

**Universidad Nacional  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Escuela de Ciencias Biológicas  
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Marinos y  
Dulceacuícolas**

**Informe Escrito Final**

**Evaluación de la inducción directa a la maduración ovárica y liberación de feromonas sexuales en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) mediante el uso combinado del neurotransmisor serotonina y el antagonista de la dopamina espiperona como técnica alternativa a la ablación ocular.**

**Proyecto de graduación presentado como requisito para optar al grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Marinos y Dulceacuícolas**

**Isabel Quesada Ávila: 116670763, 164806**

**Campus Omar Dengo  
Heredia, Costa Rica, 2023**

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Manejo de Recursos Marinos y Dulceacuícolas.

ANGEL FRANCISCO HERRERA ULLOA (FIRMA) Firmado digitalmente por ANGEL FRANCISCO HERRERA ULLOA (FIRMA) Fecha: 2023.08.07 07:29:35 -06'00'

Dr. Ángel Herrera Ulloa

Representante, Decano, quién preside

JONATHAN CHACON GUZMAN (FIRMA) Firmado digitalmente por JONATHAN CHACON GUZMAN (FIRMA) Fecha: 2023.08.07 19:04:41 -06'00'

M.Sc. Jonathan Chacón Guzmán

Representante de la Dirección

JORGE ENRIQUE ALFARO MONTOYA (FIRMA) Firmado digitalmente por JORGE ENRIQUE ALFARO MONTOYA (FIRMA) Fecha: 2023.08.07 08:09:03 -06'00'

Dr. Jorge Alfaro Montoya

RODOLFO TUTUMBA UMAÑA CASTRO (FIRMA) Firmado digitalmente por RODOLFO UMAÑA CASTRO (FIRMA) Fecha: 2023.08.07 08:18:54 -06'00'

M.Sc. Rodolfo Umaña Castro

Asesor

André Luiz Braga de Souza Firmado digitalmente por André Luiz Braga de Souza Fecha: 2023.08.09 12:20:06 -07'00'

Dr. André Luiz Braga de Souza

Asesor

Misael Rosales Leija Firmado digitalmente por Misael Rosales Leija Fecha: 2023.08.09 12:20:36 -07'00'

Dr. Misael Rosales Leija

Invitado especial

## Resumen

La ablación ocular es una técnica utilizada en la reproducción de crustáceos, siendo a su vez perjudicial para los organismos. Se han investigado técnicas alternativas para estimular la maduración sexual en especies comerciales. Este trabajo tiene como objetivo verificar el uso combinado de la serotonina y la espiperona, como técnica efectiva para la maduración ovárica en hembras de *Litopenaeus vannamei* y evaluar su posible efecto en la liberación de feromonas sexuales inductoras a la maduración ovárica. Se utilizaron tres tanques experimentales con reproductores hembras y machos. Cada tanque dispuso de 70 organismos: 20 hembras tratadas, 20 hembras control y 30 machos. Los tanques 1 (T1) y 2 (T2) presentaron 20 hembras inyectadas con serotonina y espiperona a dos concentraciones y el tanque (T3) presentó 20 hembras ablacionadas. Con las hembras control, se observó el efecto indirecto de los tres tratamientos en la inducción a la maduración sexual. Se analizó el estado de madurez sexual de las hembras calculando el índice de maduración ovárica (IMO). Se evaluó la calidad de desove de cada hembra fecundada por los machos contabilizando el número total de huevos y nauplios y el porcentaje de eclosión. Se obtuvo una maduración sexual en las hembras de los tres tratamientos y sus controles. El T2 obtuvo el valor máximo del IMO en las hembras control y el T3 obtuvo el valor mínimo en las hembras control. Los IMO promedio entre las hembras tratadas y las hembras control del T2 y el T3 mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Para la calidad del desove, en los T1 y T2 registraron la mayor cantidad de apareamientos en las hembras no inyectadas (control). Se mostró la efectividad en la maduración ovárica de las hembras control, lo que da un primer paso a la aceptación de la presencia y liberación de feromonas sexuales inducidas por la inyección de serotonina y espiperona en esta especie.

## **Agradecimiento**

A la Universidad Nacional y a la Vicerrectoría de Investigación por la ayuda económica brindada mediante el Fondo para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles en Investigación (FOCAES) y en especial a doña Gabriela Pino Chacón y a don Jorge Herrera Murillo, por su anuencia a colaborar en cada una de las solicitudes de apoyo económico requeridas para la realización de este trabajo de investigación.

A mi comité asesor conformado por el M.Sc. Rodolfo Umaña Castro y el Dr. André Luiz Braga de Souza, y mi tutor el Dr. Jorge Alfaro Montoya por su dedicación y compromiso con esta investigación. Cada aporte que cada uno realizó fue clave para el desarrollo y la culminación de este trabajo de graduación.

A mi tutor el profesor Jorge Alfaro Montoya, por todos sus conocimientos en crustáceos y en esta hermosa rama de la ciencia que llamamos Biología, que por medio de este trabajo me fueron guiando en la exploración y el entendimiento de estos organismos y me permitieron descubrir la belleza que estos invertebrados marinos esconden. De igual forma, quiero agradecerle por su atención y comprensión en las circunstancias que se fueron presentando en el transcurso de este proyecto, que mostraron tanto su calidad profesional y como humana.

A Marvin Ramírez Alvarado por su trabajo indispensable realizado en la preparación y ejecución de la etapa experimental de la investigación.

A la estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richard por brindarme las condiciones idóneas para realizar este trabajo de investigación, a don Henry Enríquez Araya y a don Orlando Chavarría Calvo. Y un especial agradecimiento a Inés Lostalo Sancho y Rebeca Quesada Céspedes por su apoyo y compañía durante mi trabajo de laboratorio en la estación.

Al profesor Jorge Boza Abarca por facilitarnos el material y espacio de laboratorio y por la posibilidad de mostrar los avances del trabajo durante su realización.

A mi colega Ian Portuguese Brenes por su colaboración en la toma y procesamiento de datos, así como en las tareas de mantenimiento del laboratorio. A Johnny Mendoza Vargas por su trabajo de asistencia en el laboratorio.

A mi padre Gabriel, por regalarme su amor a la vida y a la biología.

A mi madre Marta, por su apoyo incondicional.

A mi hermana Gabriela, por siempre estar presente en los momentos más difíciles.

A la vida y al Universo por regalarnos siempre nuevos misterios por resolver.

## Dedicatoria

A mi hermana Gabriela.

A todo aquel, toda aquella y tode aquello que algún día quiera entender esta pequeña aventura que llamamos vida.

Carlos Jaén Hernández, *in memoriam*.

"En el nombre de la Naturaleza, del Arte y de la Ciencia"

*Béla Bartók*

# Índice

Miembros del tribunal.....	I
Resumen.....	II
Agradecimientos.....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros.....	VIII
Índice de figuras.....	IX
Abreviaturas.....	XI
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Reproducción en crustáceos y la ablación ocular.....	1
1.1.2 Serotonina.....	2
1.1.3 Espiperona.....	3
1.1.4 Feromonas sexuales.....	5
1.2 Justificación.....	6
1.3 Planteamiento del problema.....	8
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
2. Marco teórico.....	9
2.1 La acuicultura y el cultivo de camarón.....	9

2.2 Cultivo de camarones.....	10
2.3 Especies de interés comercial: <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	11
2.4 Acuicultura en Costa Rica.....	13
2.5 Reproducción controlada de camarones: técnica de inducción a la maduración gonadal .....	14
2.5.1 Reproducción en cautiverio.....	14
2.5.2 Feromonas de crustáceos.....	16
3. Marco metodológico.....	16
3.1 Diseño experimental.....	17
3.2 Objeto de estudio.....	18
3.3 Preparación de inyecciones.....	20
3.4 Determinación de nivel de maduración.....	21
3.5 Análisis estadístico de datos.....	23
4. Resultados.....	24
4.1 Condiciones iniciales del experimento.....	24
4.1.1 Peso inicial de organismos experimentales.....	24
4.1.2 Calidad del agua.....	26
4.2 Maduración ovárica.....	27
4.2.1 Análisis histológico.....	28
4.2.2 Índice de maduración ovárica.....	29
4.3 Mortalidad.....	32
4.4 Calidad del desove.....	32

5. Discusión.....	38
5.1 Efecto de inyecciones.....	38
5.2 Diferencias entre tanques.....	39
5.3 Diferencias entre hembras tratadas y control.....	40
5.4 Interacción de las inyecciones con otras moléculas .....	41
5.5 Efecto de variables fisicoquímicas.....	41
5.6 Agotamiento reproductivo.....	42
5.7 Calidad de desove.....	43
6. Conclusiones.....	44
7. Recomendaciones.....	46
8. Referencias bibliográficas.....	47

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Producción de principales especies de crustáceos a nivel mundial en el 2000, 2018 y el 2020.....	11
<b>Cuadro 2.</b> Cantidad de serotonina y espiperona utilizadas en los tratamientos de los tanques 1 y 2 (T1 y T2).....	20
<b>Cuadro 3.</b> Volumen de solventes utilizados para la preparación de las inyecciones.....	21
<b>Cuadro 4.</b> Rango de temperatura y salinidad de los tanques experimentales registrados durante las tres fases de la toma de datos.....	27
<b>Cuadro 5.</b> Prueba post-hoc Wilcoxon por pares de los seis tratamientos experimentales.....	33
<b>Cuadro 6.</b> Número de huevos, nauplios y porcentaje de eclosión promedio de hembras fecundadas según cada tratamiento.....	35

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ablación del pedúnculo ocular de un camarón blanco, <i>Litopenaeus vannamei</i> en una de las hembras experimentales (A) y de otro estudio (B).....	1
<b>Figura 2.</b> Estadios de desarrollo temprano de <i>Litopenaeus vannamei</i> (N: nauplio, Z: zoea, M: mysis, P: postlarva).....	12
<b>Figura 3.</b> Organización de las semanas experimentales. ....	17
<b>Figura 4.</b> Distribución de los individuos en los tres tanques experimentales. Tanque 1 (T1): tratamiento con dosis 1 de serotonina (25 µg/ g peso corporal) y espiperona (2 µg/ g peso corporal). Tanque 2 (T2): tratamiento con dosis 2 de serotonina (40 µg/ g peso corporal) y espiperona (4 µg/ g peso corporal). Tanque 3 (T3) T3: tratamiento con hembras sometidas a la ablación ocular.....	18
<b>Figura 5.</b> Marcaje de hembras tratadas y controles de los tres tanques experimentales. Las hembras tratadas fueron marcadas con un anillo naranja (T1), un anillo rojo (T2) o ablacionadas sin anillo (T3) según el tanque experimental. Las hembras control fueron marcadas con un anillo amarillo o morado según cada tanque.....	19
<b>Figura 6.</b> Alimento congelado para tanques experimentales: calamar (Loliginidae), poliqueto ( <i>Americanuphus reesi</i> ) y sardina ( <i>Opisthonema libertate</i> ) .....	20
<b>Figura 7.</b> Vista dorsal de hembras de camarón blanco, <i>Litopenaeus vannamei</i> , en estadio I (b), estadio II (c), estadio III (d) y estadio IV (e) de maduración ovárica (flechas negras y amarillas indican el ovario).....	22
<b>Figura 8.</b> Histograma del peso inicial de los organismos experimentales: hembras (A) y machos (B) utilizados.....	25
<b>Figura 9.</b> Histograma del peso inicial y medidas de tendencia central del peso inicial de los organismos experimentales: hembras (A) y machos (B) utilizados.....	26

<b>Figura 10.</b> Estados de maduración ovárica de <i>Litopenaeus vannamei</i> a nivel macroscópico y microscópico.....	28
<b>Figura 11.</b> Índice de maduración ovárica promedio semanal en los tres tanques durante las 18 semanas experimentales.....	29
<b>Figura 12.</b> Comparación del Índice de maduración ovárica de hembras control y hembras tratadas) durante las tres fases realizadas en los tres tanques experimentales.....	30
<b>Figura 13.</b> Comparación del Índice de maduración ovárica promedio según el tanque y el tratamiento aplicado.....	31
<b>Figura 14.</b> Número de hembras presentes en los tanques según el tratamiento aplicado durante las semanas 18 experimentales.....	32
<b>Figura 15.</b> Porcentaje y número de hembras apareadas según la fase y el tratamiento aplicado.....	33
<b>Figura 16.</b> Número de hembras apareadas con desove o sin desove según el tanque y el tratamiento.....	34
<b>Figura 17:</b> C Correlación por tratamiento (A) y de los datos totales (B) del número de huevos y número de nauplios por desove de todas las muestras tomadas utilizando el método de Pearson.....	36
<b>Figura 18:</b> Correlación de parámetros de temperatura (A) y salinidad (B) con el número de huevos utilizando el método de correlación de Pearson.....	37

## Abreviaturas

CONAGEBIO	Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
EBM	Estación de Biología Marina
E-ABLATION	Ablación ocular, del inglés Eyestalk ablation
EM	Espectrometría de Masas
ESP	Espiperona
FAO	Food and Agriculture Organization
HEG	hormona estimulante de las gónadas
HHC	hormona hiperglicémica de crustáceos
HIG	hormona inhibidora de las gónadas
HIM	hormona inhibidora de la muda
HIOM	hormona inhibidora del órgano mandibular
HLGn	hormona liberadora de la gonadotropina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INCOPECA	Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura
IMO	Índice de maduración ovárica
IHHNV	Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
PPAA	Programas, proyectos y actividades académicas
PSU	Unidades prácticas de salinidad
SEPSA	Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria
SER	Serotonina
SIA	Sistema de la Información Académica de la Universidad Nacional
T	Tanque
WSSV	White Spot Syndrome Virus
5-HT	Serotonina
µg	Microgramos

# 1. Introducción

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Reproducción en crustáceos y la ablación ocular

La reproducción de los crustáceos está regulada por varias estructuras corporales como el cerebro, los ganglios torácicos, el órgano mandibular, los pedúnculos oculares, entre otros (Pillai *et al.* 2010; Swetha *et al.* 2011; Prasad *et al.* 2014). En la reproducción de estos invertebrados intervienen dos hormonas importantes: la hormona inhibidora de las gónadas (HIG) y la hormona estimulante de las gónadas (HEG). La primera hormona es producida y secretada en el pedúnculo ocular por el complejo órgano X - glándula sinusal, la cual regula la maduración gonadal de los camarones (Zapata *et al.* 2003; Chen *et al.* 2014; Diggles, 2019). La HEG es producida por el ganglio torácico y el cerebro (Cahansky *et al.* 2011; Prasad *et al.* 2014).

La glándula sinusal y el órgano X ganglionar están involucradas en la producción de la hormona inhibidora de la gónada (HIG), la cual, como su nombre lo indica, regula la maduración gonadal de los camarones (Zapata *et al.* 2003; Pillai *et al.* 2010; Swetha *et al.* 2011). La ablación ocular consiste en la extirpación de uno o los dos pedúnculos oculares de los organismos adultos, para así, disminuir la producción de HIG y estimular la maduración de los ovarios en las hembras (Figura 1) (Kannan *et al.* 2015; Pillai *et al.* 2010; Diggles, 2019).

A



B



**Figura 1:** Ablación del pedúnculo ocular de un camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* en una de las hembras experimentales (A) y de otro estudio (B). Fuente: Kannan *et al.* 2015.

Los primeros registros de ablación ocular en *L. vannamei* datan de 1976 como técnica para promover la maduración en hembras de camarón (FAO, n.d.). Esta técnica también ha sido utilizada en otros crustáceos braquiuros como *Libinia emarginata*, *Rhithropanopeus harrisi*, *Carcinus maenas*, o especies de langostas como *Homarus americanus* o cangrejos de río como *Faxonius virilis* con la misma finalidad (Laufer *et al.* 1993). Sin embargo, existen registros de mediados del siglo XX, donde ya se estudiaban los efectos de esta técnica en estos animales (Pannouse, 1943; Aoto y Nishida 1956; Swetha *et al.* 2011).

Se ha demostrado que esta técnica acelera los procesos de maduración en las hembras influenciada por hormonas sexuales como la progesterona, impulsando así la producción de larvas en los sistemas controlados (Benzie, 1998; Okumura, 2007; Swetha *et al.* 2011; Uawisetwathana *et al.* 2011; Kannan *et al.* 2015; Uengwetwanit *et al.* 2018; Diggles, 2019). Sin embargo, esta práctica tiene efectos perjudiciales en los organismos, ya que se ha visto que produce un daño en la cantidad y calidad del desove, así como una reducción en el número de eclosiones y otros parámetros de salud de los camarones (Swetha *et al.* 2011; Kannan *et al.* 2015).

### **1.1.2. Serotonina**

La serotonina, 5-Hidroxitriptamina (5-HT) es un compuesto amino derivado del triptofano, producido por organismos animales y vegetales, el cual tiene función tanto de neurotransmisor, neurohormona y mensajero extracelular (Mohammad-Zadeh, 2008; Wu y Cooper, 2012; Vleugels *et al.* 2015; Harlıoğlu *et al.* 2020; Marín *et al.* 2020). La 5-HT está presente en varios órganos en invertebrados como el sistema nervioso central, en el pedúnculo ocular y en el tejido gastrointestinal (Mohammad-Zadeh, 2008; Christie 2011; Prasad *et al.* 2014; Vleugels *et al.* 2015; Dineshan y Sudha Devi, 2020). Junto a otros compuestos como terpenoides, esteroides y péptidos, la serotonina está involucrada en la regulación de procesos fisiológicos (Christie 2011; Aprajita *et al.* 2014).

Similar a otros neurotransmisores como dopamina, melatonina y la octopamina, la serotonina está involucrado en la liberación de hormonas relacionadas al crecimiento y

reproducción de invertebrados como crustáceos (Swetha *et al.* 2011; Prasad *et al.* 2014; Gopal y Devi, 2019). La serotonina actúa activando la liberación de la hormona HEG, impulsando la maduración de las gónadas y el desove en hembras (Vaca y Alfaro, 2000; Meeratana *et al.* 2006; Wongprasert *et al.* 2006).

Varios estudios han demostrado la capacidad de la serotonina para acelerar los procesos de maduración gonadal en crustáceos (Prasad *et al.* 2014; Gopal y Devi, 2019; Dineshan y Sudha Devi, 2020; Harlıoğlu *et al.* 2020). Por ejemplo, en un estudio realizado con el cangrejo de agua dulce *Barytelphusa guerini*, se probó el efecto de tres sustancias: la naloxena como antagonista de opioides, la serotonina como neurotransmisor y la dopamina en su desarrollo reproductivo. Al inyectarse la serotonina, se observó un aumento en el tamaño del diámetro del folículo testicular, así como en el tamaño del oocito en hembras. Este resultado muestra el efecto estimulante de la serotonina en el crecimiento de las gónadas de estos crustáceos (Prasad *et al.* 2014). En otro estudio, Gopal y Devi (2019) determinaron el efecto de la serotonina en la maduración testicular en otro cangrejo *Travancoriana schirnerae*. Aquí también se observó un crecimiento de las gónadas de los machos determinado mediante el índice testicular y el diámetro acinar después del suministro de la serotonina.

En otra investigación realizada con esta misma especie de cangrejo, se demostró el efecto estimulante de esta molécula en la maduración ovárica en hembras. Mediante una estimación bioquímica, se obtuvo que los ovarios de las hembras tratadas con serotonina presentaron una mayor cantidad de proteína, lípidos y polisacáridos que las hembras control. Según los autores, esto puede deberse a la actividad de la serotonina sobre los receptores ováricos, o bien, por un mecanismo indirecto, activando una reacción en cadena estimulando la liberación de la HEG presente en el cerebro y bloqueando así la producción de la hormona inhibidora de la gónada (HIG) (Dineshan y Sudha Devi, 2020).

El efecto de la serotonina endógena, también se ha estudiado en otros invertebrados como moluscos. En una investigación realizada con el abulón *Haliotis discus hannai* se observó, mediante un estudio molecular, un incremento de la maduración de ovocitos y el desove en hembras, causado por la 5-HT (Sharker *et al.* 2019).

### 1.1.3. Espiperona

La espiperona es una molécula perteneciente a la familia de los butirofenonas utilizada en la industria farmacéutica como neuroléptico (Azibi *et al.* 1983; Glennon *et al.* 2002; Liang *et al.* 2009). Este compuesto tiene una función antagonista al neurotransmisor dopamina, bloqueando su ruta de acción (Zapata *et al.* 2003; Mustard *et al.* 2005; Liang *et al.* 2009; Cahansky *et al.* 2011). Por su parte, la dopamina tiene un rol tanto de neurotransmisor como de neuromodulador en decápodos (Harlioğlu *et al.* 2020), inhibiendo la secreción de la hormona hiperglicémica de crustáceos (HHC), la cual, al igual que la HEG, tiene un efecto estimulante en el crecimiento de las gónadas (Harlioğlu *et al.* 2020). Debido a su efecto antagónico, la espiperona también tiene un efecto estimulante en el desarrollo gonadal (Alfaro-Montoya *et al.* 2004; Cahansky *et al.* 2011; Swetha *et al.* 2011).

Para el caso de los crustáceos, en un estudio realizado por Prasad y colaboradores (2014), se observó un efecto inhibitor de la dopamina en el desarrollo reproductivo tanto en hembras como en machos del cangrejo de agua dulce, *B. guerini*. Esta reducción del tamaño de las gónadas puede estar relacionada al efecto regulatorio que este neurotransmisor tiene sobre HEG, o la estimulación en la liberación de la hormona inhibidora de la gónada (HIG) (Prasad *et al.* 2014). Este resultado es muy similar al encontrado por Dineshan y Sudha Devi (2020), donde también se observó el efecto inhibitorio de la dopamina en el desarrollo gonadal en el cangrejo *Travancoriana schirnerae*.

Por otro lado, se ha visto que la espiperona tiene una acción contraria a la inhibición provocada por el pedúnculo ocular en la maduración ovárica del cangrejo *Chasmagnathus granulata*, de manera que su suministro incrementa el tamaño de las gónadas tratadas (Zapata *et al.* 2003). En otro estudio realizado con el langostino de río *Cherax quadricarinatus*, se estudió el efecto de la espiperona y la naloxona en las gónadas de las hembras de manera *in vitro*, es decir aplicándolos directamente sobre fragmentos de ovarios. En presencia de un fragmento del ganglio torácico, los ovarios que se encontraban en estadio de post reproducción presentaron un aumento del tamaño al haber sido inyectados con estos dos antagonistas. Este resultado muestra la interacción que estos dos

órganos junto a la espiperona tienen en el desarrollo ovárico de esta especie (Cahansky *et al.* 2011) y la utilidad de estos antagonistas en su reproducción en cautiverio.

Este antagonista junto con la serotonina, tienen un efecto estimulante en la maduración y desove en hembras de crustáceos (Alfaro-Montoya *et al.* 2004; Tinikul *et al.* 2009). Se ha registrado que el uso combinado de estos dos compuestos estimula la maduración ovárica en dos especies de camarón, *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei* (Alfaro-Montoya *et al.* 2004). Sin embargo, Harlioğlu *et al.* (2020) señalan la importancia de realizar nuevas investigaciones que estudien el efecto que este neurotransmisor tiene en la liberación de otros compuestos al medio como las feromonas sexuales.

#### **1.1.4. Feromonas sexuales**

Las feromonas son moléculas involucradas en la comunicación y comportamiento de organismos de una misma especie (Wyatt, 2003; Wyatt, 2010; Hardege y Terschak, 2011). Están clasificadas en diferentes grupos moleculares como péptidos, nucleótidos, pequeñas moléculas polares y no polares, así como lípidos como las ceramidas (Thiel y Breithaupt, 2010). Estas juegan un papel importante en los procesos de reproducción y apareamiento en invertebrados (Hardege *et al.* 2011; Ottaviani, 2014).

Desde los años 70, se han hecho numerosas investigaciones en insectos sobre el uso de las feromonas sexuales como controlador de plagas, para el monitoreo de poblaciones o la identificación de especies invasoras (Baker, 2011; Ottaviani, 2014). En crustáceos como los decápodos, el olfato y quimiorreceptores de contacto resultan uno de los mecanismos más comunes para la comunicación (Bauer, 2011; Okamura *et al.* 2017). Sin embargo, existe poco conocimiento sobre las características químicas de las feromonas sexuales en este grupo, información que tendría gran utilidad para los procesos de captura y reproducción en sistemas controlados como en la acuicultura (Bauer, 2011; Thiel y Breithaupt, 2010).

Varios estudios se han enfocado en comprender cómo las feromonas sexuales facilitan las interacciones en los procesos de apareamiento (Bublitz *et al.* 2008; Bauer, 2011; Hardege *et al.* 2011; Ottaviani, 2014). Se ha visto en varias especies de crustáceos, que ciertos compuestos con funciones fisiológicas específicas tienen un efecto indirecto en la comunicación y comportamiento de los organismos. Por ejemplo, la uridina difosfato es

una feromona sexual presente en cangrejos como *Carcinus maenas*, que es excretada por la hembra en los procesos de muda y es detectada por los machos como una señal para la cópula (Bublitz *et al.* 2008; Hardege y Terschak, 2010; Hardege *et al.* 2011).

Estas señales químicas son emitidas al medio, ya sea de manera directa como feromonas volátiles o solubles, o de un organismo a otro, como feromonas de contacto (Thiel y Breithaupt, 2010; Gutiérrez-Vera, 2022). Para el caso de los camarones, debido a que viven en grupos numerosos, sus feromonas no requieren recorrer grandes distancias. En este caso las feromonas se encuentran recubriendo el cuerpo de los organismos (Bauer, 2011; Hardege y Terschak, 2010). Por el contrario, en especies menos gregarias como los ermitaños (Vaghela y Kundu, 2012), se ha visto que las feromonas de estos animales pueden permanecer activas después de seis días en el agua (Okamura *et al.* 2017).

Recientemente, se estableció un protocolo de bioensayo para la detección de feromonas sexuales de contacto en *L. vannamei*, y se descubrió una asociación significativa entre el comportamiento de apareamiento de los machos y cuatro diferentes extractos cuticulares de hembras a los que fueron expuestos (Gutiérrez-Vera, 2022). Sin embargo, la identificación y caracterización de las feromonas sexuales en camarones es poco conocida (Alfaro-Montoya *et al.* 2019; Harlioğlu *et al.* 2020, Gutiérrez-Vera, 2022).

## **1.2. Justificación**

La ablación ocular es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la acuicultura, como método de inducción a la maduración ovárica de camarones (Almeida *et al.* 2004; Okumura, 2007; Pillai *et al.* 2010; Kannan *et al.* 2015; Diggles, 2019). Varios estudios han confirmado que la ablación de uno o ambos pedúnculos oculares tiene un efecto promotor tanto en los procesos de muda como en los de reproducción de crustáceos (Stella *et al.* 2000). Se ha registrado que, al no realizarse la ablación ocular, especies como *P. monodon* presentan niveles de desove muy bajos, o en algunos casos casi nulos (Diggles, 2019).

No obstante, esta técnica también tiene efectos perjudiciales en los organismos ablacionados (Morales Covarrubias *et al.* 2006; Sainz-Hernández *et al.* 2008; Pillai *et al.* 2010; Magaña-Gallegos *et al.* 2021). En otra investigación, realizada con *L. vannamei*, se observó cómo la ablación ocular incide en la probabilidad de contraer enfermedades

infecciosas en las hembras (Morales Covarrubias *et al.* 2006). En este trabajo se obtuvo un mayor número de hembras infectadas por la enfermedad bacteriana de hepatopancreatitis necrotizante, al ser sometidas a la ablación ocular, en comparación con aquellas que habían sido inyectadas con esteroides hormonales y las hembras control. Por lo que se concluye que la ablación ocular aumenta la posibilidad de contagio de ciertas enfermedades y pone en riesgo a los individuos manipulados (Morales Covarrubias *et al.* 2006).

Por otra parte, de acuerdo con Sainz-Hernández y colaboradores (2008), se evaluó el efecto de la ablación ocular en las concentraciones de metabolitos y enzimas como la fenoloxidasa relacionadas al sistema de defensa en crustáceos. Se obtuvo una disminución de las concentraciones de estas enzimas en las hembras sometidas a la ablación bilateral ocular, lo cual refleja el efecto de la ablación a nivel del sistema inmune. En este trabajo también se observó que esta técnica aumenta significativamente el deceso de los organismos. Los individuos sometidos a la ablación bilateral ocular presentaron una mortalidad del 68 % en comparación a una mortalidad del 2 % en organismos no tratados en condiciones de cultivo. Este aumento en la mortalidad de las hembras está relacionado a un cambio en la distribución energética de las hembras ablacionadas, ya que estas invierten mayor energía en los órganos reproductivos en lugar del mantenimiento integral del organismo (Magaña-Gallegos *et al.* 2021).

Otras investigaciones también señalan la incomodidad o estrés que los camarones perciben cuando se les realiza la extracción de uno de sus pedúnculos. Movimientos bruscos de escape, desorientación y cambios en la alimentación fueron algunas de las alteraciones que los organismos manipulados expresaron en sus comportamientos. Sin embargo, los organismos tratados con xilocaína como anestésico expresaron menor afectación en su comportamiento (Diarte-Plata *et al.* 2012).

Se ha visto que la ablación ocular también afecta el tamaño de los huevos desovados. Se observó que hembras ablacionadas producen una mayor cantidad de huevos por desove, pero a su vez, producen huevos de menor tamaño. Hembras del camarón blanco *L. vannamei* sometidas a esta práctica tuvieron huevos de tamaño promedio de  $231.2 \pm 1.9$   $\mu\text{m}$  mientras que las hembras intactas obtuvieron huevos de mayor tamaño ( $P < 0.001$ ) de  $242.5 \pm 1.9$   $\mu\text{m}$ . Esta diferencia en el tamaño de huevos puede estar

relacionado con la cantidad de huevos que se produzcan por desove, lo cual puede influir también en su calidad (Magaña-Gallegos *et al.* 2021).

Las feromonas son otros compuestos importantes en el comportamiento y la comunicación de los crustáceos (Bublitz *et al.* 2008; Bauer, 2011; Okamura *et al.* 2017). Se han realizado varios estudios de caracterización de feromonas sexuales en algunos decápodos como el cangrejo verde *Carcinus maenas* (Bublitz *et al.* 2008) o el cangrejo ermitaño *Pagurus filholi* (Okamura *et al.* 2017). Se ha observado que la feromona sexual de *C. maenas*, la uridina difosfato, produce cambios en el comportamiento de crustáceos sin cercanía filogenética como *Chionoecetes opilio* y *Stenorhynchus seticornis* (Bublitz *et al.* 2008). Sin embargo, las feromonas sexuales son compuestos químicos complejos, específicos para cada especie (Ottaviani, 2014), por lo que resulta necesario una identificación y caracterización propia para cada grupo taxonómico. Por otra parte, Harlioğlu *et al.* (2020) sostienen la importancia de realizar más investigaciones relacionadas con las feromonas sexuales de camarones para su posible aplicación en sistemas productivos como la acuicultura.

La producción de camarones presenta actualmente un crecimiento importante a nivel mundial, por lo que surge la necesidad de investigar una técnica de inducción a la maduración ovárica, más eficiente y menos perjudicial para los organismos de la que se realiza en la actualidad e identificar nuevas posibles técnicas con sustancias naturales como las feromonas (Almeida *et al.* 2004; Sainz-Hernández *et al.* 2008; Harlioğlu *et al.* 2020). Por estas razones, surge la interrogante de cómo mejorar el uso combinado de la serotonina y la espiperona como método no perjudicial, efectivo y alternativo a la ablación ocular, para la estimulación a la maduración ovárica y liberación de feromonas sexuales en *Litopenaeus vannamei*.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación interdisciplinario SIA 0413-20, mediante un enfoque biológico, molecular y bioquímico, del uso combinado de serotonina y espiperona y la posible liberación de feromonas sexuales para la maduración ovárica en hembras de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

En esta investigación solo se evaluará la efectividad de estos dos compuestos en las hembras inyectadas y su efecto en las hembras no tratadas. Sin embargo, el proyecto también pretende identificar la presencia de feromonas sexuales en el medio mediante un

análisis de transcriptómica comparativa y un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (EM), que no forman parte del presente trabajo escrito.

### **1.3. Planeamiento del problema**

**Pregunta:** ¿Puede mejorarse el uso combinado de la serotonina y la espiperona como método no perjudicial, efectivo y alternativo a la ablación ocular, para la estimulación a la maduración ovárica y liberación de feromonas sexuales en el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*?

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivo general**

Verificar el uso combinado de serotonina y espiperona como técnica efectiva para la estimulación a la maduración ovárica en hembras de camarón blanco del Pacífico Oriental *Litopenaeus vannamei*, y evaluar la posible liberación de feromonas sexuales al medio.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Comparar el nivel de maduración ovárica con dos técnicas de inducción a la maduración ovárica: la ablación ocular y el uso combinado de la serotonina y espiperona.
2. Comparar la maduración ovárica con dos concentraciones distintas de la combinación de la serotonina y la espiperona en camarón blanco.
3. Determinar la posible liberación de feromonas sexuales de hembras inyectadas con serotonina y espiperona al medio.

## 2. Marco teórico

### 2.1. La acuicultura y el cultivo de camarón

Los primeros registros de la acuicultura datan de hace más de cuatro mil años antes de la era común (a. e. c.) en China, donde por más de mil años las principales especies cultivadas fueron peces como *Mugil cephalus* y *Cyprinus carpio* (Stickney y Treece, 2012). En otros países como la India, se tiene información sobre cultivos en la acuicultura hace unos 1127 años a. e. c. (Salunke *et al.* 2020). Sin embargo, según Stickney y Treece (2012), el auge de la acuicultura, como el resultado de una mezcla de investigaciones multidisciplinarias, se da a mediados del siglo XX.

Para el caso del camarón, se cree que las primeras especies cultivadas pertenecían a la familia Penaeidae, hace unos 730 años a. e. c. (Stickney y Treece, 2012). No obstante, estos autores mencionan que la primera investigación científica documentada de este grupo de crustáceos fue realizada en Japón, con la especie de camarón actualmente conocida como *Marsupenaeus japonicus*. Este estudio se enfocó principalmente en características morfológicas, taxonómicas y de ciclo de vida de esta especie. *M. japonicus* fue introducida posteriormente a nivel mundial en regiones como el este de África, el sur de Europa, el sur de Estados Unidos, en Centroamérica y Suramérica (Pillay y Kutty, 2005).

### 2.2. Cultivo de camarones

En la década de los 1980, se empezó a popularizar el cultivo de camarones, como una alternativa a la sobreexplotación de las poblaciones naturales (Arquitt *et al.* 2005; FAO, n.d; Amelia *et al.* 2021). A finales de los 80, especies como *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y *Penaeus monodon* fueron seleccionadas como buenos candidatos para su cultivo intensivo, por presentar un rápido y homogéneo crecimiento, así como una baja mortalidad en condiciones de cautiverio (Wyban y Sweeney, 1989; Amelia *et al.* 2021). Sin embargo, fue hasta el 2002, que el cultivo de *L. vannamei* se popularizó como solución a la propagación de la enfermedad de mancha blanca en *P. monodon* en el continente asiático (Flegel, 2009; Fernández de Alaiza García Madrigal *et al.* 2018; Amelia *et al.* 2021).

Entre los grupos más utilizados para cultivo de camarones se encuentran las familias Penaeidae, Solenoceridae y Pandalidae (Ortea *et al.* 2010). Según datos de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2000), la especie de

camarón con más producción por toneladas fue la especie asiática *P. monodon*, con 571 mil toneladas, seguidas por *P. chinensis (orientalis)*, *L. vannamei* y *Macrobrachium rosenbergii* (FAO, 2002; Pillay y Kutty, 2005). Para el 2013, *L. vannamei* constituía el 64% de la producción a nivel mundial (Fernández de Alaiza García Madrigal, *et al.* 2018). Según información de la FAO para el 2018, la producción total de *L. vannamei* fue de 4.966 millones de toneladas, lo que correspondía al 52.9 % de la producción mundial de crustáceos. La segunda especie más producida para este año fue *Penaeus monodon*, seguida de *M. nipponense* y *M. rosenbergii* (FAO, 2020). El reporte de la FAO (2022), indica que la producción en cultivo de *L. vannamei* alcanza los 5.812 millones de toneladas, que representa el 89% de la producción mundial de camarones (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Producción de principales especies de crustáceos a nivel mundial en el 2000, 2018 y el 2020

2000		2018		2020	
Especie	(M.T.)	Especie	(M.T.)	Especie	(M.T.)
<i>Penaeus monodon</i>	571	<i>Litopenaeus. vannamei</i>	4 966.2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	5 812.2
<i>Penaeus orientalis</i>	219	<i>Penaeus monodon</i>	750.6	<i>Procambarus clarkii</i>	2 469.0
<i>Litopenaeus. vannamei</i>	144	<i>Macrobrachium nipponense</i>	237.1	<i>Eriocheir sinensis</i>	775.9
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	119	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	234.4	<i>Penaeus monodon</i>	717.1

M.T.: Miles de toneladas

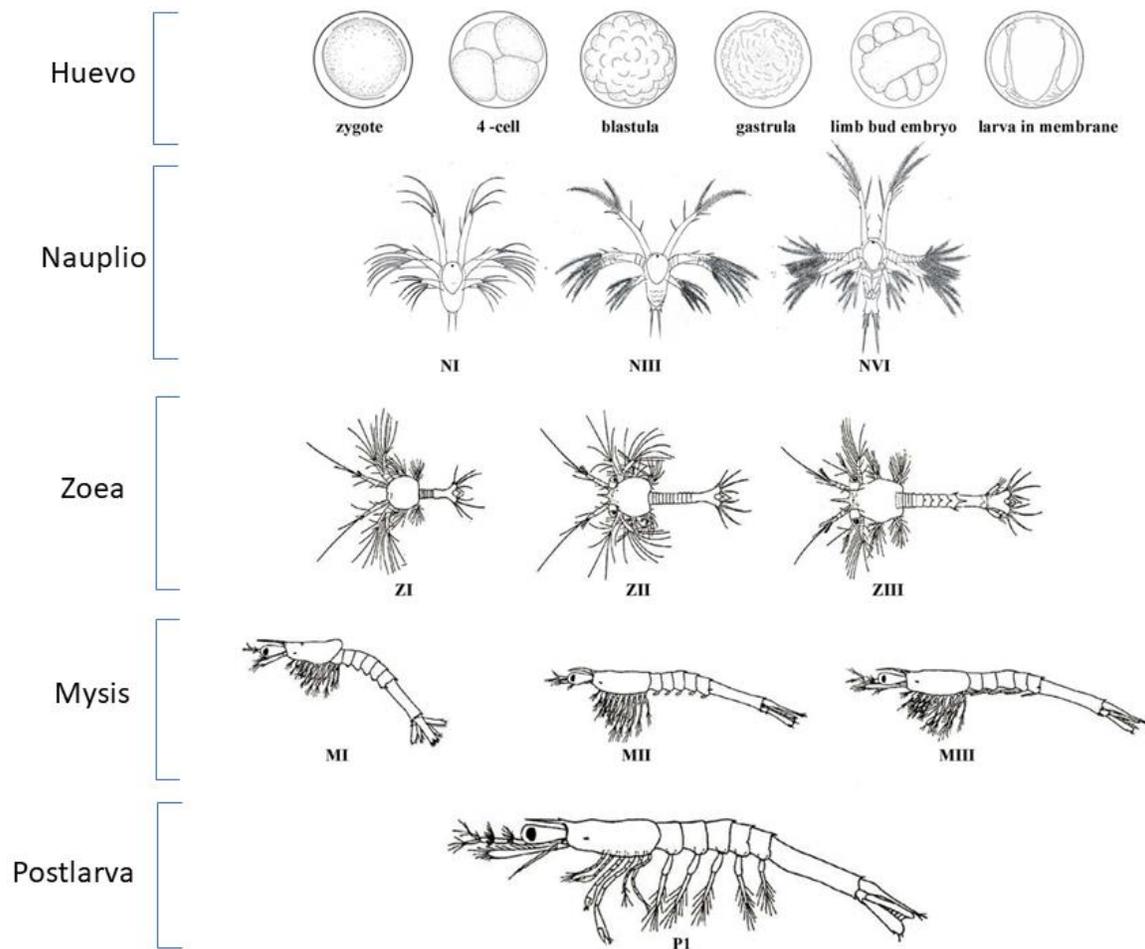
Fuente: FAO, 2002; Pillay y Kutty, 2005; FAO, 2020; FAO, 2022

### 2.3. Especies de interés comercial: *Litopenaeus vannamei*

La especie *Penaeus vannamei*, también conocida como *Litopenaeus vannamei*, fue descrita por la carcinóloga Pearl Lee Boone por primera vez en 1931 y pertenece a la familia de camarones y langostinos Penaeidae (ITIS, 2021). En 1997, la taxonomía de esta familia fue mejor detallada por los investigadores Pérez Farfante y Kensley (Farfante y Kensley 1997), quienes dividieron al género *Penaeus* en tres géneros diferentes: *Litopenaeus*, *Fenneropenaeus* y *Marsupenaeus* (Tidwell, 2012). *L. vannamei* es una especie de zonas tropicales con temperaturas superiores a los 20 °C, nativa del océano

Pacífico Este y se distribuye desde el Golfo de California, hasta las costas de Perú (Barón-Sevilla *et al.* 2004; FAO, nd).

El desarrollo de esta especie está dividido en siete etapas principales; huevo, tres etapas larvianas (nauplio, zoea, mysis), postlarva temprana, juvenil y adulto (Figura 2) (Wei *et al.* 2014). Los adultos se distribuyen principalmente en aguas costeras más abiertas, donde realizan la reproducción y el desove. Las primeras etapas larvianas pertenecen al zooplancton costero y permanecen en la columna de agua. Posteriormente, la postlarva temprana se traslada a aguas más someras, cerca de estuarios, manglares o lagunas costeras, donde se desarrolla y crece (FAO, nd).



**Figura 2:** Estadios de desarrollo temprano de *Litopenaeus vannamei* (N: nauplio, Z: zoea, M: mysis, P: postlarva). Fuente: Wei *et al.* 2014

Los primeros registros de producción de *L. vannamei* corresponden a cultivos realizados en Ecuador en 1960 (Tidwell, 2012). Posteriormente, en 1973 en el estado de Florida, Estados Unidos, se realizó la primera reproducción artificial utilizando nauplios originarios de poblaciones panameñas (FAO, nd). A inicios del siglo XXI, China se convirtió en uno de los principales productores de *L. vannamei*, con un total de 272 980 y 300 000 toneladas métricas para el 2002 y 2003 respectivamente. En otros países asiáticos como Taiwán, Tailandia y Vietnam también se instalaron empresas productoras de esta especie en estos años (Briggs *et al.* 2004). Este aumento en la producción se debió a la proliferación de ciertas enfermedades virales de crustáceos como el síndrome de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la cabeza amarilla. Estos patógenos afectaron principalmente especies asiáticas como *P. monodon*, lo cual generó la introducción de esta especie americana al sureste asiático (Briggs, *et al.* 2004; Flegel, 2009; Amelia *et al.* 2021). Adicional a lo anterior, *L. vannamei* es una de las especies con mayor demanda en el mercado, siendo Estados Unidos uno de los principales países consumidores (Briggs *et al.* 2004). Para el caso de América Latina, en la década del 2000, se produjo un aumento importante en la producción de camarón blanco en países como México (Godínez-Siordia *et al.* 2011), Honduras (Enríquez, 2003), Costa Rica (Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2013), Venezuela (Miranda *et al.* 2010) y Ecuador (Alcívar y Mendoza Bravo, 2018).

#### **2.4. Acuicultura en Costa Rica**

En Costa Rica, la acuicultura inició en la década de 1960, con el cultivo de especies de agua dulce como la trucha y la tilapia, mientras que la acuicultura marina se instaló diez años más tarde con cultivos iniciales de camarón como *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *L. occidentalis* (Peña Navarro y Chacón Guzmán, 2019). Sin embargo, su producción se ha visto restringida debido a la propagación de varias enfermedades que afectan a este género, por virus como *Baculovirus penaei* responsable de enfermedades como la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) (Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2013; Peña Navarro y Chacón Guzmán, 2019) por mencionar un ejemplo. A pesar de estas afectaciones, en el 2013, Costa Rica realizó exportaciones de camarón blanco a varias partes del mundo como a Estados Unidos, Europa y Japón (Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2014).

Según datos del Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPECA) y la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA), para el 2017, el camarón blanco correspondía al tercer grupo más cultivado en Costa Rica, precedido por dos especies de peces: la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la tilapia de agua dulce (*Oreochromis aureus* y *O. niloticus*). Para ese año, se estimó una producción total de 3165 toneladas de camarón, correspondiente a un 14.8 % de la producción total de especies acuáticas comerciales (SEPSA, 2018).

### **2.3. Reproducción controlada de camarones: técnicas de inducción a la maduración gonadal**

#### **2.3.1. Reproducción en cautiverio**

Para superar los desafíos de las diferentes etapas de la acuicultura, es necesario conocer aspectos generales de la biología de las especies de interés, así como las herramientas biotecnológicas que ayuden en la resolución de estos problemas (Wei *et al.* 2014; Alfaro-Montoya *et al.* 2019). La biotecnología ha sido un instrumento importante en la superación de desafíos en el desarrollo de la acuicultura de camarón, como en el control de ciertas enfermedades o la identificación de genes involucrados en el desarrollo y el crecimiento de estos organismos (Benzie, 1998; Wei *et al.* 2014; Tomy *et al.* 2016; Uengwetwanit *et al.* 2018). También ha permitido determinar las etapas de sus ciclos reproductivos, para optimizar la producción en los cultivos de camarones. En este sentido, en los últimos años, se han realizado varios estudios enfocados en la endocrinología y el uso de distintas hormonas como mecanismo de mejora para su reproducción (Okumura, 2004; Tinikul *et al.* 2009; Makkapan *et al.* 2011; Swetha *et al.* 2011; Jayasankar *et al.* 2020).

El aumento en la demanda de estos crustáceos ha impulsado la generación de nuevos conocimientos para su reproducción en cautiverio (Okumura 2004; Arquitt *et al.* 2005; Alfaro-Montoya *et al.* 2019). En los sistemas de cultivo, se han identificado tres etapas importantes en el desarrollo de los organismos, las cuales deben ser controladas para tener una producción exitosa. Primero, se debe conocer los mecanismos de reproducción de la especie de interés (comportamientos de cortejo, cópula o apareamiento, etc.) (Kamio *et al.* 2022). En segundo lugar, es necesario determinar las condiciones de desarrollo de las larvas o estadios juveniles, con el fin de garantizar su sobrevivencia, y por último

comprender las condiciones de crecimiento y de engorde de la especie (Vaz-Pires *et al.* 2004; Alfaro-Montoya *et al.* 2019).

En relación con los procesos reproductivos, la maduración gonadal es una etapa bastante conocida y estudiada en crustáceos (FAO, n.d.; Tsukimura, 2001; Tinikul *et al.* 2009; Chen *et al.* 2014; Tomy *et al.* 2016; Uengwetwanit *et al.* 2018; Jayasankar *et al.* 2020). La maduración ovárica en crustáceos está regulada por dos procesos: el desarrollo de los huevos o la ovogénesis y la acumulación de vitelogenina por los huevos o vitelogénesis (Tsukimura, 2001; Okumura, 2004; Swetha *et al.* 2011; Chen *et al.* 2014). Se ha estimado que *L. vannamei* alcanza su madurez sexual entre los 6 a 7 meses a partir de un peso de 20 gramos (g) en machos y 28 g en hembras. Para el caso de las hembras, organismos con pesos entre 30 y 45 g liberan entre 100 000 y 250 000 huevos de 0.22 mm de diámetro (FAO, n.d.).

En conjunto con la ablación ocular, varios métodos han sido investigados para acelerar la maduración gonadal de los crustáceos en condiciones de cautiverio. Varios estudios se han enfocado en evaluar cómo el tipo de dieta suministrados a los organismos reproductores, la calidad del agua, así como la manipulación hormonal, entre otras prácticas, juegan un rol importante en la maduración sexual de estos organismos (Chamberlain *et al.* 1981; Wouters *et al.* 2001; Swetha *et al.* 2011; Emerenciano *et al.* 2013; Sittikankaew *et al.* 2020; Magaña-Gallegos *et al.* 2021).

En una revisión realizada por Wouters y colaboradores (2001), se estudiaron los requerimientos nutricionales de especies de camarón con interés comercial para mejorar la formulación de dietas artificiales para su reproducción en cautiverio. Determinando las concentraciones de algunos nutrientes en órganos reproductivos como ovarios y testículos, observaron que nutrientes como los ácidos grasos y proteínas se encuentran en altas concentraciones en estos tejidos, lo que sugiere que estos son necesarios para las etapas de maduración y reproducción. Otros compuestos como carotenoides y vitaminas también son requeridos para su crecimiento y reproducción, por lo que debería tomarse en cuenta su inclusión en la formulación de una dieta artificial para estas especies (Wouters *et al.* 2001).

En otra investigación realizada con el camarón tigre *Penaeus monodon*, se analizaron los efectos del tipo de alimentación suministrado y de la ablación ocular sobre la

expresión génica relacionada con la maduración ovárica, donde se compararon hembras alimentadas con alimento vivo (poliqueto) y hembras alimentadas con pellets. Luego de ser sometidas a la ablación ocular, se obtuvieron diferencias significativas en la maduración ovárica y su expresión genética entre los dos grupos de hembras, donde las hembras alimentadas con poliqueto presentaron un mayor desarrollo ovárico. Este resultado muestra un efecto en conjunto de estas dos prácticas para la maduración sexual en las hembras de camarón tigre (Sittikankaew *et al.* 2020).

Otros investigadores se han centrado en comprender las relaciones endocrinas que regulan los procesos fisiológicos en los crustáceos (Okumura 2004; Tinikul *et al.* 2009; Swetha *et al.* 2011). Se ha determinado que hormonas como la hormona liberadora de la gonadotropina (HLGn), la hormona inhibidora de la muda (HIM), hormona inhibidora del órgano mandibular (HIOM) entre otras, tienen un efecto inductor en la maduración ovárica en varias especies de crustáceos (Tinikul *et al.* 2009; Swetha *et al.* 2011). Otros compuestos como los ecdisteroides o el metil farnesoato tienen efecto en la maduración sexual pero también están involucradas en otras etapas de desarrollo inicial como la embrionaria o larvaria, o bien, su efecto puede no ser el mismo en todas las especies (Okumura 2004; Swetha *et al.* 2011). Estas investigaciones muestran la variedad de compuestos involucrados en la maduración sexual de los crustáceos y como el conocer su ruta de acción permite intervenir en diferentes etapas de desarrollo.

### **2.3.2. Feromonas de crustáceos**

Para estudiar las feromonas en crustáceos se deben enfrentar varios desafíos relacionados con estas moléculas. Debido a su rápida degradación y la dificultad de separación con otros compuestos presentes en el medio, así como los diferentes comportamientos que tengan los organismos experimentales (cortejo, defensa, huida...), se dificulta el diseño experimental para su identificación (Hardege y Terschak 2010; Thiel y Breithaupt, 2010).

En la mayoría de los crustáceos, la estructura encargada de excretar las feromonas corresponde al nefroporo (Thiel y Breithaupt, 2010). La uridina difosfato es una feromona sexual del cangrejo *Carcinus maenas*, involucrada en los procesos de muda y reproducción de esta especie (Hardege y Terschak, 2011; Hardege *et al.* 2011). También se ha realizado la caracterización molecular de la feromona sexual en el cangrejo ermitaño, *Pagurus filholi*

para estudiar su efecto en el comportamiento de cortejo de este crustáceo (Okamura *et al.* 2017). Por medio de bioensayos, utilizando agua condicionada con feromonas sexuales femeninas, se estudió la influencia de estas moléculas en el comportamiento de los machos, y mediante un proceso de ultrafiltración, con un filtro de un kilodalton (1 kDa), se separaron las feromonas sexuales del medio (Okamura *et al.* 2017). No obstante, para el caso de especies comerciales como *L. vannamei*, estas moléculas han sido poco estudiadas (Alfaro-Montoya *et al.* 2019; Harlioğlu *et al.* 2020; Gutiérrez-Vera, 2022).

### 3. Marco metodológico

#### 3.1. Diseño experimental:

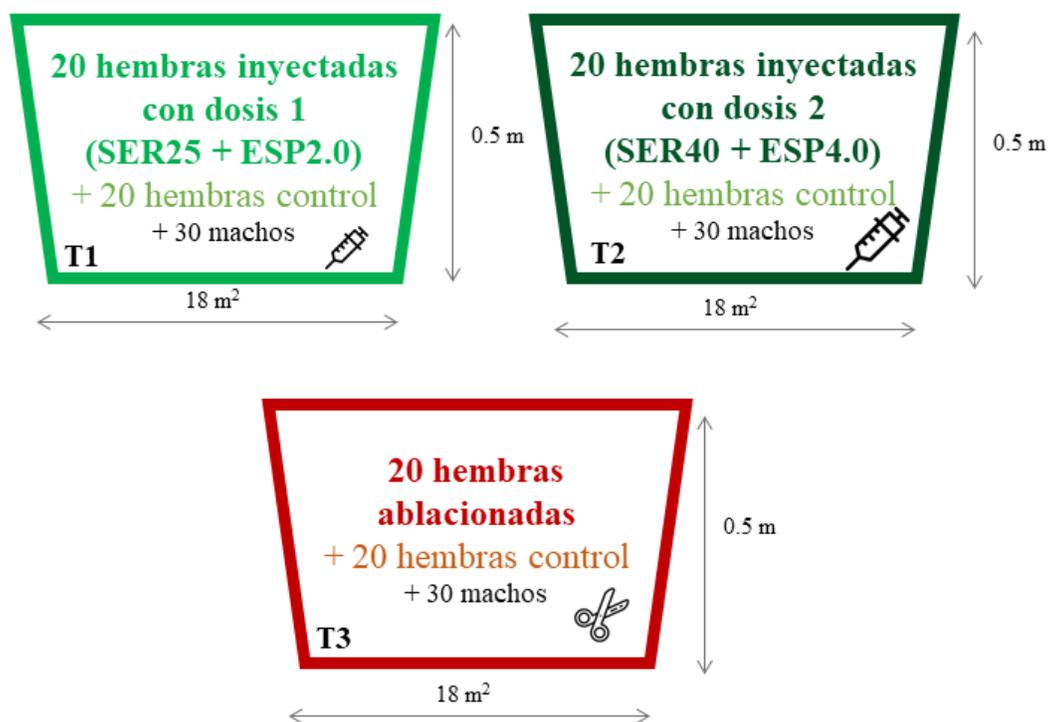
El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo y Fisiología Reproductiva de Crustáceos de la Estación de Biología Marina (EBM), Puntarenas, Costa Rica, durante los meses de mayo a septiembre del 2022. El experimento se llevó a cabo durante 18 semanas y se dividió en tres fases: (1) de la semana 0 a la 8, donde las inyecciones se aplicaron de semana por medio (semanas 0, 2, 4 y 6) y donde se realizó la ablación ocular de las hembras en la semana 0; (2) de la semana 9 a la 12, donde no se realizaron inyecciones; (3), de la semana 13 a la 18, donde se retomaron las inyecciones cada dos semanas (Figura 3).

Semana	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Fase	Fase 1								Fase 2				Fase 3						
Inyección	●		●		●		●		-				●		●		●		●
Ablación	●																		

**Figura 3:** Organización de las semanas experimentales. Los puntos rojos indican la aplicación de los tratamientos (inyección y ablación ocular) y el guión indica la no aplicación de la inyección en la semana 8.

Se utilizaron tres tanques experimentales de maduración de un área de 18 m<sup>2</sup> con una profundidad de 0.50 m y una reposición de agua salada diaria de 25 al 30 %. Se

compararon dos técnicas de inducción a la maduración ovárica en camarón patiblanco *L. vannamei*. La primera técnica correspondió a la inyección de serotonina y espiperona a dos concentraciones distintas. La dosis 1, 25  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal de serotonina + 2  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal de espiperona en el tanque 1 (T1) y la dosis 2, 40  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal de serotonina + 4  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal de espiperona en el tanque 2 (T2). Como segunda técnica de maduración se realizó la ablación de uno de los pedúnculos oculares en las hembras del tercer tanque experimental (T3). Así mismo, cada tanque disponía de 20 hembras tratadas (inyectadas o ablacionadas), 20 hembras control y 30 machos adultos (Figura 4).



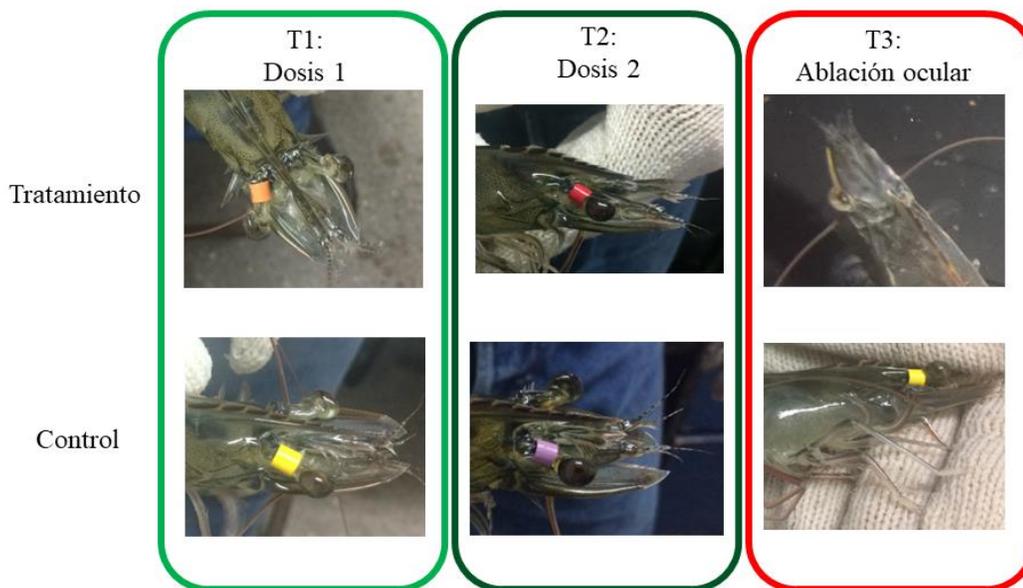
**Figura 4:** Distribución de los individuos en los tres tanques experimentales. Tanque 1 (T1): tratamiento con dosis 1 de serotonina (25  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal) y espiperona (2  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal). Tanque 2 (T2): tratamiento con dosis 2 de serotonina (40  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal) y espiperona (4  $\mu\text{g/ g}$  peso corporal). Tanque 3 (T3) T3: tratamiento con hembras sometidas a la ablación ocular.

Cada dos semanas, en cada semana de inyección, se contabilizó manualmente el número de hembras para determinar la mortalidad de cada tanque por cada tratamiento. Finalmente se determinó la tasa de mortalidad de las hembras de cada tanque y por cada tratamiento dividiendo el número total de hembras muertas al final del experimento entre el número total de hembras inicial (Pinoargote *et al.* 2018).

### **3.2. Objeto de estudio:**

En total se utilizaron 101 individuos machos y 120 individuos hembra de camarón patiblanco, *L. vannamei*, crecidos en la EBM, a partir de individuos obtenidos de la Finca ISLAMAR, ubicada en Canjelito, Nandayure, Guanacaste (10°01'44.3"N 85°13'36.5"O). Esta investigación está respaldada por la resolución R-CM-UNA-013-2021-OT-CONAGEBIO, donde se otorga el acceso a recursos genéticos y bioquímicos para el proyecto titulado “Neurotransmisores y feromonas de maduración ovárica y desove en reproducción del camarón de cultivo mundial, *Litopenaeus vannamei*. PPAA 413-20”, de la Universidad Nacional.

Al inicio del experimento, a excepción de las hembras ablacionadas, todas las hembras fueron marcadas con un anillo en el pedúnculo ocular de color diferente según su tratamiento. Para el T1, las hembras fueron anilladas con los colores naranja y amarillo (tratamiento y control), en el T2, las hembras fueron anilladas con los colores rojo y morado (tratamiento y control), y en el T3 las hembras ablacionadas no presentaron anillo (hembras tratadas) y las hembras control fueron anilladas con color amarillo (Figura 5). A todos los organismos experimentales, se les determinó inicialmente su sexo y fueron pesados para determinar la cantidad de alimentación a ser suministrada diariamente.



**Figura 5:** Marcaje de hembras tratadas y controles de los tres tanques experimentales. Las hembras tratadas fueron marcadas con un anillo naranja (T1), un anillo rojo (T2) o ablacionadas sin anillo (T3) según el tanque experimental. Las hembras control fueron marcadas con un anillo amarillos o morado según cada tanque.

Durante las 18 semanas experimentales, los tanques experimentales fueron limpiados y alimentados diariamente. Inicialmente los organismos fueron alimentados con alimento balanceado y extrusado para camarón EXIA Perform 35 (1.8mm x 3.5mm), Biomar para su crecimiento y engorde. Posteriormente, para estimular su maduración sexual, los organismos experimentales fueron alimentados con alimento fresco congelado: calamar (*Loliginidae*), poliqueto (*Americanuphis reesei*) y sardina (*Opisthonema libertate*) (Figura 6).



**Figura 6:** Alimento congelado para tanques experimentales: calamar (*Loliginidae*), poliqueto (*Americanuphus reesei*) y sardina (*Opisthonema libertate*)

### 3.3. Preparación de inyecciones:

Las inyecciones para cada tratamiento fueron preparadas utilizando serotonina creatinina sulfato monohidratado (Sigma-Aldrich) en polvo disuelta en una solución salina de 0.85 % NaCl y espiperona (Sigma-Aldrich) en polvo disuelta en etanol al 90 % acorde a las cantidades y volúmenes plasmados en los cuadros 2 y 3.

**Cuadro 2:** Cantidad de serotonina y espiperona utilizadas en los tratamientos de los tanques 1 y 2 (T1 y T2)

Tanque	Peso de serotonina (g)		Peso de la espiperona (g)	
	Total	Ind.	Total	Ind.
T1	0.03	0.001	0.0032	0.00008
T2	0.048	0.0016	0.0064	0.00016

Total: cantidad total de compuesto para solución;

Ind: cantidad suministrada a cada organismo por cada inyección;

T1: tanque 1, donde la dosis aplicada fue de 25 µg/g de peso corporal de serotonina y 2.0 µg/g peso corporal de espiperona;

T2: tanque 2, donde la dosis aplicada fue de 40 µg/g de peso corporal de serotonina y 4.0 µg/g peso corporal de espiperona

**Cuadro 3:** Volumen de solventes utilizados para la preparación de las inyecciones

Tanque	Volumen de solución salina 0.85%		Volumen de Etanol	
	(ml)		(ml)	
	Total	Ind.	Total	Ind.
T1 y T2	3.0	0.1	2.0	0.05

Total: cantidad total de compuesto para solución

Ind: cantidad suministrada a cada organismo por cada inyección

### 3.4. Determinación de nivel de maduración ovárica:

Para cuantificar el nivel de maduración ovárica de las hembras, se realizó un monitoreo tres veces a la semana (día de por medio), donde se anotó el nivel de maduración de cada hembra marcada. El nivel de maduración ovárica o estadio de madurez ovárica fue definido bajo los siguientes criterios (Tinikul *et al.* 2011) (Figura 7):

Estadio I. El ovario no es observable y presenta una coloración transparente.

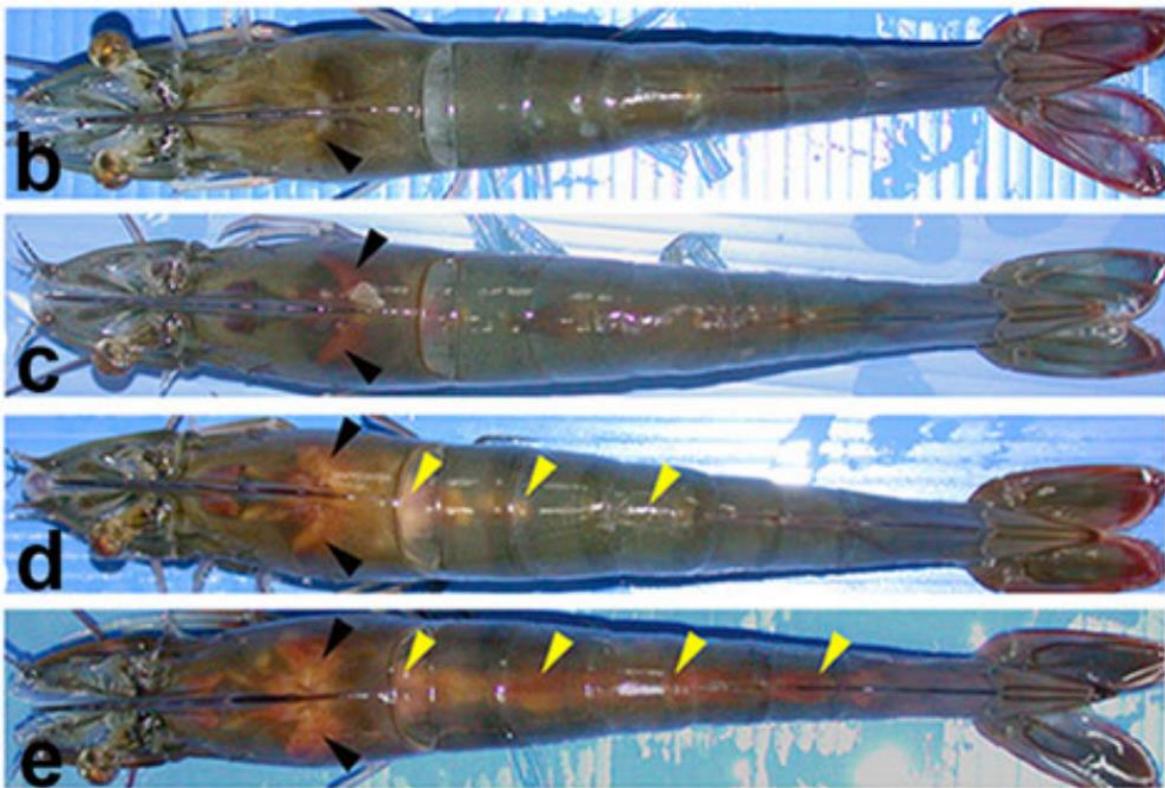
Estadio II. El ovario se distingue como una delgada línea opaca a lo largo del eje central en el dorso de la hembra.

Estadio III. Se observa una banda amarilla y gruesa que corresponde al ovario casi maduro.

Estadio IV. El ovario es turgente, ancho y de color rojo oscuro o naranja

El índice de maduración ovárica (IMO) se calculó semanalmente utilizando la siguiente fórmula:

$$IMO = \frac{\text{número de hembras con estadio de madurez III y IV}}{\text{número total de hembras}}$$



**Figura 7:** Vista dorsal de hembras de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en estadio I (b), estadio II (c), estadio III (d) y estadio IV (e) de maduración ovárica (flechas negras y amarillas indican el ovario). Fuente: Tinikul *et al.* 2011

Las hembras identificadas como fecundadas fueron transferidas y aisladas en tanques de 100 litros (l) durante la noche para la determinación de la calidad del desove de cada hembra. Esta variable fue estimada según el número de huevos obtenidos por cada desove, el número de nauplios por desove y el porcentaje de eclosión (Magaña-Gallegos *et al.* 2021). De cada tanque de 100 l, se extrajeron tres muestras homogéneas de agua de 50

ml y se contabilizó el número de huevos. Para estimar el número total de huevos por desove en los 100 l, se realizó el siguiente cálculo:

$$X = \frac{100n}{0.05}$$

donde: n: número de huevos contabilizados en cada muestra de 50 ml

X: número total de huevos por desove (en 100 l)

Posteriormente, los huevos restantes se dejaron eclosionar durante el día (23-24 horas). En la tarde, se tomaron nuevamente tres muestras de agua de 50 ml para estimar el número de nauplios por cada desove y se realizó nuevamente la estimación para los 100 l. Se calculó el porcentaje de eclosión dividiendo el número total de nauplios entre el número total de huevos. Finalmente, se estimó el porcentaje de hembras que desovaron, así como el porcentaje de mortalidad de las hembras (Magaña-Gallegos *et al.* 2021).

En los días de toma de datos, se midieron las variables de salinidad y temperatura como parámetros de calidad de agua. La liberación de feromonas inductoras de maduración ovárica se evaluó indirectamente comparando los índices de maduración de las hembras control con las hembras tratadas.

Al final de la fase experimental, se tomaron muestras de ovarios en las diversas fases del proceso de maduración para su interpretación histológica. Las secciones de ovarios se removieron mediante cirugía de hembras anestesiadas en hielo a temperaturas de 10-12 °C y se preservaron en el fijador de Davidson durante 24 h y almacenados en 50 % etanol, según Bell y Lightner (1988). Los tejidos fueron incluidos en parafina, seccionados y teñidos con hematoxilina-eosina por la Empresa Del Cruz Laboratorios, San José, Costa Rica.

### **3.5. Análisis estadísticos de datos:**

Se realizó un histograma del peso inicial por sexo de los organismos experimentales y se calcularon las medidas de tendencia central (promedio, la moda y la mediana) de esta variable de las hembras y los machos.

Para los parámetros de calidad de agua, se determinó el valor mínimo, máximo, el promedio y la desviación estándar de las variables de temperatura y salinidad.

Se calculó el promedio y la desviación estándar del Índice de maduración ovárica (IMO) semanal y se realizó una gráfica de serie de tiempo con los valores de las 18 semanas experimentales de los seis tratamientos. Se analizó la normalidad de los datos del IMO y se calculó el promedio y la desviación estándar del IMO global. Por tratarse de datos no paramétricos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias significativas de esta variable entre el tratamiento y el control de cada tanque con un nivel de significancias de  $\alpha = 0.05$ . Posteriormente, se realizó una prueba post-hoc Wilcoxon por pares para comparar los valores entre todos los tratamientos y controles. Se calculó el promedio y la desviación estándar del Índice de maduración ovárica (IMO) para las tres fases experimentales establecidas.

En cuanto a los parámetros de calidad de desove, se calculó el número promedio de huevos por desove, el número promedio de nauplios por desove y el porcentaje promedio de eclosión con sus respectivas desviaciones estándares.

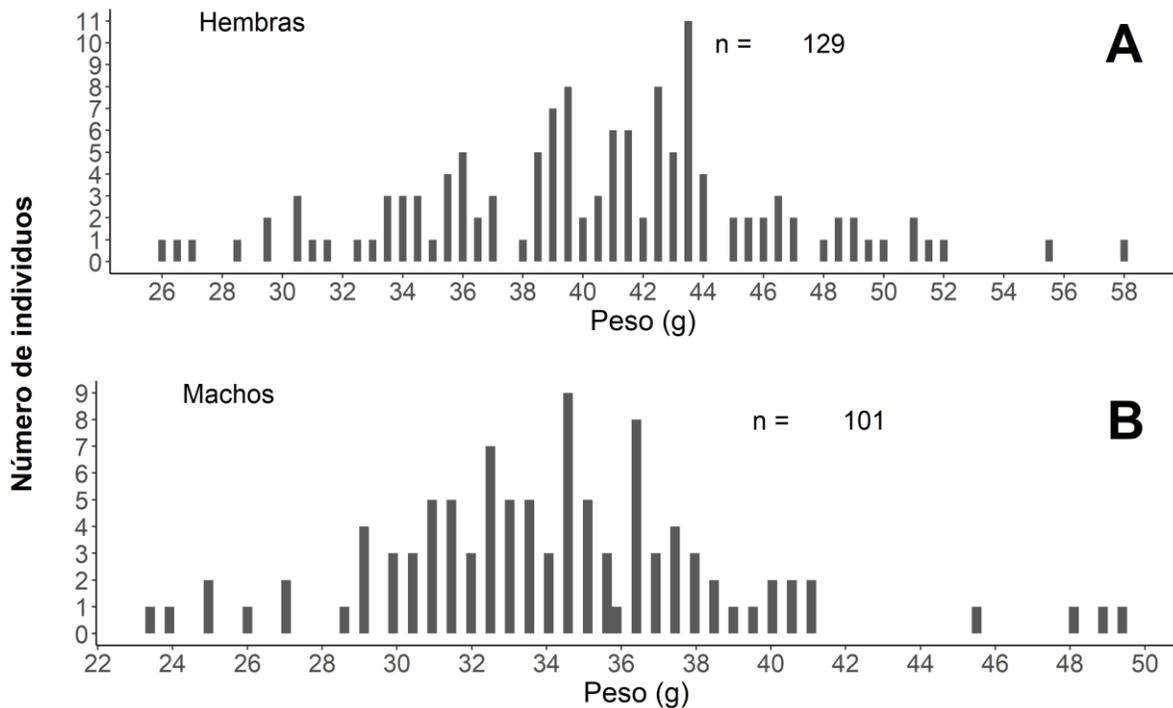
Finalmente, se realizaron tres análisis de correlación: el primero entre el número de huevos y número de nauplios por desove, el segundo entre el número de huevos y el parámetro de temperatura y el tercero entre número de huevos y la variable de salinidad. Todas las visualizaciones de los datos y los análisis estadísticos de cada variable se realizaron mediante el lenguaje de programación R versión 4.1.0.

## 4. Resultados

### 4.1. Condiciones iniciales del experimento

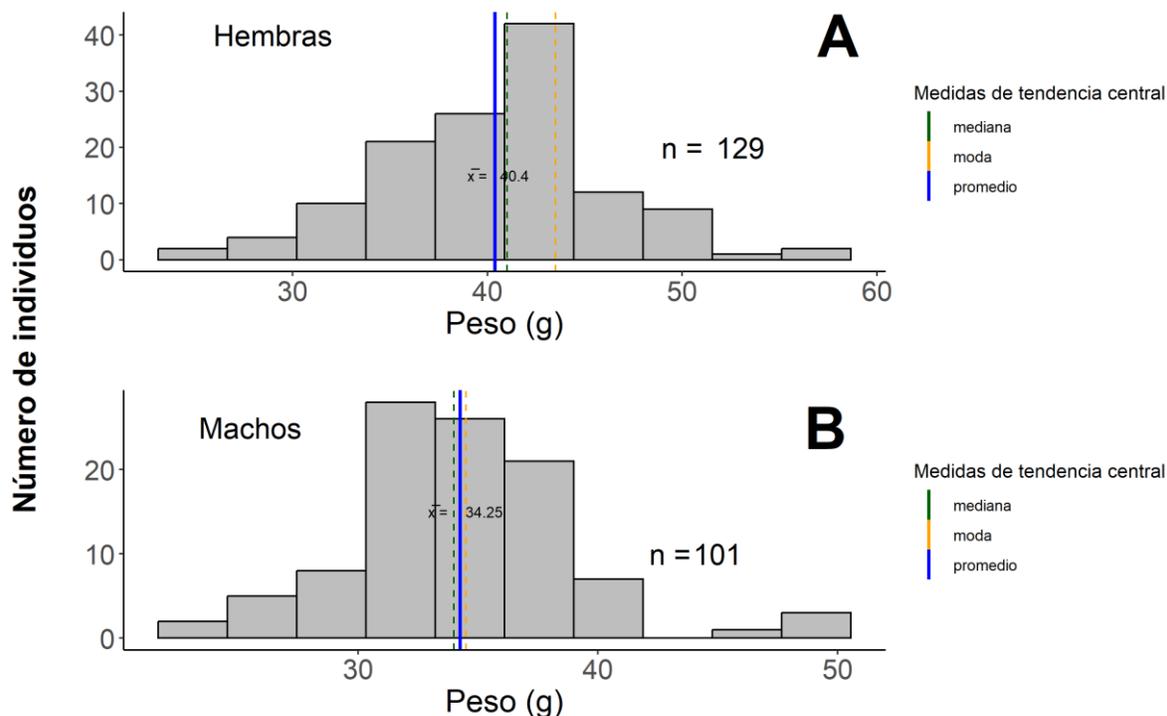
#### 4.1.1. Peso inicial de organismos experimentales

El peso inicial de los organismos utilizados para este experimento vario entre los 26 g y 58 g para las hembras y 23.5 g y 49.5 g para el caso de los machos seleccionados (Figura 8).



**Figura 8:** Histograma del peso inicial de los organismos experimentales: hembras (A) y machos (B) utilizados; n: número de individuos totales

El peso promedio de las hembras y los machos fue de  $40.40 \pm 5.84$  g y  $34.25 \pm 4.68$  g respectivamente. Se obtuvo una moda de 43.5 g y una mediana de 41 g para el peso inicial de las hembras mientras que los machos presentaron valores más bajos de 34.5 g y 34 g respectivamente para estos parámetros (Figura 9).



**Figura 9:** Histograma del peso inicial y medidas de tendencia central del peso inicial de los organismos experimentales: hembras (A) y machos (B) utilizados. La línea continua azul indica el valor promedio, la línea punteada verde indica la mediana y la línea punteada naranja indica la moda

#### 4.1.2. Calidad de agua

La temperatura registrada en los tanques experimentales fue de 26 a 28.3 °C con un valor promedio de  $27.36 \pm 0.53$  °C de las tres fases experimentales. La salinidad rondó los 26 a 35 PSU, pero a diferencia de la temperatura, esta fue mayor en la primera fase de toma de datos y menor en la segunda fase ( $31.71 \pm 1.58$  para la fase 1 y  $29.91 \pm 1.61$  para la fase 2) (Cuadro 4).

**Cuadro 4:** Rango de temperatura y salinidad registrados durante las tres fases experimentales

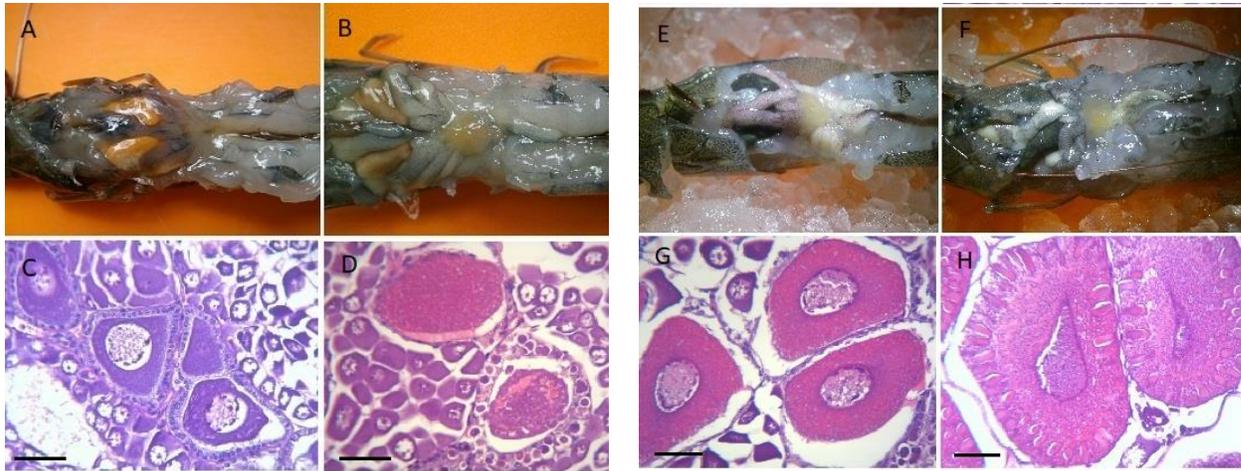
Temperatura			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Mín.	26	27	27
Máx.	28.3	28	28
Prom. $\pm$ d.e.	27.38 $\pm$ 0.62	27.29 $\pm$ 0.49	27.42 $\pm$ 0.49
Salinidad			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Mín.	28	26	26
Máx.	35	32	32
Prom. $\pm$ d.e.	31.71 $\pm$ 1.58	29.91 $\pm$ 1.61	30.25 $\pm$ 1.59

Min.: mínimo; max.: máximo; prom: promedio; d. e.: desviación estándar

## 4.2. Maduración ovárica

### 4.2.1. Análisis histológico

El estudio permitió evaluar las etapas de la maduración ovárica de *L. vannamei* según el diseño experimental propuesto. La figura 10 presenta las fases de maduración ovárica observadas a nivel macroscópico (Figura 10 A, B, E y F) y a nivel histológico (Figura 10 C, D, G y H) durante el estudio. En las hembras, los ovarios están localizados en la parte dorsal del cefalotórax, cercano al hepatopáncreas. A medida que avanza el estado de madurez ovárica, los lóbulos de los ovarios aumentan su tamaño y se tornan más visibles (Figura 10 A, B, E y F). El ciclo ovárico presenta cuatro etapas principales según el estado de las células germinales u oocitos (Figura 10 C, D, G y H): el Estado I o Pre-vitelogénesis, el Estado II o Vitelogénesis Primaria, el Estado III o Vitelogénesis Secundaria y el Estado IV o Pre-Maduración.

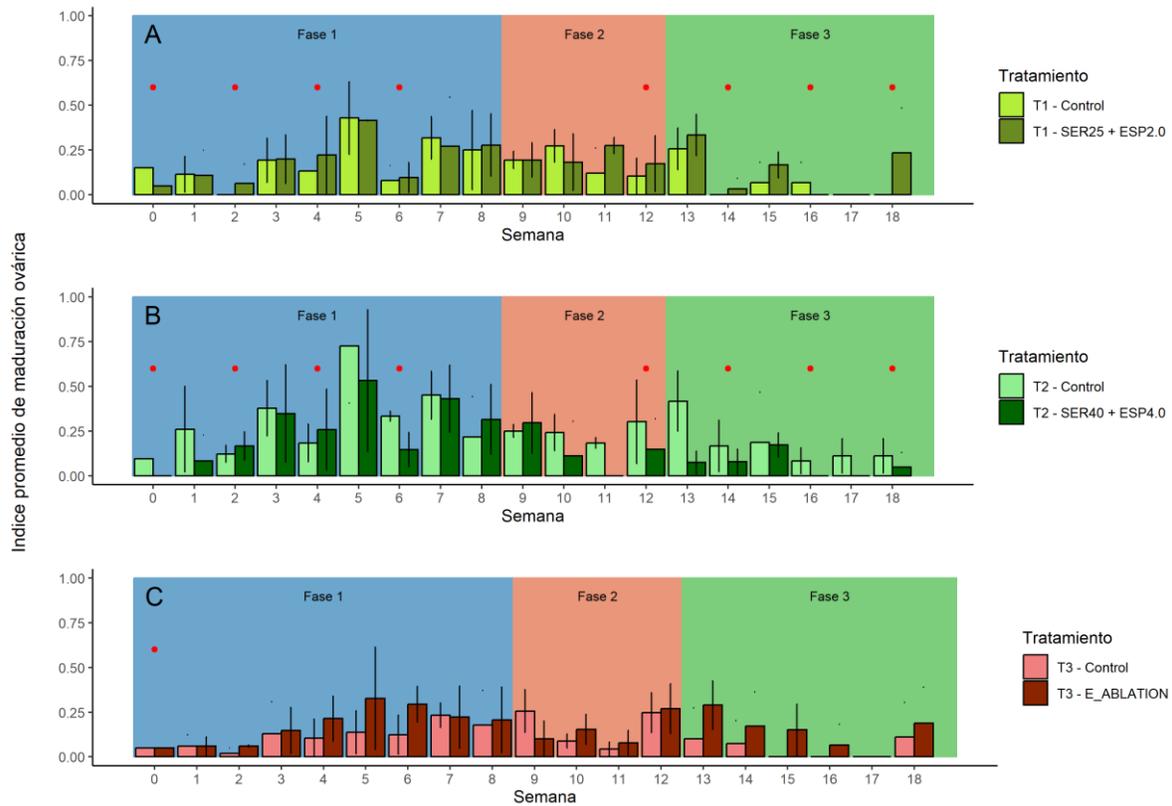


**Figura 10:** Estados de maduración ovárica de *Litopenaeus vannamei* a nivel macroscópico y microscópico. A) Estado inmaduro (I), B) Estado desarrollo temprano (II), C) Estado I, Pre-vitelogénesis, D) Estado II, Vitelogénesis Primaria, E) Estado madurando (III), F) Estado maduro avanzado (IV), G) Estado III, Vitelogénesis Secundaria, H) Estado IV, Pre-Maduración. Barra de escala = 50  $\mu$ m (Alfaro-Montoya, sin publicar).

#### 4.2.2. Índice de maduración ovárica

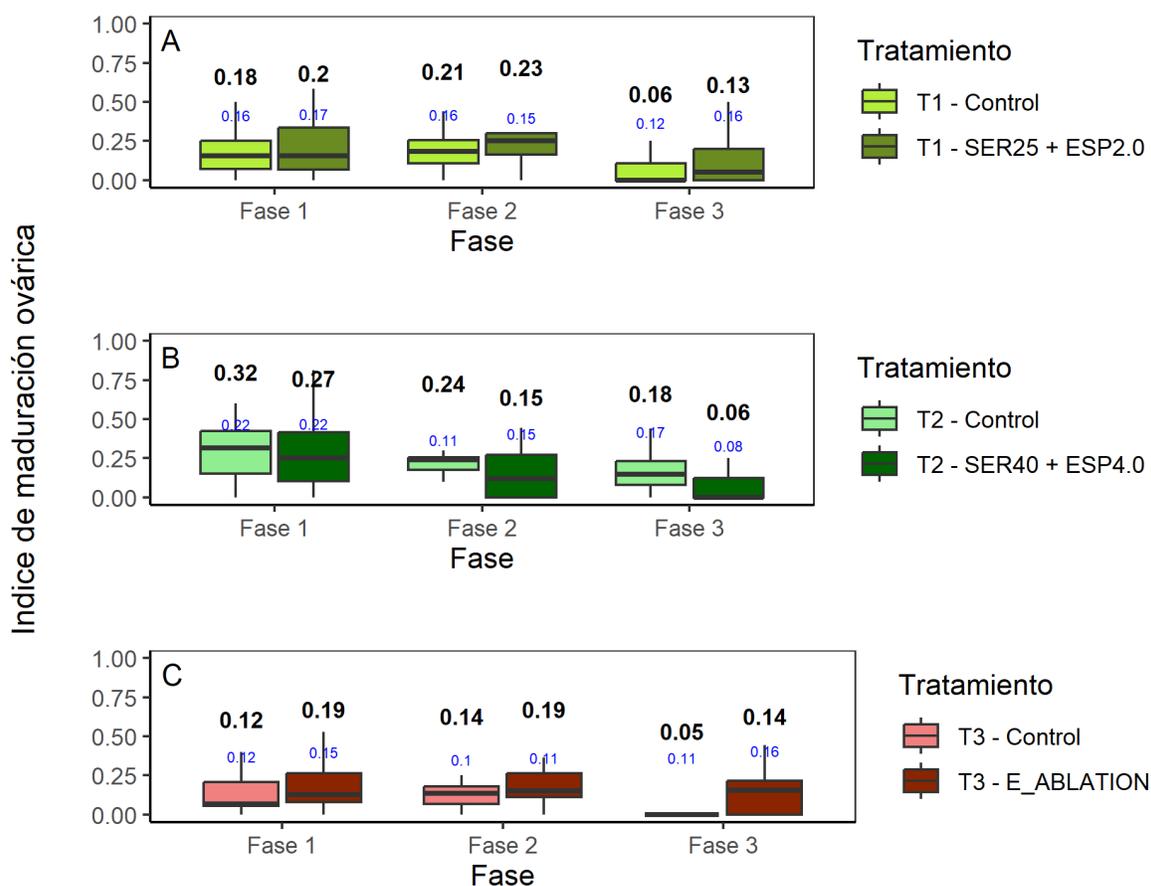
El índice de maduración ovárica ronda los valores entre 0 y 1, donde 0 se traduce como que ninguna de las hembras del tratamiento se encuentra en estado de madurez III o IV, mientras que 1 significa que la totalidad de las hembras del tratamiento se encuentran en estos estados avanzados de madurez sexual. Los valores promedios semanales obtenidos del IMO van desde 0 hasta cifras cercanas a 0.75. En el análisis semanal se observa la efectividad de las inyecciones en el T1 y el T2 al observarse un aumento en los valores del IMO promedio después de aplicada la inyección (puntos rojos) (Figura 11 A y B).

Para el caso del T3, se registraron valores más altos del índice cerca de la semana 5 después de realizada la ablación ocular (Figura 11 C). El tratamiento con valores más altos de este índice fue el tratamiento control del T2 (condicionado con las hembras con la mayor concentración de serotonina y espiperona) con cifras cercanas al 0.75 (Figuras 11 B).



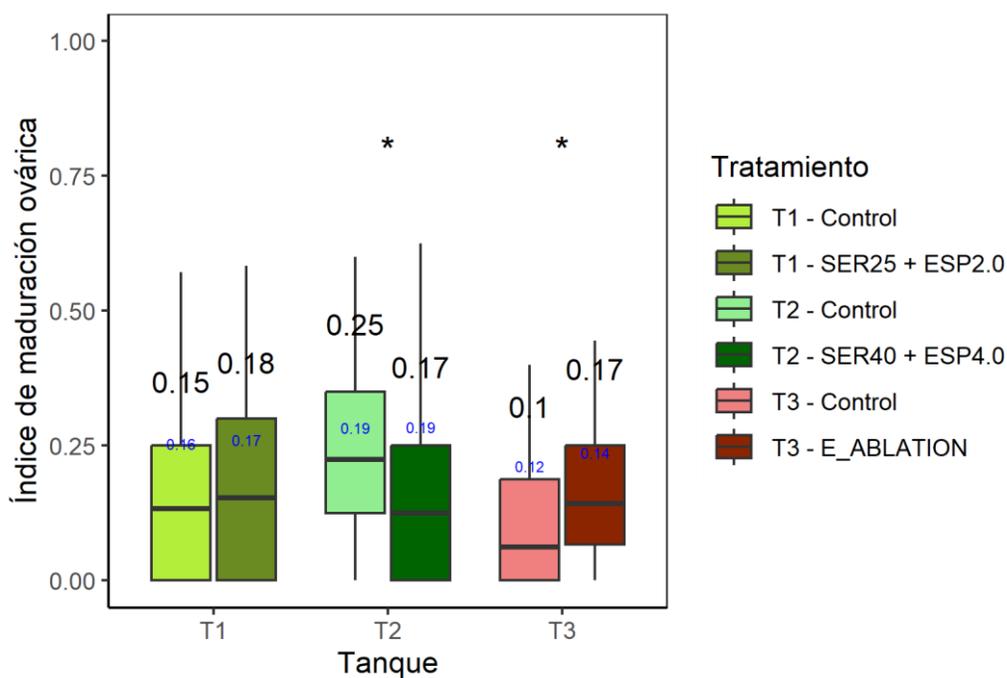
**Figura 11:** Índice de maduración ovárica promedio semanal en los tres tanques durante las 18 semanas experimentales. Los puntos rojos indican la aplicación de los tratamientos (inyección y ablación ocular para el tanque 3) y las líneas negras muestran la desviación estándar

La figura 12 corresponde a los promedios de índices de maduración para cada tratamiento por fase. Los tres tanques presentaron valores del IMO más altos en las fases 1 y 2 del experimento, siendo en su mayoría mayores a 0.12 (hasta 0.32 para el control del T2). Para el caso de la fase 3, las seis categorías presentaron valores cercanos o menores al 0.1. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas del índice con este análisis.



**Figura 12:** Comparación del Índice de maduración ovárica de hembras control y hembras tratadas durante las tres fases realizadas en los tres tanques experimentales: tanque 1 (A), tanque 2 (B) y tanque 3 (C). Los valores en negro indican los valores promedio y los valores en azul muestran la desviación estándar.

La figura 13 corresponde a los promedios de índices de maduración para cada tratamiento durante el período total del estudio. Para este parámetro, T1 obtuvo un valor promedio del IMO de  $0.18 \pm 0.16$  en las hembras tratadas y un valor de  $0.15 \pm 0.16$  para las hembras control sin diferencias significativas. En el T2 si se observaron diferencias significativas y se obtuvo un promedio mayor de este parámetro en las hembras no inyectadas (control,  $0.25 \pm 0.19$ ) y un valor de  $0.17 \pm 0.19$  para las hembras inyectadas ( $p < 0.05$ ). Para el caso del T3, las hembras ablacionadas presentaron valores más altos del IMO que las hembras control con promedios de  $0.17 \pm 0.14$  y  $0.10 \pm 0.12$  respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 13).



**Figura 13:** Comparación del Índice de maduración ovárica promedio según el tanque y el tratamiento aplicado. Los valores en negro indican los valores promedio y los valores en azul muestran la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los dos tratamientos de cada tanque según la prueba de Kruskal-Wallis.

Adicionalmente, por medio del análisis de pares de Wilcoxon se obtuvieron diferencias significativas entre los controles del tanque 1 y del tanque 2 y los controles del tanque 2 y el tanque 3 ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 5).

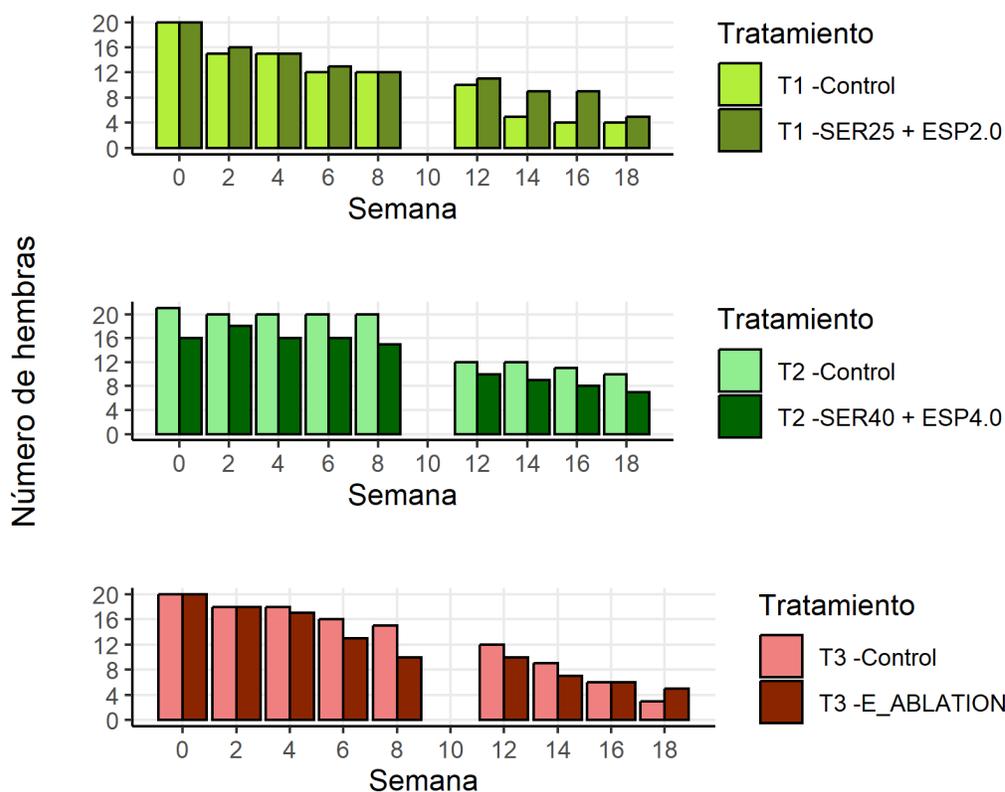
**Cuadro 5:** Prueba post-hoc Wilcoxon por pares de los seis tratamientos experimentales

	T1 – Control	T1 - SER25 + ESP2.0	T2 – Control	T2 - SER40 + ESP4.0	T3 – Control
T1 - SER25 + ESP2.0	1.000	-	-	-	-
T2 - Control	0.024**	0.625	-	-	-
T2 - SER40 + ESP4.0	1.000	1.000	0.100	-	-
T3 - Control	1.000	0.143	5.8e-05**	0.794	-
T3 - E_ABLATION	1.000	1.000	0.288	1.000	0.089

\*\* : diferencias significativa  $p < 0.05$

#### 4.4. Mortalidad

Al finalizar el experimento se obtuvo una mortalidad de 80 % y 75 % para las hembras control y las hembras tratadas del T1 respectivamente. En el T2 se obtuvieron valores de 50 % y 65 % respectivamente y el T3 registró una mortalidad de 85 % para las hembras control y de 75 % para las hembras ablacionadas. La mortalidad natural registrada durante el estudio se observa en la figura 14.

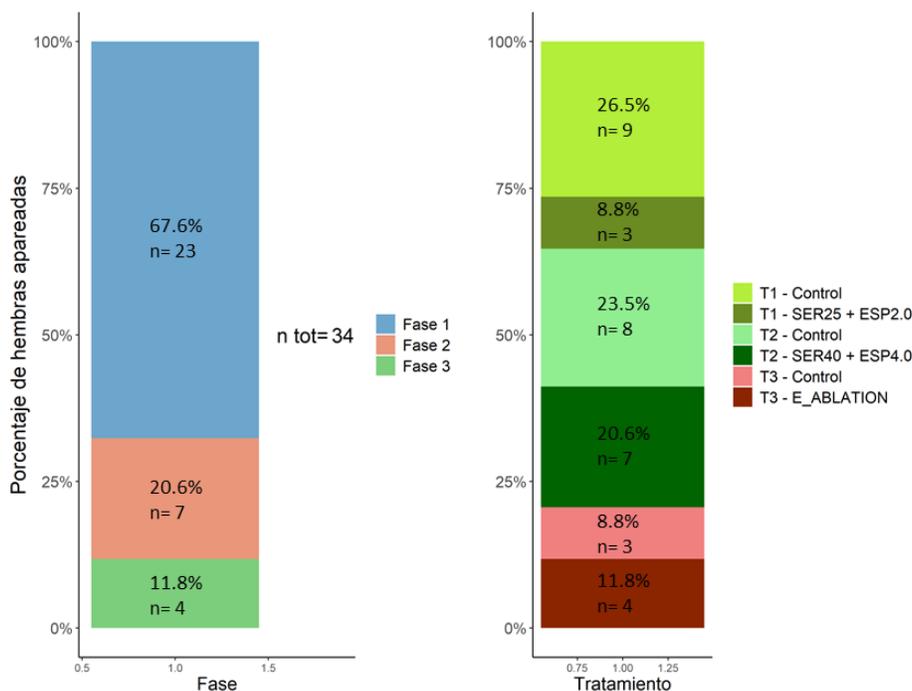


**Figura 14:** Número de hembras presentes en los tanques según el tratamiento aplicado durante las semanas 18 experimentales. Los datos se registraron cada dos semanas y la semana 10 no se realizó un conteo de las hembras por lo que no se registra ningún valor.

#### 4.5. Calidad del desove

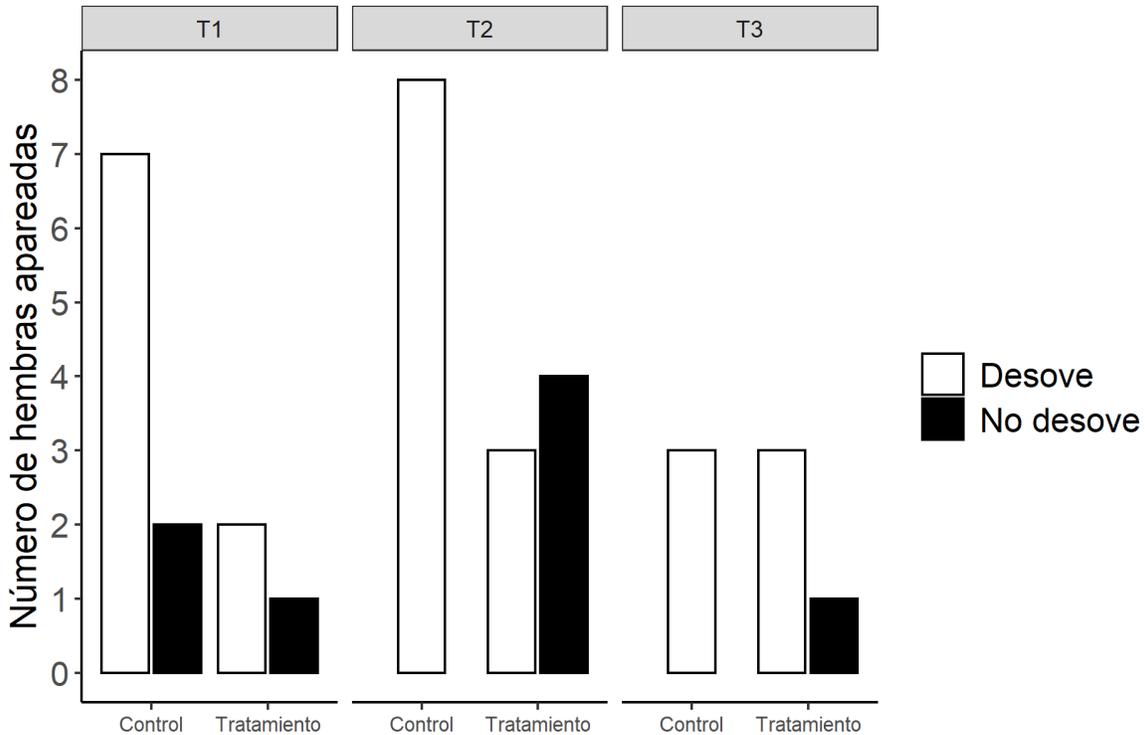
En total, se obtuvieron 34 hembras fecundadas durante las 18 semanas del experimento. El 67.6 % de las hembras fecundadas fueron encontradas durante la fase 1, n=23. Durante la fase 2 se obtuvieron 7 hembras fecundadas (20.6 %) y en la fase 3 se

obtuvieron 4 hembras en total (11.8 %). El tanque con mayor número de hembras fecundadas fue el T2, con un total de 15 hembras (20.6 % de hembras tratadas con la dosis 2, n=7, y 23.5 % con hembras control, n=8). El T1 presentó 12 hembras fecundadas: 3 tratadas con la dosis 1 (8.8 %) y 9 hembras control (26.5 %). El T3 obtuvo un total de 7 hembras fecundadas: 4 hembras ablacionadas y 3 hembras control (11.8 % y 8.8 % respectivamente) (Figura 15).



**Figura 15:** Porcentaje y número de hembras apareadas según la fase y el tratamiento aplicado

De las 34 hembras apareadas, se contabilizaron huevos de 26 organismos. Las ocho hembras restantes no registraron desove (Cuadro 7). Para el caso de los tanques de los tratamientos con serotonina y espiperona (T1 y T2), las hembras no inyectadas (control) registraron la mayor cantidad de apareamientos (9 y 8 para las hembras control respectivamente contra 3 y 7 de las hembras inyectadas). En el T3 se obtuvieron 3 apareamientos de hembras control y 4 desoves de hembras ablacionadas (tratamiento) (Figura 16).



**Figura 16:** Número de hembras apareadas con desove o sin desove según el tanque y el tratamiento aplicado.

En cuanto a la calidad de desove, las hembras control del T2 mostraron el mayor número de huevos desovados con un promedio de  $27\,111 \pm 20\,287$ . Las hembras control del T3 presentaron un promedio mínimo de número de huevos por desove de  $13\,583 \pm 17\,060$ . Con respecto a la cantidad de nauplios y el porcentaje de eclosión, las hembras control del T1 registraron un promedio máximo de número de nauplios con un valor de  $17\,467 \pm 25\,976$  lo que equivale a un porcentaje de eclosión de  $87.92 \pm 7.97\%$ . El tratamiento con menor porcentaje de eclosión correspondió a las hembras control del tanque 2 con un promedio de  $10\,370 \pm 10\,807$  nauplios por desove, es decir un  $38.25 \pm 39.67\%$  de eclosión (Cuadro 6).

**Cuadro 6:** Número de huevos, nauplios y porcentaje de eclosión promedio de hembras fecundadas según cada tratamiento

Total de hembras apareadas: 34

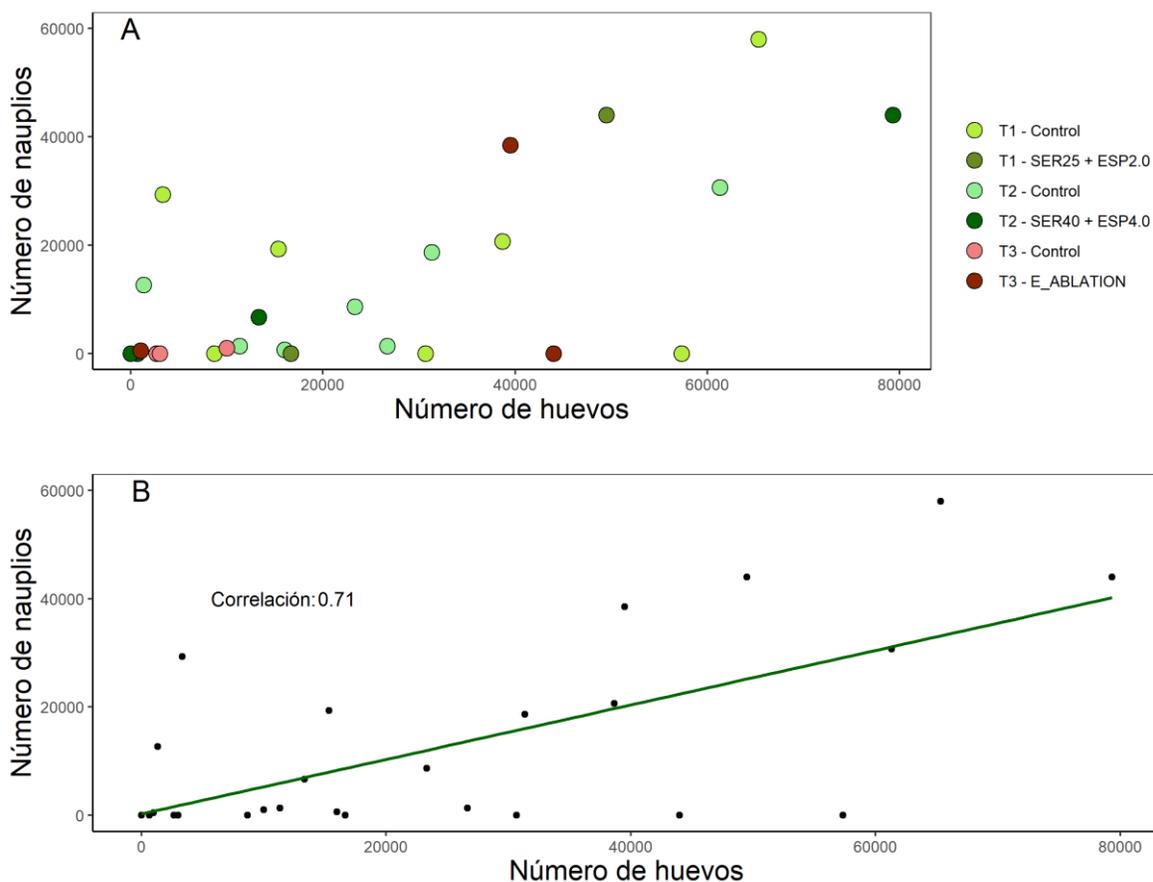
Total de hembras fecundadas (con huevos): 26

Porcentaje de fecundidad: 76.5 %

Tanque	Tratamiento	# Hembras apareadas	# Huevos prom. + ds	# Nauplios prom. + ds	% Eclosión prom. + ds
T1	SER25+ESP2.0	3	14 967 ± 20513	8 800 ± 19677	58.79 ± 51.32
	Control	9	19 867 ± 28489	17 467 ± 25976	87.92 ± 7.97
T2	SER40+ESP4.0	7	15 556 ± 31686	8 444 ± 17622	54.29 ± 30.57
	Control	8	27 111 ± 20287	10 370 ± 10807	38.25 ± 39.67
T3	Ablación	4	17 033 ± 22622	7 800 ± 17163	45.79 ± 46.77
	Control	3	13 583 ± 17060	5 417 ± 10178	39.88 ± 25.50

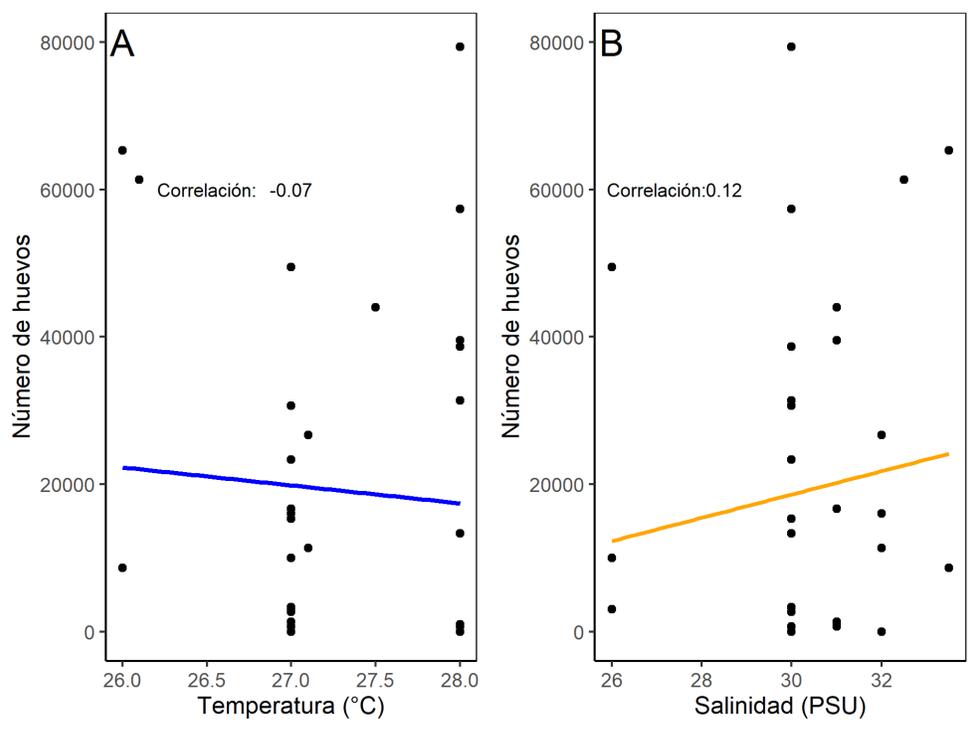
prom.: promedio  
ds.: desviación estándar

El número máximo de huevos contabilizados fue cercano a los 80 000 y el máximo de nauplios contabilizados rondó los 60 000 individuos (Figura 17 A). El análisis de correlación entre el número total de huevos y el número total de nauplios mostró una correlación positiva fuerte entre estas dos variables ( $r=0.71$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 17 B).



**Figura 17:** Correlación por tratamiento (A) y de los datos totales (B) del número de huevos y número de nauplios por desove de todas las muestras tomadas utilizando el método de Pearson ( $r=0.71$ ,  $p < 0.05$ ).

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos registrados, se obtuvo una correlación despreciable entre el número de huevos por desove y la temperatura con un índice de correlación  $r$  de  $-0.07$  (Figura 18 A) y una correlación baja entre el número de huevos por desove y la salinidad de los tanques experimentales con un valor del índice de  $0.12$  (Figura 18 B).



**Figura 18:** Correlación de parámetros de temperatura (A) y salinidad (B) con el número de huevos utilizando el método de correlación de Pearson.

## 5. Discusión

### 5.1. Efecto de inyecciones

La maduración ovárica y la diferenciación de las células germinales u oocitos en crustáceos, está determinada por la síntesis de vitelogenina o la proteína de la yema la cual está regulada por hormonas como la hormona liberadora de la gonadotropina (HLGn) o la hormona inductora al desove (HID) (Tinikul *et al.* 2011; Soonklang *et al.* 2012; Chen *et al.* 2014). La serotonina también ha sido identificada en intervenir en el sistema nervioso central, así como en los ovarios, para la maduración de los oocitos (Jayasankar *et al.* 2020). Tanto la disección realizada de los órganos reproductivos de las hembras, como los cortes histológicos de la presente investigación, mostraron el desarrollo y la maduración de los ovarios, por lo que estos resultados reflejan la capacidad inductora a la maduración de la serotonina y el antagonista de la dopamina, espiperona.

Las inyecciones de serotonina y espiperona generaron un estado de letargo en las hembras, caracterizado por una postura volteada en el fondo del tanque con flexión continua de pereiópodos y pleópodos, durante varios minutos. Inicialmente para el tratamiento del T2, se había definido una concentración de serotonina de 50  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal, como en investigaciones anteriores (Alfaro *et al.* 2004; Wongprasert *et al.* 2006; Tomy *et al.* 2016). Sin embargo, debido a los efectos mencionados, se utilizó la concentración de 40  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal de serotonina y de 4.0  $\mu\text{g/g}$  peso corporal de espiperona para el desarrollo del experimento.

El análisis semanal indica la efectiva inducción a la maduración ovárica a estados III y IV en los tres tratamientos y grupos control, con una mayor actividad de inducción en el tanque 2, con la mayor concentración de serotonina y espiperona evaluadas. En el T1 y en el T2 se observan valores más altos del IMO la semana siguiente de la aplicación de la inyección (semana 1, 3, 5, 7, 13 y 15). Este resultado es semejante al obtenido en la investigación realizada con la especie *L. stylirostris* por Alfaro *et al.* (2004) donde también se utiliza la serotonina y espiperona como tratamiento inductor a la maduración ovárica y se observa un aumento en los valores de IMO después de realizada la inyección.

Un estudio realizado con el camarón blanco de la India *Penaeus indicus* evaluó el efecto de la serotonina en la maduración ovárica comparando la expresión génica del tejido ovárico de hembras ablacionadas, hembras ablacionadas e inyectadas con serotonina al 50 µg/g de peso corporal y hembras control (no tratadas). Se analizaron cinco genes principales: dos genes involucrados en la vitelogénesis (*vg* y *vgr*) y tres involucrados en la maduración meiótica (*cdc2*, *ciclina B* and *tsp*). Se detectaron aumentos en la expresión génica de estos genes en las hembras ablacionadas y las hembras ablacionadas e inyectadas. Los genes *cdc2* y *ciclina B* aumentaron su expresión durante el estadio IV, es decir en la etapa más avanzada de la maduración ovárica, mostrando el efecto estimulante de la serotonina en la maduración sexual en esta especie. Adicional a esto, en estudios anteriores se registraron altos niveles del gen hepático *vg* transcrito en las etapas iniciales de vitelogénesis, pero una disminución de esta expresión durante la maduración ovárica, lo que sugiere una primera producción de la vitelogenina por el hepatopáncreas, y una posterior retención de este material de reserva por los oocitos para su desarrollo (Tomy *et al* 2016). Genes como el *cdc2* y la *ciclina B* también han aumentado su expresión en presencia de otras hormonas estimulantes a la maduración ovárica como la progesterona (Uengwetwanit *et al.* 2018).

## 5.2. Diferencias entre tanques

Las hembras expuestas a las inyecciones de serotonina y espiperona (T1 y T2) mostraron valores más altos en el índice de maduración ovárica y en la cantidad de huevos y nauplios producidos que las hembras sometidas a la ablación ocular, similar a lo reportado por Wongprasert *et al.* (2006). Wongprasert y colaboradores (2006) sugieren que esta diferencia en la maduración sexual puede deberse a que la eliminación del pedúnculo ocular interrumpe otros procesos fisiológicos de las hembras. No así, cuando se aplica la inyección de serotonina y espiperona, al tratarse de una técnica menos invasiva y más especializada. En este estudio, realizado con hembras del camarón tigre *Penaeus monodon* inyectadas con serotonina al 50 µg/g de peso corporal, se detectó un aumento en la concentración de serotonina en el tejido ovárico entre la etapa vitelogénica y la etapa madura pasando de  $3.53 \pm 0.26$  ng/mg de proteína a  $17.03 \pm 0.57$  ng/mg de proteína después de la inyección, lo que sugiere una función importante de la serotonina en la maduración del tejido ovárico, así como en el oviducto (Wongprasert *et al.* 2006).

### 5.3. Diferencias entre hembras tratadas y control

En el 2004, Alfaro y colaboradores proponen la hipótesis de la liberación de feromonas al medio, provocado por las inyecciones de serotonina y espiperona. El estudio de Alfaro *et al.* (2004), por primera vez, reportó el efecto inductor positivo de la inyección directa de serotonina y espiperona sobre dos especies de *Litopenaeus*. Este efecto se midió a concentraciones de 25 µg/g peso corporal (p.c.) de serotonina y 1.5 µg/g p.c. de espiperona en *L. stylirostris*, y 25 µg/g p.c. de serotonina y 5.0 µg/g p.c. espiperona, en *L. vannamei*. El efecto inductor sobre la madurez ovárica se observó también en las hembras control de ambas especies; sin embargo, el apareamiento y desove fueron mejores en la especie silvestre *L. stylirostris*. Varios autores señalan la relevancia de esta hipótesis, sin llegar a verificarla (Farhadi *et al.* 2020; Harlioğlu *et al.* 2020).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican una clara inducción de la madurez ovárica en función de las concentraciones de serotonina y espiperona evaluadas. Si bien no se encontraron diferencias significativas en el análisis del IMO según las fases experimentales definidas, en la comparación de esta variable con la totalidad de los datos si se registraron diferencias significativas. El análisis muestra una diferencia significativa de la maduración ovárica entre las hembras control del T2 con hembras inyectadas con la dosis 2 y las hembras control del T3 con hembras ablacionadas (Figura 13, Cuadro 5). Este resultado indica que las hembras control del T2 tuvieron una mayor maduración ovárica en comparación a las hembras control del T3, mostrando que el tratamiento de inyección de serotonina (40 µg/g de peso corporal) y de espiperona (4.0 µg/g peso corporal) fue más efectivo para estimular la maduración sexual de las hembras no tratadas.

El presente estudio, evaluando dos concentraciones de ambas moléculas y siguiendo un diseño experimental más robusto estadísticamente, refuerza claramente el efecto inductor directo de esta técnica de maduración sexual en las hembras inyectadas, e indirecto, en las hembras control. Además, se logró observar una intensa actividad de cortejo y apareamiento, principalmente en el T2, que en el reporte de Alfaro *et al.* (2004) no fue registrado para la especie *L. vannamei*. Esta fuerte actividad de cortejo y apareamiento se refleja con los resultados del número de hembras apareadas con desove y sin desove según el tanque y el tratamiento en la Figura 16. Estos aportes refuerzan la

hipótesis de la liberación de feromonas sexuales por las hembras inyectadas con serotonina y espiperona. Este estudio es un paso más en la búsqueda de alternativas a la ablación ocular y en la caracterización de las feromonas sexuales del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*, las cuales nos han sido identificadas hasta el momento.

#### **5.4. Interacción de las inyecciones con otras moléculas**

Además de su influencia directa en el tejido ovárico, la serotonina también influye en la producción directa o indirecta de otras moléculas como la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH), la hormona inhibidora de la muda (HIM), el metil farnesoato (MF), la hormona liberadora de la gonadotropina (HLGn) entre otras (Powell *et al.* 2015; Harhoğlu *et al.* 2020; Jayasankar *et al.* 2020).

Para el caso del MF, la serotonina tiene un efecto estimulante en su liberación (MF), el cual estimula la maduración ovárica en varias especies de camarones (Makkapan *et al.* 2011; Swetha *et al.* 2011; Farhadi *et al.* 2020). Makkapan *et al.* (2011) determinaron un aumento en la concentración de MF presente en la hemolinfa de *Fenneropenaeus merguensis* al realizar una inyección de serotonina al 1 µg/g de peso corporal, alcanzando una concentración de  $1.1 \pm 0.05$  ng/mL cinco días después de aplicada la inyección. Sin embargo, la serotonina también puede tener un efecto contrario al mencionado, dependiendo de la especie con la que se trabaje. Farhadi y colaboradores (2020) registraron un efecto estimulante de la serotonina en los niveles del MF en machos del cangrejo de río *Pontastacus leptodactylus*, pero un efecto inhibitorio para el caso de las hembras, estando en este caso relacionado con el sexo del organismo tratado. Estos autores también mencionan que en otras especies como *Procambarus clarkii* o *Portunus trituberculatus*, se ha determinado la influencia de la serotonina en el desarrollo gonadal teniendo un efecto positivo en su madurez sexual.

Con respecto a la dopamina, este neurotransmisor parece inhibir la liberación de la hormona estimuladora de las gónadas (HEG) y activar la liberación de la hormona inhibidora de las gónadas (HIG), por lo que su bloqueo con la espiperona, tiene un efecto directo sobre la activación de la maduración ovárica (Zapata *et al.* 2003; Alfaro *et al.* 2004; Cahansky *et al.* 2008).

### **5.5. Efecto de variables fisicoquímicas**

Además de los procesos fisiológicos internos de cada organismo, los factores ambientales también influyen en la reproducción de los crustáceos (Alfaro-Montoya y Vega 2011; Harlıoğlu y Farhadi 2017; Jayasankar *et al.* 2020). Variables físicas como la temperatura, la presión del agua, la cantidad de horas luz o variables químicas como la salinidad o disponibilidad de alimento tienen un efecto en tejidos involucrados en la reproducción como el órgano X o el sistema nervioso central (Harlıoğlu y Farhadi 2017; Jayasankar *et al.* 2020). Los resultados obtenidos de las correlaciones del número de huevos por desove con la salinidad y la temperatura no mostraron una relación significativa, por lo que para la presente investigación no fueron determinantes para la maduración ovárica y el desove de las hembras. Para el caso de la temperatura, esto puede deberse a que el rango al que las hembras fueron expuestas no fue tan amplio para poder distinguir alguna tendencia o relación entre las dos variables. En cuanto a la salinidad, los valores obtenidos se distribuyen en un rango mayor, ya que en las semanas de toma de datos hubo días de fuertes lluvias, disminuyendo los valores de salinidad registrados. Esto podría explicar el valor más alto de coeficiente de correlación, no obstante, no se obtuvo ningún resultado concluyente que relacione la salinidad con la calidad del desove de las hembras.

Sin embargo, en un estudio realizado con el cangrejo *Procambarus llaması*, se analizó el efecto de la temperatura a tres condiciones diferentes (16, 21 y 26 °C) en los valores de los índices gonadosomático y de maduración, los cuales fueron significativamente diferentes entre los tratamientos. En otra investigación, se obtuvo un aumento en la tasa de desove del langostino *Cherax quadricarinatus* conforme se aumentaba la temperatura, teniendo un desove más alto a los 30 °C (Harlıoğlu y Farhadi 2017). Por lo que evaluar la influencia de estas variables en la reproducción de *L. vannamei* podría tomarse en consideración para futuras investigaciones.

### **5.6. Agotamiento reproductivo**

Ciertas características morfológicas como el tamaño de los reproductores, el tipo de estructuras reproductoras, particularidades reproductivas como el número total de huevos y larvas por desove, así como análisis bioquímicos de tejidos, han sido utilizadas para conocer el rendimiento reproductivo en crustáceos (Palacios *et al.* 1999; Arcos *et al.* 2003;

Wassick *et al.* 2017; Magaña-Gallegos *et al.* 2021). En los tres tanques experimentales del presente trabajo, se obtuvo un valor máximo de maduración ovárica en la semana 5, y posterior a esta semana, se observa un decaimiento de los valores de esta variable (Figura 11). Esta disminución en la maduración puede deberse a un agotamiento de material de reserva necesario para la producción de huevos. Un resultado similar fue registrado por Palacios y colaboradores quienes registraron en *L. vannamei* una reducción en el número de desoves a partir de los 45 días (seis semanas) de realizada la ablación (Palacios *et al.* 1999).

La calidad de la producción de huevos en camarón está asociada a los nutrientes de reserva que dispongan las hembras antes del desove (Magaña-Gallegos *et al.* 2021). En un estudio realizado con hembras de esta misma especie, se comparó el rendimiento reproductivo y la calidad de los huevos de hembras reproducidas en un medio de cultivo con nutrientes y un medio con agua fresca y habiendo sido sometidas o no a la ablación ocular. Se obtuvo una mayor liberación de huevos en las hembras de los tanques enriquecidos con nutrientes, por lo que su disponibilidad afecta directamente en la calidad del desove (Magaña-Gallegos *et al.* 2021).

El agotamiento reproductivo también ha sido observado en otras especies marinas relacionado a factores como cambios estacionales, cambios en la temperatura o en la disponibilidad de alimentos (Donelson *et al.* 2010; Gruenthal *et al.* 2014).

### **5.7. Calidad de desove**

Los valores registrados en el presente trabajo para determinar la calidad de desove fueron mucho menores a los obtenidos en investigaciones previas. Estudios anteriores estimaron que hembras de entre 36 g y 45 g desovaron cerca 130 000 huevos (Ogle, 1992) mientras que hembras ablacionadas registran valores entre 101 000 y 116 000 huevos por desove (Palacios *et al.* 1999). Alfaro y Vaca (2000) reportaron entre 160 000 y 230 000 huevos por desove de hembras ablacionadas y hembras inyectadas con serotonina. Para hembras de *L. vannamei* de entre 30 g y 52 g, se ha registrado desoves de 150 000 hasta 400 000 huevos por hembra (Kannan *et al.* 2015).

Una de las posibles explicaciones de los bajos valores registrados en esta investigación, es la metodología empleada para la recolección de estas muestras. El conteo de huevos se basa en la toma de tres muestras de 50 ml de agua del tanque de desove, los huevos se sedimentan en el fondo del tanque y una adecuada homogenización es indispensable para lograr cifras representativas (Emerenciano *et al.* 2013; Magaña-Gallegos *et al.* 2021). De no realizarse esta homogenización del agua de los tanques de desove, podrían obtenerse muestra con valores sub o sobrestimados.

Adicionalmente, en un trabajo realizado en un criadero comercial del sureste de la India, el tiempo de espera para la eclosión y, por consiguiente, para la recolección de las muestras de nauplios, fue de 36 horas (Kannan *et al.* 2015). En el caso del presente trabajo, las muestras de agua de los tanques de desove fueron analizadas transcurridas entre 20 y 23 horas, por lo que los valores obtenidos pueden ser una subestimación de la cantidad real de nauplios.

El estudio de Alfaro *et al.* (2004), utilizando una sola concentración de serotonina y espiperona, reportó valores de número de huevos para *L. stylirostris* y *L. vannamei* inyectados y controles entre 100 000 y 200 000 huevos por desove, similares a los registrados en otras investigaciones (Ogle, 1992; Alfaro y Vaca, 2000; Palacios *et al.* 1999; Emerenciano *et al.* 2013; Magaña-Gallegos *et al.* 2021). Este reporte previo apoya la idea de un error técnico en las estimaciones del número de huevos de la presente investigación.

Por otra parte, el coeficiente de correlación del número de huevos y número de nauplios por desove muestra una correlación positiva con un valor de 0.71. Esto indica que a pesar de los bajos valores obtenidos, si existe una relación entre estas dos variables y que, a mayor número de huevos, mayor número de nauplios por desove. Esto supone que los datos fueron tomados bajo un mismo método y respalda la posibilidad de un error de muestreo. Por lo que, pese a la baja estimación de las muestras, se obtuvo una adecuada fertilización y eclosión de larvas.

## 6. Conclusión

La presente investigación permitió comparar, a nivel reproductivo, el efecto de dos técnicas de inducción a la maduración ovárica en una de las especies de camarón más cultivadas a nivel mundial, el camarón blanco del Pacífico Oriental *L. vannamei*. A diferencia de estudios anteriores, la maduración ovárica en las hembras sometidas a la ablación ocular fue similar a la maduración de las hembras tratadas con la técnica de inyección serotonina-espiperona, demostrando que el uso combinado de serotonina y espiperona es una técnica efectiva para estimular la maduración ovárica en hembras de esta especie. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que, hasta el momento, estas dos técnicas resultan equivalentes para la reproducción de esta especie en cautiverio.

Sin embargo, los tanques donde se aplicaron las inyecciones obtuvieron un mayor número de hembras apareadas y un mayor número de desoves, lo que sugiere que el uso combinado de serotonina y espiperona es una técnica más eficiente para la reproducción de este camarón. Por otra parte, los resultados mostraron una aceleración en la maduración ovárica en las hembras tratadas con las inyecciones de serotonina y espiperona en comparación con las hembras ablacionadas, lo que refuerza la efectividad de esta técnica. Así mismo, el tratamiento de inyección con una concentración menor a las utilizadas en investigaciones previas de serotonina (40  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal) y de espiperona (4.0  $\mu\text{g/g}$  peso corporal) fue favorable en la inducción a la maduración ovárica de las hembras de *L. vannamei*.

A pesar de no obtener diferencias significativas de la maduración sexual de las hembras inyectadas entre las dos concentraciones utilizadas en este estudio, sí se observaron diferencias significativas entre las hembras tratadas del tanque con la concentración más alta y las hembras control, quienes a su vez obtuvieron la mayor cantidad de hembras maduras. Esto respalda la hipótesis de la liberación de feromonas sexuales inducidas por la inyección de serotonina y espiperona.

Si bien, se logró demostrar la efectividad del uso combinado de la serotonina y el antagonista de la dopamina, la espiperona, es importante señalar que existen otros factores que influyen el éxito reproductivo de los camarones en cautiverio como el tipo de

alimentación suministrado a los organismos reproductores, así como la calidad de agua y nivel de nutrientes presentes en los tanques de cultivo.

En cuanto a la reproducción, los tanques con las hembras sometidas a la inyección obtuvieron un mayor número de hembras apareadas y un mayor número de desoves, lo que sugiere que adicional a los efectos ya mencionados sobre las hembras, esta técnica de maduración también podría estar afectando a los camarones machos. En este sentido surge la pregunta de si esta técnica también tiene un efecto en ejes endocrinos masculinos y si mejoraría la calidad sexual de los machos de esta especie de camarón.

Por otra parte, surge la pregunta de si esta técnica produce la liberación de derivados metabólicos que puedan ser caracterizados molecularmente y que eventualmente puedan ser considerados como contaminantes emergentes. Para abordar estas interrogantes es necesario disponer de recursos genéticos y bioquímicos de la especie que permitan la caracterización de las feromonas sexuales del camarón blanco del Pacífico. En este sentido las siguientes etapas de la investigación permitirán dar un siguiente paso para acercarse a esta caracterización molecular, y que en un futuro, las feromonas sexuales puedan ser implementadas como una técnica no invasiva y menos perjudicial que la ablación ocular para ser utilizada en la reproducción controlada de esta especie.

## **7. Recomendaciones**

- Debido a las diversas tareas de mantenimiento y limpieza del laboratorio, la alimentación de los organismos experimentales y de reserva, la toma y procesamiento de datos, para futuras investigaciones es recomendable la participación de otro u otra estudiante para facilitar la realización de las tareas semanales.
- En las etapas iniciales del experimento, es aconsejable establecer un cronograma semanal con la distribución de las tareas diarias a realizar.
- Realizar varias observaciones de identificación de los estados de madurez ovárica previas a la toma de datos, con el fin de distinguir a simple vista los cuatro niveles de maduración sexual de las hembras de camarón.

- Para facilitar la de toma de datos, preparar con antelación los cuadros u hojas de recolección de datos para agilizar el proceso.
- Realizar una bitácora con las tareas realizadas durante el día y observaciones que se consideren necesarias de señalar al menos una o dos veces por semana.
- En cuanto a las variables para determinar la calidad de desove, identificar la morfología de los huevos y nauplios previo a su conteo, para disminuir la posibilidad de errores de muestreo.
- Después de homogenizar el agua de desove de las hembras apareadas, realizar sifoneo para la toma de muestras.
- Etiquetar los tanques de toma de muestra para facilitar su uso y su limpieza.

## 8. Referencias bibliográficas

- Alcívar Pinargote, J. D., & Mendoza Bravo, C. A. (2018). Evaluación de la influencia de las actividades de producción acuícola (*Litopenaeus vannamei*) en el cambio de uso del suelo del Humedal La Segua [Tesis de bachillerato, Calceta: ESPAM MFL].
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., & Umaña-Castro, R. (2019). Research frontiers in penaeid shrimp reproduction: Future trends to improve commercial production. *Aquaculture*, 503, 70-87.
- Alfaro-Montoya, J., & Vega, L. A. (2011). The effect of environmental cues and neurotransmitters on male sexuality of the eastern Pacific *Penaeus* (*Litopenaeus*) species. *Aquaculture*, 316(1-4), 60-67.
- Alfaro, J., Zúñiga, G., & Komen, J. (2004). Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and a dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 236(1-4), 511-522.
- Almeida, E. A., Petersen, R. L., Andreatta, E. R., & Bainy, A. C. (2004). Effects of captivity and eyestalk ablation on antioxidant status of shrimps (*Farfantepenaeus paulensis*). *Aquaculture*, 238(1-4), 523-528.

- Amelia, F., Yustiati, A., & Andriani, Y. (2021). Review of shrimp (*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)) farming in Indonesia: Management operating and development. *World Scientific News*, 158, 145-158.
- Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Palacios, E., Vazquez-Boucard, C., & Racotta, I. S. (2003). Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture*, 228(1-4), 335-349.
- Arquitt, S., Honggang, X., & Johnstone, R. (2005). A system dynamics analysis of boom and bust in the shrimp aquaculture industry. *System Dynamics Review: The Journal of the System Dynamics Society*, 21(4), 305-324.
- Aoto, T., & Nishida, H. (1956). Effect of Removal of the Eyestalks on the Growth and Maturation of the Oocytes in a Hermaphroditic Prawn, *Panaeus kessleri* (With 2 Text-figures and 1 Plate). *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University*, 12(3), 412-424.
- Aprajita, K., Pandey, A. K., Singh, R., & Chauhan, U. K. (2014). Reproductive endocrinal regulation in decapod crustaceans: A review. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, 14(1-2), 55-65.
- Azibi, M., Draguet-Brughmans, M., Bouche, R., Tinant, B., Germain, G., Declercq, J. P., & Van Meerssche, M. (1983). Conformational study of two polymorphs of spiperone: possible consequences on the interpretation of pharmacological activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(3), 232-235.
- Baker, T. C. (2010). Insect pheromones: useful lessons for crustacean pheromone programs? In *Chemical communication in crustaceans* (pp. 531-550). Springer, New York, NY.
- Barón-Sevilla, B., Bückle-Ramírez, L. F., & Hernández-Rodríguez, M. (2004). Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, in a recirculating seawater system. *Ciencias marinas*, 30(1B), 179-188.
- Bauer, R. T. (2011). Chemical communication in decapod shrimps: the influence of mating and social systems on the relative importance of olfactory and contact pheromones.

In Chemical communication in crustaceans (pp. 277-296). Springer, New York, NY.

- Benzie, J. A. (1998). Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture*, 164(1-4), 23-47.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., & Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP publication*, 10(2004), 92.
- Bublitz, R., Sainte-Marie, B., Newcomb-Hodgetts, C., Fletcher, N., Smith, M., & Hardege, J. (2008). Interspecific activity of the sex pheromone of the European shore crab (*Carcinus maenas*). *Behaviour*, 145, 1465-1478.
- Cahansky, A. V., Kaiser Dutra, B., da Silva Castiglioni, D., Turcato Oliveira, G., Bond Buckup, G., & Rodríguez, E. M. (2008). Induction of ovarian growth in *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae) by means of neuroregulators incorporated to food. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 1201-1207.
- Cahansky, A. V., Medesani, D. A., Chaulet, A., & Rodríguez, E. M. (2011). In vitro effects of both dopaminergic and enkephalinergic antagonists on the ovarian growth of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), at different periods of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(1), 126-131.
- Chamberlain, G. W., & Lawrence, A. L. (1981). Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. *Journal of the World Mariculture Society*, 12(1), 207-224.
- Chen, T., Zhang, L. P., Wong, N. K., Zhong, M., Ren, C. H., & Hu, C. Q. (2014). Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) is predominantly expressed in the brain and negatively regulates hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression. *Biology of Reproduction*, 90(3), 47-1.
- Christie, A. E. (2011). Crustacean neuroendocrine systems and their signaling agents. *Cell and Tissue Research*, 345(1), 41-67.

- Diarte-Plata, G., Sainz-Hernández, J. C., Aguiñaga-Cruz, J. A., Fierro-Coronado, J. A., Polanco-Torres, A., & Puente-Palazuelos, C. (2012). Eyestalk ablation procedures to minimize pain in the freshwater prawn *Macrobrachium americanum*. *Applied Animal Behaviour Science*, *140*(3-4), 172-178.
- Diggles, B. K. (2019). Review of some scientific issues related to crustacean welfare. *ICES Journal of Marine Science*, *76*(1), 66-81.
- Dineshan S., & Sudha Devi, AR. (2020). Effects of serotonin and dopamine on ovarian development in the freshwater crab *Travancoriana schirnerae* (Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica*, *00*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/azo.12362>
- Donelson, J. M., Munday, P. L., McCormick, M. I., Pankhurst, N. W., & Pankhurst, P. M. (2010). Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish. *Marine Ecology Progress Series*, *401*, 233-243.
- Enríquez, F. J. (2003). Cultivos intensivo de *Litopenaeus vannamei* en agua con baja salinidad en Zamorano, Honduras. Tesis Ing Agro. El Zamorano, Honduras 29 p.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Miquelajauregui, M. M., & Gaxiola, G. (2013). Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture international*, *21*(5), 987-1007.
- FAO. (n.d.). Fisheries & Aquaculture - Programa de información de especies acuáticas - *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Recuperado el 4 de junio de 2021 de [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es)
- FAO (2002) Fishery Statistics – Aquaculture production 2000. FAO Year Book, Food and Agriculture Organization, Rome.
- FAO (2020) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.

- Farfante, I. P., & Kensley, B. (1998). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Journal of Crustacean Biology*, 18, 621-624.
- Farhadi, A., Harlioğlu, M. M., & Yılmaz, Ö. (2020). Effect of serotonin injection on the reproductive parameters and haemolymph methyl farnesoate level in the narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Aquaculture Research*, 51(1), 155-163.
- Fernández de Alaiza García Madrigal, R., da Silva, U. D. A. T., Tavares, C. P. D. S., & Ballester, E. L. C. (2018). Use of native and non-native shrimp (Penaeidae, Dendrobranchiata) in world shrimp farming. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 899-912.
- Flegel, T.W. (2009). Current Status of Viral Diseases in Asian Shrimp Aquaculture. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 61(3), 229-239.
- Glennon, R. A., Metwally, K., Dukat, M., Ismaiel, A. M., Herndon, J., Teitler, M., & Khorana, N. (2002). Ketanserin and spiperone as templates for novel serotonin 5-HT<sub>2A</sub> antagonists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(6), 539-558.
- Godínez-Siordia, D. E., Chávez-Sánchez, M. C., & Gómez-Jiménez, S. (2011). Acuicultura epicontinental del camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1), 55-62.
- Gopal, N., & Devi, A. R. S. (2019). Effect of administration of neurotransmitters: Serotonin and dopamine on testicular maturation in the freshwater crab *Travancoriana schirnerae* Bott, 1969 (Crustacea: Gecarcinucidae). *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 6(13), 413-428.
- Gruenthal, K. M., Gauger, B. J., & Drawbridge, M. A. (2014). Maternal reproductive exhaustion in a broadcast spawning marine finfish cultured for conservation. *Aquaculture*, 422, 129-135.
- Gutiérrez-Vera, J.A. (2022). Feromonas sexuales femeninas de contacto en *Litopenaeus vannamei*: Estandarización del protocolo para su detección y sus efectos en el comportamiento de cortejo en machos. [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y Educación superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio

[https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3663/1/tesis%20Jose%20Alberto%20Guti%C3%A9rrez%20Vera\\_21%20enero%202022.pdf](https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3663/1/tesis%20Jose%20Alberto%20Guti%C3%A9rrez%20Vera_21%20enero%202022.pdf)

- Hardege, J. D., & Terschak, J. A. (2010). Identification of crustacean sex pheromones. In *Chemical communication in crustaceans* (pp. 373-392). Springer, New York, NY.
- Hardege, J. D., Bartels-Hardege, H. D., Fletcher, N., Terschak, J. A., Harley, M., Smith, M. A., ... & Bublitz, R. (2011). Identification of a female sex pheromone in *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 177-189.
- Harlıoğlu, M. M., & Farhadi, A. (2017). Factors affecting the reproductive efficiency in crayfish: implications for aquaculture. *Aquaculture Research*, 48(5), 1983-1997.
- Harlıoğlu, M. M., Farhadi, A., & Harlıoğlu, A. G. (2020). Roles of Neurotransmitters in Decapod Reproduction. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 36(2), 633-639.
- ITIS. (2021), *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Recuperado el 5 de julio del 2021, de ITIS Report website: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=551682#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=551682#null)
- Jayasankar, V., Tomy, S., & Wilder, M. N. (2020). Insights on molecular mechanisms of ovarian development in decapod crustacea: Focus on vitellogenesis-stimulating factors and pathways. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 577925.
- Kamio, M., Yambe, H., & Fusetani, N. (2022). Chemical cues for intraspecific chemical communication and interspecific interactions in aquatic environments: applications for fisheries and aquaculture. *Fisheries Science*, 88, 203-239.
- Kannan, D., Thirunavukkarasu, P., Jagadeesan, K., Shettu, N., & Kumar, A. (2015). Procedure for maturation and spawning of imported shrimp *Litopenaeus vannamei* in commercial hatchery, southeast coast of India. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 6(4), 1-5.
- Laufer, H., Ahl, J. S., & Sagi, A. (1993). The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *American Zoologist*, 33(3), 365-374.
- Liang, L., MacDonald, K., Schwiebert, E. M., Zeitlin, P. L., & Guggino, W. B. (2009). Spiperone, identified through compound screening, activates calcium-dependent

chloride secretion in the airway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(1), C131-C141

- Magaña-Gallegos, E., Arévalo, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2021). Effects of using the biofloc system and eyestalk ablation on reproductive performance and egg quality of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)(Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae). *Animal Reproduction Science*, 228, 106749, 1-10.
- Makkapan, W., Maikaeo, L., Miyazaki, T., & Chotigeat, W. (2011). Molecular mechanism of serotonin via methyl farnesoate in ovarian development of white shrimp: *Fenneropenaeus merguensis* de Man. *Aquaculture*, 321(1-2), 101-107.
- Marin, P., Becamel, C., Chaumont-Dubel, S., Vandermoere, F., Bockaert, J., & Claeysen, S. (2020). Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors: toward the concept of 5-HT receptosomes. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 31, pp. 91-120). Elsevier.
- Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., Damrongphol, P., Wongprasert, K., Suseangtham, A. & Sobhon, P. (2006). Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*, 260(1-4), 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.010>
- Miranda, I., Valles, J. L., Sánchez, R., & Álvarez, Z. (2010). Cultivo del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en agua dulce. *Revista Científica*, 20(4), 339-346.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 187-199.
- Morales Covarrubias, M. S., Osuna-Duarte, A. G., Garcia-Gasca, A., Lightner, D. V., & Mota-Urbina, J. C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18(1), 19-25.
- Muakkassah-Kelly, S. F., Andresen, J. W., Shih, J. C., & Hochstein, P. (1983). Dual effects of ascorbate on serotonin and spiperone binding in rat cortical membranes. *Journal of Neurochemistry*, 41(5), 1429-1438.

- Mustard, J. A., Beggs, K. T., & Mercer, A. R. (2005). Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(3), 103-117.
- Ogle, J. T. (1992). A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 22(1-3), 267-274.
- Okumura, T. (2004). Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 38(1), 49-54.
- Okumura, T. (2007). Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kuruma prawns, *Marsupenaeus japonicus*. *Zoological Science*, 24(3), 233-240.
- Okamura, S., Kawaminami, T., Matsuura, H., Fusetani, N., Goshima, S. 2017. Behavioral assay and chemical characters of female sex pheromones in the hermit crab *Pagurus filholi*. *J. Ethol.*, 35, 169-176.
- Ortea, I., Cañas, B., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Gallardo, J. M. (2010). Identification of commercial prawn and shrimp species of food interest by native isoelectric focusing. *Food Chemistry*, 121(2), 569-574.
- Ottaviani, E. (2014). The importance of studying invertebrate immune-neuroendocrine functions. *Invertebrate Survival Journal*, 11(1), 1-3.
- Palacios, E., Pérez-Rostro, C. I., Ramírez, J. L., Ibarra, A. M., & Racotta, I. S. (1999). Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*, 171(3-4), 309-321.
- Pannouse, J. (1943). Influence de l'ablation du pedoncule oculaire sur la croissance d'ovarie chez la crevette *Leander serratus*. *CR Acad Sci Paris*, 217, 553-555.
- Peña Navarro, N., & Chacón Guzmán, J. (2019). Acuicultura en Costa Rica. Trabajo presentado en *World Aquaculture*, 23-28.
- Pillai, B. R., Sahoo, L., Sahu, S., Vijaykumar, S. M., & Sahu, S. (2010). Effect of unilateral eyestalk ablation on ovarian maturation and occurrence of berried females in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Indian J. Fish*, 57(4), 77-80.
- Pillay, T. V. R., & Kutty, M. N. (2005). *Aquaculture: principles and practices* (No. Ed. 2). Blackwell publishing.

- Pinoargote, G., Flores, G., Cooper, K., & Ravishankar, S. (2018). Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 49(10), 3270-3288.
- Powell, D., Knibb, W., Remilton, C., & Elizur, A. (2015). De-novo transcriptome analysis of the banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) and identification of genes associated with reproduction and development. *Marine Genomics*, 22, 71-78.
- Prasad, G. L. V., Naik, B. R., Ko, J. E., & Nagaraju, G. P. (2014). Effects of naloxone, serotonin, and dopamine on reproduction of the freshwater crab *Barytelphusa guerini*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 321(3), 173-182.
- Sainz-Hernández, J. C., Racotta, I. S., Dumas, S., & Hernández-López, J. (2008). Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*, 283(1-4), 188-193.
- Salunke, M., Kalyankar, A., Khedkar, C. D., Shingare, M., & Khedkar, G. D. (2020). A review on shrimp aquaculture in India: historical perspective, constraints, status and future implications for impacts on aquatic ecosystem and biodiversity. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(3), 283-302.
- SEPSA. 2018. Boletín Estadístico Agropecuario No. 28: serie cronológica 2014 2017. San José, Costa Rica.
- Sharker, M. R., Sukhan, Z. P., Kim, S. C., Lee, W. K., & Kho, K. H. (2020). Identification, characterization, and expression analysis of a serotonin receptor involved in the reproductive process of the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 555-567.
- Sittikankaew, K., Pootakham, W., Sonthirod, C., Sangsrakru, D., Yoocha, T., Khudet, J., ... & Karoonuthaisiri, N. (2020). Transcriptome analyses reveal the synergistic effects

of feeding and eyestalk ablation on ovarian maturation in black tiger shrimp. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.

Soonklang, N., Wanichanon, C., Stewart, M. J., Stewart, P., Meeratana, P., Hanna, P. J., & Sobhon, P. (2012). Ultrastructure of differentiating oocytes and vitellogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Microscopy Research and Technique*, 75(10), 1402-1415.

Stella, V. S., López Greco, L. S., & Rodríguez, E. M. (2000). Effects of eyestalk ablation at different times of the year on molting and reproduction of the estuarine grapsid crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*, 20(2), 239-244.

Stickney, R. R., & Treece, G. D. (2012). History of aquaculture. *Aquaculture Production Systems*, 15.

Swetha, C. H., Sainath, S. B., Reddy, P. R., & Reddy, P. S. (2011). Reproductive endocrinology of female crustaceans: perspective and prospective. *Journal of Marine Science Research and Development S*, 3, 1-13.

Thiel, M., & Breithaupt, T. (2010). Chemical communication in crustaceans: research challenges for the twenty-first century. In *Chemical communication in crustaceans* (pp. 3-22). Springer, New York, NY.

Tidwell, J. H. (2012). *Aquaculture production systems*. John Wiley & Sons.

Tinikul, Y., Poljaroen, J., Nurai, P., Anuracpreeda, P., Chotwiwatthanakun, C., Phoungpetchara, I., Kornthong, N., Poomtong, T., Hanna, P.J., & Sobhon, P. (2011). Existence and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Cell and Tissue Research*, 343(3), 579-593.

Tinikul, Y., Soonthornsumrith, B., Phoungpetchara, I., Meeratana, P., Poljaroen, J., Duangsuwan, P., Soonklang, N., Mercier, A.J., & Sobhon, P. (2009). Effects of serotonin, dopamine, octopamine, and spiperone on ovarian maturation and

embryonic development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Crustaceana*, 1007-1022.

Tomy, S., Saikrithi, P., James, N., Balasubramanian, C. P., Panigrahi, A., Otta, S. K., ... & Ponniah, A. G. (2016). Serotonin induced changes in the expression of ovarian gene network in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 452, 239-246.

Tsukimura, B. (2001). Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist*, 41(3), 465-476.

Uawisetwathana, U., Leelatanawit, R., Klanchui, A., Prommoon, J., Klinbunga, S., & Karoonuthaisiri, N. (2011). Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp. *PloS One*, 6(9), e24427.

Uengwetwanit, T., Ponza, P., Sangsrakru, D., Wichadakul, D., Ingsriswang, S., Leelatanawit, R., Klinbunga, S., Tangphatsornruang, S., & Karoonuthaisiri, N. (2018). Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to reproduction of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine genomics*, 37, 69-73.

Vaca, A. A., & Alfaro, J. (2000). Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*, 182(3-4), 373-385.

Vaghela, A., & Kundu, R. (2012). Spatiotemporal variations of hermit crab (Crustacea: Decapoda) inhabiting rocky shore along Saurashtra coast, western coast of India.

Valverde-Moya, J. A., & Alfaro-Montoya, J. (2014). Productividad y rentabilidad del cultivo de camarones marinos en el Golfo de Nicoya, Costa Rica.

Valverde-Moya, J. A., & Alfaro-Montoya, J. A. (2013). La experiencia del cultivo comercial de camarones marinos en estanques de producción en Costa Rica. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 5(1), 87-105.

Vaz-Pires, P., Seixas, P., & Barbosa, A. (2004). Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture*, 238(1-4), 221-238.

Vleugels, R., Verlinden, H., & Vanden Broeck, J. (2015). Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter*, 2.

- Warton, D. I., & Hui, F. K. (2011). The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology*, 92(1), 3-10. <https://doi.org/10.1890/10-0340.1>
- Wassick, A., Baeza, J. A., Fowler, A., & Wilber, D. (2017). Reproductive performance of the marine green porcelain crab *Petrolisthes armatus* Gibbes, 1850 in its introduced range favors further range expansion. *Aquatic Invasions*, 12(4), 469-485.
- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Huang, H., Li, F., & Xiang, J. (2014). Comparative transcriptomic characterization of the early development in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PloS one*, 9(9), e106201.
- Wongprasert, K., Asuvapongpatana, S., Poltana, P., Tiensuwan, M., & Withyachumnarnkul, B. (2006). Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 261(4), 1447-1454
- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., & Sorgeloos, P. (2001). Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202(1-2), 1-21.
- Wu, W. H., & Cooper, R. L. (2012). Serotonin and synaptic transmission at invertebrate neuromuscular junctions. *Experimental neurobiology*, 21(3), 101.
- Wyatt, T. D. (2003). Pheromones and animal behaviour (Vol. 626). Cambridge University Press, Cambridge.
- Wyatt, T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A*, 196(10), 685-700.
- Wyatt, T. D. (2014). Introduction to chemical signaling in vertebrates and invertebrates. *Neurobiology of Chemical Communication*, 1, 1-22.
- Wyban, J. A., & Sweeney, J. N. (1989). Intensive shrimp growout trials in a round pond. *Aquaculture*, 76(3-4), 215-225.
- Zapata, V., Greco, L. L., Medesani, D., & Rodríguez, E. M. (2003). Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. *Aquaculture*, 224(1-4), 339-352.