1.17	23.33 \pm 3.31	21.47 \pm 5.03	ns	ns	ns
Esperma normal (%)	78.49 \pm 4.62	78.88 \pm 2.59	84.29 \pm 2.22	82.42 \pm 2.08	ns	ns	ns
Esperma muerto (%)	17.2 \pm 4.18	17.06 \pm 2.59	12 \pm 2.28	13.05 \pm 2.76	ns	ns	ns
Melanización (%)	6.66 \pm 11.55	20 \pm 11.55	13.33 \pm 13.33	20 \pm 11.55	ns	ns	ns
IGS (%)	1.49 \pm 0.07	1.60 \pm 0.07	1.68 \pm 0.14	1.52 \pm 0.17	ns	ns	ns
Hemocitos granulares (10 ⁶)	3.99 \pm 0.63	4.91 \pm 0.90	5.46 \pm 0.83	4.31 \pm 0.64	ns	ns	ns
Hemocitos semigranulares (10 ⁶)	5.78 \pm 0.76	7.98 \pm 1.43	7.40 \pm 1.63	6.49 \pm 0.91	ns	ns	ns
Hemocitos hialinos (10 ⁶)	4.46 \pm 0.51	7.14 \pm 1.58	5.01 \pm 1.09	4.87 \pm 1.01	ns	ns	ns
ProFO (DO)	0.43 \pm 0.04	0.53 \pm 0.15	0.27 \pm 0.09	0.36 \pm 0.11	ns	ns	ns

ANOVA de dos vías dónde ns, no significativo; IGS, índice gonadosomático; ProFO, profenoloxidasa; DO, densidad óptica.

Sistema inmune

No se observaron diferencias en la actividad de la ProFO ni en el conteo de las diferentes clases de hemocitos (Tabla 9). Sin embargo, la ProFO mostró una ligera tendencia de mayor actividad en los tratamientos con biofloc y en los tratamientos alimentados con PE. El recuento de hemocitos tendió a ser mayor en el tratamiento BP y menor en el tratamiento BF.

Análisis bioquímico

El IHS fue significativamente mayor en los tratamientos alimentados con PE que con MAF (Tabla 10). La composición bioquímica del hepatopáncreas se vio afectada por la dieta, con una mayor acumulación de nutrientes en el hepatopáncreas de los camarones alimentados con PE. En el análisis de componentes principales se puede observar la contribución de cada variable al 82% de la variación del sistema (Figura 8), siendo que la dimensión 1 aportó un 58.9% y la dimensión 2 un 23.1% de la variabilidad. En la dimensión 1 la glucosa y los acilglicéridos contribuyeron a la mayor parte de la variación mientras que la proteína y el colesterol lo hicieron en la dimensión 2 (Figura 9). No se apreciaron diferencias en la composición bioquímica del tracto reproductivo ni de la hemolinfa en los diferentes tratamientos.

Tabla 10. Datos bioquímicos de la composición de la hemolinfa, el hepatopáncreas y el tracto reproductivo (promedio \pm ES) de los machos de *L. vannamei* tras 30 días de premaduración en dos sistemas de cultivo y bajo dos regímenes alimenticios.

Variable	Biofloc		Agua Clara		PERMANOVA doble vía		
	Fresco	Pellet	Fresco	Pellet	Sistema	Dieta	S x D
<i>Hemolinfa</i>							
Proteína mg/mL	96.72 \pm 6.34	101 \pm 5.51	109.3 \pm 2.48	97.37 \pm 7.25			
Colesterol mg/mL	0.24 \pm 0.01	0.28 \pm 0.04	0.32 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04	ns	ns	ns
Glucosa mg/mL	0.07 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01			
Acilglicéridos mg/mL	0.29 \pm 0.04	0.35 \pm 0.04	0.4 \pm 0.01	0.41 \pm 0.04			
<i>Hepatopáncreas</i>							
IHS (%)*	2.17 \pm 0.04	2.59 \pm 0.06	1.95 \pm 0.14	2.52 \pm 0.19	ns	0.00488	ns
Proteína mg/g	27.62 \pm 2.42	32.62 \pm 1.26	32.98 \pm 4.3	32.06 \pm 2.63			
Colesterol mg/g	0.81 \pm 0.06	0.9 \pm 0.08	0.78 \pm 0.03	1.16 \pm 0.08			
Glucosa mg/g	0.45 \pm 0.02	0.67 \pm 0.06	0.57 \pm 0.07	0.65 \pm 0.13	ns	0.0045	ns
Acilglicéridos mg/g	0.98 \pm 0.14	2.85 \pm 0.67	1.52 \pm 0.26	3.64 \pm 0.93			
AG:P	0.04 \pm 0.004	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03			
AG:C	1.23 \pm 0.19	3.11 \pm 0.48	1.92 \pm 0.27	3.27 \pm 0.96			
<i>Tracto reproductivo</i>							
Proteína mg/g	50.56 \pm 0.5	47.82 \pm 3.69	52.71 \pm 2.08	40.95 \pm 4.39			
Colesterol mg/g	0.69 \pm 0.08	0.58 \pm 0.09	0.64 \pm 0.05	0.46 \pm 0.11			
Glucosa mg/g	1.29 \pm 0.03	1.33 \pm 0.07	1.38 \pm 0.04	1.26 \pm 0.03	ns	ns	ns
Acilglicéridos mg/g	1.33 \pm 0.22	1.18 \pm 0.09	1.33 \pm 0.12	1.22 \pm 0.12			
AG:P	0.03 \pm 0.004	0.02 \pm 0.003	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.01			
AG:C	1.95 \pm 0.35	2.08 \pm 0.16	2.15 \pm 0.31	3.34 \pm 1.33			

PERMANOVA de doble vía donde ns, no significativo; IHS, índice hepatosomático; AG:P, índice bioenergético calculado como acilglicéridos/proteína; AG:C, índice bioenergético calculado como acilglicéridos/ colesterol. *El IHS fue analizado con una ANOVA de doble vía.

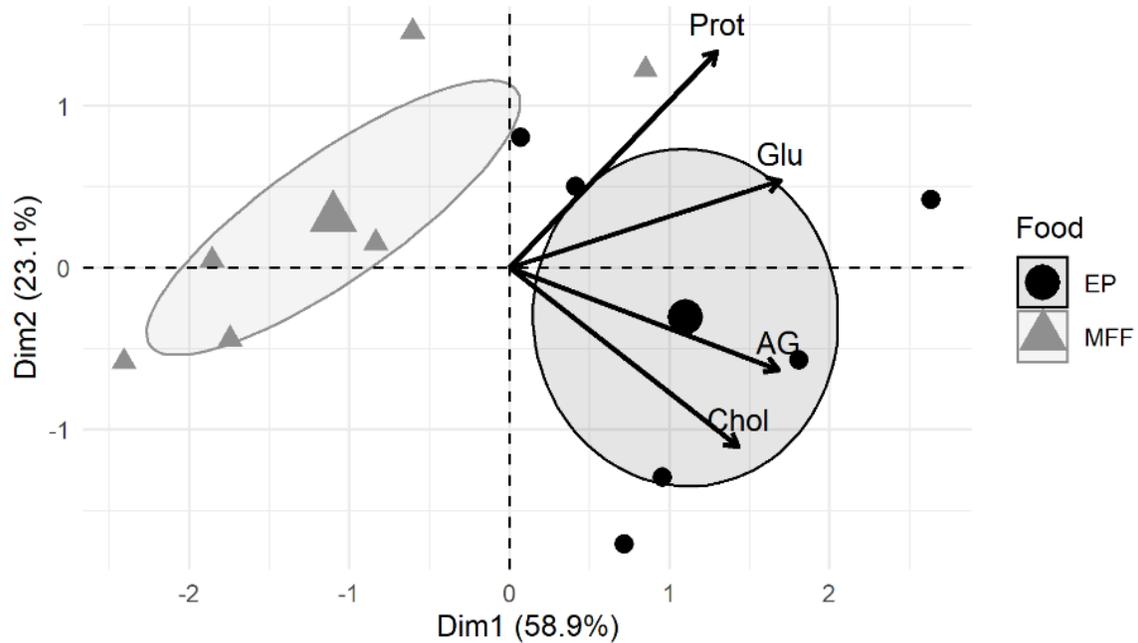


Figura 10. Análisis de componentes principales de la composición bioquímica del hepatopáncreas. EP, pellet experimental; MFF, mezcla de alimentos frescos; Prot, proteína, Glu, glucosa; AG, acilglicéridos; Chol, colesterol.

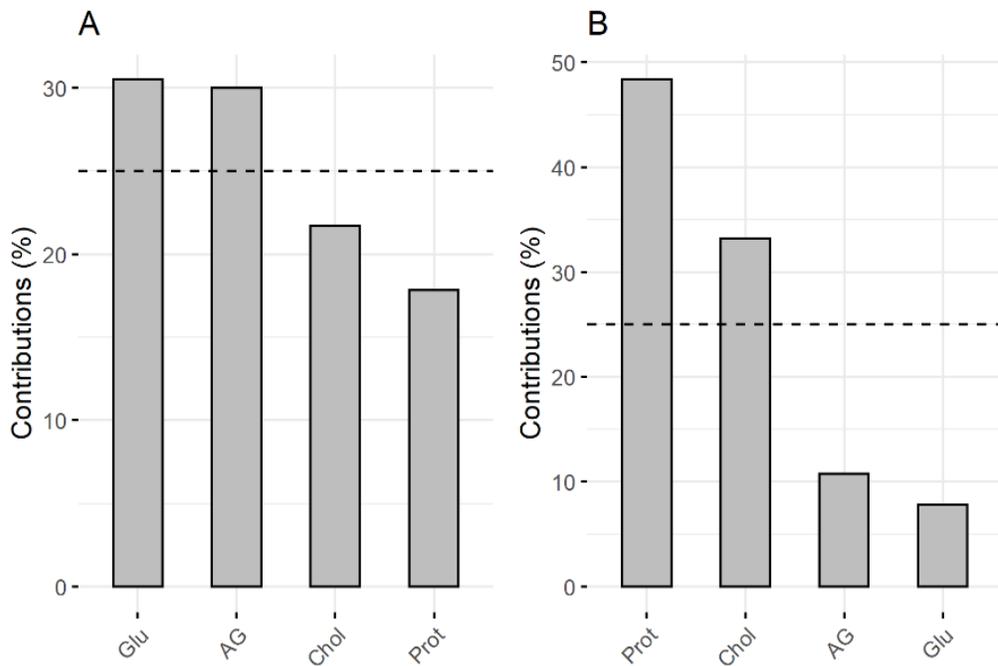


Figura 11. Porcentaje de contribución de cada metabolito al componente principal 1 y 2 (A y B, respectivamente) del análisis de componentes principales. La Línea punteada indica la contribución promedio esperada. Prot, proteína, Glu, glucosa; AG, acilglicéridos; Chol, colesterol.

Biomarcadores de estrés oxidante

En el hepatopáncreas, las enzimas antioxidantes y la peroxidación de lípidos no mostraron diferencias entre tratamientos (Tabla 11). La actividad de la GSH-Px en el tracto reproductivo se mantuvo por debajo del límite de detección de la técnica, por lo que no se incluyó en el análisis. Se encontraron diferencias significativas en el tracto reproductivo en función de la dieta: los camarones alimentados con PE mostraron mayor actividad antioxidante. En el análisis de componentes principales se muestra la contribución de cada variable a la variación del sistema, representando el 92% del total (Figura 12). La dimensión 1 representa el 69.9% de la variación y está dominada por SOD y CAT mientras que la dimensión 2 representa el 23.3% y está encabezada por LPO (Figura 13).

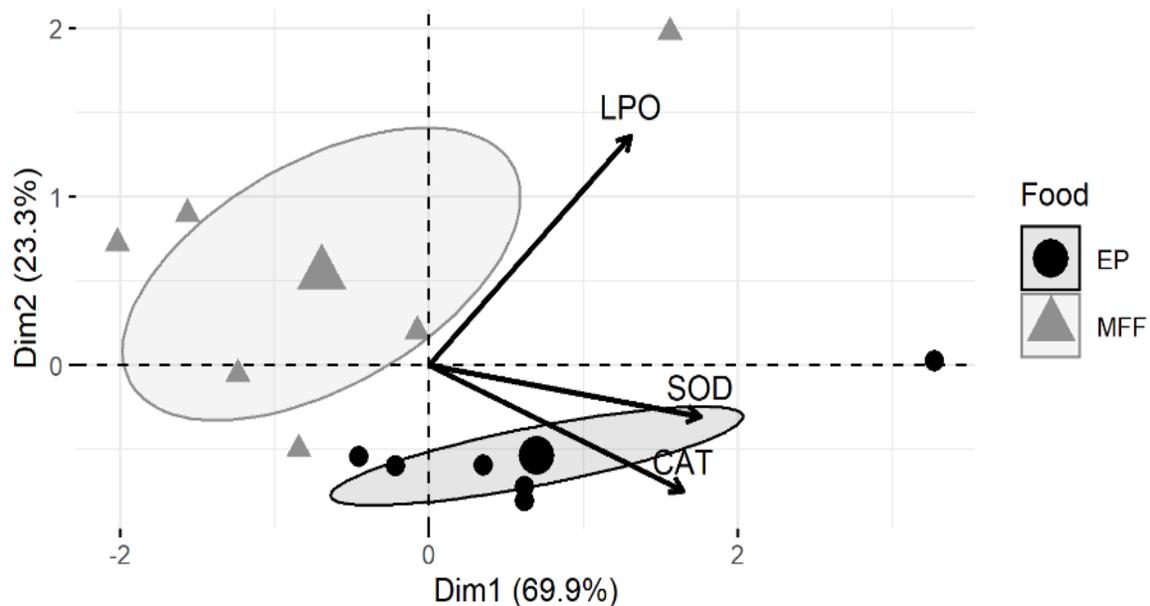


Tabla 11. Biomarcadores de estrés oxidante (promedio \pm ES) del hepatopáncreas y del tracto reproductivo de los machos de *L. vannamei* tras 30 días de premaduración en dos sistemas de cultivo y bajo dos regímenes alimenticios.

Variable	Biofloc		Agua clara		PERMANOVA doble vía		
	Fresco	Pellet	Fresco	Pellet	Sistema	Dieta	S x D
<i>Hepatopáncreas</i>							
SOD U/mg prot.	4.69 \pm 0.60	3.25 \pm 0.26	3.42 \pm 0.63	2.95 \pm 0.19			
CAT U/mg prot.	2.24 \pm 0.14	2.27 \pm 0.71	2.26 \pm 0.70	2.48 \pm 0.60	ns	ns	ns
GSH-Px μ M NADPH/min/mg prot.	0.28 \pm 0.01	0.48 \pm 0.17	0.37 \pm 0.09	0.40 \pm 0.08			
LPO μ M/mg	1.67 \pm 0.05	1.80 \pm 0.02	1.99 \pm 0.16	1.87 \pm 0.10			
<i>Tracto reproductivo</i>							
SOD U/mg prot.	1.13 \pm 0.04	1.22 \pm 0.02	1.15 \pm 0.11	1.41 \pm 0.17			
CAT U/mg prot.	0.63 \pm 0.05	0.87 \pm 0.03	0.71 \pm 0.06	0.90 \pm 0.08	ns	0.046	ns
LPO μ M/mg	0.84 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01	0.90 \pm 0.04	0.87 \pm 0.03			

PERMANOVA de doble vía dónde ns, no significativo; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH-PX, glutatión peroxidasa; LPO, peroxidación de lípidos

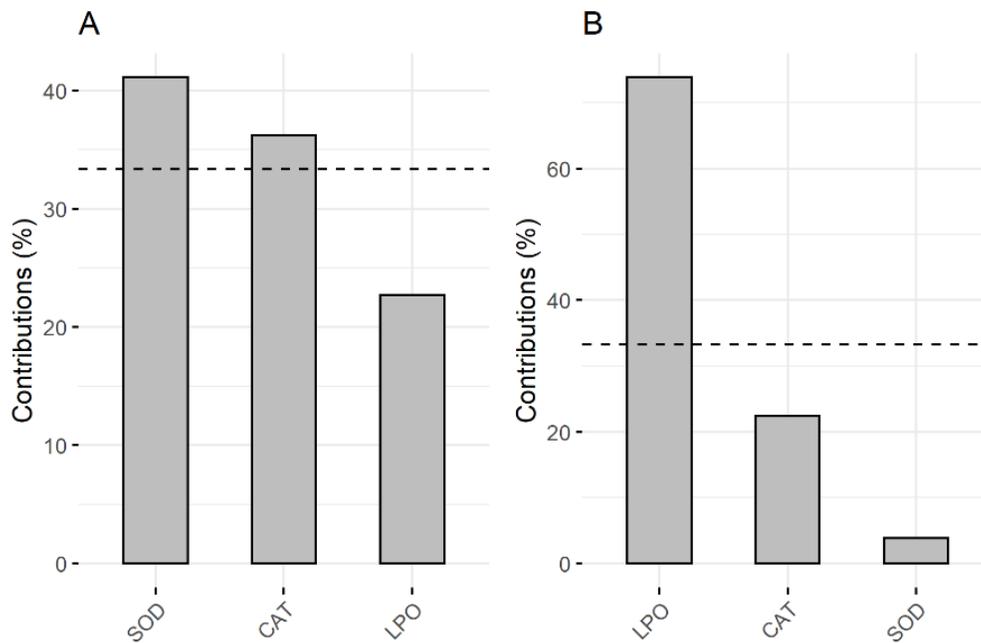


Figura 13. Porcentaje de contribución de cada biomarcador de estrés oxidante al componente principal 1 y 2 (A y B, respectivamente) del análisis de componentes principales. La Línea punteada indica la contribución promedio esperada. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; LPO, peroxidación de lípidos.

Expresión de genes

La elevada dispersión de los datos impidió encontrar diferencias significativas en ninguno de los genes analizados (Figura 14), pero las tendencias fueron las siguientes. Las expresiones de SOD, CAT y α 2M fueron las más altas en el tratamiento CF. La expresión de GSH-Px fue mayor en el tratamiento CP seguido de CF. ProFO fue mayor en los tratamientos EP. La expresión de CAS fue similar en todos los tratamientos.

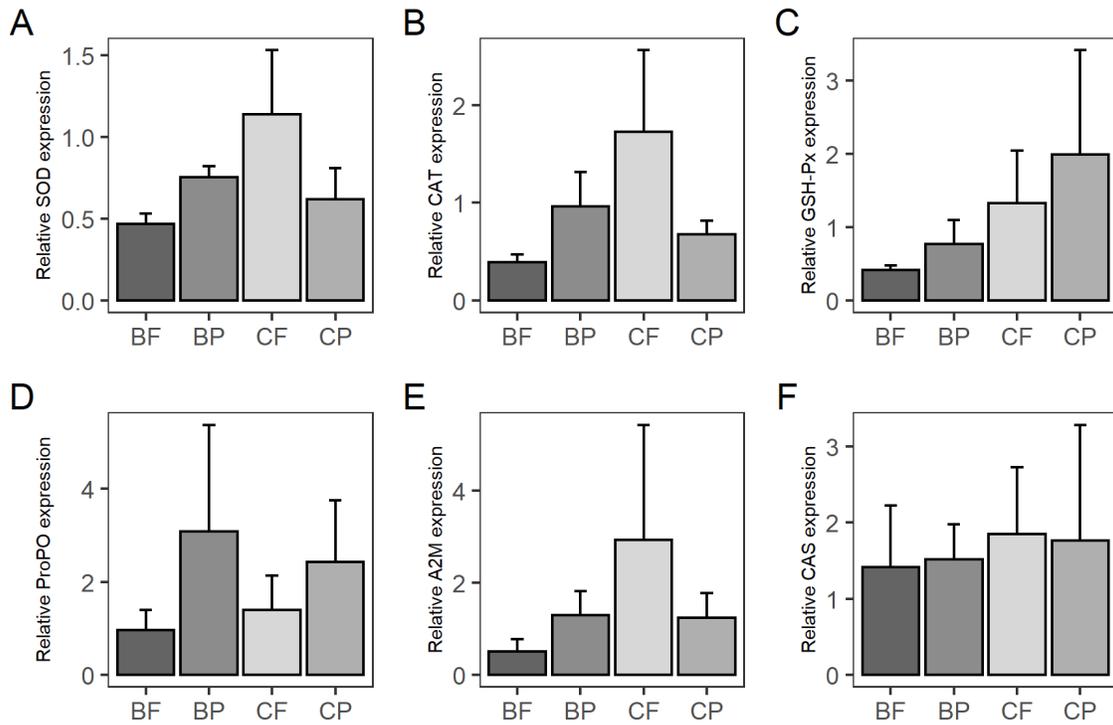


Figura 14. Expresión relativa de los diferentes genes (A-F) en el tracto reproductivo de los machos de *L. vannamei*. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH-Px, glutatión peroxidasa; ProPO, profenoloxidasa; A2M, alfa2-macroglobulina; CAS, caspasa; BF, biofloc y alimento fresco; BP, biofloc y pellet experimental; CF, agua clara y alimento fresco; CP, agua clara y pellet experimental.

Discusión

Calidad del agua

La concentración de oxígeno en todos los tratamientos se mantuvo por encima del mínimo óptimo de ≥ 4 mg/mL recomendado para biofloc por Emerenciano *et al.* (2017) y de ≥ 5 mg/mL que se reportó como la concentración mínima para no afectar al crecimiento en un estudio con *Litopenaeus setiferus* (Rosas *et al.*, 2004). Las diferencias de temperatura entre los sistemas de cultivo se atribuyen a la temperatura ligeramente superior del reservorio externo, al realizarse la renovación diaria de agua produjo un leve aumento de la temperatura en el sistema de agua clara, siendo $0,35^{\circ}\text{C}$ más elevada que los tratamientos de biofloc. Los tanques del sistema biofloc registraron menores variaciones de temperatura al estar aislados y sometidos a la acción del aire acondicionado y de los calentadores. Los menores

valores de pH en el tratamiento BF podrían deberse a una mayor cantidad de sólidos sedimentables que habrían consumido la alcalinidad, no obstante los valores de pH en todos los tratamientos estuvieron dentro del rango considerado óptimo para los camarones (Emerenciano *et al.*, 2017; Furtado *et al.*, 2014). El NAT, la concentración de nitritos y los SS no difirieron en los tratamientos con biofloc mientras que en los tratamientos con agua clara sus valores se mantuvieron por debajo del límite de detección de las técnicas debido a la renovación del agua y al biofiltro del sistema de recirculación.

Supervivencia, peso húmedo, calidad del esperma y estado inmunitario

La supervivencia fue menor en los tratamientos MAF, sin embargo, la alimentación no tuvo ningún efecto sobre la calidad espermática. La única muerte en el tratamiento AF podría ser aleatoria, mientras que la pérdida del 20% en el tratamiento BF podría estar relacionada con la calidad del agua o con la dificultad de encontrar el alimento fresco, que en ciertas ocasiones podría haber caído fuera de la bandeja de alimentación por efecto de la aireación. Las tasas de supervivencia fueron muy superiores a las obtenidas por Braga *et al.* (2015), que en un ensayo similar registró supervivencias del 40% al 66.7%. En ese estudio trabajaron (Braga *et al.*, 2015) con agua clara (con alimento fresco, tratamiento control) y biofloc con tres regímenes de alimentación diferentes (alimento fresco, pellet de juveniles y pellet de reproductores); la supervivencia más baja se registró en el tratamiento que combinaba biofloc con alimento fresco (40%), siguiendo la misma tendencia que en el presente trabajo.

Los 21.5 a 26 millones de espermatozoides por espermatóforo encontrados en el presente trabajo son menores que los 24.6 a 33.7 millones de espermatozoides reportados por Braga *et al.* (2015); estas diferencias pueden ser atribuidas a la menor densidad en su experimento, a una cepa de camarón diferente o a las diferencias en los factores abióticos entre regiones (México vs Brasil). El porcentaje de células viables encontrado en el presente trabajo fue del 80% y se encuentra dentro del rango reportado por Braga *et al.* (2015) del 66% al 89%.

En un experimento previo en el que se empleó una versión antigua del pellet experimental se obtuvo un prometedor desempeño reproductivo de *L. vannamei*

(Ortiz-Guillén *et al.*, 2022), sin embargo, el recuento de espermatozoides alcanzado en agua clara en el presente estudio (21.5 millones de células) fue casi tres veces superior a los 7.6 millones reportados en ese experimento; aunque con una menor proporción de células viables (82% frente a 90%).

El estado nutricional de los reproductores es clave para obtener un buen desempeño reproductivo y larvas de buena calidad (Racotta *et al.*, 2003). Además del alimento suministrado, el estado nutricional se ve influenciado también por el sistema de cultivo. Los estanques externos y aquellos en sistema biofloc poseen una producción natural que los camarones utilizan como alimento complementario a los pellets que los productores les suministran (Emerenciano *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2009). Los requerimientos nutricionales durante la premaduración difieren entre machos y hembras (Ortiz-Guillén *et al.*, 2022; Perez-Velazquez *et al.*, 2003). Los beneficios del biofloc durante la premaduración han sido demostrados para las hembras de *L. vannamei* pero no existe evidencia en el caso de los machos (Braga *et al.*, 2015, 2018; Magaña-Gallegos *et al.*, 2021). Los resultados de este estudio no aclaran esta cuestión, ya que la calidad espermática fue similar en todos los tratamientos. Desde el punto de vista de los operarios de un laboratorio de reproducción, sería mejor realizar la premaduración en agua clara, ya que el sistema biofloc es más dinámico y requiere de mayor supervisión.

En la búsqueda de una dieta para los machos de camarón, el primer paso fue la sustitución parcial del alimento fresco por pellets experimentales (Perez-Velazquez *et al.*, 2003), recientemente una formulación experimental logró que los camarones los que se les administró tuviesen una calidad espermática similar a la de los camarones alimentados con alimento fresco (Ortiz-Guillén *et al.*, 2022). En la búsqueda de un alimento para machos, algunos autores se han enfocado en la cantidad óptima de ciertos macronutrientes, como se mostró con la inclusión óptima de proteína para *L. setiferus* (Goimier *et al.*, 2006). Sin embargo, la cantidad de proteína no es el único criterio, ya que *L. setiferus* mostró una calidad espermática similar al ser provisto de alimentos con diferentes contenidos proteicos (Barral-Pintos & Gaxiola, 2022). En el presente trabajo las dos dietas, MAF y PE, diferían notablemente en contenido proteico (60% para la ración promedio de MAF y 46%

para el PE), sin embargo, la calidad espermática fue similar con ambos regímenes alimenticios.

La melanización es el último paso en una serie de reacciones enzimáticas en cascada (serin proteasas) que comienzan cuando el organismo reconoce algún microbio y se produce la activación de la proFO contra las posibles amenazas (Amparyup *et al.*, 2013). El sistema profenoloxidasa forma parte de la defensa humoral de los camarones, cuyo origen está en los hemocitos. Los hemocitos granulares y semigranulares contienen ProFO y esta es liberada a la hemolinfa por degranulación ante una infección (Tassanakajon *et al.*, 2013). La ausencia de diferencias significativas en la actividad de la ProFO y en las distintas clases de hemocitos impiden la especulación acerca de los efectos del alimento o del sistema de cultivo.

La melanización de los espermátóforos no siguió un patrón claro, pero su porcentaje de ocurrencia, 6%-20%, fue menor que el 27%-63% reportado por Braga *et al.* (2015). Sin embargo, el porcentaje de melanización de los espermátóforos del presente trabajo fue mayor que el reportado en un criadero comercial, del 2%-4%, a pesar de que en dicho experimento se alcanzaron temperaturas de 31°C (Corral-Rosales *et al.*, 2020). El bajo porcentaje de melanización encontrado por Corral-Rosales *et al.* (2020) se explicaría por haberse realizado en un criadero, donde los machos pueden participar en eventos reproductivos y así evitar la melanización (Alfaro-Montoya, 2010).

En el presente estudio sólo un camarón presentó un alto grado de melanización; ésta alcanzó el testículo y el camarón presentó una cantidad espermática doscientas veces inferior a la media, por lo que se excluyó del análisis estadístico. Los conteos espermáticos de los otros camarones melanizados sí fueron incluidos en sus respectivos tratamientos y análisis; sus recuentos espermáticos fueron similares a los de los machos no melanizados, lo que indicaría que esa melanización formaba parte del ciclo de renovación de los espermátóforos (Parnes *et al.*, 2006).

Análisis bioquímico

El almacenamiento de nutrientes fue mayor en los tratamientos alimentados con PE, con un mayor tamaño proporcional del hepatopáncreas y concentraciones mayores de colesterol, acilglicéridos e índices bioenergéticos AG:P y AG:C. Los acilglicéridos son las reservas energéticas más eficientes por unidad de peso, y el colesterol es un componente de las membranas celulares y un precursor hormonal (Palacios *et al.*, 1998; Rosas *et al.*, 2004). Se ha reportado que los machos de *L. setiferus* con mayores concentraciones de colesterol en el hepatopáncreas presentaron un mayor recuento de espermatozoides (Barral-Pintos y Gaxiola, 2022) y que la ausencia de colesterol en la dieta produce una disminución de la mitad del número inicial de espermatozoides en *L. vannamei* (Perez-Velazquez *et al.*, 2003). Una alta concentración de acilglicéridos en la hemolinfa y el hepatopáncreas son indicadores de un buen desempeño reproductivo de las hembras de *L. vannamei* (Arcos *et al.*, 2003), sin embargo, en el presente estudio las mayores concentraciones de colesterol o de acilglicéridos en el hepatopáncreas no se reflejaron en una mayor cantidad de espermatozoides.

La ausencia de diferencias en la composición bioquímica en el tracto reproductivo en nuestros resultados podría estar relacionada con la corta duración del ensayo, de un mes, en comparación al estudio realizado por Ceballos-Vázquez *et al.* (2010) que tuvo una duración de 12 meses. En dicho estudio hallaron diferencias bioquímicas en la composición de los órganos reproductivos de los machos de *L. vannamei* que fueron cultivados en estanques de tierra y en tanques forrados con liner.

Biomarcadores de estrés oxidante

Las enzimas antioxidantes y las vitaminas son las principales moléculas con actividad antioxidante; mientras que las enzimas son inherentes al metabolismo celular, los camarones obtienen las vitaminas a través de la dieta (Bratovcic, 2020; Conklin, 1989). El PE ha sido desarrollado a lo largo de varios ensayos y su contenido de vitaminas se considera adecuado para inducir una buena calidad espermática (Montalvo *et al.*, 2022a; Ortiz-Guillén *et al.*, 2022). En el presente trabajo no se detectaron diferencias en los biomarcadores de estrés oxidante en el

hepatopáncreas, considerado el principal órgano del metabolismo del camarón (Wang *et al.*, 2019).

Los camarones alimentados con PE presentaron mayores concentraciones de acilglicéridos y colesterol en el hepatopáncreas y, por tanto, más sustrato para la peroxidación lipídica. No obstante, las vitaminas incluidas en los pellets mantuvieron el equilibrio antioxidante del hepatopáncreas en condiciones similares a las obtenidas con el alimento fresco. El mayor HSI, acilglicéridos y colesterol con el PE en el presente estudio se asemejó a los resultados obtenidos por Barral-Pintos & Gaxiola (2022) al alimentar *L. setiferus* con pellet comercial, sin embargo, ese estudio reportó un aumento en la peroxidación de lípidos, mientras que el PE utilizado en el presente estudio contenía suficientes vitaminas para contrarrestar la peroxidación.

En contraste con lo observado en el hepatopáncreas, sí se encontraron diferencias en el estado oxidante del tracto reproductivo. El PE promovió una mayor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, y un estado similar de la integridad de la membrana celular, medida en términos de peroxidación lipídica. El estrés oxidante en los testículos afecta negativamente a la calidad y cantidad de los espermatozoides. El estrés puede ser causado por diversos factores (dieta, estrés, contaminantes) y afecta tanto a organismos vertebrados como invertebrados (Lewis & Ford, 2012; Sabeti *et al.*, 2016). La mayor actividad de la SOD en los tratamientos con pellets puede reflejar una mayor incidencia de radicales de oxígeno en estos tratamientos, ya que la función de esta enzima es transformar estos radicales en H_2O_2 (Cárdenas & Pedraza, 2006). Una alta actividad de la SOD debería producir un aumento en la actividad de la CAT para transformar el H_2O_2 en HO_2+O_2 , sustancias no tóxicas para las células (Cárdenas & Pedraza, 2006). La similitud en la peroxidación lipídica en todos los tratamientos del presente estudio mostraría un balance antioxidante similar en este tejido independientemente de la fuente de alimento y el sistema de cultivo, lo que derivaría en una calidad espermática similar.

Expresión de genes

La elevada dispersión de los datos impidió realizar hipótesis acerca de los efectos de los factores experimentales. Es importante mencionar que no hubo

correspondencia en la tendencia mostrada por la actividad de las enzimas antioxidantes y la expresión relativa de esos genes. Las diferencias entre las cantidades de ARNm y las enzimas en las que se traduce son habituales y podrían deberse a un desfase en los procesos de transcripción/traducción o estar causadas por problemas de traducción en el tejido diana (es decir, degradación del ARNm antes de la traducción) (Liu *et al.*, 2016; Montalvo *et al.*, 2022b).

La alta expresión de caspasa en el tracto reproductivo de *L. vannamei* se ha relacionado con una pobre calidad espermática (Shi *et al.*, 2018), la ausencia de diferencias en la expresión de este gen podría interpretarse como un indicador positivo del funcionamiento del PE.

Estudios futuros deberían analizar el desempeño reproductivo de *L. vannamei* en tanques monosexuales alimentados con diferentes dietas: los machos serían alimentados con el PE para fomentar una alta calidad espermática, mientras que las hembras podrían ser alimentadas con una mezcla de alimentos frescos, con o sin pellets. El desempeño reproductivo debería ser similar al obtenido con las dietas clásicas de los criaderos, el costo del alimento sería menor y al reducirse el uso de alimentos frescos, el impacto ecológico sería menor. El estudio debería abordar tanto indicadores biológicos como bioeconómicos.

Conclusiones

La premaduración de los machos de *L. vannamei* puede ser igual de exitosa tanto en agua clara como en biofloc. El pellet experimental utilizado promovió un mayor almacenamiento de nutrientes en el hepatopáncreas, sin por ello causar efectos negativos sobre el estado antioxidante. El pellet proporcionó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en el tracto reproductivo y una integridad similar de la membrana celular. La calidad espermática obtenida al alimentar con pellet experimental fue similar a la obtenida con una mezcla de alimentos frescos.

Capítulo IV

**Discusión general, conclusiones y
recomendaciones para estudios futuros**

Discusión general

Tras investigar los efectos de someter a diferentes regímenes alimenticios (mezcla de alimento fresco, pellet comercial y experimental) a los machos de *L. setiferus* y *L. vannamei* en dos sistemas de cultivo diferentes (biofloc y agua clara) durante la premaduración, a continuación, se comparan entre los resultados de diversos indicadores de ambos experimentos

La supervivencia únicamente se vio afectada por el alimento en *L. vannamei*, la cual mostró sus mayores valores en los tratamientos de pellet experimental. En ambos experimentos, las menores supervivencias registradas fueron del 80%, relativamente altas en comparación a trabajos previos realizados con machos de diversas especies de camarones peneidos (Braga *et al.*, 2013, 2015; Perez-Velazquez *et al.*, 2002, 2003).

El peso del espermátforo y la cantidad espermática de *L. setiferus* se vieron afectadas por la interacción del sistema de cultivo y el alimento, mientras que *L. vannamei* mostró una gran similitud en los indicadores de cantidad y calidad espermática. Es reseñable la diferencia en el porcentaje de células espermáticas viables entre estas dos especies, la causa más probable sería el pequeño tamaño de los machos de *L. setiferus* (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2010).

Los indicadores bioquímicos de la hemolinfa no mostraron alguna tendencia similar entre las dos especies estudiadas. Como se comentó en capítulos anteriores, estos indicadores no pueden ser rigurosamente discutidos entre todos los tratamientos experimentales ya que los camarones en sistema biofloc no se encuentran en ayuno antes de ser muestreados y los de agua clara sí. Dentro de los tratamientos de agua clara no quedó patente algún patrón apreciable entre los experimentos, ni ningún valor se salió del rango de los previamente reportados (Montalvo *et al.*, 2022; Pascual *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2004).

La influencia del alimento sobre la calidad espermática es un hecho previamente comprobado, sin embargo, no se puede concluir que exista una condición nutricional única que refleje la concentración óptima en el hepatopáncreas de cierto nutriente que sea clave para una óptima calidad espermática. Diversas condiciones nutricionales pueden inducir una calidad espermática similar, cómo se

ha observado en estos dos experimentos, se podría así inferir que los alimentos suministrados poseían los nutrientes necesarios para promover una buena calidad

Los camarones, *L. setiferus* y *L. vannamei*, cuando son alimentados con pellets durante la premaduración muestran un mayor índice hepatosomático y una mayor concentración de acilglicéridos que aquellos mantenidos con una mezcla de alimentos frescos. La dieta promovió diferencias en el estado antioxidante del hepatopáncreas, sin embargo, la única similitud entre las dos especies fue una mayor actividad de la catalasa en los tratamientos alimentado con pellets. Si el pellet comercial de *L. setiferus* promovió una mayor peroxidación de lípidos, el pellet experimental con inclusión de vitaminas permitió que los valores de este indicador fueran similares a los de los tratamientos de alimento fresco.

En el caso de los camarones machos, es llamativo observar que el sistema de cultivo no tiene ningún efecto sobre la composición bioquímica del hepatopáncreas, siendo que los efectos del biofloc en el desempeño reproductivo y la composición bioquímica de las hembras ya ha sido comprobado (Cardona *et al.*, 2016; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2010; Magaña-Gallegos *et al.*, 2021). La ausencia del efecto del sistema de cultivo en la composición bioquímica del hepatopáncreas podría estar relacionada con la duración del experimento que fue de 30 días, en comparación al realizado por Cardona *et al.* (2016) con una duración de 10 semanas.

Es reseñable las diferencias en el grado de domesticación entre estas dos especies, el cual influye en el aprovechamiento del alimento durante el crecimiento. Las especies domesticadas pueden aprovechar hasta 10 veces más que las no domesticadas (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018b, 2018c). Estas diferencias en el aprovechamiento del alimento provocan que las especies nativas presenten un pobre crecimiento, que posteriormente se traduce en unas capacidades reproductivas no óptimas (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2010).

Otro factor que se debe considerar es el sistema de cultivo en que los camarones son mantenidos hasta que llegan a la edad reproductiva. Si los camarones crecen en un sistema bajo techo de agua clara el único alimento que percibirán será el que se les suministre, mientras que en tanques externos con renovación o en sistema biofloc, la producción natural de microalgas y

microorganismos complementarán su dieta (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2010; Porchas-Cornejo *et al.*, 2012). Los dos experimentos presentados en esta tesis no presentan similitud en este aspecto, ya que *L. setiferus* fue mantenido en biofloc durante su crecimiento y *L. vannamei* estuvo en los tanques externos con renovación de agua.

Recomendaciones para estudios futuros

En el caso de *Litopenaeus setiferus* se recomienda utilizar camarones machos generación F₀ y los intentaría reproducir con hembras silvestres mediante fertilización artificial. Si los camarones son llevados a adulto en sistema biofloc, la premaduración se realizaría en agua clara con alimento comercial, lo cual sería operativamente más sencillo y económico. Sigue siendo una limitante el bajo porcentaje de células viables, por lo que sería interesante comprobar si con los resultados obtenidos se puede lograr un elevado porcentaje de fertilización de los huevos. La recomendación de utilizar hembras silvestres en la medida de lo posible es debida al bajo número de desoves logrado en cautiverio por las hembras F₀ en un experimento previo no publicado; el bajo peso de las hembras lastró en gran medida su capacidad reproductiva.

Tanto a efectos de conservación como de una posible producción comercial, considero que es de gran importancia la domesticación de *Litopenaeus setiferus*, ya que esta especie se encuentra amenazada por la sobrepesca, el cambio climático y las especies exóticas de camarón presentes en su hábitat (Rosas *et al.*, 2004; Wakida-Kusunoki *et al.*, 2013; 2011). Los métodos de cultivo emergentes como el aquamimicry podrían ser beneficiosos para el cultivo de esta especie nativa. Este sistema de cultivo añade salvado de arroz y soya fermentados por bacterias probióticas del género *Bacillus*, que sirven de alimento para los camarones y para la trama trófica que se establece, en la que predominan los copépodos (Khanjani *et al.*, 2023; Romano & Kumar, 2017). Otros puntos destacables de estos sistemas de cultivo es que utilizan densidades de cultivo bajas y la aportación de pellets comerciales es reducida.

Por otro lado, *L. vannamei* es la especie más cultivada del mundo y su producción no deja de crecer año tras año. Para optimizar la reproducción de esta

especie sería interesante aplicar el pellet experimental utilizado en este trabajo en un laboratorio de reproducción de camarón. Si lograrse igualar las tasas de fertilización y eclosión de la mezcla de alimento fresco sería un logro, ya que el pellet experimental no ensucia tanto como el alimento fresco (en términos de turbidez y putrefacción), su disponibilidad no fluctúa y presenta menor riesgo de contaminación bacteriana. Sería idóneo realizar un experimento reproductivo en tanques monosexuales y analizar tanto el componente biológico como el económico. Igualmente, si se logra eliminar los alimentos frescos (congelados) de la alimentación de los machos sería benéfico para el medio ambiente, ya que muchas veces estos productos son importados, por ejemplo, los poliquetos (Topsy Baits, Wilhelminadorp, Países Bajos) que utilizamos en el laboratorio de la UMDI-Sisal vienen congelados desde Países Bajos.

Conclusión

-La premaduración de los machos de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei* no presentó similitudes: el primer experimento presentó diferencias en la calidad espermática a causa de una interacción entre los factores experimentales, mientras que en el segundo experimento no se encontraron tales diferencias.

-La mejor calidad espermática de *Litopenaeus setiferus* se obtuvo en agua clara con alimento comercial o en biofloc con alimento fresco.

La calidad espermática de *Litopenaeus vannamei* se mantuvo similar cuando se le proporcionó alimento fresco y pellet experimental en los dos sistemas de cultivo.

-El sistema de cultivo en la premaduración no influyó en la composición bioquímica del hepatopáncreas ni del tracto reproductivo.

-Los alimentos pelletizados promueven un mayor índice hepatosomático y una mayor acumulación de acilglicéridos en el hepatopáncreas.

-El estado del sistema antioxidante del hepatopáncreas no tiene un efecto evidente sobre la calidad espermática.

-En *L. vannamei* las diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes en el tracto reproductivo no tuvieron un efecto sobre la calidad espermática.

Capítulo V (Extra)

Al camarón le falta salsa.

Artículo de divulgación científica sometido en la revista “Ecofronteras” del Ecosur en abril de 2023. No se incluye apartado gráfico ni referencias, este material es añadido una vez es aceptado.

El camarón, la gran estrella de la cocina costeña mexicana, que muchas veces es ligado de manera jocosa a efectos potenciadores sobre la libido, parece que el exceso de calor le puede volver estéril.

Ya sea que alguien se encuentre en una playa de Oaxaca bajo una palapa; en un restaurante en Mazatlán; contemplando el azul eléctrico del mar Caribe en Cancún, o bien, comiendo en una fondita de Veracruz, todas las personas tienen un grato recuerdo de las vacaciones disfrutando unos sabrosos camarones en buena compañía. Sin embargo, estas sensaciones estivales que evocamos entrelazadas como el calor y los camarones, parece que en la naturaleza no se conjugan tan bien. Todo apunta a que, a raíz del aumento de temperatura del océano, los machos de diversas especies de camarón estarían sufriendo un descenso de su capacidad reproductiva, lo que podría comprometer su supervivencia en el futuro.

México, un país camaronero

Ya sea por sus refranes o su gastronomía, existe una gran cultura alrededor de este sabroso marisco, pero también una importante fuente de desarrollo económico. La producción total de este crustáceo ronda las 250 mil toneladas anuales, de las cuales, casi tres cuartos son producidos gracias a la acuicultura. Es evidente que una gran cantidad de familias que se ven beneficiadas económicamente tanto de la pesca como del cultivo acuícola. Sin embargo, a pesar de que las pesquerías explotan diversas especies que se encuentran en la costa, solamente una, *Litopenaeus vannamei*, se cultiva a nivel comercial. Otras especies nativas de camarón se han intentado cultivar comercialmente, pero lamentablemente todavía no se cuenta con la tecnología necesaria para hacer de su cultivo una actividad económicamente rentable.

Si bien los estados de Sinaloa y Sonora producen el 80% del camarón a nivel nacional (Conapesca), la pesquería de la Sonda de Campeche todavía aporta cierto volumen a la producción nacional. Esta zona de pesca fue antaño un referente en la industria camaronera, en la que se extraía mucho camarón blanco del golfo,

Litopenaeus setiferus, y camarón café, *Farfantepenaeus aztecus*. Sin embargo, la sobreexplotación, la mala gestión del recurso y la contaminación le ha pasado factura. En los últimos diez años el volumen de pesca de la zona se ha reducido a la mitad, lo que ha llevado a los pescadores a buscar otras opciones laborales. Don Zenón, su hermano Meko y su sobrino Andrés, pescadores carmelitas que durante años apoyaron a diferentes investigadores a capturar los camarones vivos, en la actualidad se ven obligados a complementar los ingresos de la pesca con lo que obtienen limpiando cuartos de hotel.

El calor, enemigo de la fertilidad

Aunque hay quien aún insiste en negar la crisis medioambiental que vivimos, el calentamiento global es un hecho y los seres vivos del planeta ya resienten sus efectos y los camarones no son la excepción. Los camarones, que para tantas bromas de índole sexual han servido, parece que comienzan a sentir los efectos perniciosos del cambio climático. Los machos de las diversas especies de camarón que habitan en las costas mexicanas tienen una seria amenaza en el aumento de temperatura.

Se cree que la temperatura desencadena un proceso en que el sistema inmune del camarón ataca a su propio sistema reproductivo, lo cual a veces se ve complementado por la aparición de infecciones bacterianas

Tras realizar pruebas en laboratorio, se observó que cuando los camarones están en aguas un poquito más calientes de lo habitual (3 o 4 grados) comienzan a acumular melanina en su sistema reproductivo. ¿Es acaso malo que agarren color en su sistema reproductivo? En el caso de los camarones sí. Si bien la melanina es un pigmento muy común en animales y plantas, que da color a nuestra piel y cabello, su función es muy diferente en los camarones. Cuando el sistema inmune de un camarón ataca a un patógeno, es la melanina la que lo encapsula y destruye. Esta acumulación de melanina sería análoga a nuestras cicatrices. Sin embargo, lo llamativo del caso es que al aumentar la temperatura del agua se produce un ataque del sistema inmune hacia el tejido del aparato reproductor sin que exista un patógeno de por medio. Y bien, más allá de presentar una “cicatriz” en su sistema

reproductivo, esta viene acompañada de un aumento en la proporción de espermatozoides anormales.

La anomalía de los espermatozoides es identificada en el microscopio por su forma y tamaño. Desde el punto de vista reproductivo, estos espermatozoides ya no pueden cumplir con su objetivo, la fecundación de huevos para generar embriones. Estos efectos negativos sobre su capacidad reproductiva se agudizan si la exposición a altas temperaturas es prolongada. Se produce así una gran acumulación de melanina que acaba necrosando los tejidos, dejando a los camarones completamente estériles.

Rumbo a la extinción...

Esta reducción en su capacidad reproductiva puede ser altamente perjudicial tanto para la pesca como para la acuicultura, pues es la fuente de ingresos de miles de hogares. Cabría resaltar que ciertas especies no domesticadas de camarón son más sensibles a estas variaciones térmicas, poniendo en peligro las poblaciones naturales.

Si se cumplen las predicciones más pesimistas del aumento de la temperatura a nivel global, para finales del siglo XXI ésta aumentará unos 3.7 °C y aunque no pareciera un aumento alarmante, éste tendrá consecuencias muy graves en la naturaleza. Ciertos autores apuntan a que un 25 % de los invertebrados bentónicos (los que viven en el fondo como los cangrejos y las almejas) costeros pueden desaparecer. El incremento de la temperatura llevaría a una menor concentración de O₂ en el agua junto a un aumento del metabolismo de estos organismos. Esta fatal sinergia ahogaría paulatinamente a miles de especies en todo el planeta hasta su desaparición, y de acuerdo con lo observado en laboratorio, los machos de diversas especies de camarón se volverán estériles.

¿Es el final?

¿Esto significa que hemos de sacar fotos de nuestros platillos favoritos para contarles a nuestros nietos del exquisito sabor de los extintos camarones?

Independientemente de que cada quien es libre de fotografiar platillos para publicarlos en redes sociales, los camarones aún tienen un as bajo la manga para perdurar en el tiempo. Estos crustáceos tienen ciclos de vida relativamente cortos, de un año en promedio, las hembras liberan hasta 200,000 huevos y sus hábitos alimenticios son omnívoros. En sus estadios juveniles se adaptan muy bien a cualquier cambio de salinidad, temperatura u oxígeno del medio en el que habitan, ya que habitan lagunas costeras y pozas intermareales. Si el aumento de temperatura se produce de manera paulatina, sus características biológicas deberían permitir la adaptación de los camarones a las nuevas condiciones ambientales.

¿Y qué se dice en los laboratorios?

Diversos grupos de investigación, entre los que se incluye el de los autores de este artículo, han estado trabajando con las especies nativas del golfo de México en los últimos años. Es evidente que *Litopenaeus vannamei* es la especie reina del mercado, prueba de ello es que duplicó su producción mundial en el periodo 2010-2020 de 2.6 a 5.8 millones de toneladas. Sin embargo, el hecho de ser la más producida conlleva el riesgo de que una nueva enfermedad a la que esta especie sea vulnerable se expanda rápidamente y afecte la producción a nivel mundial. Su distribución en la naturaleza va desde el mar de Cortés, México, hasta Lima, Perú. Lo cual nos lleva al riesgo de cultivar en países fuera de su distribución natural, provocando que existan en la naturaleza poblaciones exóticas en Brasil, Hawái, Tailandia o Vietnam.

Por las razones arriba mencionadas se refuerza la importancia de trabajar con especies nativas, como *Litopenaeus setiferus*, la cual se distribuye desde Jersey hasta Campeche a lo largo del golfo. Esta especie, famosa por ser los camarones que pescaba Forrest Gump junto con el Teniente Dan, fue considerada como prometedora para la acuicultura a inicios de los años 90's. El cuello de botella con el que se encontraron los investigadores era que la producción de larvas era muy escasa, lo cual era debido a los problemas espermáticos de los machos. Aparte de los problemas con las temperaturas, los machos de esta especie tienden a

disminuir la calidad de su esperma cuando se estresan. Al ser una especie en fase de domesticación, los camarones silvestres eran capturados y posteriormente estabulados en las instalaciones de reproducción. Esta manipulación producía un alto estrés en los individuos, lo cual mermaba su calidad espermática y así la posibilidad de obtener larvas. A pesar de que hoy en día ya poseemos más piezas del rompecabezas de su cultivo, sigue siendo necesaria más investigación. Ésta ya no estaría orientada únicamente a la producción sino también a la conservación. La disminución de sus poblaciones junto al calentamiento y contaminación del ambiente, vuelven una prioridad los planes de conservación de esta especie.

Nuestras responsabilidades

Aún hay esperanza para los camarones, sin embargo, los seres humanos debemos de implementar en nuestras costumbres diarias hábitos más amigables con el ambiente. En este campo existe un margen de mejora en gran número de aspectos, como individuos podemos reducir nuestro consumismo a todos los niveles, tanto energético como de bienes. A nivel sociedad, es necesaria la implicación de todos para lograr reciclar de manera efectiva e incentivar la economía circular. Referente a los camarones, sería conveniente respetar de manera efectiva las vedas y apostar por el consumo de especies locales. Hoy en día existen gran número de productos con certificaciones de buenas prácticas acuícolas y pesqueras, lo cual nos ayuda a elegir de manera responsable. Consumir con sentido es nuestra obligación para que nuestros hijos puedan seguir disfrutando los manjares que el mar nos regala.

Referencias

- Aguilera-Rivera, D., Escalante-Herrera, K., Gaxiola, G., Prieto-Davó, A., Rodríguez-Fuentes, G., Guerra-Castro, E., Hernández-López, J., Chávez-Sánchez, M. C., & Rodríguez-Canul, R. (2019). Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *50*(1), 119–136. <https://doi.org/10.1111/jwas.12543>
- Alfaro-Montoya, J. (2010). The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture*, *300*(1–4), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.008>
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., & Umaña-Castro, R. (2019). Research frontiers in penaeid shrimp reproduction: Future trends to improve commercial production. *Aquaculture*, *503*(December 2018), 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.068>
- Alfaro, J., & Lozano, X. (1993). Development and Deterioration of Spermatophores in Pond - Reared *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *24*(4), 522–529. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00583.x>
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, *34*(4), 990–1001. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>
- AOAC. (2005). *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (AOAC International (ed.); 18th ed.).
- Aragón-Noriega, E. A., Pérez-Arvizu, E. M., & Valenzuela-Quiñonez, W. (2012). Latitudinal variation in reproduction timing of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) of the Mexican Pacific coast. *Crustaceana*, *85*(3), 287–300. <https://doi.org/10.1163/156854012X624664>
- Arce, S. M., Moss, S. M., & Argue, B. J. (2000). Artificial Insemination and Spawning of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Implications for a Selective Breeding Program. *UJNR Technical Report No. 28, January 2000*, 5–8. <http://140.90.235.27/retiredsites/japan/aquaculture/proceedings/report28/Arce.pdf>
- Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Palacios, E., Vazquez-Boucard, C., & Racotta, I. S. (2003). Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Egg quality and female physiological condition. *Aquaculture*, *228*(1–4), 335–349. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00313-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00313-2)
- Arshadi, A., Gharaei, A., & Mirdar Harijani, J. (2020). Effect of dietary vitamin E on

- reproductive performance and vitellogenin gene expression in broodstock of *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(5), 2475–2492. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2020.122455>
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(3–4), 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Banerjee, D., Madhusoodanan, U. K., Sharanabasappa, M., Ghosh, S., & Jacob, J. (2003). Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. *Clinica Chimica Acta*, 337(1–2), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.08.004>
- Barral-Pintos, X., & Gaxiola, G. (2022). Sperm quality and nutritional condition related to management during prematuration of *Litopenaeus setiferus* (F 0) males . *Aquaculture Research*, August, 1–12. <https://doi.org/10.1111/are.16085>
- Barreto-altamirano, Á. F., Ponce-palafox, J. T., Gaxiola, G., Arenas-pardo, M. A., Castillo-vargasmachuca, S., Parra-, A. M., & Arredondo-figueroa, J. L. (2020). *Fishmeal replacers by alternative sources for shrimp feed: General aspects*. 13(6), 6–9. <https://doi.org/10.9790/2380-1306010609>
- Bauer, R. T., & Cash, C. E. (1991). Spermatophore Structure and Anatomy of the Ejaculatory Duct in *Penaeus setiferus* , *P . duorarum* , and *P . aztecus* (Crustacea : Decapoda): Homologies and Functional Significance. *Transactions of the American Microscopical Society This*, 110(2), 144–162.
- Beseres, J. J., & Feller, R. J. (2007). Importance of predation by white shrimp *Litopenaeus setiferus* on estuarine subtidal macrobenthos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 344(2), 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.01.001>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braga, A. L., Lopes, D. L. A., Poersch, L. H., & Wasielesky, 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.030>
- Braga, A., Lopes, D. L. A., Magalhães, V., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2015). Use of biofloc technology during the pre-maturation period of *Litopenaeus vannamei* males: Effect of feeds with different protein levels on the spermatophore and sperm quality. *Aquaculture Research*, 46(8), 1965–1973. <https://doi.org/10.1111/are.12352>

- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M. C., Romano, L. A., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2018a). Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture*, 486(August 2017), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.018>
- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M., Romano, L., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2018b). Infertility of biofloc-reared *Litopenaeus vannamei* males associated with a spermatophore mycobacterial infection: Description of the pathological condition and implications for the broodstock management and larval production. *Aquaculture*, 492(April), 357–360. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.039>
- Bratovcic, A. (2020). Antioxidant Enzymes and their Role in Preventing Cell Damage. *Acta Scientifci Nutritional Health*, 4(3), 01–07. <https://doi.org/10.31080/asnh.2020.04.0659>
- Bray, W. A., Leung - Trujillo, J. R., Lawrence, A. L., & Robertson, S. M. (1985). Preliminary investigation of the effects of temperature, bacterial inoculation, and EDTA on sperm quality in captive *Penaeus setiferus*. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1–4), 250–257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00207.x>
- Browdy, C. L., McGovern-Hopkins, K., Stokes, A. D., Hopkins, J. S., & Sandifer, P. A. (1996). Factors Affecting the Reproductive Performance of the Atlantic White Shrimp, *Penaeus setiferus*, in Conventional and Unisex Tank Systems. *Journal of Applied Aquaculture*, 6(1), 11–25. https://doi.org/10.1300/J028v06n01_02
- Caballero-Zamora, A., Cienfuegos-Rivas, E. G., Montaldo, H. H., Campos-Montes, G. R., Martínez-Ortega, A., & Castillo-Juárez, H. (2015). Genetic parameters for spawning and growth traits in the Pacific white shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*). *Aquaculture Research*, 46(4), 833–839. <https://doi.org/10.1111/are.12235>
- Cárdenas, N., & Pedraza, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164–173.
- Cardona, E., Lorgeoux, B., Chim, L., Goguenheim, J., Le Delliou, H., & Cahu, C. (2016). Biofloc contribution to antioxidant defence status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*, 452, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.003>
- Ceballos-Vázquez, B. P., Rosas, C., & Racotta, I. S. (2003). Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 228(1–4), 141–151. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00322-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00322-3)
- Ceballos-Vázquez, Bertha P., Palacios, E., Aguilar-Villavicencio, J., & Racotta, I. S. (2010). Gonadal development in male and female domesticated whiteleg

- shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in relation to age and weight. *Aquaculture*, 308(3–4), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.020>
- Chamberlain, G. W. (1983). Swelling and Melanization of the Male Reproductive System of Captive Adult Penaeid Shrimp. *Journal of the World Mariculture Society*, 136(14), 135–136.
- Charmantier, G. (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: A review. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33(2–3), 177–190. <https://doi.org/10.1080/07924259.1998.9652630>
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L. M., & Giffard-Mena, I. (2014). Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*, 422–423, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.034>
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2018). Getting started with PRIMER v7. *Primer-E*, 1, 20. www.primer-e.com
- Combs, G. F., & McClung, J. P. (2016). *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. Academic press. (Fifth Edit). Academic Press.
- Conklin, D. E. (1989). Vitamin requirements of juvenile penaeid shrimp. *Actes de Colloques Ifremer*, 9, 287–308.
- Corral-Rosales, D. C., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Rodríguez-Jaramillo, C., & Palacios, E. (2018). Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquaculture Research*, 49(12), 3711–3722. <https://doi.org/10.1111/are.13839>
- Corral-Rosales, D. C., Palacios, E., Ricque-Marie, D., & Cruz-Suárez, L. E. (2018). Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquaculture Research*, 49(2), 1053–1059. <https://doi.org/10.1111/are.13554>
- Corral-Rosales, D. C., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E., Arjona-López, O., Rodríguez-Jaramillo, C., Navarro, C., & Palacios, E. (2020). Reduction of spermatophore melanization in *Litopenaeus vannamei* shrimp fed *Ulva clathrata* during a commercial hatchery production. *Animal Reproduction Science*, 217(January), 106468. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106468>
- Darvishpour, H., Yahyavi, M., Mohammadizadeh, F., & Javadzadeh, M. (2012). *Effects of Vitamins A , C , E and their Combination on Growth and Survival of Litopenaeus vannamei Post Larvae*. 4(5), 245–253.
- Dong, Q., Lin, J., & Huang, C. (2004). Effects of cryoprotectant toxicity on the

- embryos and larvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 242(1–4), 655–670. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.040>
- Du, S., Hu, C., Cai, S., Shen, Q., & Zheng, S. (2006). Effect of different levels of dietary α -tocopherol on ovarian maturation and reproductive performance of broodstock *Litopenaeus vannamei* (boone). *Journal of Shellfish Research*, 25(2), 589–593. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[589:EODLOD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[589:EODLOD]2.0.CO;2)
- Duan, Y., Zhang, J., Dong, H., Wang, Y., Liu, Q., & Li, H. (2016). Effect of desiccation and resubmersion on the oxidative stress response of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 49, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.018>
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., & Gaxiola, G. (2014). Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: Spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research*, 45(10), 1713–1726. <https://doi.org/10.1111/are.12117>
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Mascaró Miquelajauregui, M., & Gaxiola, G. (2013). Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture International*, 21(5), 987–1007. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9607-4>
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Goguenheim, J., & Gaxiola, G. (2012). Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture Research*, 44(1), 75–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03012.x>
- Emerenciano, Mauricio Gustavo Coelho, Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., & Miranda-Baeza, A. (2017). Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. *Water Quality*. <https://doi.org/10.5772/66416>
- Emerenciano, Maurício G.C., Rombenso, A. N., Vieira, F. D. N., Martins, M. A., Coman, G. J., Truong, H. H., Noble, T. H., & Simon, C. J. (2022). Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding. *Animals*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ani12030236>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. In *The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)*. FAO2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. In *Fao*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.032%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016>

- Farfante, I. P. (1975). Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. *Fishery Bulletin*, 73(3), 463–486.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509. <https://doi.org/10.3390/molecules15085561>
- Furtado, P. S., Gaona, C. A. P., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2014). Application of different doses of calcium hydroxide in the farming shrimp *Litopenaeus vannamei* with the biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*, 22(3), 1009–1023. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9723-9>
- Furtado, P. S., Valenzuela, M. A. J., Rodriguez-Fuentes, G., Campos, B. R., Wasielesky, W., & Gaxiola, G. (2016). Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(3), 201–211. <https://doi.org/10.1080/10236244.2016.1163837>
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Mamauag, R. E. P., & Han, Y. (2012). Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 356–357, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.034>
- Goimier, Y., Pascual, C., Sánchez, A., Gaxiola, G., Sánchez, A., & Rosas, C. (2006). Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Animal Reproduction Science*, 92(1–2), 193–208. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.034>
- González, R. A., Díaz, F., Licea, A., Denisse Re, A., Noemí Sánchez, L., & García-Esquivel, Z. (2010). Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 35(5), 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.05.004>
- Guitart, B., & Quintana, M. . (1978). Estadios de maduración gonadal, en las especies comerciales importantes del género *Penaeus* en el banco de Campeche. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 3(1), 82–126. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-cubana-de-investigaciones-pesqueras/articulo/estadios-de-maduracion-gonadal-en-las-especies-comerciales-importantes-del-genero-penaeus-en-el-banco-de-campeche>
- Hadwan, M. H., & Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*, 6, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>

- Harris, S. E. G., & Sandifer, P. A. (1986). Sperm production and the effects of electrically induced spermatophore expulsion in the prawn *Macrobrachium Rosenbergii* (De Man). *Journal of Crustacean Biology*, 6(4), 633–647.
- He, H., Lawrence, A. L., & Liu, R. (1992). Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 103(2), 177–185. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90411-D](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90411-D)
- Ibarra, A. M., Racotta, I. S., Arcos, F. G., & Palacios, E. (2007). Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 268(1-4 SPEC. ISS.), 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.028>
- Ibarra, J. (2015). Historia de las Enfermedades en el Cultivo de Camarón en el Noroeste de México. *VII Simposio Internacional de Sanidad e Inocuidad Acuicola*, 60.
- Jiang, S. G., Huang, J. H., Zhou, F. L., Chen, X., Yang, Q. B., Wen, W. G., & Ma, Z. M. (2009). Observations of reproductive development and maturation of male *Penaeus monodon* reared in tidal and earthen ponds. *Aquaculture*, 292(1–2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.054>
- Khanjani, M. H., da Silva, L. O. B., Fóes, G. K., Vieira, F. do N., Poli, M. A., Santos, M., & Emerenciano, M. G. C. (2023). Synbiotics and aquamimicry as alternative microbial-based approaches in intensive shrimp farming and biofloc: Novel disruptive techniques or complementary management tools? A scientific-based overview. *Aquaculture*, 567(January). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739273>
- Kumar, G., & Engle, C. R. (2016). Technological Advances that Led to Growth of Shrimp, Salmon, and Tilapia Farming. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 24(2), 136–152. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1112357>
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., & Levy, P. (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 7(4), 227–234. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0077>
- Le Vay, L., Jones, D. A., Puello-Cruz, A. C., Sangha, R. S., & Ngamphongsai, C. (2001). Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 128, 621–628. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(00\)00339-1](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(00)00339-1)
- Leung-Trujillo, J. R., & Lawrence, A. L. (1987). Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 65(3–4), 363–370. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90249-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90249-3)
- Leung - Trujillo, J. R., & Lawrence, A. L. (1991). Spermatophore Generation Times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*. *Journal of the World*

- Aquaculture Society*, 22(4), 244–251. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1991.tb00741.x>
- Lewis, C., & Ford, A. T. (2012). Infertility in male aquatic invertebrates: A review. *Aquatic Toxicology*, 120–121, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.002>
- Liñan-Cabello, M. A. (2001). *Bioactividad de Carotenoides y Retinoides durante la inducción a la maduración gonádica de L. vannamei*.
- Liñan-Cabello, M. A., & Paniagua-Michel, J. (2004). Induction factors derived from carotenoids and vitamin A during the ovarian maturation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 12(6), 583–592. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-1088-7>
- Liu, H., Chen, F., Hartmann, V., Khalid, S. G., Hughes, S., & Zheng, D. (2020). Comparison of different modulations of photoplethysmography in extracting respiratory rate: From a physiological perspective. *Physiological Measurement*, 41(9). <https://doi.org/10.1088/1361-6579/abaaf0>
- Liu, Yansheng, Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
- Liu, Yuan, Wang, W. N., Wang, A. L., Wang, J. M., & Sun, R. Y. (2007). Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*, 265(1–4), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.010>
- López-Martínez, J., Hernández-Vázquez, S., Herrera-Valdivia, E., Rodríguez-Romero, J., & Chavez, E. . (2008). La influencia ambiental en la pesquería de camarón. *Variabilidad Ambiental Y Pesquerías De México, January*, 115–128.
- Mace, M. M., & Rozas, L. P. (2017). Population dynamics and secondary production of juvenile white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) along an estuarine salinity gradient. *Fishery Bulletin*, 115(1), 74–88. <https://doi.org/10.7755/FB.115.1.7>
- Magaña-Gallegos, Eden, Arévalo, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2021). Effects of using the biofloc system and eyestalk ablation on reproductive performance and egg quality of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae). *Animal Reproduction Science*, 228(October 2020), 106749. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106749>
- Magaña-Gallegos, Eden, Bautista-Bautista, M., González-Zuñiga, L. M., Arevalo, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2018). Does unilateral eyestalk ablation affect the quality of the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae)? *Journal of Crustacean Biology*, 38(4), 401–406. <https://doi.org/10.1093/jcblol/ruy043>

- Magaña-Gallegos, Eden, González-Zúñiga, R., Arevalo, M., Cuzon, G., Chan-Vivas, E., López-Aguiar, K., Noreña-Barroso, E., Pacheco, E., Valenzuela, M., Maldonado, C., & Gaxiola, G. (2018). Biofloc and food contribution to grow-out and broodstock of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) determined by stable isotopes and fatty acids. *Aquaculture Research*, 49(5), 1782–1794. <https://doi.org/10.1111/are.13632>
- Magaña-Gallegos, Edén, González-Zúñiga, R., Cuzon, G., Arevalo, M., Pacheco, E., Valenzuela, M. A. J., Gaxiola, G., Chan-Vivas, E., López-Aguiar, K., & Noreña-Barroso, E. (2018). Nutritional Contribution of Biofloc within the Diet of Growout and Broodstock of *Litopenaeus vannamei*, Determined by Stable Isotopes and Fatty Acids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(5), 919–932. <https://doi.org/10.1111/jwas.12513>
- Mansour, N., McNiven, M. A., & Richardson, G. F. (2006). The effect of dietary supplementation with blueberry, α -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, 66(2), 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.12.002>
- Martín, L. O., & Matés, J. M. (1999). Radicales libres de oxígeno y enzimas antioxidantes. *Encuentros En La Biología*, 2, 56.
- Martínez, E., Aguilar, M., Trejo, L., Hernández, I., Díaz-Iglesia, E., Soto, L. A., Sanchez, A., & Rosas, C. (1998). Lethal low dissolved oxygen concentrations for postlarvae and early juvenile *Penaeus setiferus* at different salinities and pH. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(2), 221–229. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00980.x>
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
- Misamore, M. J., & Browdy, C. L. (1996). Mating behaviour in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*: a generalized model for mating in *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology*, 16(1), 61–70.
- Montalvo, G., Campos, S., Arenas, M., Barreto, A., Escalante, K., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2022). Immune gene expression and antioxidant response to vitamin E enriched diets for males *Litopenaeus vannamei* breeder (Boone, 1931). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 268(November 2021), 111187. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111187>
- Montalvo, G., Morones, R., Barral-Pintos, X., Arenas, M., Barreto, A., Escalante, K., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2022). Metabolic, antioxidant, and immune response of broodstock males of *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817 fed diets supplemented by vitamin C. *Journal of Crustacean Biology*, 42(4), 1–12.

<https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruac056>

Mugwanya, M., Dawood, M. A. O., Kimera, F., & Sewilam, H. (2021). Biofloc systems for sustainable production of economically important aquatic species: A review. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(13), 1–15. <https://doi.org/10.3390/su13137255>

Nagai, C., Nagata, S., & Nagasawa, H. (2011). Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, *172*(2), 293–304. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2011.03.019>

National Council Research. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National academies press.

Ortiz-Guillén, S., Magaña-Gallegos, E., Arévalo, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2022). Partial substitution of frozen-fresh food by an experimental diet in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae) broodstock. *Animal Reproduction Science*, *242*(May). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107001>

Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D., & Racotta, I. S. (2004). Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*, *234*(1–4), 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.001>

Palacios, E., Ibarra, A. M., Ramirez, J. L., Portillo, G., & Racotta, I. S. (1998). Biochemical composition of eggs and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquaculture Research*, *29*(3), 183–189. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00953.x>

Parnes, S., Raviv, S., Shechter, A., & Sagi, A. (2006). Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *Journal of Experimental Biology*, *209*(24), 4974–4983. <https://doi.org/10.1242/jeb.02586>

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., & Rosas, C. (2003). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: The effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, *218*(1–4), 637–650. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00300-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00300-9)

Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L. A., & Rosas, C. (1998). Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *Journal of the World Aquaculture Society*, *29*(4), 477–484. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00672.x>

Pérez-Farfante, I. (1969). Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *Fishery*

Bulletin of the U.S., 67, 461–591.

- Perez-Velazquez, M., Bray, W. A., Lawrence, A. L., Gatlin, D. M., & Gonzalez-Felix, M. L. (2001). Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 198(3–4), 209–218. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00510-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00510-5)
- Perez-Velazquez, M., González-Félix, M. L., Lawrence, A. L., Bray, W. A., & Gatlin, D. M. (2003). Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(1), 92–98. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2003.tb00043.x>
- Perez-Velazquez, M., Lawrence, A. L., Gatlin, D. M., González-Félix, M. L., & Bray, W. A. (2002). Replacement of fresh dietary components by a dry feed for successful maturation of male *Litopenaeus vannamei* (Boone) broodstock. *Aquaculture Research*, 33(13), 1091–1095. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00765.x>
- Porchas-Cornejo, M. A., Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., Ramos-Trujillo, L., & Barraza-Guardado, R. (2012). Consumption of Natural and Artificial Foods by Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Reared in Ponds with and without Enhancement of Natural Productivity. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, June 2014. <http://www.siamb.org.il>.
- Primavera, J. H. (2006). Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. *Ocean and Coastal Management*, 49(9–10), 531–545. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2006.06.018>
- R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Racotta, I. S., Palacios, E., & Ibarra, A. M. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227(1–4), 107–130. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00498-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00498-8)
- Ramos, L., Gonzalez, M., Morera, Y., & Rodríguez-Ramos, T. (2019). Maturation and reproduction in captivity of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* Burkenroad in Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*, 39(1), 1–20.
- Ren, S., Prentis, P., Mather, P. B., Li, Y., Tang, B., & Hurwood, D. A. (2020). Genetic parameters for growth and survival traits in a base population of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) developed from domesticated strains in China. *Aquaculture*, 523(February), 735148. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735148>
- Renaud, M. L. (1986). Detecting and avoiding oxygen deficient sea water by brown shrimp, *Penaeus aztecus* (Ives), and white shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 98, 283–292.

- Ringuet, S., Sassano, L., & Johnson, Z. I. (2011). A suite of microplate reader-based colorimetric methods to quantify ammonium, nitrate, orthophosphate and silicate concentrations for aquatic nutrient monitoring. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(2), 370–376. <https://doi.org/10.1039/c0em00290a>
- Rivera-Velázquez, G., Soto, L. A., Salgado-Ugarte, I. H., & Naranjo, E. J. (2008). Growth, mortality and migratory pattern of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Crustacea, Penaeidae) in the Carretas-Pereyra coastal lagoon system, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 523–533. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.5605>
- Rodier, J. (1981). *Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Química, fisicoquímica, bacteriología, biología*. Omega.
- Romano, N., & Kumar, V. (2017). Vegetarian Shrimp : Pellet-free Shrimp Farming. *World Aquaculture Society, December*, 36–39.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., & Van Wormhoudt, A. (2001). Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penae. *Aquaculture Research*, 32(7), 531–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00573.x>
- Rosas, Carlos, Cooper, E. L., Pascual, C., Brito, R., & Gelab, R. (2004). La condición reproductiva del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Crustacea; Peneidae): evidencias de deterioro ambiental en el sur del Golfo de México. In *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México. INE-SEMARNAT* (pp. 490–511).
- Rosas, Carlos, Fernandez, I., Brito, R., & Diaz-Iglesia, E. (1993). The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, *Penaeus notialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 104(1), 183–187. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90027-2)
- Rosas, Carlos, Sanchez, A., Eugenia Chimal, M. A., Saldaña, G., Ramos, L., & Soto, L. A. (1993). The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp *Penaeus setiferus* . *Aquatic Living Resources*, 6(2), 139–144. <https://doi.org/10.1051/alr:1993013>
- Rozas, L. P., & Minello, T. J. (2011). Variation in penaeid shrimp growth rates along an estuarine salinity gradient: Implications for managing river diversions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397(2), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.12.003>
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Talebi, A. R. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 14(4), 231–240. <https://doi.org/PMC4918773>
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., & Rosas,

- C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: The effect of acclimation. *Aquaculture*, 198(1–2), 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00576-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00576-7)
- Sandifer, P. A., Hopkins, J. S., Stokes, A. D., & Browdy, C. L. (1993). Preliminary Comparisons of the Native *Penaeus setiferus* and Pacific *P. vannamei* White Shrimp for Pond Culture in South Carolina, USA. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(3), 295–303. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00161.x>
- Sangha, R. S., Chávez-Sánchez, M. C., Martínez-Palacios, C. A., Martínez-Rodríguez, I. E., & Papp, Z. G. (2000). Effect of supplementing ascorbic acid (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in broodstock diet of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(1), 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00709.x>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Shi, W., Zha, S., Hu, L., Huang, X., Zhang, J., Yan, M., & Liu, G. (2018). Ageing reduces the reproductive performance of male white shrimp *Litopenaeus vannamei* by altering sperm intracellular Ca²⁺ concentrations and interfering with sperm apoptosis. *Animal Reproduction Science*, 198(September), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.003>
- Sookying, D., Davis, D. A., & Soller Dias da Silva, F. (2013). A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19(4), 441–448. <https://doi.org/10.1111/anu.12050>
- Sreekumar, N. V., Narayana, B., Hegde, P., Manjunatha, B. R., & Sarojini, B. K. (2003). Determination of nitrite by simple diazotization method. *Microchemical Journal*, 74(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(02\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00093-0)
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1–4), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90112-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90112-9)
- Tan, J., Luan, S., Cao, B., Luo, K., Meng, X., & Kong, J. (2019). Evaluation of genetic parameters for reproductive traits and growth rate in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture*, 511(March),

734244. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734244>

- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(4), 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>
- Torres, J. V. R., Sánchez, A. J., & Barba, M. E. (2020). Spatial and temporal habitat use by penaeid shrimp (Decapoda: Penaeidae) in a coastal lagoon of the southwestern Gulf of Mexico. *Regional Studies in Marine Science*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101052>
- Valenzuela-Jiménez, M., Aguilera-Rivera, D., Wasielesky, W., Hernández-López, I., Rodríguez-Fuentes, G., Durruty-Lagunes, C., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2021). The effect of biofloc and clear water at low and high salinity concentration on growth performance and antioxidant response of wild juveniles of atlantic white shrimp *penaeus setiferus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(3), 451–464. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue3-fulltext-2513>
- Valenzuela-Jiménez, M., Durruty-Lagunes, C., Cuzon, G., Wasielesky, W., & Gaxiola, G. (2020). North atlantic white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae) as an aquaculture target species for farming: A review. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(2), 167–178. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue2-fulltext-2306>
- Valenzuela-Jiménez, M., Durruty-Lagunes, C., Cuzon, G., Pacheco, E., Arévalo, M., Aguilera-Rivera, D., Wasielesky, W., Rodríguez-Fuentes, G., Barreto, A., & Gaxiola, G. (2021). Effect of water salinity on the oxidative system of juveniles of the North Atlantic white shrimp *Litopenaeus setiferus* reared in biofloc technology. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(1), 258–270. <https://doi.org/10.1111/jwas.12845>
- Wakida-Kusunoki, A., Rojas-González, R. I., González-Cruz, A., Amador-del Ángel, L., Sánchez-Cruz, J., & López Tellez, N. (2013). Presence of giant tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 on the Mexican coast of the Gulf of Mexico. *BiolInvasions Records*, 2(4), 325–328. <https://doi.org/10.3391/bir.2013.2.4.11>
- Wakida-Kusunoki, A. T., Amador-del Angel, L. E., Alejandro, P. C., & Brahms, C. Q. (2011). Presence of pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* (boone, 1931) in the southern gulf of Mexico. *Aquatic Invasions*, 6(SUPPL.1). <https://doi.org/10.3391/ai.2011.6.S1.031>
- Wang, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., Wang, M., & Wang, L. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the different roles between hepatopancreas and intestine of *Litopenaeus vannamei* in immune response to aflatoxin B1 (AFB1) challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 222(April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.006>
- Winemiller, K. O., Akin, S., & Zeug, S. C. (2007). Production sources and food web

structure of a temperate tidal estuary: Integration of dietary and stable isotope data. *Marine Ecology Progress Series*, 343, 63–76. <https://doi.org/10.3354/meps06884>

Wyban, J., Walsh, W. A., & Godin, D. M. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138(1–4), 267–279. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00032-1)

Zacarias, S., Carboni, S., Davie, A., & Little, D. C. (2019). Reproductive performance and offspring quality of non-ablated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under intensive commercial scale conditions. *Aquaculture*, 503(June 2018), 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.018>

Anexo I- Obtención de postlarvas de *Litopenaeus setiferus*

Litopenaeus setiferus es una especie no domesticada, siendo la obtención masiva de postlarvas el cuello de botella que impide la escalamiento de su cultivo. A continuación, se describe cómo se obtuvieron los camarones generación F₀ de *L. setiferus* empleados en el Capítulo II de esta tesis:

Los reproductores se capturaron en la costa adyacente a Ciudad del Carmen, desde una embarcación de pesca ribereña con el arte de pesca conocido como red de chinchorro. Este arte de pesca consiste en una red monofilamento provista de plomo y flotadores que genera una pared vertical de maya entre el fondo marino y se eleva desde este aproximadamente 1.5 metros de altura.

A lo largo de la jornada de pesca se obtuvieron 76 reproductores, los cuales permanecieron en una caja con agua y aireación hasta que se finalizó la captura. Llegando a puerto se introdujeron los camarones en bolsas plásticas con agua, se saturó con oxígeno puro y se cerraron las bolsas herméticamente para su traslado. Los camarones se llevaron a las instalaciones de cultivo de camarón del Instituto Tecnológico de Lerma, Campeche. Los camarones se ubicaron en el área de reproducción en un tanque forrado de liner de 20,000L.

La ración de comida del tanque consistió en el 20% de la biomasa del tanque, dividida en 4 tomas a razón de un 5% a las 0800, 1200, 1600 y 2000h; los alimentos entregados fueron poliqueto, mejillón, krill y calamar. De manera suplementaria se entregó un alimento semihúmedo a las 0000h a una ración equivalente al 2% de la biomasa del tanque.

Se midieron en 3 ocasiones a lo largo del día la temperatura, el oxígeno y el pH del agua, cada mañana se realizó un recambio de agua equivalente al 100% del volumen del tanque.

A las 7 de la tarde se realizó la comprobación visual de hembras maduras con una red y una linterna para verificar el grado de desarrollo ovárico. Aquellas hembras maduras (estadio IV de la clave de Guitart and Quintana 1978) fueron separadas para realizar la inseminación artificial. Para esta operación se capturó un macho del tanque, el cual se examinó visualmente para descartar melanización en el tracto reproductivo y posteriormente se le extruyeron los dos espermátóforos. Con

ayuda de una pinza se exprimió la masa espermática de ambos espermátóforos, formando una única masa, la cual se adhirió al gonoporo de la hembra madura, tras esto se emplazó en su respectivo tanque de desove.

A los 19 y 23 días tras la captura, se obtuvieron dos puestas viables, cosechándose 20,000 y 15,000 nauplios respectivamente, los cuales fueron trasladados a las instalaciones de la UMDI-Sisal, Yucatán. Tras el cultivo larvario se obtuvieron 12,000 y 8,500 postlarvas 10 (PL 10, 10 días ocurridos tras la última muda metamórfica). Las postlarvas fueron sembradas en tanques exteriores de 20,000L en sistema biofloc, en los cuales permanecieron durante 12 meses. Durante este lapso fueron alimentados con alimento comercial Malta Cleyton Api-Camarón (35% de proteína cruda), a una ración diaria de entre el 2-5% de la biomasa del tanque. La ración diaria se dividió en 5 tomas iguales que se entregaron a las 0000, 0400, 0800, 1600 y 2000h, previo a la alimentación se midieron la temperatura, oxígeno disuelto y pH. La salinidad, los sólidos suspendidos, el nitrógeno amoniacal total y la concentración de nitrito se midieron dos veces por semana. Las biometrías se realizaron cada dos semanas, comprobando el crecimiento y ajustando así la cantidad de alimento requerido.

Anexo II- Preparación del pellet experimental

El alimento experimental empleado en el Capítulo III se ha desarrollado en la UMDI Sisal a lo largo de los últimos años. Originalmente se concibió como un sustituto de alimento fresco para los reproductores de *L. vannamei*, obteniéndose resultados prometedores con los machos (Ortiz Guillen). La formulación del pellet experimental se mejoró a lo largo del proyecto PAPIIT-INN220819, en el que se logró obtener las concentraciones óptimas de vitamina A, C y E para obtener una calidad espermática similar a la que propicia el alimento fresco. En la Tabla X se observa la composición del alimento en porcentaje y la cantidad de cada ingrediente para elaborar 3 Kg de pellet experimental.

Tabla 12. Composición del pellet experimental

Ingrediente	g/100 g	g /3 Kg alimento
Harina de pescado (sardina)	40	1200
Harina de calamar ¹	4.6	138
Harina de trigo ²	17.54	526.2
Suero de leche	12	360
Concentrado proteico de soya	10	300
Levadura de cerveza ²	5	150
Aceite de hígado de bacalao ³	4	120
Lecitina de soya	2	60
Colesterol	0.5	15
Lisina ⁴	0.4	12
Leucina ⁴	0.3	9
Hidroxiprolina ⁴	0.2	6
Grenetina	1.45	43.5
Alginato de sodio	1.5	45
Micro Rovimix Camarón ⁵	0.1	3
Stay-C ⁵	0.3	9
dl- α -tocoferol ⁵	0.1	3
Carophyll Pink ⁵	0.01	0.3
Total	100	3000

¹ Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco, México. ² MYN Distribuidora S.A. de C.V. Mérida, Yucatán, México. ³ Drogas Tacuba S.A. de C.V. Ciudad de México, México. ⁴ Future Foods S.A. de C.V. Tlalnepantla, Estado de México, México. ⁵ DSM, Heerlen, Holanda.

La preparación del alimento experimental se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición, de la siguiente manera:

Para la elaboración de 3 Kg de alimento, se tamizaron las harinas con ayuda de un tamiz metálico que permitió el paso de aquellos granos inferiores a 250 μm . Las partículas de mayor tamaño fueron molidas con una licuadora de doble hélice (Vitamix VM0103, Vita-Mix Corporation, USA). El tamaño de grano de 250 μm es el recomendable para obtener un pellet homogéneo y estable frente a la lixiviación.

-Una vez tamizadas, se juntaron todas las harinas, el suero de leche, el concentrado proteico de soya, la levadura de cerveza y el alginato en una amasadora automática de eje vertical (Blazer 20-A, Torrey, México; 20L-9Kg capacidad máxima) y se mezclaron durante 10 minutos.

-En paralelo a la mezcla de harinas, en una batidora de mesa (K45SSWH, KitchenAid, USA) se realizó una emulsión con el aceite de hígado de bacalao y la lecitina de soya. Tras 10 minutos de homogenización se comenzó a incorporar poco a poco el colesterol y las vitaminas, homogenizándose por 20 minutos más.

-En otra batidora de mesa se disolvió la grenetina con 100 mL de agua templada y se homogenizó por 15 minutos. A continuación, se incorporaron gradualmente los aminoácidos y se homogenizó por 20 minutos más.

-Con la amasadora automática en funcionamiento, se añadió la emulsión poco a poco y se mezcló por 15 minutos. Tras este lapso, y del mismo modo se añadió el alginato a la mezcla y se homogenizó por 10 minutos.

-Se añadieron 500 mL de agua y se homogenizó por 5 minutos, posteriormente se repitió este proceso añadiendo de 100 en 100 mL hasta que se logró la textura adecuada. Cuando la masa no se agrieta ni se desbarata al soltarla, es el momento en que se debe parar de añadir agua, en total, contando con el agua utilizada para preparar la grenetina, se utilizaron 1.4 L.

-La masa se extruyó en un molino de carne con dado de 3 mm de diámetro. Los espaguetis se ubicaron en 3 charolas de aluminio y se llevaron al horno de secado. La temperatura de secado fue de 60°C y el tiempo que demoró todo el proceso fue de 12 horas, a continuación, se rompieron los pellets con una longitud similar a los pellets comerciales y se empacaron en una bolsa zip-loc y conservaron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

Anexoll- Portadas de los artículos científicos

Received: 2 August 2022 | Revised: 17 August 2022 | Accepted: 19 August 2022

DOI: 10.1111/are.16085

ORIGINAL ARTICLE



Sperm quality and nutritional condition related to management during prematuration of *Litopenaeus setiferus* (F₀) males

Xurxo Barral-Pintos¹ | Gabriela Gaxiola²

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Mexico

Correspondence
Gabriela Gaxiola, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, México.
Email: mggc@ciencias.unam.mx

Funding information
UNAM - DGAPA, Grant/Award Number: INN220819

Abstract

The aim of this study was to compare management strategies for prematuration of the *Litopenaeus setiferus* male F₀ generation through the combination of two factors, culture system and kind of food, measured in terms of sperm quality and the nutritional condition of shrimp. Four treatments were differentiated by culture system and feed (five replicates each). Treatments were clear water commercial pellet (CC), clear water fresh food (CF), biofloc commercial pellet (BC) and biofloc fresh food (BF). At the end of the experiment, survival, spermatid quality, circulating metabolites and prophenoloxidase (ProFO) were evaluated as immune conditions and the oxidative stress enzyme system. Total sperm concentration showed an interaction between culture system and food provided, showing higher values in CC and BF treatments and lower values in CF treatment. ProFO performed an interaction, showing higher activity in CF and BC treatments. Oxidative stress biomarkers showed significant differences ($p < 0.05$) in PERMANOVA related to the diet, fresh food versus commercial pellet. Data collected in this study show that optimal sperm quality in *L. setiferus* male prematuration is obtained when shrimp are held in clear water and fed with commercial pellets or maintained in biofloc system and fed with fresh food.

KEY WORDS

biofloc, feed, fresh food, *Litopenaeus setiferus*, shrimp broodstock males, spermatid quality

1 | INTRODUCTION

The culture of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, has been considered an alternative species to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, for the shrimp industry since the 1980s (Valenzuela-Jiménez et al., 2020). Despite acceptable growing rates (0.75 g/week and harvest yield 7.9 ton/ha), the absence of commercial postlarvae supply did not allow the development of the *L. setiferus* culture (Valenzuela-Jiménez et al., 2020). The cause of this lack of postlarvae is the reproductive problems that wild males of this species develop once they are kept in captivity, a topic that has been approached by several studies (Alfaro-Montoya, 2010; Pascual et al., 1998; Sánchez et al., 2001).

Reproductive performance and larval quality are directly related to the nutritional condition of broodstock; however, the nutritional requirements of males and females are not the same (Corral-Rosales

et al., 2018; Perez-Velazquez et al., 2003; Racotta et al., 2003). Considering these arguments and the success reported in breeding with monosex tanks (Browdy et al., 1996), a proper specific diet for each sex could improve reproductive performance while saving money on inadequate expensive feed (Ortiz-Guillén et al., 2022).

For *L. setiferus* males, Goimier et al. (2006) determined that the dietary optimal protein inclusion level is 45%, obtaining higher spermatid quality than treatments fed with other protein levels.

Shrimps cultured in biofloc systems during the grow-out phase or prematuration have shown better performance during the breeding season (Emerenciano et al., 2014; Magaña-Gallegos et al., 2021). Biofloc has been described as a sustainable culture system that provides shrimp with probiotic media with native protein, leading to an enhancement of the nutritional and immunological status of shrimp and ultimately resulting in optimal reproductive performance (Aguilera-Rivera, Escalante-Herrera, et al., 2019; Aguilera-Rivera,

Sperm quality of *Litopenaeus vannamei* fed fresh or experimental food in two culture systems

Xurxo Barral-Pintos¹  | Miguel Arévalo²  | Karla Escalante²  |
Martín Arenas³  | Rodrigo Morones⁴ | Eduardo Velazquez⁴ |
Gabriela Gaxiola² 

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

³División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Mexico

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

Gabriela Gaxiola, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico.
Email: mggc@ciencias.unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 2018-000068-02 NACF-18548; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: PAPIIT 220819

Abstract

The growth of shrimp production through aquaculture has led to efforts to optimize processes such as nutrition during the prematuration and reproductive phases. This study sought an optimal culture system and diet to enhance the reproductive characteristics of male *Litopenaeus vannamei* during prematuration: this compared biofloc with clear water, and an experimental pellet (EP) with a mix of fresh food. Effects were measured in terms of shrimp survival, sperm quality, immunological parameters including prophenoloxidase (ProPO) and hemocyte count, nutritional condition measured as metabolites in hemolymph, hepatopancreas, and reproductive tract, oxidative stress biomarkers in the hepatopancreas and reproductive tract, and relative expression of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, ProPO, alpha2-macroglobulin and caspase in reproductive tract. Survival was higher with pellets (100%) than with fresh food (87%). Shrimp that were fed pellets had a higher hepatosomatic index, higher nutrient concentration in the hepatopancreas, and a higher antioxidant activity in the reproductive tract. Notably, sperm quality remained similar regardless of culture system or diet. These promising results should be ratified with a bioeconomic study to

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of the World Aquaculture Society* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of World Aquaculture Society.