



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**FISIOLOGÍA Y CALIDAD REPRODUCTIVA DE
MACHOS DE CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus schmitti EN CONDICIONES DE
CAUTIVERIO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en: Acuicultura)

P r e s e n t a

Lourdes Pérez Jar

La Paz, B.C.S., Diciembre del 2005

“Las cualidades de los padres quedan en el espíritu de los hijos.” *
A mis queridos padres con todo mi amor...

“El deber de un hombre está allí donde es más útil.” *
A la tierra donde nací...

“No fructifica la educación si no es continua y constante.” *
A todos mis profesores...

“La América ha de promover todo lo que acerque a los pueblos y abominar
todo lo que los aparte.” *
A los pueblos cubano y mexicano...

*José Martí Pérez (Apóstol de la Independencia de Cuba)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado (No. de registro 182850).

A los proyectos CONACYT AC 1.11, CIP -2.8.11C y CYTED Subprograma II, Acuacultura, RED II-C, Nutrición, Proyecto II.8, por brindarme su apoyo económico.

Agradezco el apoyo profesional y material del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. A su titular Dr. Mario Martínez García. Al personal de Estudios de Postgrado por sus inestimables atenciones. Al editor del CIBNOR Señor Ira Fogel por las modificaciones realizadas a los textos en idioma Inglés.

Especialmente agradezco a mi director de tesis Dr. Ilie Racotta Dimitrov, su apoyo en todo momento, sus enseñanzas y su acertada orientación que ayudaron considerablemente a mi formación profesional. Gracias por su amistad y confianza. Agradezco a mi codirectora de tesis Dra. Laida Ramos Trujillo, por ser la profesora que me inició en la reproducción de camarones desde hace 20 años, la amiga que con su apoyo, conocimientos y dedicación aportó mucho a mi preparación como profesional.

A mi Comité Tutorial Dr. Ilie Racotta Dimitrov, Dra. Elena Palacios Metchetnov, Dra. Laida Ramos Trujillo, Dra. Tsai García Galano, Dr. Roberto Civera Cerecedo, gracias por su asesoría y comentarios críticos. Gracias también por su amistad.

Mi gran estimación y agradecimientos al M.C. Roberto Hernández Herrera (Laboratorio de Bioquímica Fisiológica); M.C. Olivia Arjona López (Laboratorio de Metabolismo de Lípidos), ambos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). A Horacio y a Manuel del Laboratorio de Cómputo por su apoyo incondicional y amistad. A Dr. Guillermo Portillo, Dr. Francisco Javier Magallón, Dr. Carlos Lechuga, Dr. Humberto

Villareal, Dr. Felipe Ascencio, Dra. Bertha Patricia Ceballos, Dra. Ana Ma. Ibarra, Dra. Minerva Maldonado y a Guadalupe Véliz, muchas gracias a todos.

Diferentes instituciones en Cuba brindaron respaldo técnico y material para la consecución de los resultados de la investigación realizada, entre ellas, el Centro de Investigaciones Pesqueras del Ministerio de la Industria Pesquera, el Centro de Investigaciones de Mejoramiento Animal del Ministerio de la Agricultura, el Centro Nacional de Investigaciones Científicas y el Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de La Habana. Deseo reconocer la colaboración de la Empresa de Producción de Postlarvas de Camarón “YAGUACAM”, Provincia de Cienfuegos, que brindó sus instalaciones y los especímenes para la realización de las investigaciones. Agradezco la cooperación de los técnicos Víctor Zamora, Juana Baró y Caridad Ulloa del Departamento de Liofilización del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, asimismo, del Ing. Omar Duvergel y del Técnico César Milanés del Centro de Investigaciones de Mejoramiento Animal.

Quisiera reconocer la valiosa colaboración brindada por profesores y amigos: M.C. Elvira Alfonso, Dra. Laida Ramos Trujillo, Dra. Tsai García Galano, M.C. Tania Rodríguez Ramos, M.C. Alfredo de la Cruz, M.C. Sylvia Leal.

En estos momentos de agradecimiento, recuerdo a mis colegas del Centro de Investigaciones Pesqueras, a los que siempre me han apoyado y estimulado para poder realizar este trabajo doctoral, también a mis colegas más allegados, los de la División de Cultivos Marinos y del Laboratorio de Camarón.

A mi querida familia le agradezco extraordinariamente su constante amor y confianza.

A todos mis amigos cubanos que de una forma u otra me ayudaron en momentos difíciles, son muchos, y es inmenso mi agradecimiento. A todos los nuevos amigos del CIBNOR, que ya tienen un espacio en mi corazón.

A todos, muchas gracias.

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Director de tesis:

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov, Fisiología Metabólica, CIBNOR, México

El Comité Tutorial y el Comité Revisor de tesis fueron integrados por:

Dra. Laida Ramos Trujillo, Fisiología de la Reproducción, CIM, Cuba

Dra. Elena Palacios Mechetnov, Metabolismo Lipídico, CIBNOR, México

Dra. Tsai García Galano, Nutrición Acuícola, CIM, Cuba

Dr. Roberto Civera Cerecedo, Nutrición Acuícola, CIBNOR, México

El Jurado de examen de grado fue integrado por:

Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov, Fisiología Metabólica, CIBNOR, México

Dra. Laida Ramos Trujillo, Fisiología de la Reproducción, CIM, Cuba

Dra. Elena Palacios Mechetnov, Metabolismo Lipídico, CIBNOR, México

Dr. Roberto Civera Cerecedo, Nutrición Acuícola, CIBNOR, México

Dr. Angel Isidro Campa Córdova, Inmunología de Organismos Marinos, CIBNOR, México

Dra. Bertha Patricia Ceballos Vázquez, Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos,
CICIMAR, México (suplente)

RESUMEN

Para lograr satisfacer la demanda de postlarvas de las granjas de producción del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba, los Laboratorios de Producción de Postlarvas requieren de un aumento del porcentaje de cópulas en reproductores obtenidos en ciclo cerrado, lo cual depende en buena medida de la calidad de los machos. Aunque está demostrado que esta especie es capaz de reproducirse en cautiverio, se han obtenido lotes de machos cuya respuesta reproductiva ha sido baja, desconociéndose los factores que lo provocan. Con el fin de analizar si este problema no se debía al tipo de sistema de maduración, en un primer experimento se comparó la respuesta reproductiva en tanques unisexo y mixto durante un periodo de producción de 28 días. El desempeño reproductivo en términos de porcentaje de hembras maduras, porcentaje de cópulas exitosas, número de huevos y nauplios por desove, porcentaje de eclosión, así como porcentaje de supervivencia de ambos sexos, no difirió entre los dos sistemas. Adicionalmente se observó que el porcentaje de cópulas exitosas se incrementó significativamente a lo largo del tiempo, alcanzando valores máximos del 90 %, a partir de la 3^{era} semana de permanencia de los animales en la nave de maduración, lo cual indica una adaptación de los organismos a las condiciones del laboratorio comercial. Al no diferir la respuesta reproductiva de los animales en ambos sistemas, se utilizaron tanques unisexo en un segundo experimento, por ser más factible para la obtención de datos, comparándose el desempeño reproductivo, la calidad espermática y la condición fisiológica entre machos de cultivo y silvestres a lo largo de un periodo productivo de 70 días. Al igual que en el primer experimento, se pudo

corroborar que los animales de ambos orígenes, están adaptados al cabo de un mes de permanencia en la nave de maduración en términos de varios indicadores productivos (cópulas exitosas, fertilización, nauplios por desove); metabólicos (niveles de proteínas y glucosa en hemolinfa); inmunológicos (conteo de hemocitos, actividad de fenoloxidasa, actividad hemoaglutinante), así como de calidad espermática (conteo total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides normales). Sin embargo, después de dos meses de permanencia de los animales en el laboratorio de maduración, prácticamente todos los indicadores sugieren un desempeño reproductivo y una condición fisiológica y de salud pobres, más acentuado en los camarones silvestres. Este declive del estado fisiológico de los animales fue reflejado en los altos valores de la actividad de fenoloxidasa, así como por una disminución significativa del conteo total de hemocitos, de la actividad hemoaglutinante y de los niveles de glucosa, lo cual se corresponde con valores más bajos del conteo espermático total y del porcentaje de células espermáticas normales, junto con valores más altos de espermatozoides muertos. El estado fisiológico pobre de los animales al final del periodo evaluado, corresponde con una capacidad más baja de la inmunorespuesta y a un agotamiento reproductivo, como resultado de una alta actividad reproductiva, conjuntamente con altas temperaturas del agua registradas. Por otro lado, el incremento del peso corporal en machos silvestres conjuntamente con la disminución de lípidos y niveles bajos de proteínas solubles en hepatopáncreas, así como la disminución de los niveles de proteína y de glucosa en la hemolinfa, sugiere que estos animales estaban empleando gran parte de los nutrientes de sus reservas corporales y de la dieta, no sólo para la reproducción, sino también para su crecimiento. Este doble uso de energía también puede explicar el agotamiento fisiológico más pronunciado en machos silvestres. En conclusión,

los resultados sugieren que al cabo de dos meses de una actividad reproductiva intensa en condiciones de cautiverio, los camarones comienzan a presentar un agotamiento reproductivo, agravado por altas temperaturas del agua, que provocó un decremento del desempeño reproductivo. Este declive fue más pronunciado en machos silvestres por ser menos tolerantes a las condiciones de cautiverio utilizadas en este trabajo. Los machos de cultivo presentaron una menor susceptibilidad a las condiciones de cautiverio, como resultado de una pre-adaptación en los estanques donde fueron criados, por lo que el uso de machos de ciclo cerrado sigue siendo una estrategia recomendable para fines de producción de postlarvas.

Palabras claves: *Litopenaeus schmitti*, desempeño reproductivo, condición fisiológica, calidad espermática

ABSTRACT

To satisfy the needs of shrimp farms of southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* in Cuba, an increased mating success of pond-reared broodstock is needed in commercial hatcheries, and this objective depends mostly on the quality of males. Even though this species can reproduce in a closed life-cycle, batches of low-performance pond-reared males have been obtained. To analyze whether the system of tanks is partly responsible, in a first experiment, reproductive performance was compared in unisex and mixed tanks during a production period lasting 28 days. In a second experiment, reproductive performance, sperm quality, and physiological condition was compared between pond-reared and wild males throughout a production period of 70 days. In the first experiment, reproductive performance of mature females, mating success, fertilization rate, number of nauplii, hatching rate, and survival for both sexes did not differ between systems. Additionally, mating success increased significantly throughout the test period, with maximum values reached the third week after residence in maturation tanks. This indicated an adaptation of the shrimp to conditions in the commercial hatchery. Because reproductive performance was not different between the two systems, unisex tanks were used in the second experiment because they are more efficient for obtaining experimental data. Similar to the results of the first experiment, pond-reared and wild shrimp completely adapted after a month of residence in maturation tanks, as measured by reproductive indicators (mating success percentage, fertilization and number of nauplii); metabolic measures (protein and glucose levels in hemolymph); immunological indicators (total hemocyte count, phenoloxidase activity, and hemoagglutinating activity), as well as sperm quality (total

sperm count and percentage of normal sperm). Nevertheless, after two months, practically all indicators suggested a poor reproductive performance and physiological and health condition. This decline was more accentuated in wild shrimp. Decline in physiological condition was determined by high values of phenoloxidase activity, as well as by a decline in total hemocyte count, hemoagglutinating activity, and glucose levels. This particular deterioration of wild males also corresponded to lower total sperm count, lower proportion of normal sperm, and higher levels of dead sperm. The poor physiological condition of the animals at the end of the experiment corresponds to a lower capacity of immune response and reproductive exhaustion, resulting from a high reproductive activity and an increase in water temperature. On the other hand, the increase in body weight, together with the decrease in lipids, low levels of total proteins in the hepatopancreas, and decline in the levels of proteins and glucose in hemolymph suggests that these specimens used part of their body reserves not only for reproduction, but for growth. This double use of energy can explain a more pronounced physiological exhaustion for wild males. In conclusion, the present results suggest that, after two months, shrimp attained a reproductive exhaustion enhanced by an increase in water temperature that produced a decline in reproductive performance. This decline was more accentuated for wild shrimp, because they were less tolerant to captivity conditions. In contrast, pond-reared males were more tolerant to these conditions indicating that their use is still an adequate strategy for production of postlarvae because they present better adaptation to conditions of captivity.

Key words: *Litopenaeus schmitti*, reproductive performance, sperm quality, physiological condition.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
CONFORMACIÓN DE COMITÉS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	viii
CONTENIDO.....	x
Relación de anexos.....	xiii
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tablas.....	xvi
Lista de abreviaturas.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	9
1. Ubicación taxonómica de <i>Litopenaeus schmitti</i>	9
2. Distribución geográfica de <i>Litopenaeus schmitti</i>	9
3. Biología reproductiva de machos de <i>Litopenaeus schmitti</i>	10
3.1. Sistema reproductor.....	10
3.2. Maduración gonádica.....	13
3.2.1. Control hormonal.....	15
4. Apareamiento.....	18
5. Calidad reproductiva de machos.....	20
6. Influencia de factores ambientales, nutricionales y biológicos.....	23
6.1. Factores ambientales.....	23
6.2. Factores nutricionales.....	24
6.3. Factores biológicos.....	28
7. Indicadores inmunológicos para la determinación de la calidad.....	31

JUSTIFICACIÓN.....	35
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	35
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. ASPECTOS GENERALES DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	37
1.1 Cría y obtención de progenitores de cultivo.....	38
1.2. Manejo del local de maduración y reproducción.....	41
2. PARTICULARIDADES DE LOS DISEÑOS Y TÉCNICAS.....	43
1. Primer experimento.....	43
1.1. Variables medidas para evaluar la respuesta reproductiva de los animales.....	44
2. Segundo experimento.....	46
2.1. Indicadores productivos.....	48
2.2. Calidad espermática.....	49
2.3. Indicadores inmunológicos.....	50
2.3.1. Obtención y procesamiento de muestras de hemolinfa.....	50
2.3.2. Determinación de los efectores de la respuesta inmune.....	51
2.4. Variables bioquímicas de la hemolinfa.....	52
2.5. Composición bioquímica del hepatopáncreas y del espermátóforo.....	53
2.6. Procesamiento estadístico de los datos.....	55
RESULTADOS.....	58
1. Comparación del desempeño reproductivo de progenitores cultivados de <i>Litopenaeus schmitti</i> en sistemas de tanques unisexo y mixtos.....	58
2. Determinación de la respuesta reproductiva, calidad espermática y condición fisiológica en machos de cultivo y silvestres de <i>Litopenaeus schmitti</i>	61

2.1. Variables ambientales.....	61
2.2. Indicadores productivos.....	63
2.3. Variables morfométricas.....	65
2.4. Calidad espermática.....	69
2.5. Indicadores inmunológicos.....	72
2.6. Variables bioquímicas de la hemolinfa.....	74
2.7. Composición bioquímica del hepatopáncreas.....	76
2.8. Composición bioquímica del espermátóforo.....	77
DISCUSIÓN.....	80
1. Comparación del desempeño reproductivo de progenitores cultivados de <i>Litopenaeus schmitti</i> en sistemas de tanques unisexo y mixtos.....	80
2. Determinación de la respuesta reproductiva, calidad espermática y condición fisiológica en machos de cultivo y silvestres de <i>Litopenaeus schmitti</i>	83
2.1. Determinación de la respuesta reproductiva y calidad espermática en machos de cultivo y silvestres de <i>L. schmitti</i>	83
2.2. Variaciones metabólicas e inmunológicas de machos adultos de diferentes orígenes de <i>L. schmitti</i> durante una actividad reproductiva continua.....	87
2.2.1. Valores iniciales y estrés.....	87
2.2.2 Cambios en el tiempo.....	90
2.2.3. Origen de los reproductores.....	94
2.3. Análisis de la composición bioquímica de hepatopáncreas y espermátóforos en machos adultos de diferentes orígenes de <i>L. schmitti</i> a lo largo de un ciclo de producción.....	94
DISCUSIÓN GENERAL.....	101
CONCLUSIONES.....	106
RECOMENDACIONES.....	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
ANEXOS	

RELACIÓN DE ANEXOS

1. Pérez-Jar, L., Rodríguez-Ramos, T., Ramos, L., Guerra, Y., Racotta, I.S., 2005. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. Aquaculture, (en prensa)
2. Pérez-Jar, L., Ramos, L., Palacios, E., Racotta, I.S., Reproductive performance and sperm quality in wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. Aquaculture, (enviado)

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Registro total de hembras maduras, copuladas y desovadas en el Periodo 1996-2002 del Laboratorio Comercial de postlarvas de camarón “YAGUACAM”, Cuba.....	4
Figura 2. Registro del porcentaje de hembras copuladas y promedio de nauplios por desove en el periodo 1996-2002 del Laboratorio Comercial de postlarvas de camarón “YAGUACAM”, Cuba	5
Figura 3. Registro mensual del porcentaje de hembras copuladas y promedio de nauplios por desove en diferentes años del Laboratorio Comercial de postlarvas de camarón “YAGUACAM”, Cuba.....	6
Figura 4. Sistema interno reproductor masculino de camarones peneidos...	11
Figura 5. Estructura de medio espermátforo de <i>L. schmitti</i>	12
Figura 6. Ubicación geográfica de las zonas donde fueron capturados los reproductores utilizados en el trabajo de investigación.....	38
Figura 7. Variaciones del porcentaje de hembras maduras y porcentaje de cópulas exitosas de diferentes sistemas de tanques de maduración.....	59
Figura 8. Registro diario de la temperatura a lo largo del ciclo de producción (promedio de tanques de machos silvestres y de cultivo).....	62
Figura 9. Indicadores productivos de hembras de cultivo apareadas con machos del mismo origen o silvestres durante un ciclo de producción de 70 días.....	64
Figura 10. Líneas de regresión entre el peso de los espermátforos y peso corporal de machos de camarón de cultivo y silvestres.....	67
Figura 11. Líneas de regresión entre el conteo total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides normales y peso corporal de machos de camarón de cultivo y silvestres.....	70
Figura 12. Indicadores inmunológicos de machos de cultivo y silvestres en diferentes tiempos a lo largo de un ciclo de producción.....	73

Figura 13. Variables bioquímicas de la hemolinfa de machos de cultivo y silvestres en diferentes tiempos a lo largo de un ciclo de producción.....	75
Figura 14. Variables bioquímicas del hepatopáncreas de machos de cultivo y silvestres en diferentes tiempos a lo largo de un ciclo de producción.....	78
Figura 15. Variables bioquímicas del espermátóforo de machos de cultivo y silvestres en diferentes tiempos a lo largo de un ciclo de producción.....	79

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Contenido de nutrientes de las dietas secas utilizadas para la cría de reproductores de cultivo de <i>L. schmitti</i>	40
Tabla 2. Contenido de nutrientes de la dieta seca utilizada en la última etapa del ciclo de cría en estanques y en el local de maduración para adultos de <i>L. schmitti</i>	42
Tabla 3. Registro de indicadores productivos de reproductores de <i>L. schmitti</i> mantenidos en tanques de maduración unisexo y mixto durante 28 días....	60
Tabla 4. Producción de huevos, nauplios y porcentaje de eclosión obtenidos de reproductores de <i>L. schmitti</i> mantenidos en tanques unisexo y mixto...	60
Tabla 5. Variables ambientales registradas en tanques de machos de cultivo y silvestres durante un periodo de 70 días.....	62
Tabla 6. Coeficientes de correlación entre variables productivas diarias y el registro de la temperatura el mismo día (0) o de cinco días antes.....	65
Tabla 7. Características morfométricas de los camarones de cultivo y silvestres muestreados en diferentes tiempos a lo largo del ciclo de producción.....	68
Tabla 8. Calidad espermática de espermátforo de camarones de cultivo y silvestres en diferentes tiempos a lo largo del ciclo de producción.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Actividad hemoaglutinante
ANCOVA	Análisis de covarianza
ANOVA	Análisis de varianza
CTH	Conteo total de hemocitos
EDTA.Na₂	Sal disódica del ácido etilendiamino tetracético
FO	Fenoloxidasa
GIH (por sus siglas en inglés)	Hormona inhibidora de la gónada
GSH (por sus siglas en inglés)	Hormona estimuladora de la gónada
IHS	Índice hepatosomático
ISS	Índice espermatosomático
NS	No significativo
PL	Postlarvas
proFO	profenoloxidasa
SIC	Solución Salina Isotónica de Camarón
TCA	Ácido tricloracético
TM	Toneladas métricas
VIH (por sus siglas en inglés)	Hormona inhibidora de la vitelogénesis

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarones peneidos se ha convertido en una de las mayores industrias de acuicultura en Asia y Latinoamérica. En sus inicios, esta actividad estaba basada en el uso de postlarvas silvestres o postlarvas producidas en los laboratorios a partir de reproductores maduros capturados en su medio natural y mantenidos bajo condiciones controladas. Con el empleo de la tecnología desarrollada para la reproducción en cautiverio de camarones peneidos, se han logrado gradualmente incrementos en la producción mundial. La producción mundial de camarón (captura y cultivo) en el 2004, llegó a 4 millones de toneladas métricas (TM), siendo el 50 % de granjas camaroneras, duplicándose el suministro mundial de camarón en los últimos 30 años. Los mayores productores de camarones de granja fueron China con 450 000 TM, Vietnam con alrededor de 350 000 TM, seguido por Tailandia con aproximadamente 300 000 TM (Rosenberry, 2004). La especie *Penaeus monodon* es la más cultivada (53%), seguida por las especies *L. vannamei*, *Penaeus chinensis* y *Fenneropenaeus indicus* (INFOFISH, 2004).

El aumento de la actividad camaronera ha provocado que la disponibilidad de postlarvas no se presente en las cantidades deseadas, lo cual se debe parcialmente a las fluctuaciones de las poblaciones silvestres de adultos durante todo el año, la captura de reproductores portadores de virus y la sobreexplotación pesquera a la que son sometidas. Por lo anterior surge la necesidad en muchos países de establecer técnicas para el cierre del ciclo de vida, lo cual no solo se traduce en mayor producción de postlarvas, sino a la posibilidad de realizar programas de mejoramiento genético de los camarones de cultivo (Browdy, 1998).

La constitución de bancos de reproductores de cultivo, su cierre del ciclo de vida y la evaluación de la maduración, fecundidad de los desoves, fertilización de los huevos y producción de nauplios de algunos peneidos de importancia comercial, ha sido objeto de estudio de varios autores (Primavera, 1978; Aquacop, 1979, 1983; Brown *et al.*, 1984; Browdy *et al.*, 1986; Ottogali *et al.*, 1988; Wyban *et al.*, 1990; Bueno, 1989; Ramos *et al.*, 1995; Mendoza, 1997; Cavalli, *et al.*, 1997; Autrand y Lucien-Brun, 1998; Palacios *et al.*, 1999b; Preston, *et al.*, 1999). Por otro lado, se han realizado estudios donde se ha puesto en evidencia el potencial reproductivo de los progenitores de cultivo, sugiriéndose su uso al realizar una buena selección y proporcionarles un manejo que posibilite obtener una adecuada calidad (Crococ y Coman, 1997; Browdy, 1992; Browdy, 1998; Palacios *et al.*, 1999c; Wouters *et al.*, 2001; Racotta *et al.*, 2003; Peixoto *et al.*, 2003; Palacios y Racotta, 2002).

La camaronicultura en Cuba en su primera etapa de desarrollo (1984), dependió de la obtención de hembras grávidas de *L. schmitti* del medio natural para la producción de postlarvas de laboratorio. Para desarrollar la maduración y reproducción en cautiverio de progenitores silvestres, se trabajó desde el inicio en la búsqueda y aplicación de métodos que garantizaron estabilizar los indicadores productivos de los parentales en el laboratorio (Ramos y Primavera, 1986; Tamame, 1987; Ramos, 1990; Pérez-Jar y Ramos, 1992; Ramos y García, 1992; Betancourt *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1994; Artiles *et al.*, 1999). Sin embargo, el envío y manejo en cautiverio de progenitores silvestres, además de ser costoso, no era capaz de garantizar una producción estable de postlarvas durante todo el

año, y por otro lado, ya se estaba presentando una disminución de las poblaciones naturales de *L. schmitti* en las zonas de captura.

A partir del año 1987, con el empleo de técnicas de ciclo cerrado se comenzó a trabajar en la constitución de bancos de reproductores de *L. schmitti*, y conjuntamente fue desarrollado un programa de investigaciones que sirvió de base para establecer la posibilidad de la sustitución gradual de los progenitores silvestres por los de cultivo. Los primeros trabajos del programa estuvieron dirigidos a determinar el efecto de técnicas de ablación en hembras y electroeyaculación en machos y su efecto sobre la respuesta reproductiva con ciclo cerrado (Ramos, *et al.*, 1995). También se evaluaron machos de distintas edades para determinar el periodo de vida óptimo para su manejo en los laboratorios (Bécquer *et al.*, 1994; Pérez-Jar y Jaime 1995), un alimento balanceado de formulación nacional para mejorar los indicadores productivos de los reproductores (Pérez-Jar, *et al.*, 1996), la evaluación de efectores de la respuesta inmune innata en condiciones de estrés (Rodríguez-Ramos, 2003) y se siguieron sucesivas generaciones en ciclo cerrado para evaluar la respuesta reproductiva en cautiverio (Pérez-Jar *et al.*, 1997). Por otro lado, se analizó la variabilidad genética de poblaciones naturales de *L. schmitti* con el propósito de determinar cuales podían ser utilizadas para la formación de bancos de reproductores heterocigóticos (Díaz, 1994).

Estos trabajos sirvieron para conformar una tecnología que fue implementada en los laboratorios comerciales de producción de postlarvas de camarón de esta especie en Cuba. Los resultados productivos obtenidos en el laboratorio “YAGUACAM” desde 1996 hasta 2002 en la maduración y reproducción de progenitores en ciclo cerrado, son mostrados en

la Figura 1., donde se observa el aumento gradual de hembras maduras obtenidas por la ampliación de las capacidades de la instalación. Sin embargo, este incremento pierde significancia cuando observamos el aumento discreto de los valores de los indicadores productivos, hembras copuladas y desovadas.

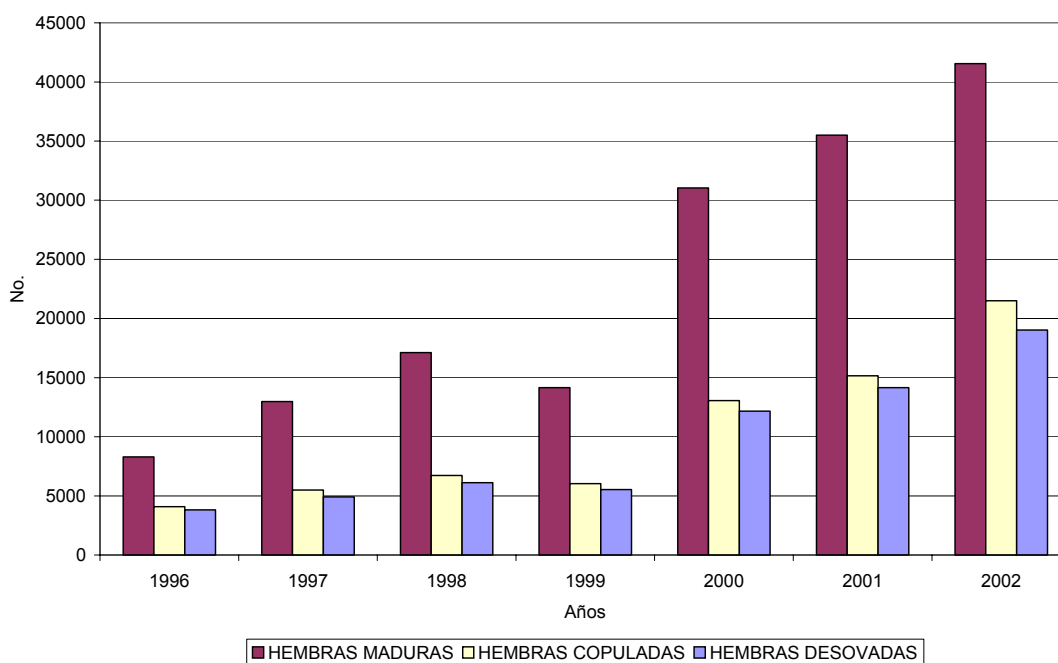


Figura 1. Registro del total de hembras maduras, copuladas y desovadas en el periodo 1996-2002 del Laboratorio Comercial de Producción de Postlarvas de Camarón “YAGUACAM”, Cuba.

El porcentaje de cópulas y el promedio de nauplios por desove, son otros indicadores productivos fundamentales que se tienen en cuenta para evaluar la eficiencia de los lotes de reproductores en cautiverio y que están directamente relacionados con la calidad reproductiva de los machos. Estos indicadores han fluctuado intra e interanualmente desde la primera producción del laboratorio (Figuras 2 y 3), lo cual repercute en los costos de

producción de las postlarvas. Esta inestabilidad en los indicadores productivos no se expresa de manera constante en los mismos meses de diferentes años, lo cual sugiere que el factor ambiental no es el principal efector en la productividad de los reproductores. Las condiciones de crianza, el estado de salud, la diversidad genética y las estrategias de manejo de los reproductores, son algunos factores que pueden tener un papel fundamental en la estabilidad de la producción de postlarvas de los laboratorios.

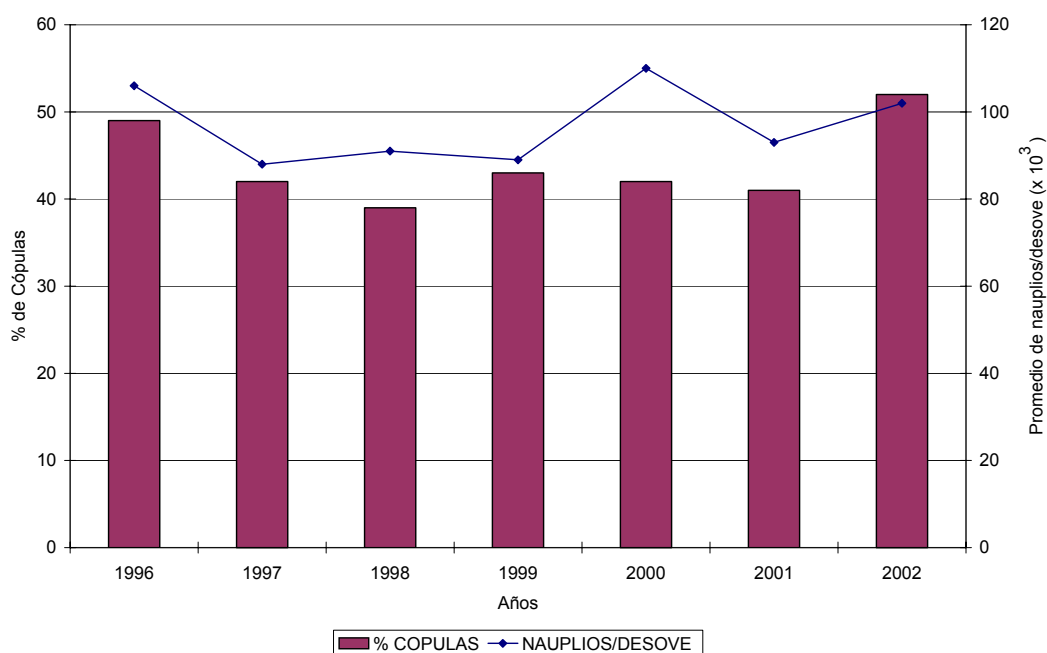


Figura 2. Registro del porcentaje de hembras copuladas y promedio de nauplios por desove en el periodo 1996-2002 del Laboratorio Comercial de Producción de Postlarvas de Camarón “YAGUACAM”, Cuba.

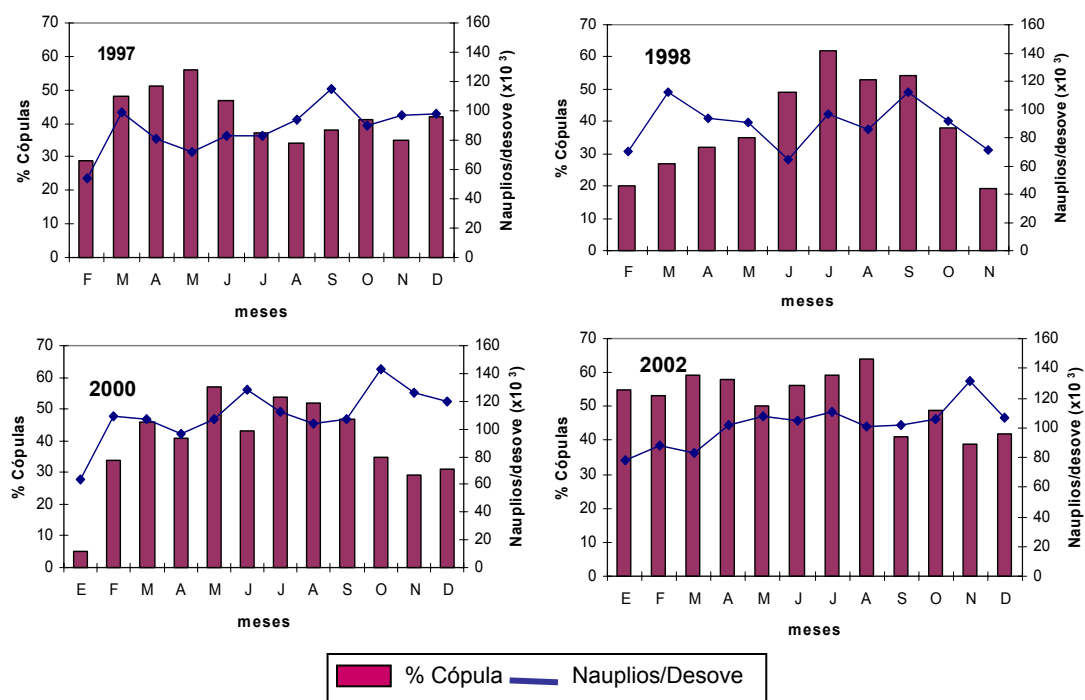


Figura 3. Registro mensual del porcentaje de hembras copuladas y promedio de nauplios por desove en diferentes años del Laboratorio Comercial de Producción de Postlarvas de Camarón “YAGUACAM”, Cuba.

La gran mayoría de las investigaciones realizadas a nivel mundial, que analizan funciones metabólicas del organismo de camarones peneidos, aspectos nutricionales y factores que eleven la respuesta reproductiva de los animales mantenidos en cautiverio, han estado enfocadas fundamentalmente al estudio de las hembras (Browdy *et al.*, 1986; Marangos *et al.*, 1988; Vincent *et al.*, 1988; Marangos *et al.*, 1989; Bueno, 1990; Harrison, 1990; Cahu *et al.*, 1995; Browdy *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1996; Palacios *et al.*, 1999a; Palacios *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2001; Arcos *et al.*, 2003). Sin embargo, los problemas reproductivos de los machos, también pueden limitar el éxito del cultivo peneidos (Leung-Trujillo y Lawrence 1987a). El deterioro de los machos pudiera estar

incidiendo en la productividad de los laboratorios, ya que como se observa en la Figura 1., el total de hembras maduras anual no fue un factor limitante. Sin embargo, el porcentaje de cópulas que depende en buena medida de los machos, tiende al 50 %, lo cual representa una eficiencia relativamente baja.

Al igual que en las hembras, la calidad de los machos depende de diversos factores que deben ser controlados para garantizar la estabilidad de la producción de postlarvas en los laboratorios. Por ejemplo, selección inadecuada de la progenie utilizada para iniciar un nuevo ciclo de reproductores de cultivo, un manejo inadecuado de los estanques donde son criados y otras causas como las ambientales, pueden provocar disminución de la productividad. Entre los trabajos que evalúan el desempeño reproductivo de machos en condiciones de cautiverio, están aquellos que han evaluado el efecto de la edad y la talla (Bray y Lawrence, 1992; Browdy, 1992; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003), los factores ambientales, nutricionales, bioquímicos y fisiológicos (Bray *et al.*, 1985; Leung-Trujillo y Lawrence 1987b; Alfaro, 1993; Pascual *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2003a; Ceballos-Vázquez, 2003; Pérez-Velázquez *et al.*, 2001; Pérez-Velázquez *et al.*, 2003).

En Cuba, existen trabajos de investigación dirigidos específicamente al estudio de los machos del camarón blanco *L. schmitti* (Tamame, 1987; Betancourt *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1995; Bécquer *et al.*, 1994; Pérez-Jar y Jaime, 1995; Pérez-Jar, 1996) y aunque está demostrado que esta especie es capaz de reproducirse en cautiverio, se requiere profundizar en esta temática, pues se han observado lotes de machos de cultivo con porcentaje de cópulas y fertilización bajos, desconociéndose los factores que lo provocan. En la presente

tesis se pretenden iniciar estudios donde se pueda analizar la condición fisiológica y calidad reproductiva de reproductores machos, teniendo en cuenta su procedencia (cultivo o medio natural), y el manejo que recibieron en su etapa productiva en laboratorios comerciales, con el propósito de reconocer posibles causas que provoquen el decremento de la productividad de los machos de camarón *L. schmitti*.

Los resultados que se obtengan con este trabajo podrían ser el inicio de un programa de investigación dirigido al mejoramiento de reproductores machos de *L. schmitti* obtenidos en ciclo cerrado, que contribuyan a optimizar el desempeño reproductivo de los mismos con la finalidad de asegurarle a las granjas camaroneras del país y a productores de otras latitudes interesados en el cultivo de esta especie, una fuente de progenitores estable y de calidad.

Este trabajo de tesis tiene como novedad científica, el interrelacionar diferentes variables como son los indicadores productivos, la calidad espermática, las variables metabólicas e inmunológicas durante un ciclo de producción comercial, para una mejor interpretación de los factores que pueden afectar el desempeño reproductivo de machos de camarón *L. schmitti*.

ANTECEDENTES

1. Ubicación taxonómica del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* según Pérez Farfante y Kensley (1997)

Phylum Arthropoda
Subphylum Crustacea
Clase Malacostraca
Subclase Eumalacostraca
Superorden Eucarida
Orden Decapoda
Suborden Dendobranchiata
Infraorden Penaeidea
Superfamilia Penaeoidea
Familia Penaeidae
Género *Litopenaeus*
Especie *Litopenaeus schmitti*

2. Distribución geográfica de *Litopenaeus schmitti*

Litopenaeus schmitti se extiende a lo largo de las Antillas Mayores, Islas Vírgenes y hasta las Antillas Menores. En la plataforma continental se extiende desde Belice a lo largo de las costas del Mar Caribe y la costa Atlántica de Sudamérica hasta Brasil. Son estuarinos y marinos, habitando hasta los 47 m de profundidad. En Cuba, es la única especie nativa que se ha cultivado con resultados comerciales. Las principales poblaciones naturales en la isla se localizan en el Golfo de Batabanó en la plataforma suroccidental, en la Bahía de

Cienfuegos, provincia Cienfuegos y en los golfos de Guacanayabo y Ana María situados en la plataforma suroriental.

3. Biología reproductiva de machos del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*

El sistema reproductor de machos de camarones del género *Litopenaeus* y la formación y estructura del espermatóforo de diferentes especies ha sido descrito por varios autores (King, 1948; Pérez- Farfante, 1975; Guitart *et al.*, 1985; Talbot *et al.*, 1989; Ro *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1991; Heitzman *et al.*, 1993).

3.1. Sistema reproductor de *L. schmitti* descrito por Guitart *et al.* (1985).

El aparato reproductor masculino de *L. schmitti* presenta externamente una estructura ubicada en el primer par de pleópodos llamada petasma, cuya función es la transferencia del espermatóforo durante el apareamiento. La forma y tamaño del petasma varía según la edad. Los gonoporos se encuentran en posición ventral, en la base del quinto par de pereiópodos que es el lugar por donde es expulsado el espermatóforo durante la cópula. El apéndice masculino se presenta como una modificación de los endopoditos del segundo par de pleópodos y su función es ayudar a la fijación del espermatóforo durante el apareamiento.

Internamente, el sistema reproductivo masculino está constituido por un par de testículos situados dorsalmente en el cefalotórax con ocho pares de lóbulos, los que rodean el hepatopáncreas. Conectados a los testículos y a ambos lados del corazón, se encuentran los

vasos deferentes, que son unos túbulos enrollados en los que se distinguen cuatro partes: una sección proximal estrecha y delgada, una porción media más engrosada con una doble curvatura, una región distal que es un tubo largo y estrecho; y por último una región terminal muscular muy dilatada, que es un receptáculo terminal, llamado ámpula terminal. En esta última región es donde se forman y almacenan los espermátóforos, que son las estructuras que el macho transfiere a la hembra durante el apareamiento y que contienen los espermatozoides. Estas ámpulas terminales desembocan en los poros genitales, por donde se expulsan los espermátóforos (Figura 4).

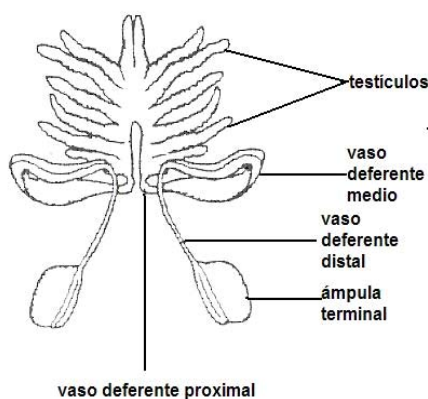


Figura 4. Sistema interno reproductor masculino de camarones peneidos (Tomado de King, 1948)

El espermátóforo de *L. schmitti* es una estructura constituida por dos placas quitinosas en forma de vaina que cubren a la masa espermática. Esta estructura está compuesta en realidad por dos unidades que se encuentran en los receptáculos terminales del macho y se unen en el momento de su expulsión, está dotada a cada lado de la parte anterior de un proceso aliforme armado de una pequeña proyección triangular en el borde posterior. Tiene además, dos placas laterales en su porción posterior. Por medio de estas estructuras el

espermátforo se fija al tético de la hembra, ayudado por una sustancia gelatinosa que lo acompaña cuando es expulsado. (Figura 5)

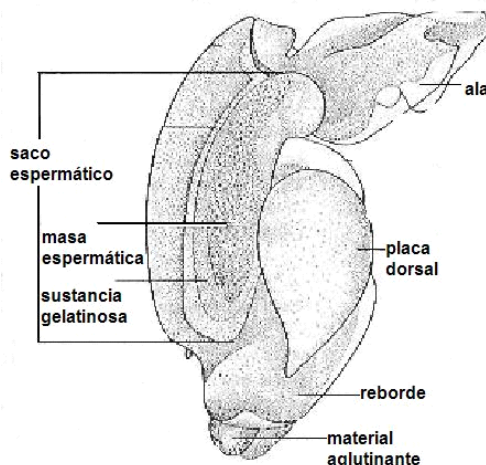


Figura 5. Estructura de medio espermátforo de *Litopenaeus schmitti*
(Tomado de Pérez-Farfante, 1975)

En la estructura microscópica de los testículos se puede apreciar que cada lóbulo está formado por túbulos contorneados. Dentro de los túbulos ocurre la espermatogénesis y cada uno funciona independientemente. Las espermatidas se agrupan en el interior de los túbulos, formando una gran masa que sale hacia un canal colector que a su vez, desemboca en la región proximal del canal deferente. A este nivel ya tiene su estructura completa, ya que la púa o "spike" está completamente desarrollada. Los espermatozoides totalmente desarrollados tienen la cabeza poliédrica, la púa es corta, ligeramente ensanchada y más aguzada en el extremo; y no tienen movilidad. Una vez que el flujo espermático llega a la región proximal de los tubos deferentes pasa a la región media en la cual se diferencian dos conductos: el primario o espermático y el secundario, separados ambos por un septo; el primero contiene la masa espermática. Según Malek y Bawan (1974), en el primer septo se forman las capas I y II del espermátforo y en el segundo se forma el ala del espermátforo

(capas III y IV). El septo tiene función secretora y está formado por dos capas de tejido epitelial. Cerca de la región distal del canal deferente, la pared epitelial se separa y quedan comunicados los dos conductos. Las células de la pared epitelial segregan una sustancia que permite la fusión de la masa espermática con el ala. Esta región asegura el descenso del espermátforo hacia el ámpula terminal.

La estructura del ámpula terminal es muy compleja con divisiones internas. Internamente existe tejido glandular que segrega continuamente un material que cubre el saco espermático. Solamente una porción del espermátforo es secretada por los segmentos de los vasos deferentes, el resto de los componentes son adicionados en las ámpulas terminales.

Los machos en buen estado se detectan al observar en el interior de las ámpulas los espermátforos grandes, blancos y turgentes. La coloración blanca y la turgencia son debidas a una abundancia del material aglutinante, el cual es sintetizado y secretado en las ámpulas. Pérez-Farfante (1975) se refiere al material adhesivo y a la masa glutinosa colectivamente como el "material glutinoso", aunque en realidad ambos difieren en estructura y adhesividad y se originan en cuatro diferentes cámaras del ámpula terminal que están interconectadas.

3.2. Maduración gonádica

A diferencia de las hembras, la maduración gonádica de los machos no se ha descrito con la asignación de estadios de desarrollo a partir de la visualización macroscópica de los

cambios en cuanto a forma, tamaño y coloración. Su maduración se ha asociado principalmente con cambios en la estructura de los genitales externos (petasma) (Tirmizi y Javed, 1976), con cambios histológicos que ocurren en los testículos y ámpulas terminales de los vasos deferentes (Ro *et al.*, 1990) y con el grado de desarrollo del espermátforo (Alfaro, 1993; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003).

Alfaro (1993) describe que la maduración de los machos de *L. stylirostris* tiene al menos tres niveles independientes. El primero es la maduración de los testículos, los cuales producen células inmaduras (espermátidas). El segundo es la maduración de los vasos deferentes, en los cuales se completa la maduración de los espermatozoides con la formación del "spike". El tercer nivel es la síntesis del espermátforo en las ámpulas terminales, donde el producto final se completa. Todo este proceso está sujeto a diversos factores, entre ellos, el grado de desarrollo del animal (edad y tamaño), el ambiente y la nutrición, que pueden afectar el proceso de maduración gonádica y por lo tanto la calidad espermática.

Heitzmann *et al.* (1993) reportan que la espermatogénesis en *L. vannamei* no está relacionada con el ciclo de muda y al parecer es un proceso continuo. Ellos sugieren que la formación del nuevo espermátforo sucede aún con la presencia externa de espermátforos, y concluyen que la producción de la masa espermática y la iniciación de la síntesis de espermátforos se produce de forma sincrónica. Por otro lado, Talbot *et al.* (1989) sugieren que en *L. setiferus* las condiciones de cautiverio pueden interferir con este sincronismo de la espermatogénesis.

El proceso de espermatogénesis en *Sicyonia ingentis* estudiado por Shigekawa y Clark (1986) y en *L. stylirostris* por Alfaro (1994), se produce en los túbulos testiculares. Las espermatogonias de la zona germinativa se alejan para entrar en meiosis y desarrollarse en espermatocitos primarios. Al completarse la primera división meiótica los espermatocitos primarios se convierten en espermatocitos secundarios, los cuales a su vez, al completar la segunda división meiótica, dan lugar a las espermátidas. Posteriormente, las espermátidas pasan por el proceso de espermiogénesis, madurando hasta transformarse en espermatozoides funcionales. Las espermátidas completan su maduración en función del tipo de estrategia reproductiva de la especie. Así tenemos que en aquellas especies de camarón que pertenecen al grupo de los no acanalados, cuyas hembras presentan télico abierto, la maduración final de las espermátidas tendrá lugar dentro del vaso deferente de los machos (Shigekawa y Clark, 1986; Alfaro, 1994), mientras que en especies del grupo de los acanalados, cuyo télico es cerrado, la maduración no parece completarse en el sistema reproductor masculino, sino que se lleva a cabo en el télico de la hembra después de producirse la cópula (Alfaro, 1994).

3.2.1. Control hormonal

Los centros endocrinos en crustáceos están compuestos por el sistema neurosecretor órgano X/glándula sinusal, el cerebro, el ganglio torácico, el órgano mandibular, la glándula androgénica en machos y los propios ovarios en hembras, y estos son reguladores directos de la reproducción al producir hormonas o factores de estimulación o inhibición del desarrollo gonadal (Ver revisiones de Fingerman, 1987; Huberman, 2000; Palacios y

Racotta, 2002). En el tallo ocular es donde se encuentra la principal glándula endocrina de crustáceos, el complejo neurosecretor órgano X/glándula sinusal, productora de varias hormonas que están involucradas en la regulación de diferentes procesos fisiológicos. Así tenemos a la hormona inhibidora de la gónada (GIH, por sus siglas en inglés) o de la vitelogénesis (VIH, por sus siglas en inglés), cuyos órganos blanco principales son el ovario y el testículo. Por medio de la extirpación de esta glándula (ablación del tallo ocular), se elimina este complejo neuroendocrino y por ende disminuyen los niveles de GIH/VIH permitiendo que se acelere el proceso de maduración de las gónadas, lo cual ha sido claramente demostrado para hembras (Primavera, 1985; Browdy, 1992; Bray y Lawrence, 1992). También se ha reportado que secreciones del órgano mandibular, como el terpenoide farnesoato de metilo, tiene un papel importante en el proceso reproductivo tanto en hembras como en machos de crustáceos (Laufer *et al.*, 1993).

La regulación endocrina de la reproducción en los machos de camarón y otros crustáceos, está dada principalmente por la acción de la glándula androgénica localizada en el conducto deferente medio del sistema interno reproductor, que controla la espermatogénesis y el comportamiento sexual (Alfaro, 1990). También hay evidencias de un factor estimulador, al parecer procedente del cerebro o ganglio torácico, que actúan sobre la glándula androgénica de crustáceos (Kleinholz y Keller, 1979; Browdy, 1992). Está reportado que el cauterizar la región media del protocerebrum conduce a una degeneración de los testículos (células germinales y somáticas), el epitelio de los vasos deferentes y la glándula androgénica (Alfaro, 1990).

La respuesta reproductiva de machos ablacionados ha sido explorada para diferentes especies. Chamberlain y Lawrence (1981) reportaron que la ablación de machos subadultos de *L. vannamei* incrementó el tamaño de los testículos, sincronizó su desarrollo e incrementó la frecuencia de las cópulas. Leung-Trujillo y Lawrence (1985) observaron un incremento en el peso de los testículos y de los espermátóforos y un incremento en la cantidad de espermatozoides en machos ablacionados de *L. vannamei*, sin efectos adversos sobre la calidad espermática. A su vez, Alfaro y Lozano (1993), demostraron que la calidad del espermátóforo en machos jóvenes de *L. vannamei*, puede ser mejorada al ablacionar el tallo ocular. Sin embargo, la ablación de machos de *L. stylirostris* no resultó en un incremento en el número de cópulas naturales (Ottogalli *et al.*, 1988). Tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de cópulas, número de huevos por desove, y porcentaje de fertilización en machos ablacionados y no ablacionados de *L. setiferus* (Browdy *et al.*, 1996). Hasta la fecha, la ablación de machos no es utilizada a nivel de producción, pues aún existen controversias en los resultados (Gomes y Honculada-Primavera, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993).

Otros estudios han sido realizados con el propósito de mejorar la calidad espermática en machos a través del control hormonal. Así, tenemos los trabajos de Alfaro (1996) en *L. vannamei* y Yashiro *et al.* (1998) en *P. monodon* los cuales obtuvieron un aumento en el peso del espermátóforo y un aumento en el conteo total de espermatozoides en respuesta a la inyección con testosterona.

La serotonina y la dopamina, ambas aminas biogénicas, son neuromoduladores de la secreción hormonal y por lo tanto afectan el proceso reproductivo. La serotonina posiblemente dispara la liberación de la hormona estimuladora de la gónada (GSH, por sus siglas en inglés) en *Uca pugilator* de ambos sexos (Richardson *et al.*, 1991) y la dopamina inhibe la maduración gonádica, aparentemente por inhibición de la liberación de la GSH o también por la estimulación de la liberación de la GIH (Sarojini *et al.*, 1996).

4. Apareamiento

Ramos y Gesteira (1997) describen diferencias en las formas de reproducción entre las especies de télico cerrado y las de télico abierto. En las hembras que presentan télico abierto (género *Litopenaeus*), el cual consiste de placas esternales especializadas con protuberancias y cavidades que posibilitan la fijación del espermátforo externamente. En las especies de télico abierto, el apareamiento ocurre antes del desove, cuando las hembras están casi o completamente maduras. En estos casos el desove ocurre horas después del apareamiento y el espermátforo se desprende, por lo que solo es utilizado para fertilizar un desove. Las hembras de télico cerrado presentan una espermateca o receptáculo seminal, donde el espermátforo es almacenado hasta el momento del desove. En estas especies la transferencia del espermátforo ocurre poco después de que la hembra muda y tiene el exoesqueleto blando. Luego del endurecimiento del exoesqueleto, ésta puede madurar y desovar, varias veces antes de la próxima muda y el esperma puede ser utilizado para la fertilización de uno o varios desoves.

Los camarones peneidos presentan un cortejo sexual previo al apareamiento. El comportamiento durante el cortejo y el apareamiento ha sido descrito para varias especies de camarón como *Marsupenaeus japonicus* (Hudinaga, 1942), *Penaeus monodon* (Primavera, 1983), *Penaeus semisulcatus* (Browdy y Samocha, 1985) *Farfantepenaeus paulensis* (Brisson, 1986), *L. vannamei* (Yano *et al.*, 1988), *L. schmitti* (Bueno, 1990), *L. setiferus* y *L. vannamei* (Missamore y Browdy, 1996).

Yano *et al.* (1988) plantea que el cortejo sexual en *L. vannamei* lo conforman varios pasos: acercamiento, arrastre, persecución y apareamiento ventral. Este autor sugiere la existencia de dos feromonas relacionadas con el cortejo que son liberadas por las hembras de los camarones peneidos. Una de estas feromonas es liberada por hembras que están madurando, es estable en el agua y estimula el inicio del cortejo (feromona estimuladora del cortejo), la otra es una hormona de vida corta que liberan las hembras maduras listas para el desove (feromona estimuladora de la cópula), que estimula el apareamiento y sólo es percibida por el macho en estrecho contacto físico.

En relación con el estado de desarrollo sexual que presentan las hembras con espermatóforo adherido, Cárdenas (1952) en *L. stylirostris* y Palacios *et al.* (2003) en *L. vannamei*, observaron que el apareamiento se realiza de preferencia en las hembras maduras (estadio IV) o ya muy próximas a alcanzar este estadio de madurez. De hecho, se ha sugerido que la transferencia del espermatóforo tiende a acelerar el proceso de madurez sexual, cuando el apareamiento se efectúa sobre hembras que no han culminado la maduración de sus gónadas (Cárdenas, 1952; Yano, 1993). En *L. vannamei*, aunque se han observado

persecuciones entre machos y a hembras sin desarrollo gonadal, únicamente las hembras en estadio de madurez avanzado son copuladas (Yano, 1993; Palacios et al., 2003).

5. Calidad reproductiva de machos

Al igual que para el desarrollo gonádico, la mayoría de la investigación dirigida a analizar o mejorar la calidad reproductiva ha sido enfocada a hembras, existiendo una serie de revisiones bibliográficas muy completas al respecto (Primavera, 1985; Harrison, 1990; Bray y Lawrence, 1992, Browdy, 1992; Palacios y Racotta, 2002; Racotta *et al.*, 2003). Sin embargo, este trabajo se encamina al análisis de las variables de calidad reproductiva de los machos precisamente porque el conocimiento es más limitado, aunque será necesario establecer frecuentemente analogías con lo que se conoce en hembras.

En este sentido, la determinación de la calidad espermática constituye un importante indicador de la calidad reproductiva de los machos, utilizándose como herramienta fundamental tanto en investigación como en producción comercial de postlarvas (Chamberlain *et al.*, 1983; Alfaro, 1993; Bécquer *et al.*, 1994; Betancourt *et al.*, 1994; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2004). Leung Trujillo y Lawrence (1987a) describieron una técnica con la cual ofrecen criterios para la evaluación del potencial reproductivo de los machos de *L. setiferus* que incluye: 1) análisis del peso del espermátforo (que será discutido más adelante); 2) la calidad espermática, que incluye el número total de espermatozoides por espermátforo, porcentaje de espermatozoides vivos normales y porcentaje de espermatozoides con anormalidades. Adicionalmente, se ha tomado en cuenta el tiempo de regeneración del espermátforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987b; 1991).

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos se han utilizado colorantes de vitalidad, como el tripán-azul (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987a) y la acridina-naranja (Wang *et al.*, 1995) o por otro lado, la inducción de la reacción del esperma con agua de desove (Griffin *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1995).

La extracción–regeneración del espermatóforo para asegurar la calidad espermática del lote de machos, es una práctica común en los laboratorios que cuentan con salas para la maduración y reproducción de camarones peneidos. Las técnicas de extracción manual del espermatóforo presionando suavemente la base de las ámpulas descrito por King (1948), y la electroeyaculación (Sandifer, 1984), son comúnmente utilizadas en diferentes especies de camarones. Alfaro y Lozano (1993) y Ceballos-Vázquez *et al.* (2004) observaron que la calidad espermática de *L. vannamei* aumenta gradualmente, después de al menos tres regeneraciones del espermatóforo mediante extracción manual. Sin embargo, Ramos *et al.* (1995) al trabajar con *L. schmitti* y Rosas *et al.* (1993) con *L. setiferus*, observaron que al aplicar la técnica de electroeyaculación, ocasionaban traumas que afectaban la calidad de los espermatóforos regenerados, muchos de los cuales terminaban con grados variables de necrosis al final del experimento.

La disminución de la condición fisiológica de los machos y por ende de su respuesta reproductiva asociada al tiempo de permanencia en condiciones continuas de maduración, ha sido estudiada por Leung-Trujillo y Lawrence (1987a) en *L. setiferus*, quienes obtuvieron un aumento en el porcentaje de células espermáticas anormales y disminución en el conteo espermático y en el porcentaje de espermatozoides vivos después de 7 semanas. Talbot *et al.* (1989), trabajando con machos de *L. setiferus* mantenidos en

cautiverio, detectaron que a los 35 días todos fueron infértiles, aún cuando los vasos deferentes aparentemente parecían normales. Ellos plantearon que esta especie de camarón produce células espermáticas de manera sincrónica (los testículos usualmente presentan diferentes estadios en la espermatogénesis) y encontraron que al mantenerlos en cautiverio se afectó la actividad testicular y se perdió el sincronismo. Por las razones arriba mencionadas, el hecho de remover los espermátóforos de machos cautivos, bien a través de la cópula natural o de la eyaculación manual, puede evitar la inflamación algunas veces observada en los vasos deferentes, lo cual puede provocar procesos degenerativos en el sistema reproductor interno.

En la etapa de reproducción una de las principales patologías que se presentan es el síndrome degenerativo del tracto reproductivo del macho, el cual fue descrito en *L. setiferus* por Talbot *et al.* (1989). Si bien se hallaron bacterias en el espermatozoide de los animales, ellos plantean que esta no es la causa primaria de la afección, sino el efecto sobre el estado inmunológico y/o fisiológico de las condiciones de cautiverio, principalmente el estrés, la calidad del agua y la nutrición (Talbot *et al.*, 1989). A su vez, Alfaro (1993) describe el síndrome de melanización del sistema reproductivo del macho en *L. stylirostris*, el cual es causado por la melanina producida por el sistema inmune del camarón después de afectaciones por bacterias quitinolíticas.

6. Influencia de factores ambientales, nutricionales y biológicos.

6.1. Factores ambientales

El control y la estabilidad de los factores ambientales (luz, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, porcentaje de recambio de agua, dimensiones y forma del tanque, etc.) son pasos determinantes para lograr una óptima calidad reproductiva en condiciones de cautiverio. Así se debe lograr una semejanza con las condiciones naturales, controlando todos aquellos factores que pueden ser estimuladores naturales y eliminando o reduciendo aquellos que pueden bloquear la respuesta reproductiva de los animales (Wyban y Sweeney, 1990; Bray y Lawrence, 1992; Browdy, 1992). Entre las distintas variables ambientales, se ha determinado que la temperatura es una de las más importantes en el control de la reproducción de peneidos, pues variaciones de la misma pueden acelerar o inhibir el proceso de maduración. Bray y Lawrence (1992) consideran que el rango de temperatura óptima para la reproducción de la mayoría de las especies de peneidos mantenidos en cautiverio es entre 27 y 29 °C. Por otro lado, Robertson *et al.* (1991) reportaron el mismo rango de temperatura óptima, para *L. stylirostris*.

Los machos *L. vannamei*, mantenidos a temperatura de 26 °C presentaron 37 % de células anormales, mientras que a 29 y 32 °C se obtuvo 100 % de células anormales. (Pérez-Velázquez *et al.*, 2001). Pascual *et al.* (1998) en una población de machos silvestre de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio y expuestos a tres temperaturas (26, 30 y 35°C), plantean que la disminución de la respuesta inmune es la razón principal de la mecanización y no la infección por bacterias y que el deterioro del tracto reproductivo y los espermátóforos

puede ser retardado manteniendo la temperatura del agua a 25-27°C. Por otro lado, Leung-Trujillo y Lawrence (1991) y Bray *et al.* (1985) sugieren que es posible retardar el proceso de deterioro de los espermátóforos y el declive de la calidad espermática manteniendo a los animales a bajas temperaturas (26°C). Ramos (1990) al trabajar con reproductoras de *L. schmitti* silvestres en sistema de tanques mixtos, obtuvo los valores máximos de nauplios por desove en el mes de Mayo y plantea que estos valores disminuyen cuando la temperatura del agua es superior a 30 °C o inferior a 26 °C. Ceballos-Vázquez *et al.* (2004) aunque no utilizaron como objeto de estudio la temperatura al trabajar con machos de *L. vannamei*, plantean que una de las causas que puede haber incrementado el porcentaje de espermatozoides muertos en los primeros machos muestreados, fue la alta temperatura del agua en los estanques (28 °C). Browdy *et al.* (1996) sugieren que los machos deben ser mantenidos en tanques separados de las hembras para llevar un control de la temperatura del agua donde no se afecte el desempeño reproductivo.

6.2. Factores nutricionales

La reproducción en los crustáceos conlleva movilización, biosíntesis y acumulación de nutrientes, en particular en hembras hacia la gónada. La nutrición es un factor muy importante que promueve la maduración sexual e influye en la fecundidad y la viabilidad de las larvas. Las dietas usadas para la reproducción de peneidos deben ser suministradas de forma fresca o congelada, ricas fundamentalmente en proteínas y ácidos grasos polinsaturados. La dieta fresca puede ser combinada con alimentos secos formulados, preferentemente con un alto contenido de proteína (40 %). En un peletizado de alta calidad se pueden brindar al

animal suplementos de vitaminas y minerales, así como otros micronutrientes esenciales que contribuyan a incrementar la producción (Bray *et al.*, 1990; Harrison, 1990; Browdy, 1992; Wouters *et al.*, 2001).

Harrison (1990) enfatiza la importancia de identificar los requerimientos nutricionales específicos para los reproductores de cada especie, pues un alimento mal formulado o una dieta incompleta pueden provocar trastornos en el desempeño reproductivo de los animales. El establecimiento de los requerimientos nutricionales se puede realizar evaluando dietas con distintos contenidos de un nutriente particular o bien, de manera indirecta, a partir del análisis de la composición bioquímica de distintos órganos implicados en la transferencia y acumulación de nutrientes asociados al proceso reproductivo. Es importante garantizar la calidad reproductiva por medio de dietas tanto de hembras como de machos, dado que hay evidencias de diferencias en los requerimientos nutricionales entre sexos (Racotta *et al.*, 2003; Pérez-Velázquez *et al.*, 2003). Sin embargo, se le ha dado más atención a los requerimientos de hembras que de los machos. De los pocos trabajos que han evaluado los requerimientos nutricionales de manera directa, se consideran algunos de los más importantes a continuación.

Pérez-Velázquez *et al.* (2003) obtuvieron valores mayores de conteo de células espermáticas (13.7×10^6) al utilizar combinación de alimento seco (75%) con alimento fresco (25 %) para *L. vannamei* y por el contrario, indican que el alimento fresco (60 % de calamar y 40 % de poliquetos) como único alimento para reproductores, provocó pérdida de peso en los machos y disminuyó el conteo total de espermatozoides. Sin embargo, Wang *et*

al. (1995) en *L. vannamei* no encontraron diferencias entre los tratamientos que contemplaban dietas artificiales, alimento fresco y la combinación de ambos, pero el ayuno durante 24 días, ocasionó pérdida de peso corporal y peso del espermátforo, así como un decremento en el conteo espermático. Por otro lado, Alfaro y Lozano (1993) sugieren que un incremento del esperma de *L. vannamei* al trasladarlos al laboratorio puede deberse a la dieta utilizada, que consistió en alimento seco Nicovita Plus[®] (3 % de la biomasa total) y un 2 % de calamar congelado.

En cuanto a la evaluación de distintos componentes bioquímicos en órganos, Harrison (1990) plantea que los aminoácidos se requieren para la elaboración de las proteínas del vitelo, las enzimas, las hormonas, los gametos y la restauración y formación del tejido en general. Castille y Lawrence (1989) reportaron que las proteínas resultaron ser el componente más abundante en testículos y en la combinación vasos deferentes-ámpulas terminales, siendo mayor las concentraciones en machos maduros que en inmaduros de *Farfantepenaeus aztecus* y *L. setiferus*. Los lípidos son reconocidos como fuente de energía y los ácidos grasos de las familias w6 y w3 se consideran esenciales en la maduración gonádica y se ha sugerido que el balance entre ellos juega un papel importante en las funciones hormonales (Harrison, 1990 y Wouters *et al.*, 2001). Los camarones no sintetizan el colesterol *de novo*, por lo que es conveniente agregarlo a la dieta, ya que es precursor de hormonas que están implicadas en el desarrollo de huevos y larvas. Castille y Lawrence (1989) determinaron que los lípidos totales no diferían entre los diferentes grados de madurez de *P. aztecus* en vasos deferentes, ámpulas terminales, así como tampoco en hepatopáncreas. Por otro lado, Kulkarni y Nagabhushanam (1979) reportaron una

disminución significativa de glucógeno y grasas en el hepatopáncreas durante la maduración del ovario y la espermatogénesis de *Parapenaeopsis hardwickii* y un incremento simultáneo de éstos en el ovario y los testículos. Los carbohidratos contribuyen a la acumulación de reservas de glucógeno en el hepatopáncreas, que sirven para los procesos de biosíntesis durante la maduración, además son una fuente de componentes de las lipoproteínas que sirven para el transporte de nutrientes del hepatopáncreas a la gónada a través de la hemolinfa y también están involucrados en la síntesis de los ácidos nucleicos y la quitina. Pillary y Nair (1973) reportan que durante la maduración en machos de tres especies, cantidades considerables de ácidos nucleicos son sintetizados para la producción de espermatozoides. Sasikala y Subramoniam (1987) reportaron la caracterización bioquímica de varios mucopolisacáridos y su función en la transferencia del espermátforo, como adhesivo para el almacenamiento en el tético de la hembra durante la cópula de *Fenneropenaeus indicus* y *Metapenaeus monoceros*. La función de los carotenoides en crustáceos ha sido normalmente atribuida a la pigmentación, como precursores de la vitamina A (Meyers y Latscha, 1997) y como antioxidante (Miki *et al.*, 1994). También ha sido propuesto que los carotenoides estimulan el sistema inmune de los animales, incrementan la tolerancia al estrés creado por condiciones ambientales adversas, mejoran el desarrollo embrionario, el crecimiento y la maduración gonadal (Menasveta *et al.*, 1994; Menasveta *et al.*, 1995). En machos de *L. vannamei* se ha evaluado el efecto de la vitamina C en términos de la tasa de apareamiento y la calidad espermática (Leung-Trujillo y Lawrence, 1988). A su vez, Pérez-Jar *et al.* (1996) al ensayar con *L. schmitti* una dieta que contenía suplementos de vitamina C y E (0.5g/100g y 0.01/100g porcentaje en peso seco respectivamente), reportan igualmente un aumento en la actividad de apareamiento. Garza-

Aguirre y Aguirre-Hinojoso (1999), comentan sobre la importancia de la vitamina E en dietas de camarones y plantean que esta vitamina puede servir como antioxidante natural y que su deficiencia se ha asociado con deformidades del esperma.

6.3. Factores biológicos

La densidad y la relación de sexo a la que se deben mantener los animales en los tanques de maduración son prerequisites para lograr con éxito la reproducción en cautiverio, aunque a su vez dependen del tamaño de los tanques, de la calidad del agua de mar, la proporción de la circulación y profundidad del agua en dichos tanques (Bray y Lawrence 1992). Estos autores recomiendan que la biomasa por metro cuadrado no debe sobrepasar los 300 g para de esta forma asegurar un mejor manejo de los tanques, parámetros físico - químicos, evitar el estrés de los animales y garantizar el espacio necesario para el cortejo y la transferencia del espermátforo. Las densidades comúnmente utilizadas para los reproductores en los tanques de maduración son de 3 - 7 individuos por m². Aquacop (1977) observó que para *P. monodon*, los mejores resultados reproductivos los obtuvo al utilizar 1 individuo/m². Las especies más pequeñas pueden mantenerse a más altas densidades. En especies de tético abierto recomiendan relaciones de sexo de 1:1 (hembra: macho), cuando es utilizado el sistema de tanques mixto. No obstante, es factible el uso de relaciones de sexo donde el número de machos es mayor que el de las hembras para asegurar la transferencia del espermátforo (Ottogalli *et al.*, 1988; Wyban y Sweeney, 1990 y Pérez-Jar y Ramos, 1992). Otro sistema utilizado es el de los tanques unisexo para especies de tético abierto, donde las hembras maduras son transferidas a tanques de machos para la cópula (Aquacop, 1983).

Este sistema ofrece oportunidades para el desarrollo de sistemas experimentales, disminuye los costos de producción y ofrece la oportunidad de darles una dieta y un control de la temperatura del agua diferente a los machos (Browdy *et al.*, 1996).

La edad y la talla son parámetros que también definen el potencial reproductivo de los progenitores, y varían en relación a la especie (Browdy, 1992). Tanto en la naturaleza como en estanques, los machos con mejor potencial para la madurez sexual y la reproducción en *L. vannamei* son los que tienen tallas de alrededor de 40 g y ligeramente mayor en *L. stylirostris* (Bray y Lawrence, 1992). En *P. monodon*, que es de las especies más grandes de este género, los machos mayores de 50 g son recomendables para la reproducción (Primavera, 1983). Leung - Trujillo y Lawrence, (1987a) y Wang *et al.* (1995) han observado en machos jóvenes de *L. vannamei* menores de 24 g altos índices de espermatozoides con anomalías. Pratoomchat *et al.* (1993) en *P. monodon* menores de 50 g también hicieron esta observación.

Ceballos-Vázquez *et al.* (2003), al evaluar reproductores de *L. vannamei* de la misma edad pero de diferente peso corporal (unos cultivados en estanques de tierra y otros en estanques de marea), observaron diferencias en la cantidad y calidad de células espermáticas, obteniéndose los valores más altos en aquellos de mayor peso que fueron criados en estanques de marea, donde la densidad de siembra fue menor y existía la presencia de alimento natural, por lo que, los autores concluyen que el número de células espermáticas también dependió de las condiciones de cultivo y fue independiente del peso de los animales.

En relación a las condiciones previas a la maduración, Alfaro (1993) sugiere que los machos adultos de *L. stylirostris* criados en cautiverio, requieren tener mayores tallas que las alcanzadas por los silvestres en su primera maduración, para estar aptos desde el punto de vista reproductivo. Este autor, al evaluar el potencial reproductivo de machos de *L. stylirostris* provenientes de estanques, observó que la calidad de los espermátóforos fue significativamente superior en camarones de 30–40 g comparados a los de 20-30 g de peso, teniendo en cuenta el número total de espermatozoides vivos normales.

Por otro lado, se ha propuesto que la talla por sí misma no es un buen indicador de la reproducción, sino que está estrechamente relacionada con la edad, llegando los machos a alcanzar su madurez sexual entre los 8 y 10 meses (Bray y Lawrence, 1992). Betancourt *et al.* (1994), al evaluar la calidad espermática de machos de 5, 7 y 9 meses de edad de *L. schmitti* obtenidos en ciclo cerrado, observaron que el número total de espermatozoides se elevó desde los 5 hasta los 7 meses, no encontrando diferencias entre 7 y 9 meses de edad y que el mayor número de espermatozoides vivos anormales se observó en machos de 5 meses. De manera similar, Pratoomchat *et al.* (1993) obtuvieron machos de *P. monodon* con peso y calidad de esperma adecuados para la reproducción con edades de 6 y 7 meses en cultivo semi-intensivo. Sin embargo, Ceballos-Vázquez *et al.* (2003) en *L. vannamei* reportan que los machos de 10 a 12 meses de edad tienen una calidad espermática significativamente mayor que ejemplares de 6 y 8 meses de edad.

Alfaro (1993) plantea que la alta frecuencia de espermatozoides con defectos encontrados en animales jóvenes parece indicar que los vasos deferentes, lugar en el cual finaliza la

maduración de los espermatozoides al completar la formación de la "púa", no maduran al mismo tiempo que los testículos, que es donde comienzan a producirse los espermatozoides inmaduros.

7. Indicadores inmunológicos para la determinación de la calidad de reproductores

La condición fisiológica de los camarones, así como de otros organismos, se ve influenciada por la variación de parámetros ambientales, produciendo cambios en los indicadores hematológicos y tisulares, lo cual a su vez repercute en la susceptibilidad de los camarones a las infecciones. Por lo anterior, estos indicadores pueden ser usados para evaluar las condiciones de salud general de los organismos en cultivo en un momento dado. Diversos autores se han dedicado a la búsqueda de indicadores que sirvan de herramientas para conocer el estado fisiológico, nutricional e inmunológico de los mismos. Así tenemos que el estado fisiológico de las hembras de *L. vannamei* en cautiverio puede ser evaluado por la composición bioquímica en músculo de adultos, huevos, nauplios y larvas (Palacios *et al.*, 1998; Palacios *et al.*, 1999b; Palacios *et al.*, 2000). Algunos metabolitos sanguíneos también han sido utilizados como indicadores del estado general de juveniles (Rosas *et al.*, 2004) y reproductores (Racotta y Palacios, 1998). La activación de mecanismos de defensa inmunitaria y los cambios en los índices hematológicos que producen inmunodeficiencias e incrementan la susceptibilidad a diferentes enfermedades han sido evaluadas por diferentes autores (Ding *et al.*, 1997; Cedeño *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2001a; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2001b; Sánchez *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003b).

El manejo del estado de salud en el cultivo de camarones peneidos y la prevención de la diseminación de enfermedades a escala mundial, depende en gran medida del conocimiento que se logre alcanzar sobre la fisiología de esta especie, y en especial de sus sistemas de defensa contra la invasión de agentes extraños. Para ello, ha sido necesario crear métodos de ensayo que permitan evaluar la respuesta inmune de estos animales ante situaciones de estrés o frente a agentes patógenos que afecten su salud (Rodríguez, 1996). El conocimiento de la inmunología del camarón, es un elemento clave para establecer estrategias para el control de las enfermedades en su cultivo (Bachere, 2000).

Los camarones tienen mecanismos eficientes para defenderse contra patógenos potenciales presentes en su hábitat. Aunque la dureza de la cutícula constituye una barrera estructural y química para los parásitos, es necesaria una defensa inmune interna eficiente, para eliminar microorganismos oportunistas y patógenos que pueden entrar en la cavidad del cuerpo a través de heridas o durante la muda (Vargas Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

La respuesta inmunológica en este grupo no es adaptativa, es decir no hay verdadera inmunidad específica (no hay verdaderos anticuerpos y hay menos heterogeneidad de efectores celulares en comparación con los vertebrados), aunque en algunos casos parece haber alguna inducibilidad (Newman y Bullis, 2001). En camarones, la respuesta inmune involucra tanto a efectores celulares como humorales. Los efectores celulares de estos animales son las células sanguíneas denominadas hemocitos. Los efectores humorales, por su parte, incluyen a proteínas que pueden ser de reconocimiento, proteínas de coagulación o

proteínas que participan en el sistema profenoloxidasa (sistema proFO) (Rodríguez, 1996; Soderhall y Thorquist, 1997). La proFo se encuentra en el interior de los hemocitos en forma de proenzima inactiva conocida como profenoloxidasa y es necesaria para el proceso de melanización que ocurre en respuesta a materiales extraños que invaden el hemocele (Noga, 2000).

Entre las técnicas más utilizadas se para evaluar los efectores inmunes (celulares y humorales) en camarones de diferentes especies se encuentra el conteo total y diferencial de hemocitos, cuantificación de proteínas (Rodríguez, 1996; Soderhall y Thorquist, 1997); actividad hemoaglutinante del plasma (Perazzolo *et al.*, 2002; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2001a y b); actividad antibacteriana del plasma y la producción de anión superóxido (Muñoz *et al.*, 2000). Varios factores externos pueden modificar la respuesta inmune, entre estos se han estudiado la temperatura (Rodríguez-Ramos, *et al.*, 2001b) y las dietas (Cedeño *et al.*, 2000). En *L. schmitti*, los trabajos han estado dirigidos a la caracterización de los efectores inmunológicos y al estudio de sus variaciones frente a condiciones de estrés. Para el caso específico de los reproductores de esta especie se ha demostrado experimentalmente la influencia negativa que ejercen las altas temperaturas en algunos biomarcadores de la respuesta inmune, como la actividad hemoaglutinante y su relación con la calidad espermática de los machos (Espinosa *et al.*, 2002). Estos autores concluyen que la actividad hemoaglutinante y la calidad espermática están relacionadas y en los animales con mayores títulos de hemoaglutinación (16-256), hay mayor adaptación a las condiciones del cautiverio. Rodríguez-Ramos (2003), reporta como valores normales para adultos de camarón recién capturados de los estanques, valores de actividad de

fenoloxidasa de 0.003 unidades de absorbancia y 23 millones de células de hemocitos totales.

Las variables bioquímicas y moleculares son utilizadas para evaluar situaciones de estrés, debido a que estas dan lugar a una cascada de respuestas fisiológicas y moleculares (Sánchez *et al.*, 2001). Se ha reportado que la concentración de proteínas totales en la hemolinfa representan un indicador de la calidad de la dieta (Cedeño *et al.*, 2000). Los niveles de glucosa en la hemolinfa también pueden ser usados para indicar el estado nutricional de los camarones, dada su relación con los niveles de carbohidratos en la dieta (Rosas *et al.*, 2002). Hall y van Ham (1998) y Racotta y Palacios (1998) sugirieron además que los niveles de glucosa y lactato en hemolinfa pueden ser considerados como indicadores biológicos del estrés para camarones. Un incremento fuerte y rápido de las concentraciones de glucosa en la hemolinfa (hiperglicemia), es una respuesta al estrés en los animales, dichas concentraciones pueden retornar a la normalidad entre 20-30 mg/dl (Racotta y Palacios, 1998) en animales sanos, una vez que desaparezca el efector estresante. Ramos y Cano (1981) en *L. schmitti* después de provocar un estrés por emersión, lograron una recuperación de los animales a las 7 horas. Bajo una situación de estrés continuo, las concentraciones de lactato pueden aumentar en el músculo cuando la capacidad de oxidación del mismo es menor y la ruta que predomina es la del metabolismo anaeróbico. Para evitar daños asociados con la acumulación de cristales de lactato en el músculo, éste se almacena en la hemolinfa (Paterson, 1993), de ahí que este metabolito, sea otro indicador biológico, utilizado para evaluar la respuesta de los camarones antes situaciones de estrés.

JUSTIFICACIÓN

La sustitución de reproductores silvestres por los cultivados en ciclo cerrado, es una alternativa que comenzó a aplicarse en Cuba a partir del año 1987, con ello los camaricultores garantizan una fuente estable y de calidad que les asegure cumplir con los planes de producción de postlarvas y con el compromiso de proteger el medio ambiente, evitando la explotación de las poblaciones naturales. Se han estudiado diferentes métodos que promueven la calidad de las hembras de camarón mantenidas en cautiverio, asumiendo que son las principales responsables de la productividad de los laboratorios. Lo anterior contrasta con los pocos estudios que se han desarrollado para conocer las causas que provocan una baja calidad en lotes de machos durante un ciclo de producción en laboratorios comerciales, que dificultan el éxito de la actividad. Por ello, con este trabajo de tesis nos proponemos realizar estudios que ayuden a evaluar algunos aspectos fisiológicos y de calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, mantenidos a lo largo de un ciclo productivo en condiciones de cautiverio, con el propósito de analizar posibles causas que repercutan en su desempeño reproductivo.

HIPÓTESIS

Las condiciones de cautiverio empleadas para la reproducción de *Litopenaeus schmitti*, provocan una menor condición fisiológica en machos, lo cual a su vez repercute en el número de cópulas exitosas, la calidad espermática y la viabilidad de los desoves.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la condición fisiológica y la calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, bajo la influencia de ciclos de producción en cautiverio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el desempeño reproductivo de *Litopenaeus schmitti* en sistemas de tanques mixtos y unisexo en condiciones de laboratorios de producción comercial.
2. Comparar los indicadores reproductivos y la calidad espermática en machos de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti* a lo largo del ciclo de producción bajo condiciones de cautiverio.
3. Comparar la capacidad de respuesta inmune en machos de cultivo y silvestres del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, a lo largo del ciclo de producción bajo condiciones de cautiverio.
4. Comparar la composición bioquímica de espermátóforos y de hepatopáncreas en machos de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti*, a lo largo del ciclo de producción bajo condiciones de cautiverio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de tesis está compuesto por dos experimentos: (1) un experimento independiente y (2) un experimento con tres capítulos sucesivos. En primer término serán descritos los aspectos generales de los diseños experimentales, en segundo término se describen las particularidades del diseño y las técnicas que se emplearon en cada uno de ellos.

1. ASPECTOS GENERALES DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

Los experimentos fueron desarrollados en el Laboratorio de Producción de Postlarvas de Camarón “YAGUACAM”, Provincia Cienfuegos, Cuba, donde fueron obtenidos los indicadores del desempeño reproductivo y las muestras para evaluar la calidad espermática y la condición fisiológica de machos de camarón. La calidad espermática se evaluó en las propias instalaciones del Laboratorio de Producción. Las muestras para el análisis del estado inmunológico y metabólico de los reproductores fueron evaluadas en el Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Cuba, y los análisis bioquímicos en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. La especie objeto de estudio es el camarón blanco *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997; Decápoda, Penaeidae). El primer experimento fue desarrollado en el mes de febrero del 2002 y tuvo una duración de 28 días. Los experimentos sucesivos se desarrollaron desde Febrero hasta Abril de 2003, durante todo un ciclo de producción comercial de 70 días.

Los ejemplares silvestres que se utilizaron en el estudio fueron capturados en el Golfo de Guacanayabo, Provincia Granma, zona sur oriental de Cuba, mediante arrastres de 20 minutos con barcos camaroneros, a una velocidad de 2 nudos. El traslado al Laboratorio "YAGUACAM", se realizó en la noche por carretera, en bolsas de polietileno de 20 litros de capacidad (5 animales/bolsa), las cuales fueron llenadas con 2/3 de oxígeno y 1/3 de agua de mar de la zona de captura.

Los ejemplares de cultivo (generación F1) fueron criados en los estanques del Banco de Reproductores del Laboratorio "YAGUACAM", ubicado al sur y centro del archipiélago cubano (Figura 6).



Figura 6. Ubicación geográfica de las zonas donde fueron capturados los reproductores utilizados en el trabajo de investigación.

1.1. Cría y obtención de progenitores de cultivo.

Las postlarvas destinadas para iniciar cada ciclo de cultivo, se obtuvieron del propio Laboratorio "YAGUACAM" a partir de reproductores silvestres del Golfo de Guacanayabo, Provincia Granma. El sistema de cultivo empleado es semi-extensivo en dos etapas denominadas: precría-engorde y engorde-progenitores. Los estanques de tierra son

rectangulares de 0.38 ha con un metro de profundidad promedio y tres compuertas de entrada - salida. Las densidades de siembra varían en cada etapa del cultivo, utilizándose 10 PL₂₅/m², para la primera etapa donde permanecerán tres meses. Al alcanzar un peso promedio de 12 g se realiza la cosecha y se siembran los animales seleccionados (tallas mayores y estado de salud adecuado) en los estanques para la segunda etapa, en la cual se utilizará una densidad de 0.5 adultos/m² durante 3.5 meses.

Los controles de rutina que se tienen en cuenta son los parámetros abióticos; temperatura (°C) y oxígeno disuelto del agua (mg/L), medidos dos veces al día con un oxímetro (YSI[®], Modelo 58) con 0.1 °C y 0.1 mg/L de precisión. El pH se midió una vez al día con un pH metro (Toa HM-18ET) de ± 0.01 unidades de precisión. La salinidad (ups) y transparencia fueron medidas una vez al día utilizando un refractómetro (Atago[®], Modelo 2401) con rango de hasta 100 ups y un Disco Secchi, respectivamente. El intercambio de agua es entre 2 y 10 % diario, según lo requiera el cultivo.

Se realizaron muestreos quincenalmente para determinar el peso promedio, el estado de salud de los animales, la supervivencia y el ajuste del alimento. A partir de la etapa de engorda se utilizó la atarraya como arte de pesca. El tamaño de muestra considerado para las biometrías quincenales fue de 50 animales.

En la etapa de precría-engorda se ofrece un alimento peletizado de forma granulada con diámetros entre 0.1 y 1.5 mm a razón del 20 % del peso húmedo de la biomasa total. A

partir de la segunda semana, se comienza a distribuir un 10 % del peso húmedo de la biomasa total hasta terminar con un 5 % de un granulado de 2.3 mm. En la etapa de engorda-progenitores, se emplearon granulados entre 2.3 y 3.0 mm de diámetro a un 5 % de la biomasa total (Tabla 1). Se incluyó además, una dieta compuesta de calamar (*Loligo gahi*) congelado y picado en pequeñas porciones a razón de un 10 % del peso húmedo de la biomasa total una vez a la semana y una dieta peletizada para maduración, suministrado 2 ó 3 días a la semana a razón de un 5 % de la biomasa total. El alimento en cada etapa fue suministrado al boleo desde un bote.

Tabla 1. Composición proximal de las dietas peletizadas (Zeigler Brothers Inc.) añadidas en las dos etapas de la cría en estanques, para la obtención de reproductores de cultivo de *Litopenaeus schmitti*. (Información tomada de la etiqueta)

NUTRIENTES	PRECRÍA-ENGORDA (1)	ENGORDA-PROGENITORES (2)
	(%)	(%)
Proteínas	35	28
Lípidos	10	8
Carbohidratos	<25	<25
Cenizas	10	10
Humedad	12	12

(1) Desde PL₂₅ hasta 3 meses de edad (2) Desde los 4 meses hasta los 7 meses de edad

La cosecha de los camarones se realizó a los 7 meses de edad bajando el nivel de agua del estanque y capturándolos con una atarraya en la esclusa de salida. Los animales fueron distribuidos por sexo en cestos plásticos, inmersos en tanques rectangulares de fibra de vidrio de 600 litros de capacidad, con aireación constante, que contenía agua del mismo

estanque cosechado, mezclada con agua del reservorio a donde fueron trasladados. Para la selección de los animales se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Estado sanitario (no presencia de algas epífitas, parásitos, hongos y necrosis. Buen estado de las branquias, apéndices, antenas y estructura reproductora. Consistencia del exoesqueleto dura)
- Peso (> de 40 g para las hembras y > de 25 g para los machos). Las mediciones se realizaron en el laboratorio de maduración con una balanza digital monoplano (Sartorius) de 0,01 g de precisión

El traslado de los reproductores se realizó en horario nocturno usando un vehículo tanto para la siembra entre las distintas etapas como para el envío de los reproductores a la nave de maduración del laboratorio de producción de postlarvas. Los animales fueron mantenidos en cestos a razón de 1 camarón/litro, los cuales permanecían dentro de tanques rectangulares con agua del propio estanque.

1.2. Manejo del local de maduración y reproducción

El local destinado para la maduración y reproducción de los animales es cerrado con iluminación artificial, manteniéndose un fotoperiodo de 14:10 horas (luz/oscuridad). Se utilizaron tanques ovalados de fibra de vidrio con 10 m³ de capacidad (superficie de 16m²). El nivel del agua se mantuvo a 5 m³ a través de sistemas de reboso, con un intercambio diario de 200 % y la aireación era suministrada mediante piedras difusoras. Diariamente

eran registradas las variables físico - químicas del agua: temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L), pH y salinidad (ups).

El alimento suministrado de forma alterna, estaba compuesto por calamar (*Loligo sp.*) congelado (3 raciones diarias a razón del 20 % del peso húmedo de la biomasa total) y una dieta artificial para la maduración (Tabla 2), a razón del 2 % del peso húmedo de la biomasa total en 2 raciones diarias.

Tabla 2. Contenido de ingredientes y nutrientes de la dieta peletizada (Zeigler Brothers Inc.) utilizada en la última etapa del ciclo de cría en estanques y en la sala de maduración para alimentar los reproductores de *Litopenaeus schmitti*. (Información tomada de la etiqueta)

DIETA SECA PARA MADURACION
<p>INGREDIENTES: Harina de Trigo, Harina de Carne Calamar, Cereal, Harina de Carne de Cangrejo, Harina de Carne de Pescado, Harina decorticada de Soya, Harina de Sangre, Levadura Seca, Aceite de Calamar, Aglutinante para dietas secas, Inmunoestimulante (1,3 β-Glucano), Lecitina de Soya, Fosfato de Sodio, Colesterol, Propionato de Calcio (preservativo), Cloruro de Colina, Proteinato de Manganeso, Proteinato de Zinc, Proteinato de Cobre, Calcio Iodado, Proteinato de Hierro, Proteinato de Cobalto, Carbonato de Calcio, Selenita de Sodio, Microbials Direct-Fed, Acetato de Vitamina A, Esterol Animal D-activado (fuente de Vitamina D), dl-alfa Acetato de Tocoferol (Suplemento de Vitamina E), Suplemento de Vitamina B₁₂, Suplemento de Riboflavina, Niacina, Pantotenato de Calcio, Complejo de Menadione Bisulfato de Sodio (fuente de Vitamina K), Ácido Fólico, Mononitrato de Tiamina, Hidróxido de Pyridoxina, Biotina, L-Ascorbyl-2-Polyfosfato (fuente de Vitamina C), Cantaxantina, Inositol.</p>
<p>Análisis garantizado: Proteína Cruda 40% Min., Grasa Cruda 9% Min., Fibra Cruda 4% Max.</p>

2. PARTICULARIDADES DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS APLICADAS

1. Primer experimento: Comparación del desempeño reproductivo de progenitores cultivados de *Litopenaeus schmitti* en sistemas de tanques unisexo y mixtos

Este experimento se planteó con el propósito de definir dos aspectos: (1) si el empleo de alguno de los sistemas de tanques influye en el decremento del porcentaje de cópulas exitosas de los reproductores (2) seleccionar el sistema de tanques que será utilizado en el siguiente experimento.

Se capturaron reproductores de 7 meses de edad en los estanques del laboratorio “YAGUACAM” (648 hembras con peso promedio de 43 g y 564 machos con peso promedio de 26 g). Los reproductores fueron distribuidos en diferentes tanques según el tratamiento que correspondiera. Para el tratamiento de sistema de tanques mixtos o convencionales los reproductores de ambos sexos fueron transferidos a 6 tanques, con una relación de sexo de 1:1 (54 hembras y 54 machos) y una densidad de 7 individuos/m² según lo recomendado por Pérez-Jar y Ramos (1992). Para el tratamiento de sistema de tanques unisexo, los reproductores fueron separados por sexos según el método recomendado por Browdy *et al.* (1996), las hembras fueron distribuidas en 4 tanques a razón de 81 por tanque (densidad de 5 hembras/ m²), y los machos en 2 tanques (llamados de cópula) a razón de 120 por tanque (7 machos/ m²).

Se empleó el criterio de Ramos y Primavera (1986) para la búsqueda diaria de hembras en estadio de maduración IV, basándose en la identificación macroscópica de las gónadas maduras de *L. schmitti*. En los tanques unisexo se realizaba la revisión de las hembras maduras a las 11:00 horas, las cuales eran distribuidas equitativamente en cada tanque de cópula. La captura de hembras copuladas en ambos sistemas de tanques se realizó una hora después de comenzado el periodo de oscuridad (19:00 horas). Para el reconocimiento de las hembras con espermátforo adherido, se tuvieron en cuenta las condiciones de adhesión (espermátforo completo y masa espermática sola), las hembras que no presentaron espermátforo fueron devueltas a sus tanques. El desove de las hembras y la eclosión de los huevos se realizó en tanques individuales cilindro-cónicos negros de 200 y 100 litros de capacidad respectivamente, que contenían agua de mar filtrada, EDTA.Na₂ (sal disódica del ácido etilendiamino tetracético) a razón de 10 ppm y 1 ppm de eritromicina.

1.1. Variables medidas para evaluar la respuesta reproductiva de los animales

Se registró el número total de hembras maduras, copuladas y desovadas por tratamiento cada semana. El porcentaje de hembras que maduraron del total por cada tratamiento (% hembras maduras del total = $\frac{\text{Total de hembras maduras (IV)}}{\text{Total de hembras del tratamiento}} \times 100$). El porcentaje de hembras que copularon del total por cada tratamiento (% hembras copuladas del total = $\frac{\text{Total de hembras copuladas}}{\text{Total de hembras del tratamiento}} \times 100$). Se llevó el registro diario del porcentaje de cópulas exitosas del total de hembras maduras por tratamiento (% de cópulas exitosas = $\frac{\text{Total de hembras con}}{\text{Total de hembras maduras}} \times 100$).

espermátforo o masa espermática / Total de hembras maduras identificadas en cada tratamiento x 100).

Los conteos de huevos y nauplios por tratamiento se realizaron en tanquetas de 80 litros mediante el método volumétrico con 10 submuestras de 1 mL tomadas del volumen total. A su vez, se calculó diariamente el promedio de huevos y nauplios por desove (huevos o nauplios/desove = Total de huevos o nauplios / Total de hembras con desoves aptos). El porcentaje de eclosión de los huevos por tratamiento se determinó mediante la fórmula: (% eclosión = Total de nauplios / Total de huevos x 100). El porcentaje de supervivencia por sexo, mediante la fórmula: % supervivencia = Total (hembras o machos) – Total (hembras o machos) muertos / Total de (hembras o machos) x 100.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el módulo de Modelo Lineal General (GLM) en el Programa estadístico STATISTICA versión 7.0, software (StatSoft, Inc.2001, Tulsa, OK, USA). Se realizó un ANOVA de dos vías de clasificación (sistemas de tanques por tiempo de permanencia de los animales en la nave de maduración), para el porcentaje de hembras maduras (IV), porcentaje de cópulas exitosas, promedio de huevos por desove, promedio de nauplios por desove y porcentaje de eclosión. Para aquellas variables que presentaron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey's posthoc para la comparación de medias. Para los valores reportados en porcentaje se utilizó la transformación arcoseno (\sqrt{p}), antes de aplicar el análisis estadístico, aunque se reportan los valores no transformados.

Se utilizó la prueba “t” para analizar diferencias significativas entre la temperatura de ambos tratamientos y para la supervivencia final de ambos sexos. Los datos se reportan como la media \pm error estándar. Los valores probabilísticos (P) inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

2. Segundo experimento: Determinación de la respuesta reproductiva, calidad espermática y condición fisiológica en machos de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti*

En los resultados obtenidos en el primer experimento, se observó que no difiere el porcentaje de cópulas exitosas entre ambos tratamientos, lo cual descarta la posibilidad de la influencia del sistema de tanques sobre este indicador productivo. Sin embargo, por la factibilidad del manejo de los tanques unisexo relacionado con la rapidez con que pueden ser localizadas las hembras maduras y copuladas en diferentes horarios del proceso productivo, es que en el presente experimento se seleccionó el empleo de este sistema. En este experimento, se planteó desarrollar un ensayo donde se evalúe durante un periodo experimental más prolongado el desempeño reproductivo, calidad espermática, variables metabólicas e inmunológicas de la hemolinfa y variables metabólicas de hepatopáncreas y espermatóforos de machos de diferentes orígenes tratando de determinar los factores que puedan afectar el porcentaje de cópulas exitosas.

Los reproductores de cultivo de ambos sexos criados en el laboratorio de “YAGUACAM” que arribaron a la edad de 7 meses con pesos promedios iniciales de 40 g (hembras) y 25 g

(machos), fueron cosechados y transferidos a la nave de maduración del propio laboratorio, en el mismo periodo de tiempo que la llegada de los reproductores machos silvestres con peso promedio inicial de 22 g. En su totalidad fueron utilizados 600 machos adultos de cada origen.

Las hembras fueron colocadas a razón de 85 por tanque de maduración (5 hembras/ m²), las cuales no fueron ablacionadas y los machos en tanques similares pero denominados tanques de cópula (centros de cópula), a razón de 120 animales por tanque (7 machos/m²). Se utilizaron 5 tanques para cada origen durante un ciclo de producción de 70 días.

Las variables físico-químicas del agua de los tanques, temperatura, oxígeno disuelto, pH, y salinidad fueron medidas diariamente. En particular, tuvieron lugar fluctuaciones de la temperatura, lo cual será analizado a lo largo del presente experimento por la importancia de la influencia de la temperatura sobre el desempeño reproductivo y la condición fisiológica de los machos.

La búsqueda de hembras en estadio de maduración IV, se realizó a las 11:00 horas diariamente, empleándose el criterio de Ramos y Primavera (1986) para la identificación macroscópica de las gónadas maduras de *L. schmitti*. En cada tanque de cópula eran depositadas hembras maduras manteniendo una relación de sexo de 10 machos: 1 hembra (12 hembras por tanque de cópula). La captura de hembras copuladas se realizó una hora después de comenzado el periodo de oscuridad (19:00 horas) y para su reconocimiento se tuvieron en cuenta las condiciones de impregnación (espermátforo completo y masa

espermática sola) las hembras que no presentaron espermatóforo fueron devueltas a sus tanques. El desove de las hembras y la eclosión de los huevos se realizó en tanques individuales cilindro-cónicos negros de 200 y 100 litros de capacidad respectivamente, que contenían agua de mar filtrada, EDTA.Na₂ (sal disódica del ácido etilendiamino tetracético) a razón de 10 ppm y 1 ppm de eritromicina.

Se llevó el registro diario de los indicadores productivos que definen su desempeño reproductivo. También 15 machos silvestres y 15 de cultivo en estadio de intermuda (exoesqueleto endurecido) fueron muestreados a los 3, 30, y 60 días después de su traslado al local de maduración. Seis horas después de la última alimentación, a los animales se les extrajo hemolinfa, fue registrado el peso total de cada macho, el hepatopáncreas fue disectado y pesado, los espermatóforos extraídos manualmente fueron pesados en una balanza analítica Sartorius (0.0001 g de precisión), una de las mitades fue utilizada para realizar la calidad espermática y la otra para los análisis bioquímicos. Los hepatopáncreas y una de las mitades del espermatóforo fueron congelados en nitrógeno líquido y liofilizados para su análisis posterior. Fueron calculados el índice hepatosomático (IHS) y el índice espermatosomático (ISS): $(\text{peso del tejido/peso corporal}) \times 100$.

2.1. Indicadores productivos

Porcentaje de cópulas exitosas del total de hembras maduras (n=12) colocadas en cada tanque de machos por tratamiento ($\% \text{ de cópula exitosa} = \text{Total de hembras con}$

espermátforo o masa espermática / Total de hembras maduras colocadas en tanques de machos x 100).

Para el porcentaje de fertilización de los huevos por tratamiento, se uso un microscopio a 40x (Olympus), fueron tomadas tres alícuotas de 5 mL, para determinar el número de huevos con división celular normal y desarrollo embrionario 10 horas después de ocurrido el desove ($\% \text{ fertilización} = \text{Total de huevos con embrión y formación de doble membrana} / \text{Total de huevos} \times 100$).

El conteo de nauplios por tratamiento se realizó en tanquetas de 80 litros, empleándose el método volumétrico con 10 submuestras de 1 ml tomadas del volumen total. A su vez, fue calculado diariamente el promedio de nauplios por desove ($\text{nauplios/desove} = \text{Total de nauplios} / \text{total de hembras con desoves aptos}$).

2.2. Calidad espermática

Como indicadores de calidad espermática se tomaron en cuenta el porcentaje de espermatozoides vivos normales, el porcentaje de espermatozoides vivos anormales, el conteo total de espermatozoides por espermátforo y el conteo total de espermatozoides muertos. A su vez, fue registrado al final del periodo experimental, el número de machos con presencia de espermátforos necrosados.

La calidad espermática fue determinada mediante el conteo de las células de esperma teniendo en cuenta las características morfológicas de las mismas, y por la reacción de

biotinción con azul de triptano. En el conteo espermático se utilizó una cámara de Neubauer, según la técnica descrita por Leung-Trujillo y Lawrence (1987), homogenizando el espermátforo en una solución salina libre de calcio (Composición por un litro de solución: 21.63 g NaCl, 1.12 g KCl, 0.53 g H₃BO₃, 0.19 g NaOH, 4.93 g MgSO₄•7H₂O, y pH ajustado a 7.4 con el 1N HCl). Las células espermáticas muertas fueron detectadas al teñirse con la solución de azul de triptano al 0.1% (Sigma, St. Louis, USA) preparada y mezclada con la solución salina libre de calcio y con la suspensión de esperma en una proporción de 1:10 (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987). Después de 10-15 minutos, los espermatozoides muertos fueron contados a la vez que se clasificaron las células espermáticas por su morfología. Los espermatozoides con un cuerpo esférico y una púa (o “spike” en inglés) alargada eran considerados normales mientras que los anormales eran distinguidos de los normales por tener los cuerpos malformados o por tener la púa doblada, corta, o inexistente (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987). Los cálculos de los conteos se realizaron con la siguiente fórmula: Células /mL = Σ Conteo total de espermatozoides x dilución x 10⁴

2.3. Indicadores inmunológicos

2.3.1. Obtención y procesamiento de las muestras de hemolinfa

La hemolinfa (200 μ L) fue extraída con una jeringuilla de 1 mL con una aguja de grosor 20 G del seno ventral situado en el cefalotórax. Fue utilizado como anticoagulante una solución isotónica para camarón (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10mM y EDTA 20

mM, pH 7.3), modificada de la preparación sugerida por Vargas-Albores *et al.* (1992), empleando proporciones iguales de anticoagulante y hemolinfa. Para evitar la influencia de las variaciones circadianas, las extracciones fueron realizadas a la misma hora (entre las 09:00 y 10:00 horas). Se separó un volumen de 25 μ L de hemolinfa para el conteo de hemocitos totales y el remanente fue centrifugado 10 minutos a 800 g y 4°C, para obtener el plasma para los análisis, que fueron realizados el mismo día en el laboratorio a una temperatura de 20 °C.

2.3.2. Determinación de los efectores de la respuesta inmune

Para determinar la actividad fenoloxidasa (FO), fueron colocados 10 μ l de plasma en una microplaca y se le añadieron 250 μ l de L-DOPA. La mezcla fue incubada durante 20 minutos y leída a 492 nm. La actividad fenoloxidasa específica fue calculada dividiendo el valor de absorbancia obtenido entre el tiempo de incubación, y este valor, a su vez, fue dividido entre los miligramos de proteína de la hemolinfa (Hernández-López *et al.*, 1996).

Para el conteo total de hemocitos (CTH) fueron mezclados 25 μ L con 75 μ L de una de solución Alsever (glucosa 113 mM, citrato de sodio 27.2 mM, ácido cítrico 2.8 mM, cloruro de sodio 71.9 mM, con una concentración final de formaldehído del 4%). El conteo se realizó utilizando un hematocitómetro de Neubauer y un microscopio a 40x (Olympus), utilizando la fórmula: Células /mL = (Σ Conteo total de hemocitos/ 8) x dilución x 10^4

Para la determinación de la actividad hemoaglutinante (AH), fueron utilizados eritrocitos de sangre humana tipo 0+, donadas por el Banco Provincial de sangre de Ciudad de La Habana, los que fueron sometidos a un proceso de formolización reportado por Hebert (1973) para garantizar su preservación (menos de cuatro meses), y diluida hasta un 5% en PBS 1X (NaCl 0.01M, KH_2PO_4 0.15M, Na_2HPO_4 0.15M, pH 7.4) para realizar el experimento. Para los ensayos de AH, se utilizaron placas en U multiexcavadas. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra de hemolinfa en PBS 0.01mM, incubándose a temperatura ambiente, con igual volumen (20 μ l) de la suspensión de eritrocitos humanos. Las determinaciones se realizaron dos horas después, y la AH fue expresada como el valor inverso de la última dilución en la cual fue observada una reacción positiva con respecto a los controles, en los cuales la hemolinfa fue sustituida por 20 μ l de PBS 0.01mM. Las lecturas de los títulos fueron realizadas por al menos dos técnicos de laboratorio.

2.4. Variables bioquímicas de la hemolinfa

La concentración de proteínas totales fue determinada mediante el kit comercial Biuret (Merck), después de diluir la muestra de hemolinfa para medir entre 1 y 10 mg/mL de proteína. La concentración de glucosa fue determinada utilizando un kit comercial (GOD-PAP, Randox).

2.5. Composición bioquímica del hepatopáncreas y del espermatozóide

A las muestras liofilizadas se les determinó su peso total final, y se separaron aproximadamente 40 mg de hepatopáncreas y la mitad del espermatozóide considerado para análisis bioquímico. Las muestras fueron maceradas con un homogenizador manual y uno eléctrico (Daigger Vortex Genie 2[®]) hasta hacerlas polvo, se resuspendieron en 1 mL de Solución Salina Isotónica de Camarón (SIC), cuya composición es NaCl 450 mM y KCl 10 mM por litro y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta realizarles posteriormente las diferentes determinaciones bioquímicas que son descritas a continuación:

Proteínas solubles (método de Bradford, 1976): Se tomaron 20 µl de la muestra resuspendida en SIC y se colocaron en un tubo eppendorf con 80 µl de Hidróxido de Sodio 0.1 N (dilución 1:5), dejándolo reposar durante 2 horas, posteriormente se agitó y se recuperaron en un tubo de ensayo 10 µl de esta muestra, al que se le añadió 1 ml de solución reactiva (Bradford Reagent Sigma), se agitó y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic Instruments, Genesys 2[®], a una longitud de onda de 595 nm en un lapso no mayor de 60 min. La concentración de proteínas se calculó a partir de una curva estándar de albúmina bovina diluida en Hidróxido de Sodio 0.1 N que se corrió simultáneamente con las muestras.

Carbohidratos totales (método de Antrona, Van Handel, 1965): Se tomaron 100 µl de la muestra de tejido resuspendida en solución isotónica de camarón (SIC) que fueron diluidos 1:2 con 100µl de TCA (ácido tricloracético) al 20 %. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm y 5°C durante 10 minutos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se pusieron en un tubo de ensayo añadiéndole 1 ml de solución de antrona al 0.1% en ácido sulfúrico al 76%. Los tubos fueron calentados en un Baño de María a una temperatura de 85-90°C de 10 a 15 minutos dependiendo de la sensibilidad deseada para cada tejido. Por último, los tubos fueron enfriados en un baño de hielo y se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. La concentración de carbohidratos se calculó a partir de una curva estándar de dextrosa con TCA al 20 %, que se corrió simultáneamente con las muestras.

Lípidos totales (método de la sulfofosfovainillina) (Barnes y Blackstock, 1973): Se tomaron 25µl de la muestra resuspendida en SIC que fueron diluidos 1:5 (SIC) y se colocaron en un tubo de ensayo añadiéndole 250 µl de ácido sulfúrico concentrado, se agitaron y los tubos fueron calentados utilizando un baño María a 90°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar y posteriormente se agitaron nuevamente y se colocaron 20 µl de la muestra en una microplaca añadiéndole 200 µl de solución reactiva (Reactivo Vainillina), se dejaron reposar por 40 minutos y finalmente se leyó la absorbancia de las muestras en un fotocolorímetro de microplacas (lector de placas) a una longitud de onda de 540 nm.

Triglicéridos (Kit comercial – Randox TR1697). Este método fue adaptado en técnica de microplaca para tejidos de camarón por Palacios *et al.* (2000): Se tomaron 10 μ l de la muestra resuspendida en SIC que fueron diluidos 1:5 (SIC) (misma dilución que para la determinación de lípidos) y se pusieron en una microplaca añadiéndole 200 μ l de solución reactiva del Kit comercial, posteriormente se dejó reposar durante 20 minutos y por último se leyó la absorbancia en un fotocolorímetro de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

Lactato (Kit comercial de Randox LC2389). Este método fue adaptado para espermátóforos de camarón en técnica de microplaca por Ceballos-Vázquez *et al.* (2004): Del mismo sobrenadante utilizado para carbohidratos se tomaron 20 μ l y se colocaron en una microplaca añadiéndole 200 μ l de solución reactiva (Randox LC2389), posteriormente se dejaron reposar durante 10 minutos y por último se leyó la absorbancia en un fotocolorímetro de microplacas a una longitud de onda de 540 nm.

Por cuestiones de sensibilidad de las distintas técnicas para los diferentes tejidos, los lípidos totales, y los triglicéridos, únicamente se midieron en muestras de hepatopáncreas, mientras que el lactato únicamente se determinó en espermátóforos.

2.6. Procesamiento estadístico de los datos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el módulo de Modelo Lineal General (GLM) en el programa estadístico STATISTICA (versión 7.0) software (StatSoft, Inc. 2001, Tulsa,

OK, USA). Un ANOVA de dos vías de clasificación, seguido de la prueba de Tukey's post-hoc para la comparación de medias, fue utilizado para determinar las diferencias significativas de las variables registradas durante el periodo experimental teniendo en cuenta el origen de los animales (silvestre y cultivo) y el tiempo en que fueron realizados los muestreos (para los indicadores de producción con un periodo de 70 días y 3, 30 y 60 días para la calidad espermática, indicadores inmunológicos y variables metabólicas en hemolinfa, hepatopáncreas y espermatóforos). Para el análisis de la relación entre variables morfológicas y de calidad espermática y el peso corporal de los machos, fue utilizado un análisis de correlación. Cuando la correlación fue significativa para camarones silvestres o de cultivo, se uso un análisis de ANCOVA utilizando como covariable el peso corporal. También se realizó un análisis de correlación diaria de las variables productivas (porcentaje de hembras copuladas y porcentaje de fertilización de los huevos en el día X) y la temperatura del agua registrada el mismo día (día X) o de uno a cinco días antes (X-1 hasta X-n). Un test de chi-cuadrado fue utilizado para determinar las diferencias entre la proporción de machos con espermatóforos melanizados por tanque. Se utilizó la prueba "t" pareada (por día) con el propósito de determinar si diferían entre los orígenes las variables abióticas de temperatura (°C), salinidad (ups), oxígeno disuelto (mg/L) y pH, medidas a lo largo del periodo experimental. Para las variables: porcentaje de cópulas, porcentaje de huevos fértiles, porcentaje de espermatozoides normales y porcentaje de espermatozoides anormales fue utilizada la transformación arcoseno (\sqrt{p}), antes de aplicar los análisis estadísticos, pero solo se reportan las medias para datos no transformados. Para el total de número de hemocitos, la actividad hemoaglutinante y para las variables bioquímicas

determinadas en espermatóforos, los datos fueron transformados a \log_{10} para alcanzar una distribución normal. Los datos se reportan como la media \pm error estándar. Los valores probabilísticos (P) inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Comparación del desempeño reproductivo de progenitores cultivados de *Litopenaeus schmitti* en sistemas de tanques unisexo y mixtos

No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en el porcentaje de hembras que maduraron en cada tratamiento (Figura 7-A). El porcentaje de cópulas exitosas con respecto al total de hembras maduras fue significativamente diferente ($P<0.05$), a lo largo del tiempo de permanencia de los animales en la nave de maduración, independientemente del sistema de tanques empleado, con valores mínimos ($< 60\%$) entre la primera y tercera semana, para alcanzar valores máximos ($> 90\%$) entre la tercera y cuarta semana (Figura 7-B).

Durante el periodo experimental, de un total de 324 hembras en cada tratamiento, el porcentaje que maduraron (estadio IV) se aproximó al 50 %. A su vez, del total de hembras en cada sistema de tanques, fueron copuladas el 30 % en los unisexo y el 27 % en los mixtos. No se observaron diferencias en la supervivencia para ambos sexos entre los sistemas de tanques de maduración unisexo y mixto (Tabla 3). Tampoco se presentaron entre sistemas de tanques durante el tiempo experimental al analizar el promedio de huevos por desove, el promedio de nauplios por desove y el porcentaje de eclosión (Tabla 4).

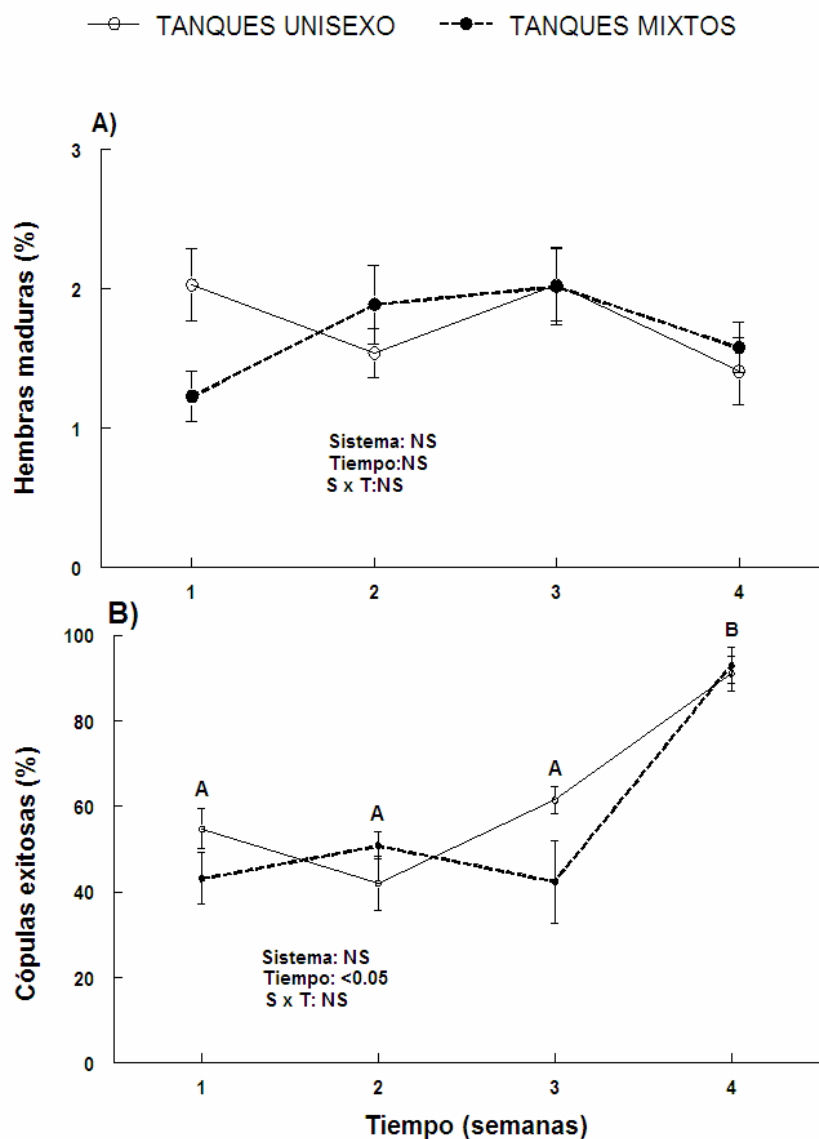


Figura 7. Variaciones del porcentaje de hembras maduras de *Litopenaeus schmitti* (A) y del porcentaje de cópulas exitosas (B), (media \pm error estándar) de diferentes sistemas de maduración (unisexo y mixto), determinado durante el periodo experimental. Los resultados del ANOVA de dos vías (tiempo en producción y sistemas de tanques de maduración) son descritos: (NS: No significativa). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias globales de cada tratamiento a lo largo del tiempo.

Tabla 3. Registro de los principales indicadores productivos en tanques unisexo y mixtos para analizar el desempeño reproductivo de reproductores de cultivo de *Litopenaeus schmitti*, durante un periodo experimental de 28 días. Los valores de supervivencia se muestran como: media \pm error estándar

INDICADORES PRODUCTIVOS	SISTEMA DE TANQUES	
	UNISEXO	MIXTO
Total de hembras	324	324
Total de machos	240	324
Total de hembras maduras (IV)	159	153
Total de hembras copuladas	97	89
Total de hembras desovadas	94	85
Hembras maduras del total (%)	49.0	47.2
Hembras copuladas del total (%)	29.9	27.4
Supervivencia de hembras (%)	90.7 \pm 0.10	91.6 \pm 0.07
Supervivencia de machos (%)	95.4 \pm 0.04	96.2 \pm 0.05

Tabla 4. Producción de huevos y nauplios y porcentaje de eclosión (media \pm error estándar) obtenidos en tanques unisexo y mixto a partir de reproductores de cultivo de *Litopenaeus schmitti*, durante un periodo experimental de 28 días.

INDICADORES PRODUCTIVOS	SISTEMAS DE TANQUES	TIEMPO (SEMANAS)			
		1	2	3	4
Huevos/desove ($\times 10^3$)	Unisexo	160 \pm 4.23	161.7 \pm 7.75	170.7 \pm 6.76	162.5 \pm 6.0
	Mixto	157 \pm 1.27	158.5 \pm 3.11	161.2 \pm 3.14	161.7 \pm 3.62
Nauplios/desove ($\times 10^3$)	Unisexo	84.5 \pm 2.32	84.0 \pm 4.47	88.5 \pm 3.51	87.5 \pm 4.61
	Mixto	80.2 \pm 3.09	82.8 \pm 1.83	84.7 \pm 2.98	83.4 \pm 2.94
Eclosión (%)	Unisexo	52.1 \pm 0.48	52.0 \pm 0.93	52.9 \pm 0.19	53.9 \pm 1.37
	Mixto	50.6 \pm 1.18	52.9 \pm 0.97	52.4 \pm 1.00	51.6 \pm 1.08

Los parámetros abióticos, salinidad ($34 \text{ ups} \pm 0.1$) y oxígeno disuelto ($5.45 \pm 0.50 \text{ mg/L}$) promediaron valores recomendados por la literatura (Bray y Lawrence, 1992). Por otro lado, no se observó diferencia significativa en la temperatura medida en ambos tratamientos, promediando un valor de $25.0 \pm 0.17 \text{ }^\circ\text{C}$ (mín. $23.0 \text{ }^\circ\text{C}$ y máx. $26.0 \text{ }^\circ\text{C}$) durante el periodo evaluado.

2. Determinación de la respuesta reproductiva, calidad espermática y condición fisiológica en machos de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti*

2.1. Variables ambientales

En la Figura 8 se presenta el comportamiento de la temperatura del agua de los tanques a lo largo del ciclo de producción. Las variables ambientales temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH, medidas diariamente, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5).

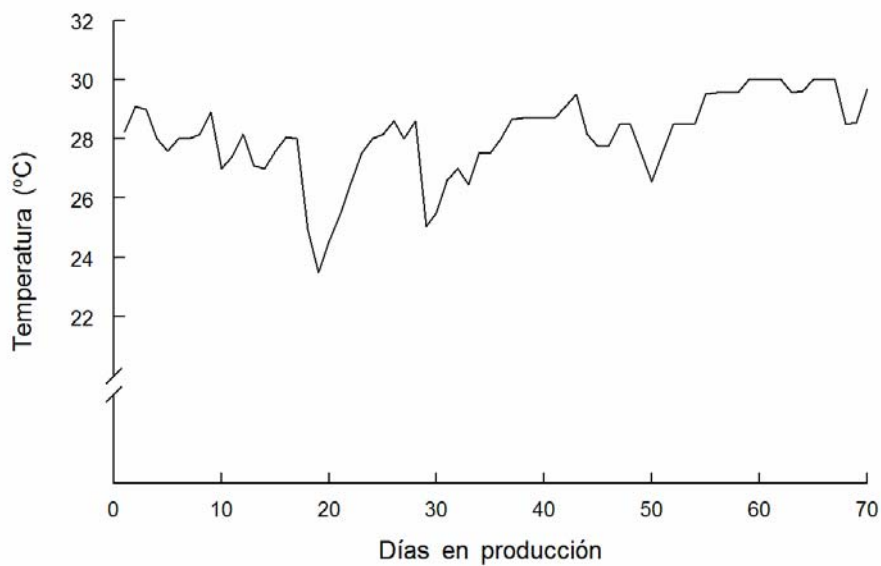


Figura 8. Registro diario de la temperatura del agua de los tanques a lo largo del ciclo de producción (promedio de tanques silvestres y de cultivo).

Tabla 5. Variables ambientales temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/l), salinidad (ups) y pH, (media \pm error estándar) obtenidos en ambos tratamientos (cultivo y silvestre de *Litopenaeus schmitti*) durante un periodo experimental de 70 días.

Variables ambientales	Silvestre	Cultivo
Temperatura (°C)	28.07 \pm 0.17	28.11 \pm 0.17
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.76 \pm 0.08	6.78 \pm 0.08
Salinidad (ups)	34.4 \pm 0.12	34.4 \pm 0.12
pH	8.15 \pm 0.03	8.11 \pm 0.03

2.2. Indicadores productivos

Al realizar un análisis del porcentaje de cópulas exitosas entre los tratamientos, no se obtuvo diferencia entre ambos lotes de reproductores machos (58 % para animales de cultivo y 55 % para animales silvestres), aunque hubo diferencias significativas en el tiempo, observándose fluctuaciones con valores máximos a los 35 días y un declive hacia el final del periodo evaluado (Figura 9A). Aunque no fue significativa la interacción entre el tiempo y el origen, el declive fue más pronunciado para machos silvestres (factor origen, $P = 0.143$). Al analizar el porcentaje de huevos fertilizados se puede apreciar que existen diferencias significativas en el tiempo, con valores más bajos en el inicio y al final del periodo experimental, con valores cercanos al 45 % de huevos fertilizados, mientras que a la mitad del experimento se llega a valores superiores al 50 % (Figura 9B). Se observó un porcentaje de fertilización menor para machos silvestres, principalmente en los 60 y 70 días ($P < 0.05$). Los promedios más bajos de nauplios por desove fueron observados en ambos orígenes al inicio y al final del ciclo de producción, mientras que a mediados del periodo se observaron valores iguales o superiores a los 110×10^3 de promedio de nauplios por desove (Figura 9C). La producción de nauplios tiende a disminuir en las hembras cruzadas con machos silvestres, lo cual nuevamente se puede apreciar en los 60 y 70 días. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

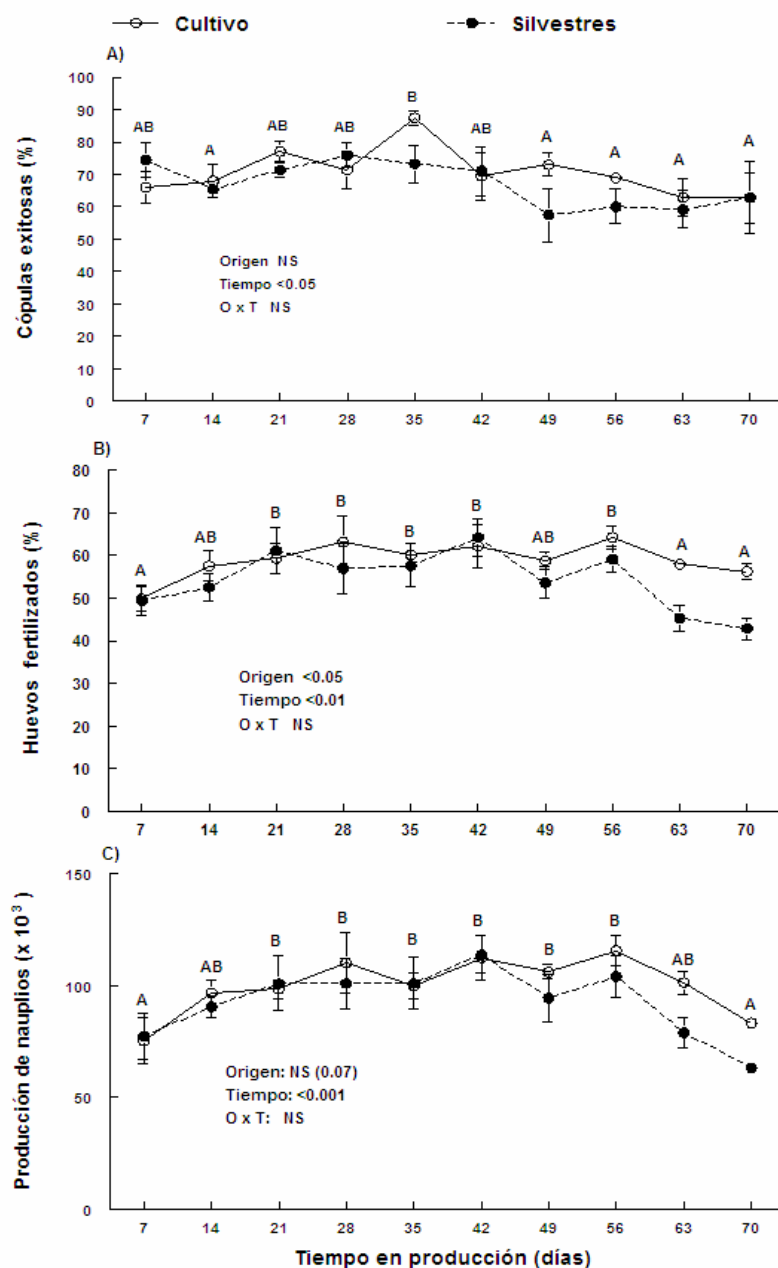


Figura 9. Indicadores productivos de hembras de cultivo apareadas con machos de cultivo o silvestres de *Litopenaeus schmitti* durante un ciclo de producción de 70 días: A) Porcentaje de hembras copuladas, B) Porcentaje de huevos fertilizados y C) Promedio de nauplios por desove. Los datos son expresados como media \pm error estándar. Los resultados del ANOVA de dos vías (tiempo en producción y origen de los machos) son descritos: (NS: No significativo). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$), para las medias globales de cada tratamiento (machos de cultivo y silvestre) durante el tiempo de producción.

El porcentaje de cópulas exitosas se correlacionó significativamente con los registros de la temperatura del agua de los tanques del mismo día o de dos días previos, tanto para animales silvestres como para los de cultivo (Tabla 6). Para el porcentaje de fertilización, la correlación con la temperatura fue significativa sólo para camarones silvestres, la temperatura tuvo su efecto sobre este indicador hasta cuatro días antes de producirse el desove (Tabla. 6).

Tabla 6. Coeficientes de correlación (r) entre variables productivas diarias y registro de la temperatura el mismo día (día X) o de cinco días antes (X-1 hasta X-5).

Indicadores productivos	Día del registro de la temperatura usado para la correlación					
	X	X-1	X-2	X-3	X-4	X-5
Cópulas exitosas (%)						
Cultivo	- 0.33**	- 0.39***	- 0.35**	- 0.19	- 0.10	0.01
Silvestre	- 0.25*	- 0.40***	- 0.38**	- 0.24	- 0.19	- 0.14
Huevos fertilizados (%)						
Cultivo	- 0.03	- 0.15	- 0.05	0.03	0.01	- 0.10
Silvestre	- 0.30*	-0.41***	- 0.37**	- 0.38**	- 0.33**	- 0.20

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

2.3. Variables morfométricas

El peso corporal de los machos de cultivo fue significativamente mayor que el de los silvestres. A lo largo del periodo experimental, aunque la interacción no fue significativa, a partir de la comparación de medias se observó un incremento significativo sólo para los machos silvestres (Tabla 7). Con relación al peso del espermátforo, se obtuvo un efecto significativo con relación al origen con valores iniciales más altos para los camarones silvestres. Dado que hubo un aumento significativo en el peso del espermátforo para los

machos de cultivo después de 30 y 60 días, se alcanzaron valores cercanos a los de los animales silvestres (Tabla 7). Cuando el peso corporal fue incluido como covariable en un análisis de ANCOVA o cuando el peso del espermatóforo fue corregido por el peso corporal para obtener un índice espermiosomático (ISS), el efecto principal del tiempo ya no fue significativo (ANCOVA) o no fue tan evidente (carencia de diferencias entre las medias para ISS). Sin embargo, la diferencia entre camarones silvestres y de cultivo continuaba estando presente y de hecho fue más acentuada, indicando que el valor del peso corporal más alto de camarones de cultivo estaba enmascarado por el resultado de espermatóforos más grandes para camarones silvestres. El uso del análisis de ANCOVA fue justificado por correlaciones significativas entre peso del espermatóforo y peso corporal y las líneas de regresión correspondientes también ilustraron los espermatóforos más grandes de machos silvestres para el intervalo completo del peso corporal del camarón (Figura 10).

El peso del hepatopáncreas fue afectado por el origen, con valores más bajos para los camarones silvestres, y por tiempo con un patrón irregular dependiendo del origen según lo demostrado por la interacción significativa: hubo un aumento gradual para los machos silvestres a lo largo del periodo mientras que para los machos de cultivo, se observó un pico a los 30 días (Tabla 7).

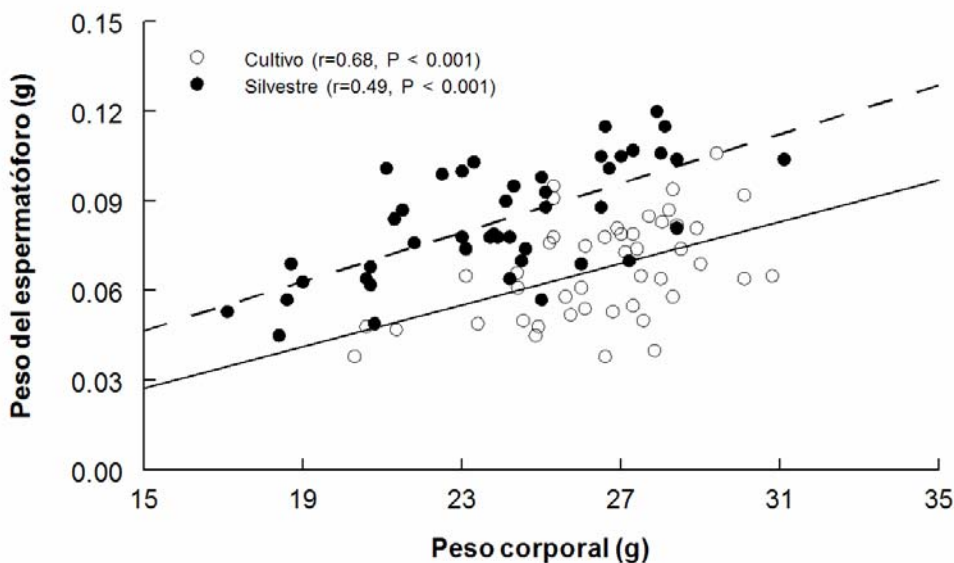


Figura 10. Líneas de regresión entre el peso de los espermatóforos y peso corporal. Se muestra el coeficiente de correlación y significancia para camarones de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti*.

Cuando el peso corporal fue incluido como covariable en un análisis de ANCOVA o cuando el peso del hepatopáncreas fue corregido por el peso corporal para obtener un índice hepatosomático (IHS), sólo la interacción seguía siendo significativa con valores más altos a los 60 días en camarones silvestres, mientras que la tendencia opuesta fue observada para camarones de cultivo con los valores más bajos en 60 días. El análisis de ANCOVA fue justificado por la correlación significativa entre el peso del hepatopáncreas y el peso corporal para ambos, para camarones silvestres ($r = 0.68$, $P < 0.05$) y camarones de cultivo ($r = 0.57$, $P < 0.05$).

Tabla 7. Características morfométricas de los camarones de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti* muestreados en diferentes tiempos a lo largo del ciclo de producción.

	Inicio	30 días	60 días	ANOVA (ANCOVA)		
				Origen	Tiempo	OxT
Peso corporal (g)						
Cultivo	25.2±0.6 ^b	27.2±0.4 ^b	27.1±0.5 ^b	<0.001	<0.001	NS
Silvestre	22.1±0.8 ^a	24.7±0.6 ^{ab}	25.1±0.8 ^b			
Peso del espermatóforo (mg)						
Cultivo	54.5±3.3 ^a (54.7)	73.5±3.3 ^b (66.8)	73.8±4.5 ^b (67.6)	<0.001 (<0.001)	<0.001 (0.056)	NS (NS)
Silvestre	74.4±4.9 ^b (84.8)	89.1±4.8 ^b (90.8)	87.1±4.5 ^b (87.6)			
ISS (%)						
Cultivo	0.22±0.011 ^a	0.27±0.012 ^a	0.27±0.016 ^a	<0.001	<0.05	NS
Silvestre	0.33±0.016 ^b	0.36±0.016 ^b	0.35±0.015 ^b			
Peso del hepatopáncreas (g)						
Cultivo	0.67±0.031 ^{ab} (0.67)	0.73±0.023 ^b (0.67)	0.68±0.029 ^{ab} (0.63)	<0.05 (NS)	<0.05 (NS)	<0.05 (<0.01)
Silvestre	0.57±0.030 ^a (0.65)	0.63±0.026 ^{ab} (0.64)	0.73±0.037 ^b (0.73)			
IHS (%)						
Cultivo	2.67±0.090 ^{ab}	2.67±0.071 ^{ab}	2.51±0.091 ^a	NS	NS	<0.01
Silvestre	2.58±0.088 ^{ab}	2.54±0.096 ^{ab}	2.89±0.098 ^b			

Indice espermiosomático (ISS); Índice hepatosomático (IHS)

Los resultados del ANOVA de dos vías (o ANCOVA en paréntesis) para Origen, Tiempo en producción o la interacción entre ambos factores (OxT) son mostrados en las últimas columnas. Dentro de cada fila, las medias con exponentes diferentes son significativas. Las medias ajustadas para el peso corporal como resultado del ANCOVA se muestran entre paréntesis.

2.4. Calidad espermática

El conteo espermático en general fue mayor a mediados del ciclo de producción para ambos orígenes, y aunque no se observó ninguna interacción significativa entre el origen y el tiempo, se obtuvo un patrón diferente para machos silvestres y de cultivo: el valor más bajo fue observado en el inicio del ciclo de producción para los camarones de cultivo y al final para los camarones silvestres (Tabla 8). Una interacción significativa entre ambos factores fue obtenida para el porcentaje de espermatozoides vivos normales con una disminución en el tiempo para camarones silvestres pero no hubo diferencia significativa entre los tres muestreos para camarones de cultivo (Tabla 8).

Aunque fueron observadas correlaciones significativas entre el conteo de espermatozoides o el porcentaje de espermatozoides vivos normales y el peso corporal para los camarones de cultivo (Figura 11A y 11B), los análisis de ANCOVA con el peso corporal como covariable no corrigen los efectos descritos previamente. El porcentaje de espermatozoides vivos anormales no fue afectado por el tiempo en el ciclo de producción o el origen de los camarones, mientras que el conteo de espermatozoides muertos aumentó significativamente en el tiempo para ambos orígenes (Tabla 8). El porcentaje de machos por tanque con espermátóforos melanizados fue significativamente más alto ($P < 0.05$) para los camarones silvestres (4.8%) que para los de cultivo (1.6%).

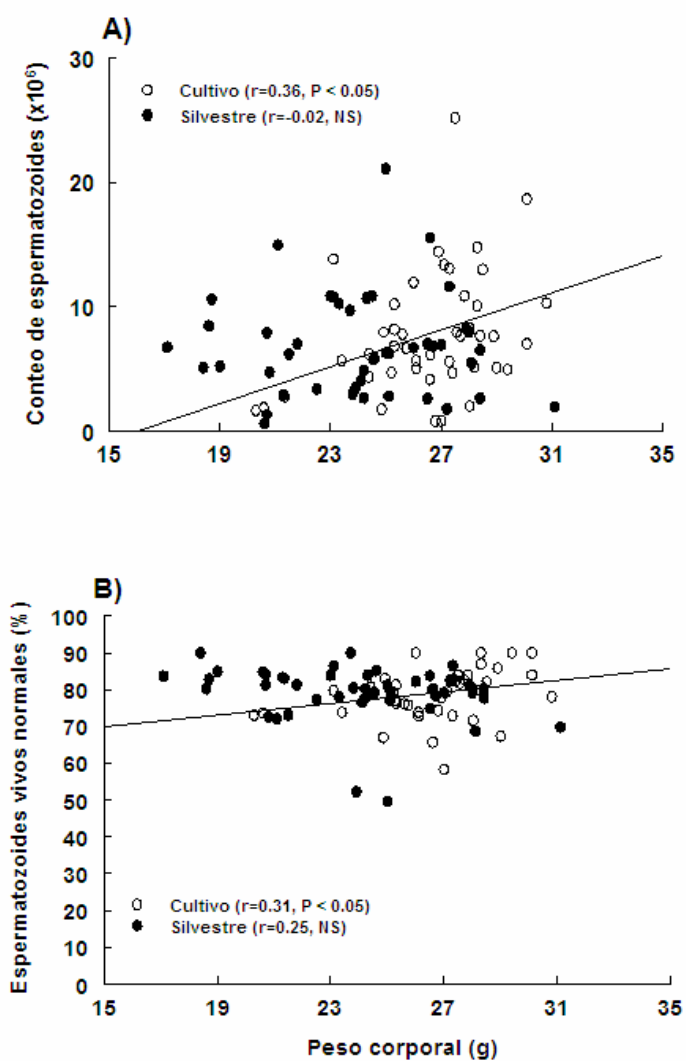


Figura 11. Líneas de regresión entre el conteo total de espermatozoides (A), porcentaje de espermatozoides normales (B) y peso corporal de machos de *Litopenaeus schmitti*. Se muestran los coeficientes de correlación y significancias para camarones de cultivo y silvestres. NS: No significativo.

Tabla 8. Calidad espermática de medio espermátforo de muestras de camarones silvestres y de cultivo de *Litopenaeus schmitti* en diferentes tiempos a lo largo del ciclo de producción.

	Inicio	30 días	60 días	ANOVA (ANCOVA)		
				Origen	Tiempo	OxT
Conteo total de espermatozoides x10 ⁶						
Cultivo	9.7±0.79 ^a (9.8)	20.1±1.51 ^b (19.6)	16.7±1.04 ^b (16.2)	NS	<0.005	NS
Silvestre	12.4±0.79 ^{ab} (13.2)	17.8±1.25 ^{ab} (18.0)	10.5±0.98 ^a (10.6)	(NS)	(<0.005)	(NS)
Espermatozoides vivos normales (%)						
Cultivo	77.3±1.28 ^{ab} (77.3)	80.9±1.48 ^{ab} (80.7)	78.3±2.23 ^{ab} (78.2)	NS	<0.05	<0.05
Silvestre	82.0±0.91 ^b (82.3)	80.9±0.90 ^{ab} (81.0)	73.9±3.04 ^a (73.9)	(NS)	(<0.05)	(<0.05)
Espermatozoides vivos anormales (%)						
Cultivo	12.5±1.92	11.5±1.16	13.7±2.87	NS	NS	NS
Silvestre	10.0±1.87	15.4±2.16	16.3±4.79			
Conteo de espermatozoides muertos x10 ⁶						
Cultivo	0.36 ±0.03 ^a	0.46 ±0.06 ^{ab}	0.74 ±0.07 ^{ab}	NS	<0.05	NS
Silvestre	0.36 ±0.05 ^a	0.50 ±0.04 ^{ab}	1.0 ±0.20 ^b			

Los resultados del ANOVA de dos vías (o ANCOVA en paréntesis) para Origen, Tiempo en producción o la interacción entre ambos factores (OxT) son mostrados en las últimas columnas. Dentro de cada fila, las medias con exponentes diferentes son significativas. Las medias ajustadas para el peso corporal como resultado del ANCOVA se muestran entre paréntesis.

2.5. Indicadores inmunológicos

Los camarones de cultivo y silvestres tenían valores similares de la actividad del FO en plasma (0.011 y 0.010 unidades de absorbancia respectivamente) después de tres días del traslado al local de maduración. Esta actividad disminuyó significativamente después de un mes en el ciclo de producción en ambos grupos, y después de dos meses aumentó significativamente, específicamente en los machos silvestres, alcanzando valores similares al muestreo inicial (Figura 12A). Los valores del CTH no fueron diferentes entre orígenes (31.50×10^6 en organismos de cultivo y 22.16×10^6 en silvestres). Después de un mes, no se observaron diferencias significativas en el primer muestreo, pero disminuyeron significativamente después de dos meses, independiente del origen de los camarones (Figura 12B). La AH mostró resultados similares a los observados para el CTH: no se obtuvieron diferencias entre ambos grupos, ni entre los dos primeros muestreos (3 y 30 días), aunque fue observada una disminución significativa después de dos meses, independientemente del origen de los camarones (Figura 12C).

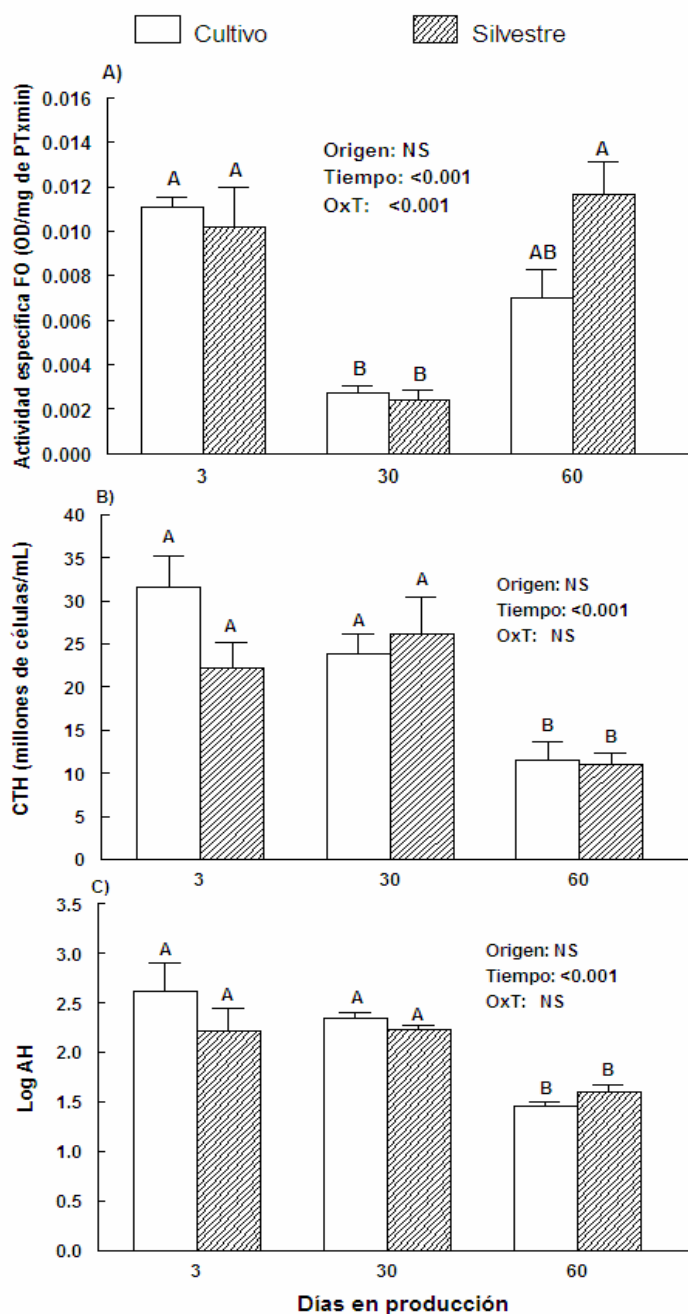


Figura 12. Indicadores inmunológicos de machos silvestres y de cultivo de *Litopenaeus schmitti* en diferentes tiempos (3, 30 y 60 días) a lo largo de un ciclo de producción: A) Actividad específica fenoloxidasa FO (PT: proteínas totales), B) Conteo total de hemocitos, C) Logaritmo del nivel de actividad hemoaglutinante. n = 15 de cada muestra. Los datos son expresados como media \pm error estándar. Los resultados del ANOVA de dos vías (tiempo en producción y origen de los machos) son descritos: (NS: No significativo). Diferentes letras indican diferencias significativas (P < 0.05), para las medias globales de cada tratamiento (machos de cultivo y silvestres) durante el tiempo de producción.

2.6. Variables bioquímicas de la hemolinfa

La concentración de proteínas totales en la hemolinfa aumentó significativamente en ambos grupos después de un mes y posteriormente disminuyó en el segundo mes en ambos grupos, aunque las diferencias significativas con el muestreo a los 30 días fueron observadas solamente para machos silvestres. Las concentraciones iniciales de la glucosa fueron significativamente más altas en los camarones silvestres (53.28 mg/dL) que en los de cultivo (38.14 mg/dL). En ambos grupos, la glucosa disminuyó después de un mes, pero esta disminución fue más pronunciada en camarones silvestres, que para los de cultivo donde sí hubo significancia. Después de 60 días, la glucosa en la hemolinfa disminuyó a niveles muy bajos (< 10 mg/dL) en ambos grupos (Figura 13A y B).

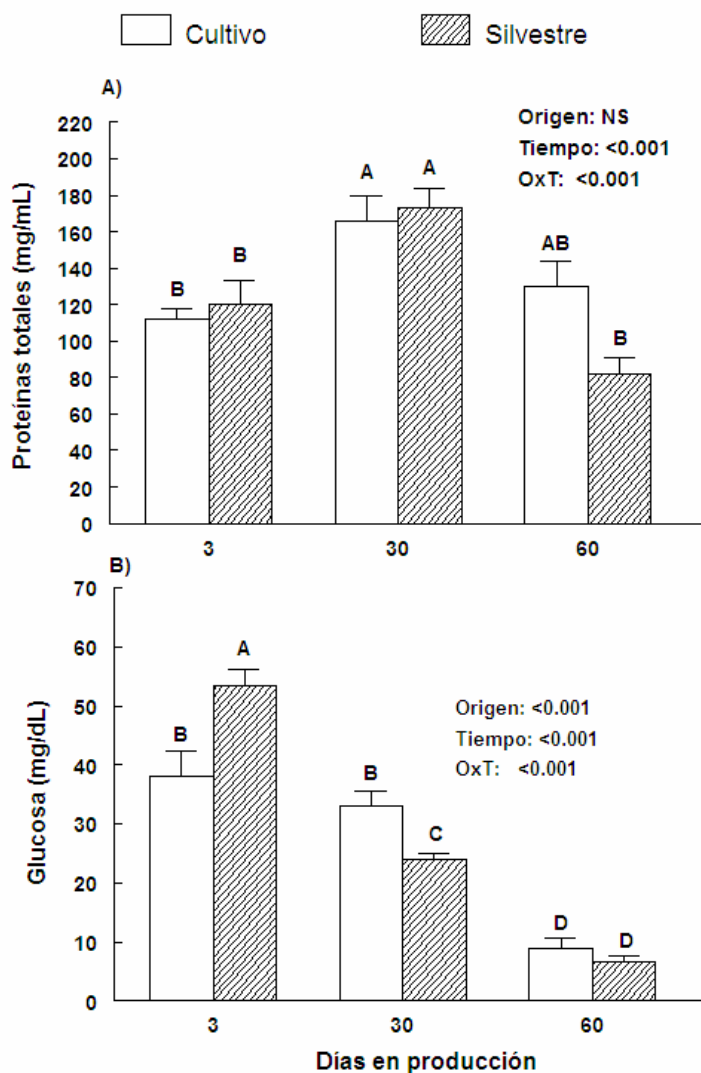


Figura 13. Variables bioquímicas de la hemolinfa de machos silvestres y de cultivo de *Litopenaeus schmitti* en diferentes tiempos (3, 30 y 60 días) a lo largo de un ciclo de producción: A) Proteínas totales, B) Glucosa; n = 15 de cada muestra. Los datos son expresados como media \pm error estándar. Los resultados del ANOVA de dos vías (tiempo en producción y origen de los machos) son descritos: (NS: No significativo). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$), para las medias globales de cada tratamiento (machos de cultivo y silvestres) durante el tiempo de producción.

2.7. Composición bioquímica del hepatopáncreas

Los niveles de proteínas solubles de los machos silvestres se mantuvieron sin diferencias a lo largo del ciclo de producción. Sin embargo, para los animales de cultivo los niveles incrementaron significativamente desde el inicio hasta el final del periodo evaluado. Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos durante todo el ciclo de producción, excepto en el primer muestreo que corresponde al tercer día de la entrada de los animales al local de maduración (Figura 14A).

No se observaron diferencias significativas en los valores de carbohidratos totales entre ambos orígenes, pero sí se observó un efecto significativo del tiempo y de la interacción entre ambos factores (Figura 14B). Así tenemos que para los animales de cultivo los valores fueron aumentando gradualmente alcanzando diferencias significativas entre los 3 y 60 días del ciclo de producción, mientras que para animales silvestres las diferencias fueron observadas entre los 30 y 60 días, obteniéndose el valor más alto en el último muestreo.

Para los lípidos totales se observan efectos significativos de ambos factores y de la interacción (Figura 14C). En el primer muestreo, los niveles de lípidos totales fueron significativamente más altos para los animales silvestres (474.54 mg/g), disminuyendo posteriormente a partir de los 30 días, alcanzando valores similares a los camarones de cultivo (353.57 mg/g). Para los machos de cultivo las medias durante los 3 y 30 días se mantuvieron sin cambios y posteriormente aumentaron significativamente hacia los 60 días.

Con relación a los niveles de triglicéridos, no hubo diferencias significativas entre ambos orígenes a lo largo del periodo. Sin embargo, se observaron valores significativamente menores a los 30 días en comparación al inicio y al final del periodo evaluado (Figura 14D).

2.8. Composición bioquímica del espermatozoido

Los niveles de proteínas y carbohidratos no fueron diferentes entre los dos orígenes ni durante el ciclo de producción. Por otro lado, los niveles de lactato fueron significativamente más altos (2.27 mg/g) para los machos silvestres en el primer muestreo comparado con los valores obtenidos a lo largo del ciclo de producción y con los valores obtenidos en los tres muestreos para machos de cultivo (Figura 15A, B y C).

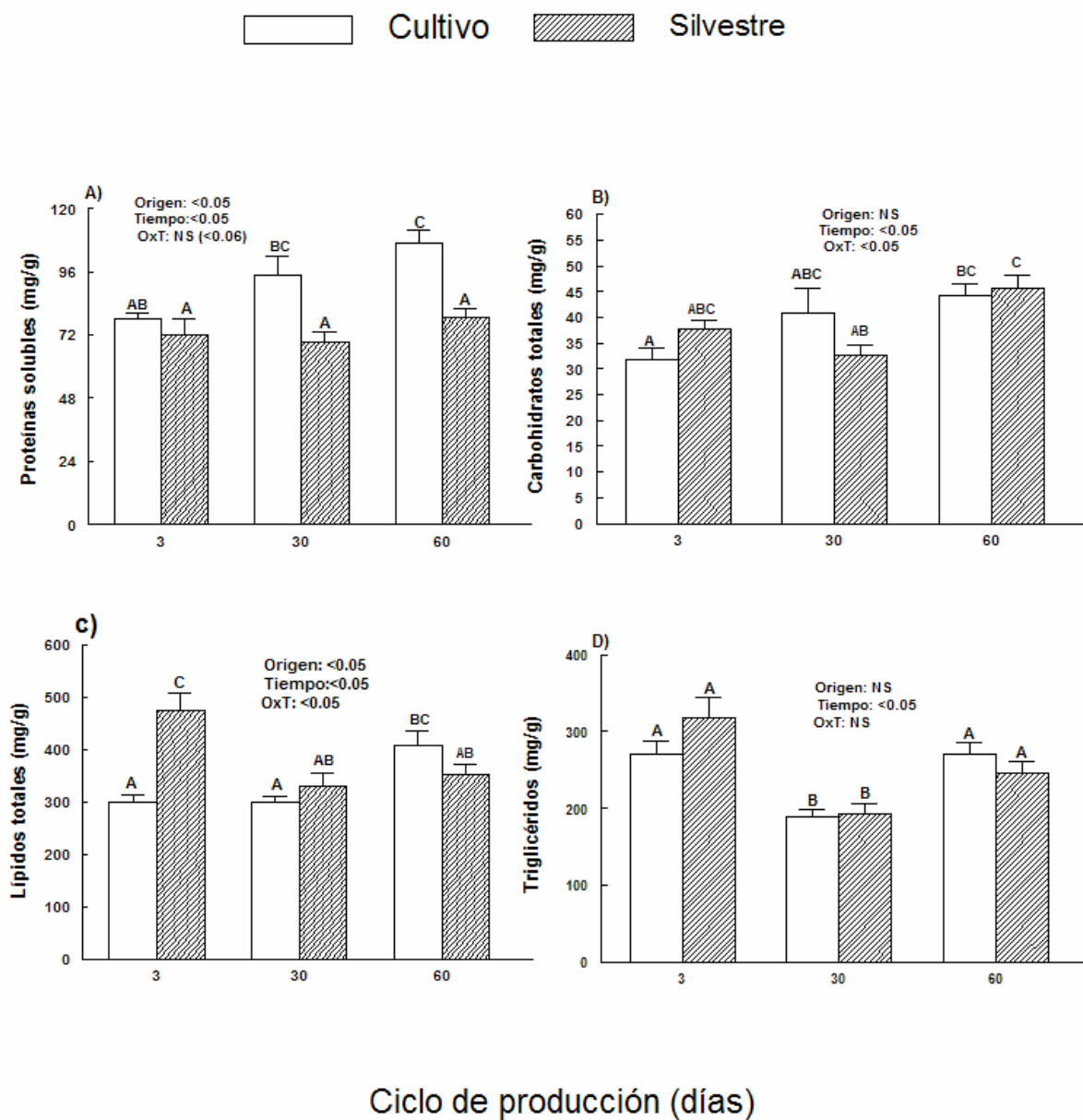


Figura 14. Variables bioquímicas del hepatopáncreas de machos silvestres y de cultivo de *L. schmitti* en diferentes tiempos (3, 30 y 60 días) a lo largo de un ciclo de producción: A) Proteínas solubles, B) Carbohidratos totales, C) Lípidos totales; D) Triglicéridos; (mg/g peso seco del órgano); n = 15 de cada muestra. Los datos son expresados como media \pm error estándar. Los resultados del ANOVA de dos vías (tiempo en producción y origen de los machos) son descritos: (NS: No significativo). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$), para las medias de cada tratamiento durante el tiempo de producción.

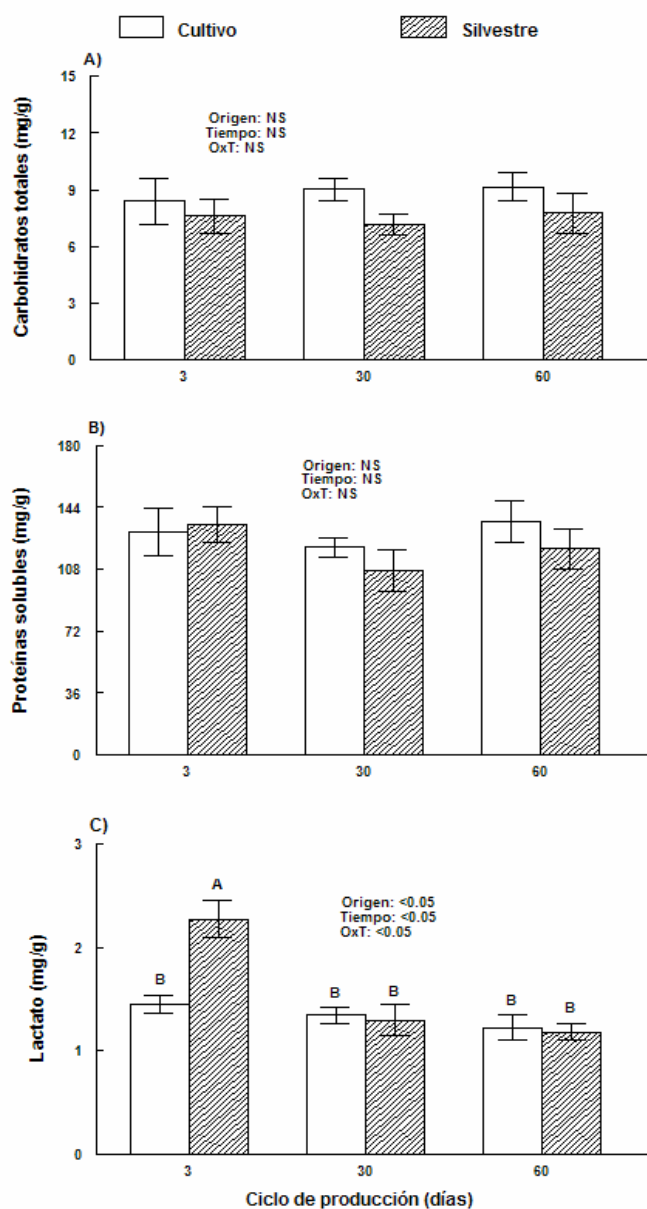


Figura 15. Variables bioquímicas del espermatóforo de machos silvestres y de cultivo de *L. schmitti* en diferentes tiempos (3, 30 y 60 días) a lo largo de un ciclo de producción: A) Carbohidratos totales, B) Proteínas solubles, C) Lactato; (mg/g peso seco del órgano); n = 15 de cada muestra. Los datos son expresados como media \pm error estándar. Los resultados del ANOVA de dos vías (tiempo en producción y origen de los machos) son descritos: (NS: No significativo). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$), para las medias de cada tratamiento durante el tiempo de producción.

DISCUSIÓN

1. Comparación del desempeño reproductivo de progenitores cultivados de *Litopenaeus schmitti* en sistemas de tanques unisexo y mixtos

Los resultados productivos alcanzados para la maduración y reproducción del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, con la tecnología empleada en este trabajo, indican que la respuesta reproductiva de los adultos de cultivo es semejante en los sistemas de tanques de maduración unisexo y mixto, lo cual quedó demostrado al observarse similitud en los valores de los indicadores productivos medidos. No fueron observadas diferencias en el número de desoves por hembra, promedio de huevos por desove, promedio de nauplios por desove, porcentaje de cópulas exitosas y porcentaje de eclosión entre los tratamientos, al igual que los resultados obtenidos por Browdy *et al.* (1996), al comparar la respuesta reproductiva de *L. vannamei* en tanques convencionales y unisexo. Sin embargo, si bien la proporción de cópula exitosas no difiere entre tratamientos, se observó un incremento a partir de la tercera semana de permanencia de los animales en la nave de maduración, lo cual sugiere una adaptación gradual de los mismos a las condiciones de cautiverio creadas y deja abierta la necesidad de realizar estudios donde se determine el tiempo de aclimatación que requieren los animales para su adaptación fisiológica a las condiciones del local de maduración, ya que estas son muy diferentes a las de los estanques donde fueron criados. La respuesta de los animales a la cópula una vez lograda su adaptación se puede considerar como buena, alcanzándose de hecho un valor superior al 90 % que representa un mayor rendimiento que el 68 % reportado por Pérez-Jar *et al.* (1996) al trabajar durante 30 días

con reproductores también de 7 meses en condiciones similares, así como con respecto a los datos históricos del laboratorio comercial donde fue desarrollado el presente trabajo (Ver Introducción).

El sistema de tanques utilizado por otros autores y en general por los productores a escala mundial, es el sistema de tanques mixtos o convencionales. Yano (1988) plantea que la relación de sexo usual es 1:1 en tanques de maduración, pero que algunas granjas incrementan el número de hembras a una relación de 2 a 2.5:1 (hembras:machos), ya que las hembras pueden liberar feromonas que estimulan la cópula en los tanques. Este mismo autor sugiere que tanto hembras ablacionadas como no ablacionadas de *L. vannamei*, pueden madurar sin la presencia de machos en los tanques, pero el promedio de hembras que maduran solas es más bajo que aquellas que maduran junto a los machos. Este planteamiento no fue válido en el presente trabajo ya que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de hembras maduras (IV) al comparar ambos sistemas.

Para el sistema de tanques unisexo, existe el reporte de Missamore y Browdy (1996), los cuales exponen que solamente el 27 % de cópulas que observaron en su trabajo, fueron exitosas utilizando una relación de sexo de: 1 hembra: 7 machos. Por otro lado, Naessens *et al.* (1997), al adoptar el uso de tanques unisexo para detectar el efecto en *L. vannamei* de una dieta peletizada para maduración combinada con la biomasa de *Artemia*, concluyen que ésta contribuyó más en la respuesta reproductiva de hembras que en los machos. Browdy *et al.* (1996), afirman que al separarse los animales por sexo se puede incrementar la calidad y eficiencia de la maduración comercial en los sistemas

productivos, pues permite un mayor control de todos los factores que pueden afectar la conducta copulatoria de los reproductores.

Al analizar los resultados del porcentaje de hembras maduras, teniendo en cuenta el total de hembras mantenidas en la nave, observamos que los bajos valores que se obtuvieron en ambos tratamientos pueden estar influenciados por trabajar durante un periodo relativamente corto con hembras no ablacionadas. Según lo reportado por Artiles *et al.* (1999) para esta especie, las hembras no ablacionadas pueden presentar una frecuencia de maduración de entre 7 y 15 días, mientras que las ablacionadas pueden lograr su estadio de maduración IV cada 3 ó 4 días. Esto repercutió a su vez en el bajo porcentaje de hembras copuladas en cada tratamiento durante el periodo experimental (Tabla 3).

En cuanto a los nauplios por desove, aunque los resultados fueron bajos al compararlos con lo logrado por Pérez-Jar *et al.* (resultados inéditos), quienes obtuvieron valores superiores a los 100×10^3 nauplios por desove, hay similitud con los valores alcanzados por otros autores con la misma especie obtenida en ciclo cerrado. Por ejemplo, Bueno (1990) en sistema de tanques mixtos, hace un análisis de los promedios de nauplios por desove y observa que esta especie puede mantener constante sus resultados por encima de 78960 nauplios por desove. Asimismo, Ramos *et al.* (1995) al trabajar con hembras de cultivo no ablacionadas, obtuvieron un promedio de 70338 nauplios por desove.

Otro aspecto debatido por investigadores y productores, al referirse al sistema de tanques unisexo, es la probabilidad de un mayor número de muertes y desgaste en las hembras

debido a que son sometidas a una manipulación más intensa, reduciendo de esta manera su vida productiva. No obstante, en el periodo experimental utilizado en este trabajo no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de ambos sexos entre los tratamientos, lo cual indica que esta variable al igual que el porcentaje de cópulas, no son afectados por el manejo utilizado en cada sistema de maduración, dado que la principal mortalidad ocurrió al inicio del experimento. La adaptación a las condiciones creadas en los laboratorios comerciales y el manejo que se utilice son aspectos esenciales para prolongar la vida útil de los animales. Es importante entonces desarrollar diversas evaluaciones del desempeño reproductivo y de la condición fisiológica de los animales durante un periodo experimental más largo, aspecto que se realizó en el segundo experimento.

2. Determinación de la respuesta reproductiva, calidad espermática y condición fisiológica en machos de cultivo y silvestres de *Litopenaeus schmitti*

2.1. Determinación de la respuesta reproductiva y calidad espermática en machos de cultivo y silvestres

En el momento de su captura y traslado al local de maduración, los camarones silvestres fueron de menor talla que los de cultivo y esta diferencia pudo haber afectado algunas de las variables medidas. Por ejemplo, es bien conocido que el peso del espermátforo y el conteo espermático se incrementan con el aumento del peso corporal para varias especies de peneidos (Pratoomchat *et al.*, 1993; Rosas *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995; Ceballos-

Vázquez *et al.*, 2003), un resultado que también se obtuvo en el presente trabajo. Además, se observó un aumento en el porcentaje de espermatozoides vivos normales en pesos corporales más altos para los camarones de cultivo, semejante a los resultados de Ceballos-Vázquez *et al.* (2003) para *L. vannamei* y los de Alfaro (1993) para *L. stylirostris*.

Además de encontrarse diferencias en el peso corporal, los camarones silvestres presentaron espermátóforos más grandes y en general, aunque no difirieren existe la tendencia de presentar hepatopáncreas más pequeños. Se observa que el peso del hepatopáncreas es una consecuencia directa del peso corporal, ya que el efecto del origen no fue significativamente mayor al utilizar el ANCOVA o cuando el peso del hepatopáncreas fue corregido para el peso corporal con los valores calculados del índice hepatosomático. Sin embargo, la diferencia del peso corporal había, incluso, enmascarado parcialmente la diferencia del peso del espermátóforo entre camarones silvestres y de cultivo. Al no observarse ninguna diferencia en el conteo espermático entre ambos orígenes, sin importar el empleo del ANCOVA, se sugiere que existan diferencias en la cantidad de masa aglutinante del espermátóforo. Esta posibilidad fue confirmada visualmente. En este aspecto, sería importante que en otros estudios se realicen ensayos para determinar el contenido de los mucopolisacáridos que constituyen esta masa aglutinante como lo describen (Sasikala y Subramoniam, 1987). En concordancia, Wang *et al.* (1995) reportaron que es probable que variaciones en el peso del espermátóforo puedan ser debidas a diferencias de tamaño de los componentes estructurales y cantidad del material adherente, así como del tamaño de la masa de la esperma. Un posible efecto de lo anterior, es que pudiéramos haber obtenido un desempeño reproductivo más bajo en

camarones de cultivo como resultado de una cantidad más baja de masa de aglutinante, que a su vez está implicada en las características de la adherencia del espermátforo (Pérez-Farfante, 1975; Talbot *et al.*, 1989; Heitzman *et al.*, 1993). Sin embargo, este no fue el caso, y pudo comprobarse al analizar las diferentes variables productivas, que dependen fundamentalmente de la calidad reproductiva de los machos, tal como porcentaje de cópulas exitosas, porcentaje de huevos fertilizados y promedio de nauplios por desove. De hecho, el porcentaje de huevos fertilizados fue incluso más alto en machos de cultivo. Igualmente, no fueron observadas diferencias en cuanto a la calidad espermática entre camarones silvestres y de cultivo, aunque a lo largo del periodo experimental se observó una respuesta diferente, lo cual será discutido más adelante. En concordancia con esto, tenemos que Pratoomchat *et al.* (1993) no observaron diferencias en la calidad espermática de camarones silvestres y de cultivo de *P. monodon*, a pesar de tener mayor talla corporal y espermátforos más grandes los especímenes silvestres. Estos resultados del desempeño reproductivo de machos de cultivo justifican claramente su uso para la producción de las larvas de *L. schmitti*, tomando en consideración todas las ventajas que aporta el empleo de reproductores obtenidos en ciclo cerrado (Ver revisiones de Browdy, 1998; Racotta *et al.*, 2003).

El general, el patrón del desempeño reproductivo de los camarones fue decreciendo a lo largo el ciclo de producción, lo cual corresponde al fenómeno bien conocido del agotamiento reproductivo, reportado principalmente para las variables relacionadas con las hembras (Ver revisión de Racotta *et al.*, 2003). Aunque no se detectó ninguna interacción significativa, esta disminución parece ser más pronunciada en camarones silvestres. Esto

también corresponde con valores más bajos del conteo espermático total y del porcentaje de células espermáticas vivas normales, junto con valores más altos de espermatozoides muertos en camarones silvestres a finales del ciclo de producción. El declive en la calidad espermática a lo largo de regeneraciones consecutivas de espermatóforos fue observado claramente para *L. setiferus* (Leung-Trujillo y Lawrence 1987; Talbot *et al.*, 1989; Rosas *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 1998). Esto no se comporta igual para otras especies tales como *L. stylirostris* (Alfaro, 1993), *P. monodon* (Gomes y Honculada-Primavera, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993) y *L. vannamei* (Leung-Trujillo y Lawrence 1985, Alfaro y Lozano, 1993; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de no observar cambios en el conteo espermático y de espermatozoides anormales durante un mes en regeneraciones consecutivas, Alfaro y Lozano (1993) encontraron un aumento en el número de espermatóforos melanizados a lo largo de tres meses. La incidencia de espermatóforos melanizados fue también más alta para camarones silvestres en el presente trabajo. Dos causas principales para la disminución de la calidad espermática o para la presencia de espermatóforos melanizados han sido propuestas: 1) la ausencia de transferencia de espermatóforos, que es el resultado de un proceso de degeneración natural (Alfaro y Lozano, 1993) y 2) debido a las altas temperaturas del agua (Bray *et al.*, 1985; Pascual *et al.*, 1998; Pérez-Velázquez *et al.*, 2001). La primera explicación no se aplica a las condiciones del trabajo actual para los machos, los cuales tuvieron una presencia continua de hembras maduras en los tanques. Por otro lado, las altas temperaturas registradas al final del ciclo de producción pudieran explicar la disminución de la calidad espermática. En el presente trabajo, se encontró una influencia más pronunciada de la temperatura en machos silvestres, los cuales presentaron una mayor susceptibilidad. Los análisis de la correlación

entre la temperatura y las variables productivas también apoyan la hipótesis de una susceptibilidad más alta en camarones silvestres; sin embargo, una breve explicación del significado y de los alcances de estos análisis debe primero ser indicada. El efecto de la temperatura del agua en la calidad espermática es apoyado por la correlación negativa entre el índice del porcentaje de huevos fertilizados y la temperatura del agua de cuatro días antes del apareamiento. Según Pascual *et al.* (2003), el deterioro de la calidad espermática en *L. setiferus* fue observada dos días después de presentarse un aumento de la temperatura de 31 a 33 °C, lo cual refuerza nuestra hipótesis sobre la influencia de este factor a corto plazo. La correlación para el porcentaje de huevos fertilizados fue significativa sólo para camarones silvestres, lo cual confirma una influencia más pronunciada de la temperatura en machos silvestres. La menor susceptibilidad de machos de cultivo a las altas temperaturas podría ser el resultado de una pre-adaptación de los mismos a estas condiciones de fluctuaciones que ocurren normalmente en los estanques.

2.2. Variaciones metabólicas e inmunológicas de machos adultos de diferentes orígenes de *Litopenaeus schmitti* durante una actividad reproductiva continua

2.2.1. Valores iniciales y estrés

A pesar de no haber realizado mediciones en los animales antes de su transferencia al laboratorio, varios indicadores tales como, la alta actividad de la FO, altos niveles de glucosa, y niveles bajos de la proteína en hemolinfa, sugieren que al principio del ciclo productivo estaba presente en los animales una condición general de estrés, probablemente debida a su transferencia al laboratorio.

En el presente estudio, los valores de fenoloxidasa en plasma (0.01-0.011 unidades de absorbancia) que se obtuvieron en el muestreo inicial (tres días después de transferidos los animales al local de maduración) fueron más altos en los camarones silvestres y los de cultivo que los obtenidos por Rodríguez-Ramos (2003), los cuales extrajeron la hemolinfa de adultos de camarones de cultivo inmediatamente después de ser capturados en los estanques donde son criados (0.003 ± 0.0003 unidades de absorbancia). Esto pudiera ser explicado por el aumento en la FO, así como de su precursor del zimógeno intracelular, proFO, durante la aclimatación del camarón *L. schmitti* (Rodríguez-Ramos, 2003) y en *L. setiferus* (Sánchez *et al.*, 2001), trabajos en los cuales el aumento de la actividad FO fue observado siete días después de su transferencia a las condiciones del laboratorio, al compararlos con los animales muestreados directamente de los estanques. En ambos estudios, a su vez ocurrió una disminución significativa de los hemocitos circulantes. En este sentido, los valores del CHT del presente trabajo en el muestreo inicial para ambos grupos son más bajos (20 a 30 millones de células) que los reportados por Sánchez *et al.*, (2001) en animales de cultivo (60 millones), pero similares a los resultados obtenidos por Rodríguez-Ramos (2003) (23 millones) con *L. schmitti* recién capturados de los estanques. En general, estos valores pueden ser considerados como aceptables, considerando que 20 millones de células es el número sugerido por Rodríguez *et al.* (2000) para peneidos sanos. De la misma manera, los valores obtenidos en el primer muestreo de la AH son similares a los recomendados por Rodríguez-Ramos *et al.* (2001a) y Rodríguez-Ramos (2003) para *L. schmitti* en condiciones similares. El estrés inducido por la transferencia de los animales a las condiciones del local de maduración fue primeramente detectado por las alteraciones en el nivel de la FO, lo cual sugiere que entre los indicadores inmunológicos evaluados, éste

fue uno de los más sensibles. En otras situaciones estresantes, tales como la ablación del pedúnculo ocular en hembras o la extirpación del espermatóforo en machos, fue reportado un aumento en actividad de FO junto con una reducción en el CHT para *F. paulensis* (Perazzolo *et al.*, 2002). De igual forma, la exposición a una hipoxia aguda en *L. stylirostris* también dio lugar a un aumento de la FO y a una disminución del CHT (Le Moullac *et al.*, 1998).

La glucosa es otra de las variables reconocidas asociadas al estrés en camarones peneidos (Hall y Van Ham, 1998; Racotta y Palacios, 1998). Se considera que en animales no estresados, los valores de glucosa están por lo general en el rango de 13-20 mg/dL (Racotta y Palacios, 1998; Racotta *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003). Los valores iniciales obtenidos en este estudio (cerca o mayores a 40 mg/dL) cayeron en el rango de valores reportados comúnmente para camarones estresados (para revisión vea Pascual *et al.*, 2003a y b) y se podrían explicar como una respuesta a la transferencia a los tanques de maduración. Niveles iniciales de glucosa más altos en camarones silvestres, indican que son más susceptibles al estrés por la manipulación en el traslado y por las condiciones de confinamiento en el local de maduración, o pudieron haber tenido una dieta más rica en carbohidratos en el medio donde se desarrollaron. La primera explicación era de esperar, considerando que los camarones silvestres normalmente no están sujetos a la manipulación humana, ni al estrés provocado por traslados largos, como los que se emplean con los camarones de cultivo. Los niveles de glucosa también reflejan el contenido de carbohidratos de la dieta (Rosas *et al.*, 2000), es por ello que los diferentes niveles de

glucosa obtenidos en diversos estudios pudieran estar relacionados con una dieta en particular (Pascual *et al.*, 2003b).

La concentración de proteínas no está asociada como un indicador que de manera inmediata refleje una situación de estrés, aunque algunos estudios reportan una disminución de niveles de la proteína durante un estrés agudo (Racotta y Palacios, 1998; Perazzolo *et al.*, 2002). Los niveles de la proteína en el muestreo inicial se pueden considerar como relativamente bajos, comparándolos con los observados en el segundo muestreo y con los niveles reportados para otros reproductores peneidos (Palacios *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2004), lo cual puede estar relacionado con las características del alimento que consumían los animales antes de su traslado a la nave de maduración.

2.2.2. Cambios en el tiempo

Un mes después de iniciado el ciclo productivo, los camarones de ambos grupos mostraron una aparente condición metabólica e inmunológica sana o normal. La actividad más baja de FO después de 30 días, comparada con el muestreo inicial, sugiere una adaptación a las condiciones del local de maduración, ya que los niveles son similares a los de reproductores cultivados en estanques (Rodríguez-Ramos, 2003). Una condición fisiológica óptima de los camarones un mes después de su traslado también se ve reflejada por los niveles de glucosa y de proteínas. Los niveles de glucosa entre 20 y 30 mg/dL están más cercanos del rango normal para peneidos (Racotta y Palacios, 1998; Pascual *et al.*, 2003b) que el de los valores iniciales, reflejando de esta forma una situación libre de estrés por manipulación. El aumento en los niveles de proteínas después de los valores iniciales bajos, pudiera indicar

una adaptación de los animales a las condiciones existentes en el local de maduración, según lo que se concluye a su vez en este trabajo para la actividad FO y para los niveles de glucosa.

En general, el nivel de proteínas en hemolinfa es un buen indicador de la calidad de la dieta (Cedeño *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2003b) y para el estado general de salud en los animales (Rodríguez *et al.*, 2000). En el presente trabajo los animales fueron alimentados con calamar congelado y con una dieta artificial para reproductores. El alto valor alimenticio del calamar se le atribuye al alto contenido proteínico y a una composición equilibrada de aminoácidos, que es similar a la encontrada en camarones (Bray *et al.*, 1990; Wouters *et al.*, 2001). Por otro lado, el alimento artificial específico para la maduración de camarones tenía un alto contenido proteínico (40%), lo cual influye en los niveles de proteínas del camarón. Además también se incluyen aditivos alimenticios no convencionales, tales como vitamina C, que reduce el estrés (Lee y Shiau, 2002; López *et al.*, 2003), e inmunoestimulantes tales como β /glucanos, que ayudan a prevenir enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2000). Por otro lado, una combinación de alimento fresco y de peletizados para camarones peneidos da mejores resultados que una dieta que contemple exclusivamente alimento fresco (Bray *et al.*, 1990; Galgani *et al.*, 1989; Nascimento *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1995; Pérez-Velázquez *et al.*, 2003). Una dieta óptima también se ve reflejada en los efectores y los mecanismos de las respuestas inmunológicas. En este sentido, Cedeño *et al.* (2000) demostraron que altos niveles de proteína en la dieta realzaron la capacidad de la respuesta inmunológica, en relación a la actividad germicida, al conteo de hemocitos y a la actividad hemoaglutinante. En resumen,

los resultados indican que un mes después de permanecer en las condiciones del local de maduración, los machos de camarón demostraron una mejor condición fisiológica e inmune, asociada probablemente a su adaptación a estas condiciones y a la calidad de la dieta.

Al final del ciclo de producción (60 días en los tanques de maduración), prácticamente todos los indicadores sugieren una condición fisiológica y de salud pobre. Se observaron altos valores de la actividad FO, así como una disminución significativa del CHT y de la AH. Durante infecciones microbianas, hay activación del sistema de FO, donde está implicada la liberación del contenido de los hemocitos granulares y semi-granulares (Soderhall *et al.*, 1994; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Además, hay una agregación de hemocitos en los órganos sujetos a la infección microbiana, que reduce el número de hemocitos circulantes (Paterson *et al.*, 1976; Smith y Soderhall, 1983). Le Moullac *et al.* (1998) sugirió que la disminución del CHT puede dar lugar a niveles más bajos del inhibidor de la enzima que activa la FO, lo cual también podría explicar un aumento en actividad del FO. Aunque no se realizó un análisis de la presencia de patógenos en la hemolinfa, grandes cantidades de bacterias fueron observadas en la masa espermática de los machos después de 60 días, indicando que los animales hacían frente a una infección bacteriana general que podría dar lugar a una alta actividad del FO y a un CHT bajo. Un declive en la actividad hemoaglutinante también fue observado en el tercer muestreo y podía ser un indicativo de infección microbiana. Perazzolo *et al.* (2002) no encontraron diferencias en la actividad hemoaglutinante en varias situaciones de estrés en *F. paulensis*. Son necesarios más estudios para una mejor comprensión de la AH como indicador

inmunológico de la salud de camarones y su mecanismo durante la infección y el estrés crónico.

Los niveles de la proteína total y de la glucosa también declinaron a los 60 días, indicando un estado fisiológico pobre, lo cual concuerda con una disminución en el desempeño reproductivo y en la calidad espermática, posiblemente como resultado de un agotamiento reproductivo de los animales (Racotta *et al.*, 2003). El fenómeno de agotamiento reproductivo es bien conocido en hembras de camarón (Primavera, 1985; Palacios *et al.*, 1999; Racotta *et al.*, 2003). En los machos, la influencia del tiempo bajo condiciones de laboratorio o la regeneración repetida del espermátforo sobre la calidad espermática es polémica (véase Ceballos-Vázquez *et al.*, 2004) y no se ha evaluado en términos del estado fisiológico o de la condición de salud. En hembras, pero también en machos, el proceso reproductivo requiere mucha energía y movilización de las reservas para la síntesis de componentes específicos. Esto podría explicar la disminución de los niveles de la proteína y de la glucosa en la hemolinfa ya que es una fuente de estos componentes, junto con el músculo y la glándula digestiva (Gibson y Barker, 1979; Marangos *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1996).

Todos estos resultados nos indican que después de cierto período de tiempo bajo condiciones de laboratorio asociadas a alta actividad reproductiva, los machos de *L. schmitti* parecen alcanzar un estado fisiológico de total estrés o agotamiento, por lo cual deben ser sustituidos pasados los dos meses. Aún debe ser analizado si la infección microbiana, junto con el agotamiento reproductivo, actúa de forma sinérgica para causar

este estado o si el estrés da lugar a una capacidad de inmunorespuesta deprimida propiciando una infección microbiana. En este contexto, la reproducción continua y forzada pudiera representar una situación de estrés crónico, que trae consigo un debilitamiento de los animales, una reducción de la respuesta inmune y de la resistencia de los animales a la invasión de bacterias patógenas que habitan el ambiente marino, según lo demostrado en otros estudios que determinaron situaciones de estrés en camarones (Le Moullac *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001; Perazzolo *et al.*, 2002).

2.2.3. Origen de los reproductores

Además de las diferencias para los niveles iniciales de la glucosa discutidos previamente, hay un declive más pronunciado para camarones silvestres en los niveles de la actividad de FO y de la proteína con relación a los camarones de cultivo al final del ciclo de producción. Estos resultados, junto con el declive más pronunciado en la respuesta reproductiva y en la calidad espermática de los machos silvestres (Pérez-Jar, resultados inéditos), sugieren que los camarones silvestres son más susceptibles al agotamiento reproductivo y al estrés crónico que los camarones de cultivo.

2.3. Análisis de la composición bioquímica de hepatopáncreas y espermatóforos en machos adultos de diferentes orígenes de *Litopenaeus schmitti* a lo largo de un ciclo de producción.

El análisis de la composición bioquímica de tejidos de reserva (hepatopáncreas principalmente y en menor grado, músculo y hemolinfa) y gónada, ha sido ampliamente

descrito en hembras de camarones peneidos para demostrar una transferencia de energía y nutrientes específicos durante el proceso de maduración gonádica (Kulkarani y Nagabhushanam, 1979; Marangos *et al.*, 1988; Vincent *et al.*, 1988; Castille y Lawrence, 1989; Marangos *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1996; Palacios *et al.*, 2000). Sin embargo, son muy pocos los trabajos en machos que analicen la composición bioquímica de diferentes órganos, incluyendo los distintos componentes del sistema reproductor (Castille y Lawrence, 1989; Ceballos-Vázquez, 2003). Además, en machos la asignación de estadios de madurez a partir de la organización citológica de la gónada tal como se aplica para las hembras no es factible, ya que la producción de espermatozoides es constante, por lo cual no existe un periodo de producción gamética definido, en el que se aprecie un intercambio de componentes bioquímicos desde un tejido de reserva hacia la gónada (Ceballos-Vázquez, 2003). Por lo anterior, para entender algunos de los resultados del presente trabajo se analizará brevemente el fenómeno ya conocido en las hembras. En condiciones de reproducción continua e intensiva, las hembras presentan ciclos consecutivos de maduración y desove, que podía afectar la transferencia de nutrientes a la gónada, dando una menor acumulación en la gónada misma, o bien, una disminución considerable en los tejidos de reserva. El primer problema al parecer no ocurre, dado que la composición bioquímica general de gónadas de hembras de *L. vannamei* que han tenido múltiples desoves, es similar a la de hembras con pocos desoves (Palacios *et al.*, 2000; Arcos *et al.*, 2004). Asimismo, los niveles de lípidos en hembras de *F. indicus* en su tercer desove no difieren de los encontrados en hembras en su primer desove, aunque sí se observó una disminución del 20% en el índice gonadosomático indicando una capacidad menos eficiente de madurar consecutivamente (Vázquez-Boucard *et al.*, 2004). Los niveles de

reservas en otros tejidos sí pueden disminuir como consecuencia de su transferencia continua a la gónada. Este el caso de los lípidos del hepatopáncreas, que muestran una disminución del 90% para triglicéridos y del 70% para fosfolípidos entre hembras después de su tercer desove, comparado con hembras inmaduras antes de su primer desove (Vázquez-Boucard *et al.*, 2004). Sin embargo, no se trata de un fenómeno generalizado y al parecer depende de las condiciones particulares de maduración (en particular la dieta) dado que en otros trabajos no se observó variación en la composición bioquímica general en relación a los múltiples desoves (Palacios *et al.*, 2000; Arcos *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, los niveles de proteínas y carbohidratos en el espermatóforo no variaron con respecto al tiempo, por lo cual podemos asumir lo mismo que para hembras: la actividad reproductiva continua que implica regeneraciones de nuevos espermatóforos no afectó la acumulación de estos componentes en los nuevos espermatóforos regenerados a lo largo del tiempo. En cuanto a la posible transferencia de componentes bioquímicos a partir del hepatopáncreas, tampoco se observa un patrón claro de disminución, lo cual nos hace suponer que no existe una movilización cíclica de nutrientes desde el hepatopáncreas hacia el sistema reproductor de machos, o bien que los nutrientes son aprovechados eficientemente para el proceso metabólico reproductivo. Sin embargo, sí hubo ciertas diferencias entre ambos orígenes en cuanto a la composición bioquímica a lo largo del tiempo. En los animales de cultivo hubo un incremento en los niveles de proteína y lípidos totales del hepatopáncreas, mientras que en los silvestres las proteínas no variaron y los lípidos inclusive disminuyeron. Esto podría indicar que mientras que los animales de cultivo presentaron aparentemente una mejor asimilación de estos nutrientes como posible

adaptación a la dieta de laboratorio, esto no fue el caso para los organismos silvestres. Esto podría deberse al incremento en peso en reproductores silvestres lo cual sugiere que los animales estaban empleando gran parte de los nutrientes de sus reservas corporales y de la dieta suministrada en el local de maduración, no solamente para la reproducción, sino también para su crecimiento.

La alimentación también puede explicar estas y otras diferencias encontradas entre machos silvestres y de cultivo, por lo cual es necesario resaltar brevemente la importancia de la dieta en el proceso reproductivo. La alimentación es un factor decisivo para el desarrollo de los camarones en las diferentes etapas de su cría, siendo de suma importancia el conocimiento en cuanto a la calidad y cantidad del alimento a adicionar en función de la especie, edad, estado fisiológico y condiciones de cultivo, entre otras (Akiyama y Chiang, 1993; Tacon, 1999; Berger, 2001). Para *L. schmitti* se tienen conocimientos de sus hábitos alimentarios en condiciones naturales (Anderes, 1982 y 1984), de sus requerimientos nutricionales en las etapas de postlarvas y juveniles (García *et al.*, 1990; Galindo *et al.*, 1992 a, b; Álvarez *et al.*, 1996) y de la aceptación de dietas artificiales en reproductores (Ramos y García, 1992; Pérez-Jar *et al.*, 1996). Los factores nutricionales tienen un papel crítico en la maduración y el apareamiento, en la fertilidad, la fecundidad, en la viabilidad y en la calidad de la descendencia (Harrison, 1990; Browdy, 1992), y un desbalance o una dieta incompleta pueden provocar un desempeño reproductivo pobre o incluso impedir la reproducción (Bray y Lawrence, 1992). En estudios recientes Pérez-Velázquez *et al.* (2003), al emplear una dieta de maduración compuesta de alimento fresco (60% calamar, 40% de poliqueto *Glycera dibranchiata*), observaron pérdida de peso en machos de *L.*

vannamei y disminución del conteo total de espermatozoides, por lo que concluyen que la dieta de maduración donde se suministre únicamente alimento fresco, no es nutricionalmente óptima para machos. Por otro lado, Alfaro y Lozano (1993) incrementaron la producción de esperma en machos de cultivo de *L. vannamei* al utilizar dos técnicas: ablación ocular usando una dieta en la sala de maduración a partir de alimento fresco congelado (13 % de la biomasa total) y la otra técnica fue usando una formulación marca Nicovita Plus[®] (3 % de la biomasa total) y calamar congelado (2 %). En el presente trabajo, se le suministró a los reproductores de ambos lotes a lo largo del ciclo de producción, una dieta congelada compuesta por calamar (75 %) y una dieta seca para maduración (25 %). Esta dieta representó un cambio con respecto a la dieta que tenían anteriormente, principalmente para animales silvestres, pero también para los de cultivo dado que en los estanques eran alimentados principalmente a base de la misma dieta seca y ocasionalmente calamar (ver Métodos). Además del efecto crecimiento previamente analizado, el incremento de proteínas observado únicamente en los animales de cultivo pudo deberse directamente al incremento en la proporción de calamar, en contraste con los organismos silvestres que en el medio natural tienen una disponibilidad de alimento fresco con alto contenido proteico. Una explicación similar se puede dar para lípidos: el calamar representó una fuente adicional de lípidos para organismos de cultivo cuyos niveles de lípidos incrementaron, aunque sólo a los 60 días, posiblemente por una adaptación más lenta en cuanto a la asimilación de este macronutriente. Por lo contrario, los niveles de lípidos en hepatopáncreas disminuyeron en los organismos silvestres, indicando una deficiencia en la dieta con respecto al alimento disponible en el medio natural. Lo anterior

parece ser válido principalmente para fosfolípidos, dado que los triglicéridos no presentaron el mismo patrón, pero es difícil de explicar únicamente con estos resultados. En este sentido, hubiera sido interesante analizar más a fondo las diferentes clases de lípidos y el perfil de ácidos grasos. De cualquier manera, niveles más altos de lípidos en reproductores silvestres de *L. vannamei* también fueron reportados por Palacios *et al.* (2000), aunque en juveniles de *P. monodon* (O'Leary y Matthews, 1990) y *L. schmitti* (Jiménez *et al.*, 1995) se han reportado concentraciones más altas de lípidos neutros en organismos cultivados que en silvestres.

Para explicar las diferencias observadas en el nivel de lactato en el espermátforo, es necesario plantear primero que los espermatozoides de crustáceos, al igual que de muchos animales, dependen en buena medida del metabolismo anaerobio (Jeyalectumie y Subramoniam, 1987; 1991). De acuerdo a lo anterior, Ceballos-Vázquez (2003) observó una disminución de carbohidratos en el vaso deferente y el ámpula terminal, mas no en el espermátforo, en relación a la edad, efecto concomitante a un mayor desarrollo y por ende, de mayor producción de espermatozoides. Sin embargo, no se observó un incremento paralelo del lactato probablemente, porque éste era recirculado a través de la hemolinfa o por gluconeogénesis en estos mismos órganos (Ceballos-Vázquez, 2003). En este trabajo, si bien hubiera sido esperada una disminución de carbohidratos, esta no ocurrió por las posibles razones ya mencionadas anteriormente sobre un balance adecuado entre aporte y utilización de nutrientes. Si bien también hubiera sido esperada una acumulación de lactato, esta tampoco ocurrió posiblemente, porque en este caso también el metabolito fue recirculado. Con lo anterior es difícil entonces explicar por qué los machos silvestres al

inicio tienen niveles más elevados de lactato en términos de mayor producción o metabolismo de espermatozoides. Alternativamente, podemos considerar un intercambio libre entre la hemolinfa y el ámpula terminal y a su vez con el espermatóforo, con lo cual los niveles de lactato pudieran reflejar lo que ocurre en la hemolinfa. Dado que en varias situaciones de estrés ocurre un incremento de lactato en la hemolinfa (Racotta y Palacios *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2002), es posible que los niveles de este metabolito en los camarones silvestres simplemente reflejen la condición de estrés inicial la cual resultó ser más pronunciada que en organismos de cultivo, tal como se discutió en la sección anterior sobre los niveles de glucosa.

DISCUSIÓN GENERAL

El desempeño reproductivo, la calidad espermática, la supervivencia, y el estado de salud de los adultos de camarón mantenidos en locales de maduración, son afectados por las condiciones creadas en los laboratorios comerciales, al manejo que se emplee y a la condición fisiológica que presentan al inicio y durante un ciclo de producción. La adaptación de los camarones cualquiera que sea su origen, a las condiciones del local de maduración, donde existe un control artificial de todos los factores que influyen en su maduración y reproducción, es fundamental. Cuando se logran minimizar los factores que inhiben la conducta reproductiva y se estabilizan aquellos que la estimulen, es cuando podemos hablar de que se está empleando un manejo adecuado.

En el presente trabajo, al evaluar algunos factores del manejo que influyen en la condición fisiológica y calidad reproductiva de camarones blancos *L. schmitti* de diferentes orígenes y a lo largo de un ciclo de producción, pudimos corroborar que los animales están completamente adaptados al cabo de un mes de permanencia en el local de maduración, lo cual pudo observarse al analizar varios indicadores productivos (porcentaje de cópulas exitosas, porcentaje de huevos fertilizados, promedio de nauplios por desove); metabólicos (concentración total de proteínas y niveles de glucosa en la hemolinfa); inmunológicos (conteo total de hemocitos, actividad específica de fenoloxidasa, actividad hemoaglutinante), así como de calidad espermática (conteo total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos normales y vivos anormales, conteo de espermatozoides muertos).

Al final del ciclo de producción de 60 días, prácticamente todos los indicadores sugieren un desempeño reproductivo y una condición fisiológica y de salud pobre, observándose más acentuado en los camarones silvestres. En general, el patrón del desempeño reproductivo de los camarones fue decreciendo a lo largo el ciclo de producción, lo cual corresponde al fenómeno bien conocido del agotamiento reproductivo, reportado principalmente para las variables relacionadas con las hembras (ver revisión de Racotta *et al.*, 2003). Lo anterior corresponde con valores más bajos del conteo espermático total y del porcentaje de células espermáticas vivas normales, junto con valores más altos de espermatozoides muertos y la incidencia de espermátóforos melanizados más pronunciado en camarones silvestres.

Este declive en la capacidad reproductiva, también fue acompañado por un estado fisiológico deprimido de los animales reflejado por la disminución significativa del conteo total de hemocitos, de la actividad hemoaglutinante y los niveles de glucosa. Sin embargo, otros indicadores como la composición bioquímica del hepatopáncreas y del espermátóforo no sugieren alteraciones importantes posiblemente por tratarse de indicadores demasiado generales.

La presencia continua de hembras maduras transferidas a los tanques de machos durante el periodo experimental, nos hace descartar la posibilidad de un deterioro de la respuesta reproductiva y de la calidad espermática provocado por la no regeneración de los espermátóforos en los machos, lo cual fue reportado por (Alfaro y Lozano, 1993). Sin embargo, las altas temperaturas observadas al final del ciclo de producción pudieran explicar el declive de las variables medidas, observado principalmente para machos

silvestres. La mayor susceptibilidad de los camarones silvestres a las altas temperaturas se puede explicar por una pre-adaptación de los camarones de cultivo a estas condiciones que normalmente se presentan en los estanques donde son criados, en contraste a lo que sucede en mar abierto donde los parámetros abióticos son más estables. Por otro lado, el incremento del peso corporal en machos silvestres conjuntamente con la disminución de lípidos y niveles bajos de proteínas solubles en hepatopánceras, así como la disminución de los niveles de la proteína y de la glucosa en la hemolinfa, nos sugiere que estos animales estaban empleando gran parte de los nutrientes de sus reservas corporales y de la dieta suministrada en la nave de maduración, no solamente para la reproducción, sino también para su crecimiento, ambos procesos requieren mucha energía y movilización de las reservas para la síntesis de componentes específicos. Este doble uso de energía en el caso de los machos silvestres también puede explicar el agotamiento fisiológico más pronunciado en estos animales.

Por otro lado, otra causa de una condición fisiológica pobre al final del ciclo de producción, pudo haber sido la presencia de patógenos. Aunque no fue realizado un análisis de la presencia de estos en la hemolinfa, grandes cantidades de bacterias fueron observadas en la masa espermática de los machos después de 60 días, indicando que los animales hacían frente a una infección bacteriana general que podría dar lugar a alta actividad específica de fenoloxidasa y a un conteo total de hemocitos bajo. Aún debe ser analizado si la infección microbiana, junto con el agotamiento reproductivo, actúa de forma sinérgica para causar este estado o si el estado de estrés da lugar a una capacidad más baja de la inmunorespuesta permitiendo la aparición de la infección microbiana. En este contexto, la reproducción

continua representa una situación de estrés, que trae consigo un debilitamiento de los animales, una reducción de la respuesta inmune y de la resistencia de los animales a la invasión de bacterias patógenas que habitan el ambiente marino, según lo demostrado en otros estudios que determinaron situaciones de estrés en camarones (Le Moullac *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001; Perazzolo *et al.*, 2002).

Todos estos resultados indican que después de cierto período de tiempo bajo condiciones de cautiverio asociadas a una alta actividad reproductiva, los machos de *L. schmitti* parecen alcanzar un estado fisiológico deficiente, lo cual repercute en el porcentaje de cópulas exitosas, la calidad espermática y la viabilidad de los desoves, confirmándose la hipótesis planteada en este trabajo. Al comparar los diferentes indicadores reproductivos, metabólicos e inmunológicos entre machos de cultivo y silvestres mantenidos en cautiverio a lo largo de un ciclo de producción de 70 días, concluimos que con las condiciones de manejo establecidas en el laboratorio, los camarones silvestres resultaron ser más susceptibles al agotamiento reproductivo y al estrés crónico que los camarones de cultivo. Por otro lado, los machos de cultivo son más recomendables para los productores de camarón de esta especie, aunque deben ser sustituidos después de dos meses de producción.

Sin embargo, como el propósito del presente trabajo fue realizar estudios que ayudasen a analizar los factores que pueden ocasionar en los machos adultos de camarón *L. schmitti* un bajo desempeño reproductivo y condición fisiológica pobre, es por ello que se proponen más adelante recomendaciones a los laboratorios comerciales que tengan o quieran implementar el cultivo de esta especie y a investigadores vinculados a los procesos

productivos, de manera que puedan alargar el tiempo de vida útil de los animales mantenidos en los locales de maduración.

CONCLUSIONES

El desempeño reproductivo de adultos de camarón de cultivo *Litopenaeus schmitti* fue similar en tanques de maduración unisexo y mixto. El indicador productivo porcentaje de cópulas exitosas, fue significativamente mayor en la cuarta semana ($> 90 \%$) de permanencia de los animales de cultivo en la nave, independientemente del sistema de maduración empleado.

Al mes de permanencia en el local de maduración, los machos de camarón de cultivo y silvestres, alcanzaron una condición fisiológica e inmune óptima, asociada a su adaptación a estas condiciones. Mientras que a partir de los dos meses el declive en el desempeño reproductivo y calidad espermática, fue acompañado por un fuerte deterioro de la condición metabólica e inmunológica, siendo más acentuado para animales silvestres.

El estado fisiológico pobre de los animales al final del periodo evaluativo, fue provocado por un agotamiento reproductivo como resultado de una alta actividad reproductiva, que conjuntamente con altas temperaturas (30°C) y la presencia de patógenos, conllevó a una capacidad de inmunorespuesta baja, mucho más pronunciada en machos silvestres.

El aumento del peso corporal de los reproductores silvestres durante el ciclo reproductivo, indica que emplearon gran parte de nutrientes para los procesos metabólicos de crecimiento y reproducción, lo cual conllevó a un mayor desgaste fisiológico.

Los camarones silvestres fueron más susceptibles al estrés inducido por la manipulación humana, por las altas temperaturas y por las condiciones empleadas en el local de maduración. Por otro lado, los resultados indican que los camarones de cultivo son más tolerantes a las condiciones de laboratorio

RECOMENDACIONES

1. Priorizar el uso de reproductores de cultivo para garantizar una producción estable de postlarvas, ya que los silvestres son más susceptibles a la manipulación humana y a las condiciones de cautiverio en periodos reproductivos largos.
2. Aunque no se presentaron diferencias entre los sistemas de maduración (unisexo y mixto), se debe profundizar en estudios que comparen ambos sistemas por un periodo productivo más prolongado, donde se relacionen indicadores reproductivos, metabólicos e inmunológicos que nos permitan evaluar la condición fisiológica y calidad reproductiva de los animales, para corroborar las ventajas y desventajas de ambos sistemas de maduración.
3. Realizar estudios de tiempos de aclimatación (una vez que son transferidos al local de maduración) y de recuperación (cuando comiencen los primeros signos de deterioro) de los machos.
4. Analizar si la infección microbiana, junto con el agotamiento reproductivo, actúa de forma sinérgica para causar un estado fisiológico de total estrés en los animales o si el estrés da lugar a una capacidad de inmunorespuesta más baja propiciando la aparición en los animales de una infección microbiana.
5. Realizar estudios de aspectos bioquímicos y de requerimientos nutricionales en machos adultos de *L. schmitti*, donde a su vez se evalúe la influencia de factores biológicos y ambientales que puedan incidir en el proceso de reproducción de esta especie.

6. Profundizar en estudios metabólicos de los machos de esta especie, dirigidos a la evaluación de las variaciones de la composición bioquímica en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas, ya que son fuentes de diferentes componentes necesarios para el proceso reproductivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama, D., Chiang, N., 1993. Requerimientos nutricionales del camarón y manejo del alimento. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, Mendoza Alfaro, R.(eds). Memorias del 1er. Symposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Monterrey, México, 479-491.
- Alfaro, J., 1990. A contribution to the understanding and control of the male reproductive system melanization disease of broodstock *Penaeus setiferus*. A Thesis Master Science, Texas A & M University, 64 pp.
- Alfaro, J., 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. J. World Aquacult. Soc. 24: 6-11.
- Alfaro, J., 1994. Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda:Penaeidae). Rev. Biol. Trop.42: 121-129.
- Alfaro, J., 1996. Effect of 17 α -Methyltestosterone and 17 α -Hydroxyprogesterone on the quality of white shrimp *Penaeus vannamei* spermatophores. J. of the World Aquacul. Soc. 27: 487- 492.
- Alfaro, J., Lozano, X., 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 24: 522-529.
- Álvarez, J., Galindo, J., Jaime, B., Anderes, B., Pelegrin, E., 1996. Empleo de diferentes niveles de proteína en dietas prácticas para el engorde del camarón *Penaeus schmitti* en estanques de tierra. Rev. Cub. Invest. Pesq. 20: 35-39

- Anderes, B., 1982. Composición de la base alimentaria de camarones comerciales del género *Penaeus* y su relación con la meiofauna. *Rev. Cub. Invest. Pesq.* 7: 77-93.
- Anderes, B., 1984. Espectro alimentario de los camarones rosado y blanco (*Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*) en la Ensenada de La Broa. *Rev. Cub. Invest. Pesq.* 8: 51-64.
- Aquacop. 1977. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon* Fabricius in Polynesia. *J. World Maricult. Soc.*, 8: 927-945.
- Aquacop. 1979. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 445-452.
- Aquacop. 1983. Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching for penaeid shrimps in the Center Oceanologique du Pacifique, En: J.P. McVey (ed), *CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture* (1):105-121.
- Arcos, G., F., Ibarra, A.M., Palacios, E., Vázquez-Boucard, C., Racotta, I.S., 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: eggs quality and female physiological condition. *Aquaculture* 228: 335-349.
- Artiles, M. A., Regueira, E., Pérez-Jar, L., 1999. Maduración y reproducción de *Penaeus schmitti* utilizando hembras ablacionadas y no ablacionadas bajo iluminación natural. *Rev. Invest. Mar.* 20: 93-102.
- Autrand, M., Lucien-Brun H., 1998. Técnicas de producción de progenitores de camarón en cautiverio. La experiencia francesa. *Panorama Acuícola.* 3: 15-16.
- Bachere, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191: 3-11.

- Barnes, H., Blackstock J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 12: 103-118.
- Bécquer, U., Ramos, L., Betancourt, A., 1994. Respuesta reproductiva de *Penaeus schmitti* a los siete y nueve meses de edad. Rev. Invest. Mar. 15: 256-261.
- Berger, C., 2001. Aportes de la Biotecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones. Panorama Acuícola 6: 8-10
- Betancourt, A., Ramos, L., Tamayo, A., Carballo, N., Bécquer, U., Torres, M., 1994. Calidad de la esperma de *Penaeus schmitti* en condiciones de cautiverio. Rev. Invest. Mar. 15: 251-255.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Bioch. 72: 248-253.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., 1984. Sourcing *Penaeus setiferus*: a summary of larval production, incidence of capture of mated females, and mating incidence by time of day on research cruises 1981-1983. J. World Maricul. Soc. 15:11-28.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Lester, L.J., 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. J. World Aquacult. Soc. 21: 41-52.
- 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*. J. World Maricult. Soc. 16: 250-257.

- Bray, W.A. Lawrence, A.L., 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. 93-173
En: Fast A. W. y Lester L. J. (Eds). Marine shrimp culture: Principles and practices.
Elsevier Science Publishers. Saint Louis
- Brisson, S., 1986. The mating of *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967 (Decápoda,
Penaeidae). Crustaceana 50: 108-110.
- Browdy, C. L., 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production
technologies: improving the outlook for superior captive stocks. Aquaculture 164: 3-
21.
- Browdy, C. L., 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species:
Perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii
production pp: 22-51. En: J.A. Wyban, editor. Proceeding of the Special Session on
Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Browdy, C., Samocha, T.M., 1985. Maturation and spawning of ablated and nonablated
Penaeus semisulcatus de Hann. Aquaculture, 49:19-29.
- Browdy, C.L., Hadani, A., Samocha, T.M., Loya, Y., 1986. The reproductive
performance of wild and pond-reared *Penaeus semisulcatus* De Haan. Aquaculture,
59: 251-258.
- 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. J. Appl. Aquacult. 6: 11-25.
- Brown, A. Jr., Tave, D., Williams, T.D., Duronslet, M.J., 1984: Production of second
generation penaeid shrimp *P. stylirostris* from México. Aquaculture 41: 81-84.

- Bueno, S. L. de S., 1989 Fechamento do ciclo de vida do Camargo branco *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 (Crustacea, decapada, Penaeidae) sob condicoes de cultivo em escala comercial. Doctoral dissertation. Sao Paulo University, Brazil.
- Bueno, S. L. de S., 1990. Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large-scale reared conditions. J. World Aquacult. Soc. 21: 170-179.
- Cahu, C., Cuzon, G., Quazuguel, P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 112A: 417-424.
- Cárdenas, M. F., 1952. Descripción del espermatóforo de *Penaeus stylirostris* (Stimpson). Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, 13: 35-43.
- Castille, F. L., Lawrence, A. L., 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* (Ives) and *P. setiferus* (L.). J. Crust. Biol. 9: 201-211.
- Cavalli, R.O., Scardua, M.P., Wasielesky, Jr. W., 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. J. World Aquacult. Soc. 28: 260-267.
- Chamberlain, G.W., Lawrence, A.L., 1981. Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. J. World Maricult. Soc. 12: 209-224.
- Chamberlain, G.W., Sterling, G., Johnson, K., Lewis, D.H., 1983. Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult penaeid shrimp. J. World Maricult. Soc. 14:135-136.

- Chow, S., Dougherty, M. M., Dougherty, W. J., Sandifer, P.A., 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. J. Crustac. Biol., 11: 201-216.
- Ceballos-Vázquez, B. P., 2003. Evaluación el potencial reproductivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en condiciones de domesticación. Trabajo de Tesis para obtener el grado de Dr. en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., La Paz, México. 160 pp.
- Ceballos-Vázquez, B. P., Aparicio-Simón, B., Palacios, E., Racotta, I.S., 2004. Sperm quality over consecutive spermatophore regenerations in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. World. Aquacult. Soc. 35: 178-188.
- 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: 141-151.
- Cedeño, R., Valenzuela, E., Rodríguez, J., 2000. Efectores inmunitarios como marcadores de deficiencias nutricionales en dietas para *Litopenaeus vannamei*. Panorama Acuícola, 5: 42-44
- Crocós, P. J., Coman, G. J., 1997. Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimising broodstock selection, Aquaculture 155: 55-67.
- Díaz, F. R., Mato, J., Espinosa, G., Santana, O., Berovides, V., 1994. Distancia y variabilidad genética entre poblaciones del camarón blanco *Penaeus schmitti*. III Congreso de Ciencias del Mar, 15-18 Febrero, C. Habana, Cuba. [resumen]

- Ding – Meili, Lin-Lin, Li-Guangyou, Zhu-Jinzhaoh. 1997. Effects of organic pollution on *Penaeus chinensis* body's intraenvironment and external environment. Oceanol.-Limnol.-Sin.-Haiyang-Yu-Huzhao 28: 7-12
- Espinosa, G., Rodriguez-Ramos, T., Ramos, L., Marrero, J., Borrell, Y., Bécquer, U., Nodas, F., Hernández, N. D., 2002. Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, CIVA 2002. Disponible en URL: <http://www.civa2002.org>, pp. 765-777
- Fingerman, M., 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. J. Crustacean Biol. 7: 1-24.
- Galgani, M.L., Cuzon, G., Galgani, F., Goguenheim, J., 1989. Influence du régime alimentaire sur la reproduction en captivité de *Penaeus indicus*. Aquaculture 81: 337-350.
- Galindo, J., Fraga, I., Álvarez, J.S., Reyes, R., González R. Cartaza, R., 1992a. Requerimientos proteicos en juveniles de camarón blanco *Penaeus schmitti*. Rev. Cub. Inv. Pesqu. 17: 47-57.
- Galindo, J., Álvarez, J. S., Fraga, I., Reyes, R., Jaime, B., Fernández, I., 1992b. Influencia de los niveles inclusión de lípidos en dietas para juveniles de camarón blanco *P. schmitti*. Rev. Cub. Invest. Pesq. 17:23-36.
- García, T., Gaxiola, G., Jaime, B., 1990. Effects of protein energy ratios on the growth and survival of *Penaeus schmitti*. World Aquaculture 90, Res. Halifax, Canada. 61 pp.
- Garza-Aguirre, M., Aguirre-Hinojosa, E., 1999. Reproducción en cautiverio de camarones peneidos, pp: 39-65. En: Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y Prácticas, A.G.T. (editor), S. A., México. 283 pp.

- Gibson, R., Baker, P.L., 1979. The decapoda hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17: 285-346.
- Gomes, L.A.O., Honculada-Primavera, J., 1993. Reproductive quality of male *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 112: 157-164.
- Griffin, F.J., Jr. Clark, W.H., Crowe, J.H., Crowe L. M., 1987. Intracellular pH decreases during the in vitro induction of the acrosome reaction in the sperm of *Syconia ingentis*. *Biological Buletin* 173: 311-323.
- Guitart, B., González, E., Reyes, R., Fraga, I., 1985. Descripción del aparato reproductor masculino de *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. *Rev. Cub. Inv. Pesq.* 10: 41-58.
- Hall, M.R., van Ham, E. H., 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World. Aquacult. Soc.* 29: 290-299.
- Harrison, K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of Decapod Crustaceans: a review. *J. Shellfish. Res.* 9: 1-28.
- Heitzmann, J. C., Diter, A., Aquacop .1993. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture* 116: 91-98.
- Herbert, W., 1973. Hemagglutination. En: *Handbook of experimental immunology* (D.M. Wein, ed.), Vol. I, Segunda Edición, 20.1-20.16.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 61-66.

- Huberman, A., 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191: 191-208.
- Hudinaga, M., 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. *Jap. J. of Zool.* 10: 305-393.
- INFOFISH. 2004. Elementos do Mercado Mundial de Camarão. Revista da ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camargo. Ano 6., 28p.
- Jeyalectumie, C., Subramoniam, T., 1987. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Partelphusa hydrodromous* (Herbst). *Exp. Biol.* 46: 231-236.
- Jeyalectumie, C. Subramoniam, T., 1991. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference to sperm metabolism and storage in the female. *Molec. Reprod. Develop.* 30: 44-55.
- Jiménez, M.A., García, E., Gandonou, G., Oliva, M., 1995. Metabolismo lipídico del hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* en cultivo y del medio natural. *Rev. Invest. Mar.* 16: 157-164.
- King, J.E., 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull.* 94: 244-262.
- Kleinholz, L. H., Keller, R., 1979. Endocrine regulation in crustacea. In: *Hormones and evolution*. E. J. Barrington (Editor), Academic Press, New York, pp. 159-213.
- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in the marine prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture* 18: 373-377.

- Laufer, H., Ahl, J.S.B., Sagi, A., 1993. The role of juvenile hormone in crustacean reproduction. *Amer. Zool.* 33: 365-374.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D. J., Avarre, C., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol.* 8: 621-629.
- Lee, M. H., Shiau, S.Y., 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 12: 119-129.
- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1985. The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *J. World Maricult. Soc.* 16: 258-266.
- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1987a. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65: 363-370.
- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1987b. Spermatophore regeneration times for three commercially important penaeid species: *Penaeus stylirostris*, *Penaeus vannamei* and *Penaeus setiferus*. *J. World Aquacult. Soc.* 18: 32A (Abstract 127).
- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1988. The effect of ascorbic acid on sperm and spermatophore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. *J. World Aquacult. Soc.* 19: 46A.
- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1991. Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei* and *P. stylirostris*. *J. World Aquacult. Soc.* 22: 244-251.

- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, G., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C., 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224: 223-243.
- Malek, S. R. A., Bawab, F. M., 1974. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forskál, 1775) (Decapoda, Penaeidae). II. The deposition of the main layers of the body and of the wing. *Crustaceana* 27: 73-83.
- Marangos, C., Ramos, L., Oliva, M., 1988. Variations des teneurs en acides aminés libres de l'ovaire, de l'hépatopancréas et de l'hémolymphe, de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 97: 95-106.
- Marangos, C., Ramos, L., Oliva, M., 1989. Variations des teneurs en protéines de l'hémolymphe, de l'hépatopancréas et de l'ovaire de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 96: 179-190.
- Medina, A., Vila, Y., Mourente, G., Rodríguez, A., 1996. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forskál, 1775). *Aquaculture* 148: 63-75.
- Menasveta, P., Choosuwap, J., Piyatiratitivorakul, S., Fast, A., Latscha, T., 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). En: *The Third Asian Fisheries Forum* (Chou, L.M., Munro, A.D., Lam, T.J., Chen, T.W., Cheong, L.K., Hooi, K.W., Phang, V.P.E. & Tan, C.H., eds), pp. 713-716. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

- Menasveta, P., Chaiyanetr, N., Piyatiretitivorakul, S., Kittakoop, P., 1995. Dietary prophylaxis against yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). En: Shrimp Biotechnology in Thailand (Flegel, T.W., Menasveta, P. & Paisarnrat, S., eds), pp. 61-70. NSTDA, Bangkok, Thailand.
- Mendoza, R., 1997. Nauplii production from wild, cultivated, and mixed populations of blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. J. Appl. Aquac. 7: 41-50.
- Meyers, S. P., Latscha, T., 1997. Carotenoids. In: Crustacean Nutrition (D'Abramo, L., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M., eds), 6: 164-193. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Miki, W., Otaki, N., Shimidzu, N., Yokohama, A., 1994. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. J. Mar. Biotechnol., 2: 35-37.
- Missamore, M. J., Browdy, C. L., 1996. Mating behavior in the white shrimp *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei*: A general model for mating in *Penaeus*. J. of the Crus. Biol. 16: 61-69.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodriguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachere, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 191:89-107.
- Naessens, E., Lavens, P., Gomez, L., Browdy, C.L., McGovern-Hopkins, K., Spences, A.W., Kawahigashi, D., Sorgeloos, P., 1977. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. Aquaculture, 155: 87-101.
- Nascimento, L. A., Bray, W.A., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1991. Reproduction of ablated and unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of fresh-frozen natural and dried formulated feeds. Aquaculture 99: 387-398.

- Newman, S.G., Bullis, R.A., 2001. Immune mechanisms of shrimp: form, function and practical application. Craig L. Browdy and Darryl E. Jory, (eds). The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Banton Rouge, LA USA.
- Noga, E.J., 2000. Hemolymph biomarkers of crustacean health. Recent Advances in Marine Biotechnology, 5: 125-163
- Ottogalli, L., Galinie, C., Goxe, D., 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* over ten generations in New Caledonia. J. Aquacult. Trop. 3: 111-125.
- Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture, 185: 353-371.
- Palacios, E., Ibarra, A. M., Ramírez, J., Portillo, L.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. Aquacult. Res. 29: 183-189.
- Palacios, E., Racotta, I.S., 2002. Reproducción de camarón: Un punto de vista fisiológico. pp: 43-81. En: Camaronicultura Avances y tendencias. AGT Editor, S. A., México, 167pp.
- Palacios, E., Pérez-Rostro, C. I., Ramirez, J. L., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 1999a. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. Aquaculture, 171: 309-321.

- Palacios, E., Carreño, D., Rodríguez-Jaramillo, C., Racotta, I.S., 1999b. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of white pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, Broodstock. *J. Appl. Aquacult.* 9: 1-23.
- Palacios, E., Racotta, I.S., APSA.1999c. Spawning frequency analysis of wild and pond-reared pacific white shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 30: 180-191.
- Palacios, E., Racotta, I.S., Heras, H., Marty, Y., Moal, J., Samain, J – F., 2001. Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture International* 9: 531-543.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., 2003a. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218: 637-650
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L.A., Rosas, C., 1998. Effect of water temperatura on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World. Aquacult. Soc.* 29: 447-484.
- Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C., 2003b. Blood metabolitos and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 142: 735-745.
- Paterson, B.D., 1993. The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid praws (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 395-400.

- Paterson, W.D., Stewart, J.E., Zwicker, B.M., 1976. Phagocytosis as cellular immune response mechanisms in the American lobster, *Homarus americanus*. J. Invertebr. Pathol. 27: 95-104.
- Peixoto, S., Wasielesky, Jr. W., D'Incao, F., Cavalli, R., 2003. Comparison of the reproductive performance of similar-sized wild and captive *Farfantepenaeus paulensis*. J. World Aquacult. Soc. 34: 50-56.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A.A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture 214: 19-33.
- Pérez-Farfante, I., 1975. Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. Fishery Bulletin, United States 73: 463-486.
- Pérez-Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world, keys and diagnoses for the species and genera. Mémoires Muséum National d'Histoire Naturelle, Zoologie, Tome 175: 235 pp.
- Pérez-Jar, L., 1996. Obtención de progenitores de cultivo del camarón blanco *Penaeus schmitti* a escala comercial. Trabajo de Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Marina. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, 44 pp.
- Pérez-Jar, L., Ramos, L., 1992. Determinación de la proporción de sexos del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en tanques de maduración inducida para el incremento de la cópula natural. Rev. Invest. Mar. 13: 167-172.

- Pérez-Jar, L., Jaime, B., 1995. Respuesta reproductiva de progenitores de *Penaeus schmitti* al utilizar machos de diferentes edades de cultivo. Rev. Invest. Mar., 16: 69 - 73.
- Pérez-Jar, L., Jaime, B., García, T., 1996. Efecto de dietas pelletizadas en la respuesta reproductiva de progenitores de *Penaeus schmitti*. Rev. Invest. Mar. 17: 221-227.
- Pérez-Jar, L., Samada, S., Espejo, M., 1997. Producción y empleo de cuatro generaciones parentales del camarón blanco *Penaeus schmitti* en ciclo cerrado. Rev. Invest. Mar. 17: 169-177.
- Pérez-Velazquez, M., Lawrence, A.L., Gatlin III, 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 setiferus* (Boone) broodstock. Aquacult. Res. 33: 1091-1095.
- Pérez-Velazquez, M., Bray, W. A., Lawrence, A. L., Gatlin III, D.M., González-Félix, M. L., 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 198: 209-218.
- Pérez-Velazquez, M., González-Félix, M. L., Lawrence, A. L., Bray, W. A., Gatlin III, D.M., 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. J. World Aquacult. Soc., 34: 92-98.
- Pillary, K.K., Nair, N. B., 1973. Observations on the biochemical changes in the gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus*, and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. Mar. Biol. 18: 167-198.
- Pratoomchat, B., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Fast, A.W., 1993. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. J. World. Aquacult. Soc. 24: 530-540.

- Preston, N.P., Brennan, D.C., Crocos, P.J., 1999. Comparative costs of postlarval production from wild or domesticated Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), broodstock. *Aquacult. Res.* 30: 191-197.
- Primavera, J. H., 1978. Induced maturation and spawning in five month old *Penaeus monodon* by eyestalk ablation. *Aquaculture* 13: 355-359.
- Primavera, J. H., 1983. Broodstock of sugpo *Penaeus monodon* Fabricius. Southeast Asian Fisheries Development Center, Extension Manual 7. Aquaculture Department SEAFDEC, Iloilo, Philippines. 26 pp.
- Primavera, J. H., 1985. A review of maturation and reproduction in closed thelicum penaeids. En: Proc. of the First Intl. Conf. on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Taki, Y.P. et al. (Eds). Aquaculture Department SEAFDEC, Iloilo, Philippines. 47-64.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World. Aquacult. Soc.* 29: 351-356.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A. M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227: 107-130.
- Racotta, I. S., Palacios, E., Méndez, L., 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 35: 269-275.
- Ramos, L., 1990. Fecundación artificial del camarón blanco *Penaeus schmitti*: Fecundidad y viabilidad de los desoves. *Rev. Invest. Mar.* 11: 157-166.

- Ramos, L., Vázquez-Boucard, C., Oliva, M. García, E., Fernández, I., 1996. Variations in the total lipids content, lipids and fatty acids class during the ovarian maturation in the *Penaeus schmitti* and *P. notialis*. Rev. Invest. Mar. 17: 157-165.
- Ramos, L., Molina, J. M., Pérez, L., Torres, B., 1994. Maduración, reproducción y desove de *Penaeus schmitti* bajo diferentes condiciones. Rev. Invest. Mar. 15: 28-38.
- Ramos, L., Primavera J.H., 1986. Induced maturation in ablated *Penaeus notialis* and *Penaeus schmitti*. En: The First Asian Fisheries Forum, (J.L. Mc Lean, L.B. Dizon y L.V. Hosillos, eds.), Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp: 667-700.
- Ramos, L., Espejo, M., Samada, S., Pérez-Jar, L., 1995. Maturation and Reproduction of Pond - Reared *Penaeus schmitti*. J. World Aquacult. Soc., 26: 183-187.
- Ramos, L., Cano, M., 1981. Estudio de algunos aspectos relacionados con el metabolismo glucídico de las especies *Penaeus notialis* (Farfante, 1967) y *Penaeus schmitti* (Burkenroad, 1936). Rev. Invest. Mar. 1: 116-141.
- Ramos, L., Gesteira, T. C., 1997. Manual: Reproducción controlada de camarones peneidos. Grupo de estudios de camarones marinos (GECMAR). 67pp.
- Ramos, L., García, T., 1992. Maduración y reproducción de *Penaeus schmitti* utilizando como complemento de la alimentación diferentes dietas pelletizadas. Rev. Invest. Mar. 13: 159-166.
- Richardson G.H., Deccaraman, M. Fingerman, M., 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. 99C: 53-56.
- Robertson, L., Bray, W., Lawrence, A., 1991. Reproductive response of *Penaeus stylirostris* to temperature manipulation. J. World Aquacult. Soc. 22: 109-117.

- Rodríguez, J., 1996. Estado del Arte de la Investigación Científica en Inmunología de Penaeidos. Taller de Trabajo. La investigación científica en Penaeidos de Ibero América, 10-14 junio, pp: 37-45.
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M.A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Rodríguez-Ramos, T., 2003. Evaluación de cuatro efectores de la respuesta inmune innata en condiciones de estrés, en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. Tesis en opción al grado de Maestro en Biología Marina y Acuicultura, Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Julio 2003, 72pp.
- Rodríguez-Ramos, T., Borrell, Y., Ramos, L. Bécquer, U., Espinosa, G., 2001a. Actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. Rev. Invest. Mar. 22: 229-234.
- Rodríguez-Ramos, T., Borrell, Y., Ramos, L., Bécquer, U., Espinosa, G., 2001b. Aplicación de la actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. Rev. Invest. Mar. 22: 235-240.
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A. L., 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3. J. Crust. Biol. 10: 455-468.

- Rosas, C., Sánchez, A., Chimal, M., Saldaña, E. G., Ramos, L., Soto, L. A., 1993. The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp *Penaeus setiferus*. *Aquatic Living Resource* 6: 1-6.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., Wormhoudt, A.V., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249: 181-198.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Wormhoudt, A. V., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 47-67.
- Rosas, C., Cooper, L., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A., 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Mar. Biol.* 145: 401-413.
- Rosenberry, B., 2004. *World Shrimp Farming 2004. An annual report.* Bob Rosenberry, editor, Shrimps News International, USA, 276 pp.
- 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: 13-28.
- Sandifer, P. A., Lawrence, A. L., Harris, S. G., Chamberlain, G. W., Stokes, A. D., Bray, W. A., 1984. Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp, *Penaeus* spp. *Aquaculture* 41: 181-187.

- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1996. In vitro inhibition by dopamine of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Experientia* 52: 707-709.
- Sasikala, S. L., Subramoniam, T., 1987. On the occurrence of acid mucopolysaccharides in the spermatophores of two marine prawns, *Penaeus indicus* (Milne-Edwards) and *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) (Crustacea: Macrura), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 133: 145-153.
- Shigekawa, K., Clark, Jr. W.H., 1986. Spermiogenesis in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Growth Different.* 28: 95-112.
- Smith, V. J., Soderhall, K., 1983. Induction of desgranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.*, 133: 295-303.
- Soderhall, K., Thorquist, O., 1997. Crustacean immunity-A short review. Gudding R. (eds): *Fish Vaccinology*. *Dev. Biol. Stand. Basel*, Karger. 90: 45-51.
- Soderhall, K., Cerenius, L., Johansson, M.W., 1994. The proPO system and its role in invertebrate defense. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 712: 155-161.
- Tacon, A., Cruz-Suárez, E., 1999. Gestión de la Acuicultura "Alimentación y Nutrición". En: *Acuicultura Sostenible: Desarrollo y Comercio*. Lima, Perú, 9-11 Junio, 1999. 36pp.
- Talbot, P., Howard, D., Leung-Trujillo, J.R., 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: 365-377.

- Tamame, M. T., 1987. Electroeyaculación y tiempo de regeneración del espermatóforo del camarón blanco *Penaeus schmitti*. Tesis para obtener el Título de Licenciatura en Biología General, Universidad de Oriente, Cuba, 63 p.
- Tirmizi, N.M., Javed, W., 1976. Study of juveniles of *Metapenaeus stebbingi* Nobili (Decapoda, Penaeidae) with particular reference to the structure and development of the genitalia. *Crustaceana* 30: 55-67.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analyt. Biochem.* 11: 256-265.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2000. B-glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191:13-21.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A., Ochoa, J.L., 1992. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp *Penaeus californiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.
- Vázquez-Boucard, C.G., Patrois, J., Ceccaldi, H.J., 2004. Exhaustion of lipid reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. *Aquaculture*, 236: 523-537.
- Vicent, M., Ramos, L., Oliva, M., 1988. Variations qualitatives et quantitatives des pigments caroténoïdes dans l'ovaire, et l'hépatopancréas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* 96: 155-164
- Wang, Q., Misamore, M., Jiang, C. Q., Browdy, C.L., 1995. Eggs water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: Dietary effects on sperm quality. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 261-271.

- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202: 1-21.
- Wyban, J., Chang, R., Sweeney, J., 1990. Selective breeding for reproductive quality in marine shrimp. *World Aquacult. Soc. 21 st. Ann. Conf.* p.76. [abstract]
- Yano, I., 1993. Ultraintensive culture and maturation in captivity of penaeid shrimp. pp: 290- 313 En: *CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture, 2nd Edition, Volumen I*, Mc.Vey, J.P. (Editor), Boca de Raton, USA, 313pp.
- Yano, I., Kanna, R. A., Oyama, R. N., Wyban, J. A., 1988. Mating behavior in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 97: 171-175.
- Yashiro, R., Na-anant, P., Dumchum, V., 1998. Effect of Methyltestosterone and 17 α -Hydroxyprogesterone on spermatogenesis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fab. En: Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.