



## **Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola**

**Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez,  
Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe  
Nieto López, David A. Villarreal Cavazos,  
Julián Gamboa Delgado, y Carlos A.  
Martínez Palacios**

**Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola**  
2022, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios.

Programa Maricultura  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León 2022

Copias disponibles en:  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Biológicas  
**Programa Maricultura**  
Cd. Universitaria  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León  
C.P. 66455  
Tel.+Fax. 818352 6380  
E-mail: [lucia.cruzsr@uanl.edu.mx](mailto:lucia.cruzsr@uanl.edu.mx)

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

- Autores del escrito. 2022. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios. Investigación e innovación en nutrición acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.473 ISBN: 978-607-27-1732-9. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias

## Directorio

Dr. Santos Guzmán López  
Rector

Dr. Juan Paura García  
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña  
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas  
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

### Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, y Carlos A. Martínez Palacios.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455  
Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx  
Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2022. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado, ©Carlos A. Martínez Palacios.

ISBN:978-607-27-1732-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores. El contenido es responsabilidad de los autores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

## **Respuesta Antioxidante y del Sistema Inmune de Machos Reproductores de *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) Alimentados con Dietas Suplementadas con Vitamina E**

Grecia Montalvo, Sarahi Campos, Martín Arenas, Alvaro Barreto, Karla Escalante<sup>1</sup>, Gerard Cuzon, Gabriela Gaxiola.

Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) Sisal. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México (UNAM). México.

E-mail: greciamontalvofernandez@gmail.com

---

### **Resumen**

La adición de suplementos vitamínicos a la dieta podría controlar el síndrome de melanización de las gónadas. Un alimento balanceado con alta calidad nutricional se empleó como dieta control (149 mg/kg) y se prepararon dietas de tratamiento con 3 niveles de vitamina E: 894 mg/kg (dieta A), 1639 mg/kg (dieta B) y 2384 mg/kg (dieta C). Se instalaron tres tanques de 500 L para cada tratamiento y se colocaron siete individuos en cada tanque. La cantidad y calidad de los espermatozoides fueron cuantificados y clasificado como células normales, anormales o muertas. Se cuantificó el colesterol, triglicéridos, glucosa, proteína total en la hemolinfa y la actividad de Profenoloxidasa (ProFO) y de enzimas antioxidante: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gpx) en el aparato reproductor. Además, se cuantificó la expresión diferencial de genes del sistema inmune y los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) en el aparato reproductor. La cantidad y calidad de esperma fue mayor en los camarones alimentados con la dieta A. La adición de vitamina E a la dieta A, condujo a una disminución del colesterol y triglicéridos. La peroxidación lipídica y la expresión diferencial de genes del sistema inmune también fueron menor en la dieta A, lo que sugiere que esta dieta contribuye a un buen estado fisiológico, donde la activación del sistema inmunológico y los genes que codifican las enzimas antioxidantes no son necesarios. Sin embargo, con el aumento de vitamina E en las dietas B y C, el contenido de triglicéridos y la peroxidación lipídica aumentó en la hemolinfa. Los machos alimentados con las dietas B y C presentaron una alta actividad de las enzimas antioxidantes y poca cantidad de esperma, lo que sugiere un estado de estrés oxidativo. Por lo tanto, la dieta basal A suplementada con 894 mg/kg de vitamina E es recomendado para el cultivo de machos reproductores de *L. vannamei*.

Palabras clave: camarón, inmune, calidad espermática, estrés oxidativo, vitamina E.

## 1. Introducción

Durante el proceso de cultivo de camarón, uno de los obstáculos para tener machos reproductores de calidad, que aseguren altas tasas de fertilización, es la melanización del aparato reproductor. Este proceso es inducido por el estrés oxidativo y puede provocar la disminución de espermatozoides viables y esterilidad (Parnes *et al.*, 2006). Los agentes oxidantes son producidos de manera natural por el metabolismo celular en procesos básicos como la respiración, la ovogénesis y la espermatogénesis (Hargreaves, 1998). Es por esto que se hace necesario controlar el estrés oxidativo para evitar afectaciones en la capacidad reproductiva.

La inclusión de vitaminas en la dieta de camarones puede ser una estrategia útil para controlar los radicales libres por su alta capacidad antioxidante. Se conoce que las vitaminas desempeñan funciones en la maduración sexual de vertebrados e invertebrados y que participan en varios procesos como la espermatogénesis y la protección de las membranas biológicas de la peroxidación de lípidos (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003).

Desde la década de los 70, la investigación en nutrición de camarón se centró en identificación de compuestos estimulantes de la maduración, el desarrollo de dietas y los requerimientos de lípidos y vitaminas fundamentalmente la A, C y E. Sin embargo, los requerimientos de vitaminas para los reproductores en muchas especies de camarón aún no se han definido, porque las dietas artificiales para reproductores generalmente se complementan con una mezcla completa de vitaminas (Wouters *et al.*, 2001).

Para lograr una reproducción exitosa de los camarones peneidos es igualmente importante la calidad reproductiva de machos y hembras, sin embargo, se ha prestado mucha atención a los efectos de la dieta en el desarrollo de las hembras (Cahu *et al.*, 1991; Cahu *et al.*, 1995; Wouters *et al.*, 1999b; Wouters *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Arshadi *et al.*, 2020) mientras los estudios de machos reproductores son más escasos (Leung-Trujillo and Lawrence, 1988).

En uno de los pocos estudios en los que se ha explorado la nutrición de los reproductores machos se pudo comprobar que los machos de *Litopenaeus setiferus* L alimentados con una dieta deficiente en vitamina E tenían un porcentaje significativamente menor de espermatozoides normales, en comparación con los camarones alimentados con una dieta que contenía vitamina E (Chamberlain 1988).

En otro estudio con la especie *Marsupenaeus japonicus* Bate se probaron dietas que contenían 0, 500, 1.000 y 1.500 mg de L-ascorbil-2-fosfato de magnesio (APMY), un derivado hidrosoluble de

la vitamina C y se evaluó las respuestas en crecimiento, supervivencia y el índice gonadosomático (peso de la gónada como porcentaje del peso total del cuerpo). Los individuos alimentados con dietas que contenían 500, 1.000 y 1500 mg/kg de APMY produjeron un crecimiento y una supervivencia favorables. El índice gonadosomático de los machos alimentados con la dieta con 1500 mg / kg de APM Y fue significativamente mayor que los de los camarones alimentados con 0 y 500 mg/kg. (Alava *et al.*, 1993).

En un trabajo reciente realizado con machos de *Panaeus monodon* Fabricius se estudió el efecto de diferentes concentraciones vitamina E (200, 600 y 1000 mg / kg) sobre la regeneración y calidad del espermátforo que se evaluaron mediante el peso del espermátforo, el recuento de espermatozoides y las tasas de ausencia de espermátforo. El peso del espermátforo, la cantidad de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales fue superior en individuos alimentados con dietas suplementadas con vitamina E con respecto a la dieta control ( $p < .05$ ), pero no hubo diferencias significativas entre los individuos sometidos a las dietas suplementadas. El número total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó con el aumento de vitamina E (600 y 1000 mg/kg). Los autores concluyeron que 200 mg /kg de vitamina E en el alimento podría promover eficazmente la regeneración del espermátforo y mejorar la cantidad de espermatozoides de *Panaeus monodon* (Jiang *et al.*, 2020).

En el caso particular de *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) un estudio realizado con machos reproductores demostró que una dieta típica de maduración de alimento fresco (60% calamar, 40% de poliqueto *Glycera dibranchiata*) provocó pérdida de peso en los individuos y disminuyó el conteo total de espermatozoides, por lo que los autores concluyeron que la dieta de maduración no es nutricionalmente óptima para machos reproductores (Chamberlain y Lawrence, 1981).

Pérez-Velázquez *et al.* (2003) realizaron un estudio donde se probaron diferentes dietas, eliminando de manera selectiva algunos componentes de la dieta basal de maduración, como la mezcla de vitaminas, colesterol, fosfolípidos y Astaxantina. Evaluaron su efecto sobre la calidad reproductiva en machos reproductores de *L. vannamei*. Sus resultados demostraron que la cantidad de esperma de camarones alimentados con la dieta control (la cual contenía mezcla de vitaminas) fue significativamente mayor que la de los camarones alimentados con la dieta sin vitaminas ( $4.6 \pm 3.2$  million sperm cell y  $- 1.7 \pm 2.6$  million sperm cells respectivamente). Aunque este estudio no fue diseñado para evaluar el efecto de ninguna vitamina en particular, sí permitió demostrar que

las vitaminas juegan un papel importante en la capacidad reproductiva de machos de *L. vannamei* (Leung-Trujillo and Lawrence 1988).

En un estudio más específico se estudiaron los efectos de la eliminación de las vitaminas liposolubles individuales (A, D, E y K) de las dietas semipurificadas sobre el crecimiento y la supervivencia de *Litopenaeus vannamei*. Los tratamientos incluyeron una dieta control suplementada con vitaminas A, D<sub>3</sub>, E y K<sub>3</sub> y dietas donde se excluyeron de manera individual cada uno de estas vitaminas. El mejor crecimiento (aumento de peso de 7283%) se observó en camarones alimentados con una dieta control con suplementos de las vitaminas. Se produjo un crecimiento significativamente menor en camarones alimentados con dietas deficientes en vitamina A (6242%), D<sub>3</sub> (5588%) y E (4821%). Los camarones alimentados con una dieta sin suplemento de vitamina E tuvieron significativamente la supervivencia más baja. La mayoría de los camarones alimentados con la dieta sin vitamina E suplementaria exhibieron un oscurecimiento del hepatopáncrea que no se observó en los otros tratamientos (Haiqui *et al.*, 1992).

Para *L. vannamei* se han sugerido requerimientos óptimos de vitamina E. Akiyama *et al.* (1992) propusieron 300 mg/kg para la formulación de dietas comerciales, estas estimaciones se realizaron basándose en cambios en los parámetros de crecimiento. Posteriormente He & Lawrence (1993b) evaluaron dietas purificadas con diferentes cantidades de vitamina E y basándose en el incremento del peso corporal, propusieron un requerimiento óptimo de 99 mg/kg de vitamina E. Sin embargo; no existen estudios que propongan una cantidad de vitamina E óptima, para esta especie, basándose en la calidad espermática, lo cual es de vital importancia para lograr una buena capacidad reproductiva de la especie en condiciones de cultivo.

Para evaluar el estrés oxidativo en camarones usualmente se mide la concentración de lípidos y otros metabolitos en la hemolinfa, la actividad de enzimas antioxidantes como: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutation peroxidasa (Gpx) que ayudan a controlar las especies reactivas de oxígeno. Además, el sistema inmune se activa en condiciones de estrés, por lo que, la expresión diferencial de los genes del sistema inmune también ayuda a conocer el estado fisiológico de los individuos. Algunos de los genes del sistema inmune de camarones son: alpha2 macroglobulina (a2M), hemocianina (Hc), peneidina (Pen), profenoloxidasa (proFO). La estimación de todos estos parámetros nos permite explicar los resultados referentes a la calidad espermática.

Teniendo en cuenta la capacidad antioxidante de la vitamina E y su importancia en la espermatogénesis de camarones, nos planteamos la siguiente hipótesis: si se alimentan individuos machos reproductores de *L. vannamei* con una dieta suplementada con diferentes cantidades de vitamina E, se debe lograr una mayor cantidad y calidad espermática comparado con individuos alimentados con una dieta sin el suplemento vitamínico. En este escenario podemos predecir una disminución del estrés oxidativo, expresado como una disminución de lípidos en la hemolinfa, disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, una baja expresión diferencial de los genes del sistema inmune, así como de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes en individuos alimentados con dietas suplementadas con vitamina E. Para someter a prueba esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos: 1) Determinar la cantidad y calidad espermática en individuos alimentados con diferentes concentraciones de vitamina E, 2) determinar la concentración de triglicéridos, colesterol, profenoloxidasa y proteínas totales en la hemolinfa, 3) cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) en el aparato reproductor, 4) Determinar la expresión diferencial de los genes del sistema inmune ( $\alpha 2M$ , Hc, Pen y ProFO) y los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) en el aparato reproductor.

## **2. Materiales y Métodos**

### ***Material experimental***

Los camarones empleados se obtuvieron en el área de cría larvaria en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal (Facultad de Ciencias de la UNAM). Se emplearon tanques rectangulares de 1.50 m de largo, por 50 cm de ancho y 1 m de profundidad, con el fondo cóncavo, de fibra de vidrio revestidos de blanco con un volumen de 400 litros y una capacidad para sembrar 20,000 organismos por tanque. Se mantuvo la temperatura entre 28- 30°C y un fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad). Los tanques de cultivo se llenaron con agua de mar previamente filtrada utilizando filtro de 10 y 5 micras. Se añadió al agua EDTA (10mg/L) para tener una salinidad de cultivo de 36 ppm. Aunque los nauplios se alimentan de sus reservas nutricionales se le adicionó una pequeña porción de microalgas (*Chetoceros ceratosporum* y *Tetraselmis chuii*). Se realizó el recambio de agua de 50% en los estadios de Mysis (MI, MII, MIII). En el estadio de postlarva (PL5) se realizó el recambio de agua de un 60%. Posteriormente las postlarvas se pasaron al área de engorda para la etapa de crecimiento hasta ser adulto reproductores.



### ***Condiciones de crecimiento***

Los animales en el área de engorda se mantuvieron en dos tanques con revestimiento circular de geomembrana (20 000 litros, 1 m de profundidad) en un sistema de biofloc con aireación constante, sin recambio de agua. La temperatura del agua 27 °C y la salinidad al 35%. Diariamente se tomaron los parámetros de la calidad del agua (oxígeno disuelto, pH y temperatura) tres veces al día. Los animales se alimentaron con una dieta comercial tres veces al día (9:20 am, 4:05 y 8:05 pm). Una vez a la semana se realizó la medición de nitrato, nitrito y amonio en los tanques. Previo al montaje del experimento los animales se pasaron a un área de aclimatación en un sistema de recirculación de agua clara, diluyendo el biofloc gradualmente, donde permanecieron de 3 a 4 días. Posteriormente se procedió al sexado de los animales en tinas de 50 L, para separar los machos reproductores que se emplearon en el experimento.

### ***Dietas implementadas***

Se utilizó como control positivo una dieta basal (G. Gax) reconocida para el cultivo de camarón (Tabla 1) la cual contiene 149 mg/kg de vitamina E. Se prepararon tres dietas a partir de la dieta basal con diferentes inclusiones de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Se prepararon 3 kg de cada una. El procedimiento se realizó mezclando las diferentes harinas y luego se le añadieron los ingredientes líquidos. Posteriormente se mezclaron las diferentes cantidades de aglutinantes con agua para luego ser unido con la masa que contiene los ingredientes y mezclarlo durante 20 minutos. Se añadió 1 L de agua y se terminó de mezclar. Posteriormente se pasó la masa por una moledora y al final se puso a secar en un horno a 60°C durante 8 horas.

Tabla 1. Composition and proximate analysis of experimental diets.

<i>Ingredientes</i> (% peso seco)	Basal	A	B	C
Harina de sardina <sup>a</sup>	40.45	40.45	40.45	40.45
Harina de calamar <sup>a</sup>	4.6	4.6	4.6	4.6
Harina de trigo <sup>b</sup>	18	17.9	17.8	17.7
Suero de leche	12	12	12	12
Concentrado de proteína de soja	10	10	10	10
Levadura de cerveza	5	5	5	5
Aceite de pescado <sup>a</sup>	4	4	4	4
Aceite de soya	2	2	2	2
Mezcla de aminoácidos <sup>d</sup>	2.35	2.35	2.35	2.35
Rovimix <sup>®</sup> Premix <sup>c</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
Rovimix <sup>®</sup> vit E <sup>®e</sup>	0	0.1	0.2	0.3
Alginato de sodio	1.5	1.5	1.5	1.5
<i>Análisis aproximado % DW</i>				
humedad	6.27	8.57	8.26	8.33
proteínas	42.5	42.5	42.5	42.5
lípidos	11.61	11.24	11.79	11.03
ceniza	14.28	14.30	14.43	14.54
carbohidratos	23.5	23.5	23.5	23.5
energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	18	18	18	18

<sup>a</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V. Jalisco, MX. <sup>b</sup>Casa Santos Lugo S.A. de C.V. Mérida, MX.

<sup>d</sup>LYS+LEU+OHproline. <sup>e</sup>DMS Nutritional Products México S.A. de C. V.

### ***Diseño experimental***

Para el experimento se emplearon camarones con un peso promedio de 19.7 g. Se evaluaron 4 tratamientos (dieta basal, dieta A, dieta B y dieta C) detalladas en el acápite anterior. Se dispusieron tres tanques de 500L para cada tratamiento, considerados como la unidad experimental y siete individuos por cada tanque, distribuidos aleatoriamente. Se utilizó un sistema de recirculación de agua clara. A partir del cuarto día, se comenzó a contar de manera oficial cada registro. Se

monitorearon los parámetros de oxígeno y temperatura y se les cambiaba el agua de manera diaria para evitar que los desechos eleven los niveles de amonio y disminuyan los niveles de oxígeno. Los animales se mantuvieron un mes con las diferentes dietas.

### ***Muestreo***

Un mes después de exponer a los individuos a las dietas se procedió a realizar el muestreo para lo cual se seleccionaron al azar 4 individuos de cada tanque y se tomaron muestras de hemolinfa y aparato reproductor. Se realizó la biometría de los animales para determinar el peso promedio. La hemolinfa se recogió del seno ventral en una jeringa de 30 G × 13 mm precargada con anticoagulante de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una solución isotónica de camarones (SIC-EDTA) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA Na<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.3) y se empleó para determinar los metabolitos. Se utilizó un espermátforo para determinar la calidad espermática, del resto del aparato reproductor una parte se conservó a -80 ° C para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes y otra parte en 600 µL de una solución RNA later a -80 ° C para la determinación de la expresión diferencial de los genes del sistema inmune y las enzimas antioxidantes.

### ***Calidad espermática***

Para el estudio de la calidad espermática se extrajo un espermátforo de manera manual. Se colocó en un tubo de ensayo de 5 ml, previamente llenado con 2 ml de solución libre de calcio, y se procedió a liberar las células espermáticas macerando el tejido en un líquido homogenizador. De la solución resultante se extrajeron 900 µl y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, pasando la solución espermática por una malla de 90-110 micras. Después se añadió 100 µl de azul de tripan, y se dejó reposar de 15 a 20 minutos en refrigeración. Posteriormente se añadió una gota de la solución espermática que contiene el colorante a una cámara de Neubauer y se observó a través del microscopio con un aumento 40X. Las células espermáticas enfocadas se clasificaron en tres grupos: normales, anormales y muertas, esto con el objetivo de determinar la calidad espermática. Además, se contabilizó el número de células espermáticas en cada uno de los tratamientos.

### ***Metabolitos en hemolinfa***

Los metabolitos triglicéridos, colesterol y glucosa fueron medidos en hemolinfa, empleando un kit comercial para diagnóstico médico (Randox ©, Tlalnepantla, México) (Hernández-López, 2001; Martínez Porchas *et al.*, 2013). La solución de hemolinfa con anticoagulante se centrifugó a 800 g durante 3 min a 4 ° C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf®. La absorbancia de las muestras (10 µL) se registraron por triplicado en un lector de microplacas a 490 nm (Appliskan ©, Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA), y las concentraciones se calcularon a partir de una solución de sustrato estándar. Se midió la proteína soluble total en hemolinfa, según Bradford (1976) adaptado a un método de microplaca usando 200 µL de un concentrado de reactivo colorante (Bio-Rad, Philadelphia, PA) y albúmina de suero bovino como estándar (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA). La absorbancia de muestras (10 µL) se leyó por triplicado a 595 nm (Appliskan ©, Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA).

### ***Actividad de enzimas antioxidantes y estrés oxidativo***

Se determinó la actividad enzimática de Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y Glutathion peroxidasa (Gpx, EC 1.11.1.9) en el aparato reproductor. Para la actividad de SOD se utilizó un kit comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Una unidad de superóxido dismutasa se definió como la cantidad de enzima requerida para inhibir la actividad de la xantina al 50% en 20 min. Para la actividad de la catalasa, se realizó una adaptación, en una microplaca usando la técnica reportada por Hadwan y Abed (2016), incubando 10 µL de enzima obtenida en muestras de hemolinfa en dos placas de 96 pocillos. Un volumen de 100 µL de tampón fosfato (pH 7,4) en una microplaca mientras que 100 µL del mismo tampón con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para la segunda microplaca. Se incubaron muestras en ambas microplacas durante 3 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µL de molibdato de amonio. En ambos casos, la absorbancia se midió por triplicado a 450 nm en un lector de microplacas (Beckman Coulter® Modelo DTX 880, Brea, CA). La actividad de la Glutathion peroxidasa fue medida por espectrofotometría como la tasa de reducción de NADPH a 340 nm (25 ° C) usando el protocolo de Plagia y Valentine (1967) modificada para microplacas de 96 pocillos. Se adicionó 15 µL de muestra diluida a 120 µL de buffer Tris-HCL (50mmol L<sup>-1</sup>, pH= 7.6) que contenía 0.1 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 0.14 mmol L<sup>-1</sup> de NADPH, 1 mmol L<sup>-1</sup> de glutatión y 1 U de glutatión reductas. La reacción se inició con la adición de 15 µL de t- butylhydroperóxido 0.2 mmol L<sup>-1</sup>. La actividad de

glutación peroxidasa fue estimada utilizando el coeficiente de extinción molar de NADPH ( $6.220 \text{ mol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y expresada en unidades internacionales ( $\mu\text{mol NADPH consumido min}^{-1}$ ). Como parte del estrés oxidativo se determinó la peroxidación de lípidos (LPO) empleando una modificación para microplacas del método FOX. Este método se basa en la oxidación del reactivo  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  por agentes oxidantes de la muestra que luego se unen con el reactivo xilenol naranja (XO). Después de una hora de incubación se obtiene un complejo  $\text{Fe}^{+3}$ -XO, de color y se midió la absorbancia a los 560 nm. Para la cuantificación de los peróxidos de lípidos no se utilizó trifenilfosfina sino se realizó a través de una curva de calibración con concentraciones conocidas de hidroperóxido de terc-butilo (Banerjee *et al.*, 2003).

### ***Extracción de RNA y síntesis de cDNA***

El RNA total fue extraído a partir de 100 mg de aparato reproductor, preservado previamente en 600  $\mu\text{L}$  de una solución de RNA later. Se empleó el protocolo de Trizol (TRIZOL®, Life Technologies, Carlsbad, CA) y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ . La concentración y pureza del RNA fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260/280 nm con un espectofotómetro (Nanodrop) (ThermoScientific, Wilmington, DE). Solo las muestras con un valor de absorbancia superior a 1.8 fueron tomadas para los siguientes experimentos. Las muestras fueron tratadas con DNAsa libre de RNAsa para eliminar alguna posible contaminación con DNA en un volumen de reacción de 10  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min, posteriormente se les añadió a las muestras 1  $\mu\text{L}$  de EDTA y se incubaron a  $65^\circ\text{C}$  durante 10 min. El DNA complementario (cDNA) fue obtenido en un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . La reacción contenía: 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, 2  $\mu\text{L}$  de  $10\times$  reverse transcriptase (RT) buffer, 0.8  $\mu\text{L}$  de 10 mM dNTP, 2  $\mu\text{L}$  de  $10\times$  RT Primers Random, 1  $\mu\text{L}$  de U-reverse transcriptase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 10.2  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa. El programa de PCR tiene los siguientes pasos:  $25^\circ\text{C}$  durante 10 min,  $37^\circ\text{C}$  durante 120 min,  $85^\circ\text{C}$  durante 5 min y finalmente a  $4^\circ\text{C}$  termina la reacción.

### ***Expresión diferencial de genes (RT-q PCR)***

La expresión de los genes del sistema inmune: alpha2 macroglobulina ( $\alpha 2\text{M}$ ), hemocianina (Hc), peneidina (Pen), profenoloxidasa PproFO) y los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx), fueron medidas por RT- q PCR. Se emplearon los *primers* específicos publicados para *L. vannamei* Aguilera *et al.*, 2018 (Tabla 2). OligoPerfect® software

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Todos los *primers* fueron producidos por Sigma-Aldrich® (Toluca, México). Las reacciones de RT- q PCR se llevaron a cabo en un termociclador fluorométrico IQ5 (BIO-RAD®, Philadelphia, PA) empleando una mezcla de SYBR Green (Bio-Rad®, Philadelphia, PA). Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pocillos y en un volumen de reacción de 15 µL la cual contenía: 7.5 µL de super mix SYBR Green (Bio-Rad®, Philadelphia, PA), 0.5 µL de cada primer específico (forward y reverse), 4,5 µL de agua libre de pirógenos y 2 µL de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 30 s. Cada muestra fue corrida en triplicado con el gen de la β actina como control interno (GenBank # AF300705) (Wang, Chang, & Chen, 2007). Para cada *primer* se incluyó un control negativo sin cDNA. Después de la amplificación de PCR se realizó un análisis de la curva Melt para corroborar que solo hubo un producto de amplificación. La expresión relativa de cada gen analizado se calculó a partir de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , donde  $C_t$  es el valor correspondiente al número de ciclo en el que la fluorescencia fue generada (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para amplificar genes del sistema inmune y enzimas antioxidantes en *L. vannamei*

Gen	Secuencia		Tamaño pb
	foward	reverse	
<i>β-Actin</i>	5'-TGTGTGACGACGAAGTAGCC-3'	5'-TGGTCGTGAAGGTGTAACCA- 3'	142
A2M	-GTTTCCATCACCGCCTCA-3'	5'-ACCTTATCCTGCGGTGCCA- 3'	227
ProFO	5'-ACCGTACAAGGAAGAGGAAC-3'	5'-TCTCGCAGGTCGTTGTTGAT- 3'	222
Hc	5'- GTCTTAGTGGTTCTTGGGCTTGTC-3'	5'- GGTCTCCGTCCTGAATGTCTCC-3'	124
Pen3a	5'-CTGGTCTTCTTGCCTCCTT-3'	5'-ATATCCCTTTCCACGTGAC- 3'	121
SOD	5'-AGCTTACATCTCCATCCTGG-3'	5'-ATCTGAGGACTGACTGTGC-3'	189
CAT	5'-ACTCCCATTTGCTGTTTCGT-3'	5'-ATCCCAATTTCTTCTTCTG-3'	195
Gpx	5'-AGTCGATGTCAACGGGTCAAC-3'	5'-GCTGAACCTCTTAAACGGCTG- 3'	180

### ***Statistical analysis***

Todo el análisis de datos estadísticos y la visualización gráfica se realizaron en el software R 4.0.2 (R Core Team 2021). Usamos la prueba de razón de verosimilitud y los criterios de información de Akaike para seleccionar el modelo parsimonioso óptimo con la variable predictora más informativa. Para la validación del modelo, inspeccionamos el trazado de los residuos de Pearson frente a cada variable explicativa, frente a los valores ajustados y los datos observados frente a los valores ajustados. La significancia se asignó a  $p < 0,05$ . Cuando se observaron diferencias significativas, se realizaron pruebas post hoc con un ajuste de Tukey de la biblioteca emmeans (Lenth 2021).

### **Cantidad de esperma.**

Ajustamos un modelo mixto binomial negativo con el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015). Los datos del recuento de espermatozoides se modelaron en función del tratamiento (basal, A, B y C) y la

calidad del esperma (normal, anormal y muerto). El modelo incluyó Tanque y organismo como efectos aleatorios. El método utilizado para la estimación de los parámetros fue de máxima verosimilitud y los valores p se calcularon utilizando la aproximación de Wald.

### Enzimas antioxidantes y genes del sistema inmune

Ajustamos un modelo de mínimos cuadrados generalizados con el paquete nlme (Pinheiro *et al.*, 2021). Los datos de la actividad enzimática se modelaron en función del tratamiento. Por otro lado, los datos de expresión diferencial de los genes del sistema inmune se transformaron en base diez logarítmica y el modelo incluyó una variación de estructura por nivel de tratamiento. El método utilizado para la estimación de parámetros fue de máxima verosimilitud.

## **3. Resultados**

### ***Calidad espermática***

La cantidad total de esperma fue mayor en los individuos alimentados con la dieta A ( $1463.61 \times 10^4$  células / mL), superando la cantidad de esperma en la dieta basal ( $1375.16 \times 10^4$  células / mL) aunque no hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo; al aumentar la cantidad de vitamina E en las dietas B y C hubo una disminución considerable de la cantidad de esperma ( $417.08.46 \times 10^4$  células / mL y  $455.81 \times 10^4$  células / mL respectivamente) (Figura 1-A).



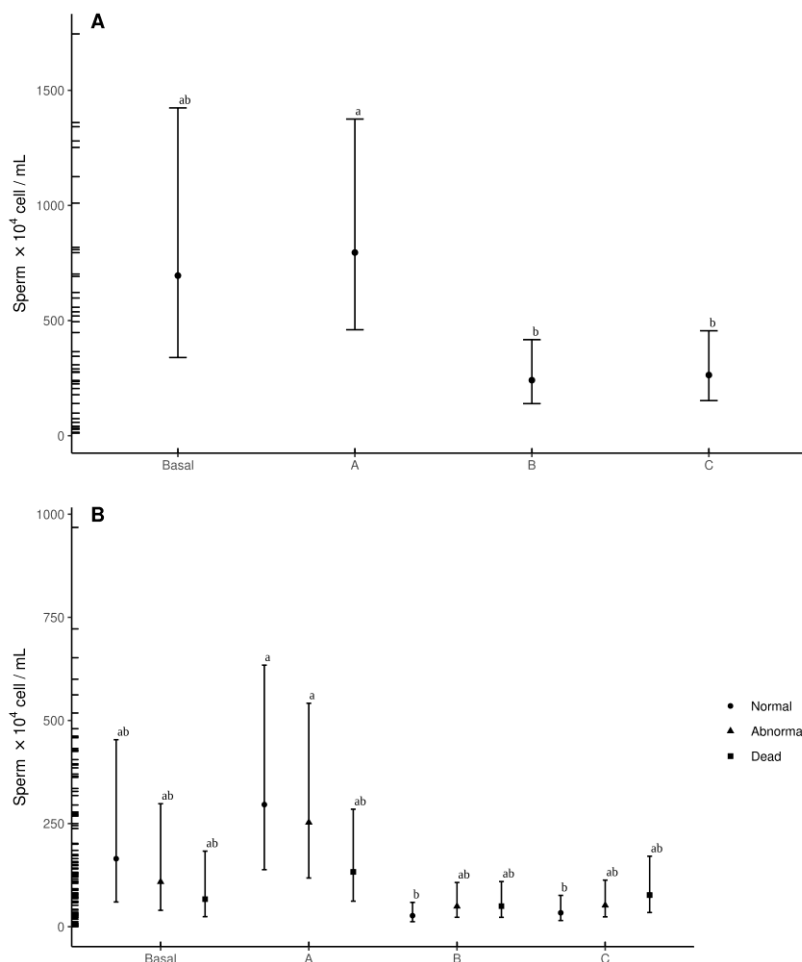


Fig. 1. Cantidad (A) y calidad espermática (B) de machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* sometidos a dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia  $p < 0.05$ .

En cuanto a la calidad espermática encontramos un patrón similar. El número de células espermáticas normales fue superior en los individuos de la dieta A ( $634 \times 10^4$  células / mL) comparado con la dieta basal ( $453.3 \times 10^4$  células / mL) y al aumentar la cantidad de vitamina E hubo una disminución de células espermáticas normales en las dietas B y C ( $58.9 \times 10^4$  y  $75.8 \times 10^4$  células / mL respectivamente) (Figura.1-B).

### Metabolitos en la hemolinfa

La cantidad de triglicéridos en la dieta A ( $0.31 \pm 0.01$ ) fue menor con respecto a la dieta basal ( $0.35 \pm 0.01$ ), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). La concentración de triglicéridos fue significativamente mayor en los individuos alimentados con la dieta C ( $0.42 \pm 0.02$  mg / mL) con respecto a los de la dieta B ( $0.25 \pm 0.06$  mg / mL) (Figura 2-C). Los metabolitos colesterol, glucosa y ProFo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Figuras 2 A, B y D). Las proteínas totales en hemolinfa no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 3).

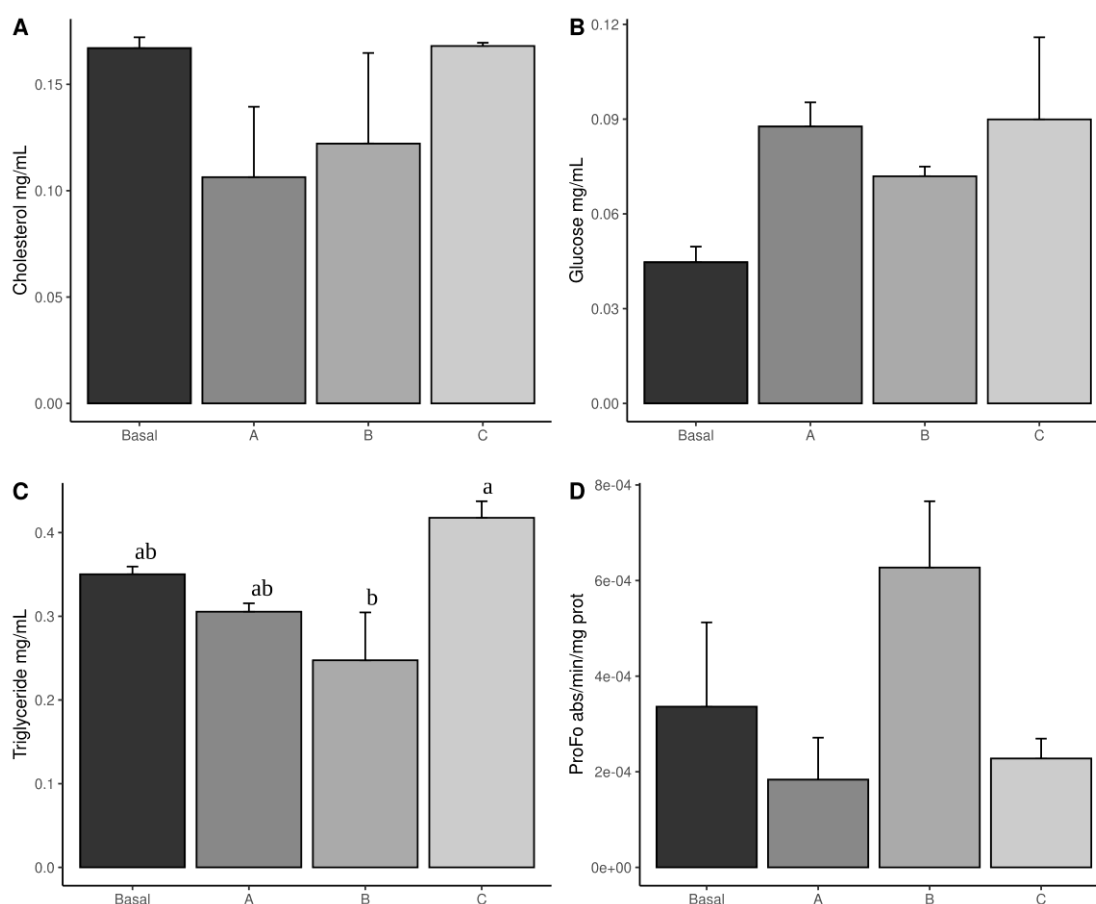


Fig. 2.

Concentración de metabolitos en hemolinfa de machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia  $p < 0.05$ .

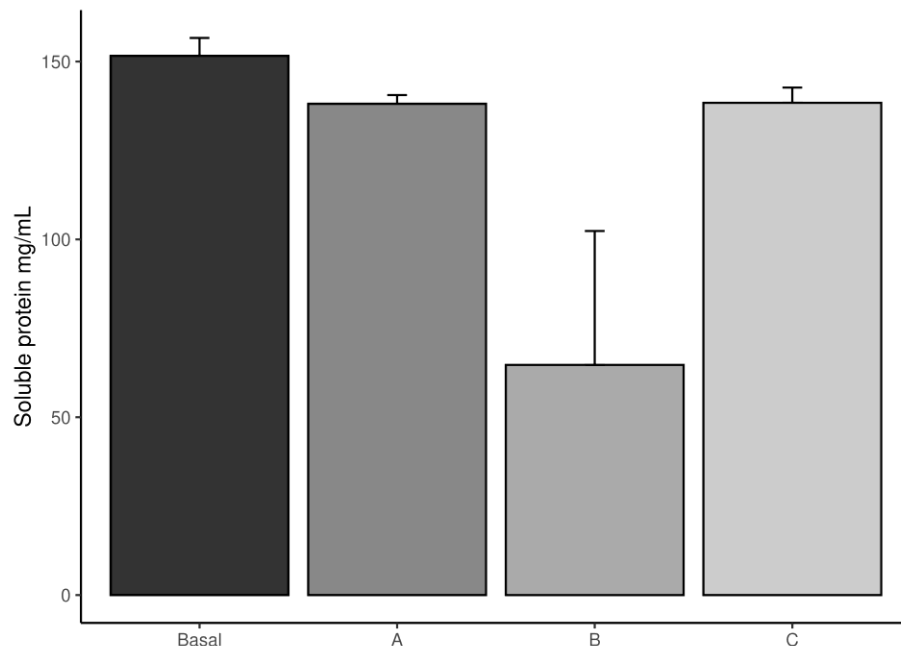


Fig. 3. Concentración de proteínas solubles totales en hemolinfa de machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia  $p < 0.05$ .

#### ***Actividad enzimas antioxidantes y estrés oxidativo***

La mayor actividad de la SOD se obtuvo en individuos alimentados con la dieta C (10.7973 U/mg of prot), aunque no presentó diferencias significativas con los alimentados con la dieta B (9.5316) ( $p < 0,05$ ). La menor actividad de esta enzima se encontró en individuos alimentados con las dietas basal y dieta A (6.5585 y 6.4416 U/mg of prot respectivamente) (Figura 4-A). La actividad de la enzima CAT no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Figura 4-B). En cuanto a la actividad de la Glutación peroxidasa solo se encontraron diferencias significativas con los individuos alimentados con la dieta A (8.5576) ( $p < 0,05$ ) los cuáles presentaron los menores valores de actividad enzimática (Figura 4-C). La peroxidación de lípidos (LPO) fue superior en los individuos alimentados con la dieta C (90.7009 nMol peróxido/mL) y se observó una ligera disminución de peroxidación lipídica en individuos alimentados con la dieta A (82.5032 nMol

peróxido/mL) con respecto a los alimentados con la dieta basal (87.8833 nMol peróxido/mL), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4-D).

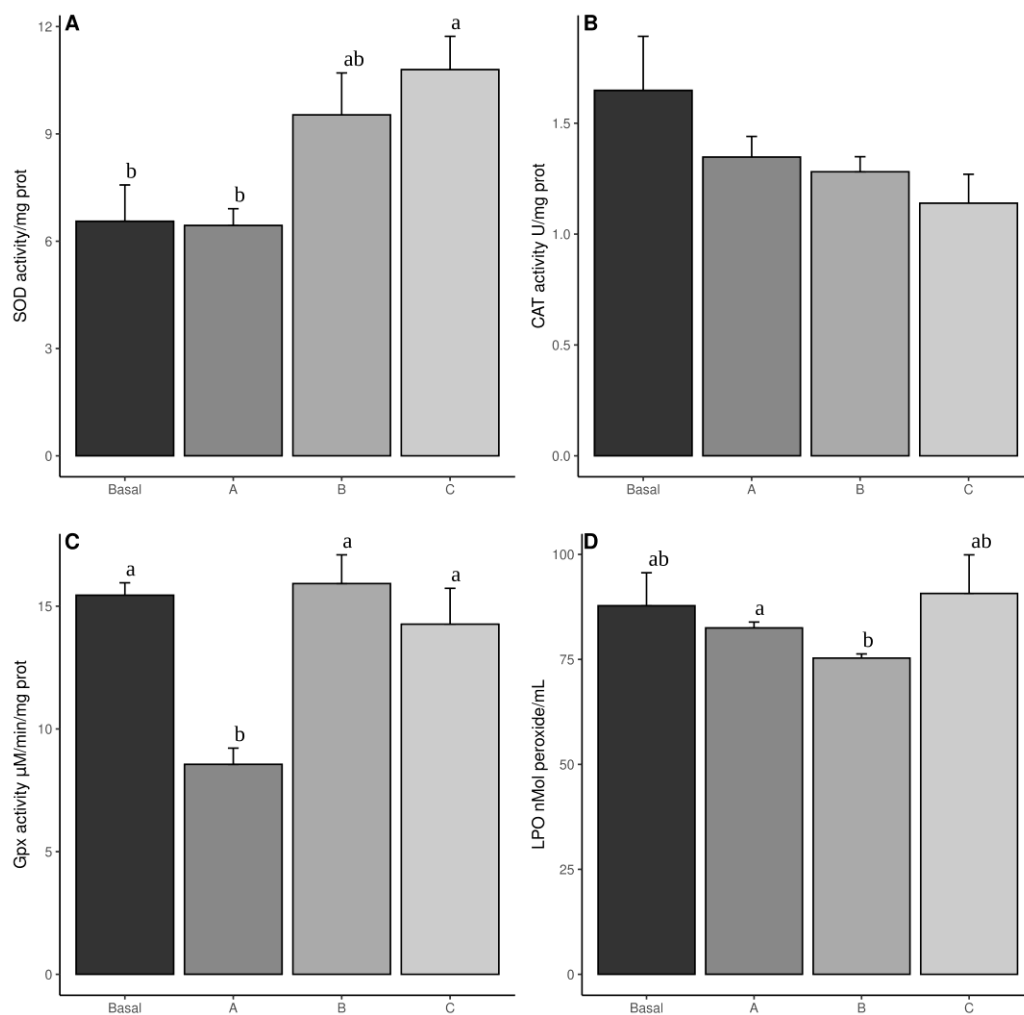


Fig. 4. Actividad de

enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos en aparato reproductor de individuos machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia  $p < 0.05$ .

#### ***Análisis de la expresión relativa de genes del sistema inmune y enzimas antioxidantes.***

Se encontró un patrón consistente donde la expresión relativa de los genes del sistema inmune analizados es menor en individuos alimentados con la dieta A (A2M, 0.0786; Pen, 0.0587; Hc, 0.2714; ProFo, 0.0471) con respecto a la dieta basal (A2M, 0.1261; Pen, 0.3173; Hc, 27.3728; ProFo, 0.0550), aunque no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). La expresión relativa

de los genes A2M, Pen y proFo (0.4620; 1.2434; 1.0732 respectivamente) en individuos sometidos a la dieta C fue superior con respecto a los demás tratamientos (Figuras 5- A, C y D).

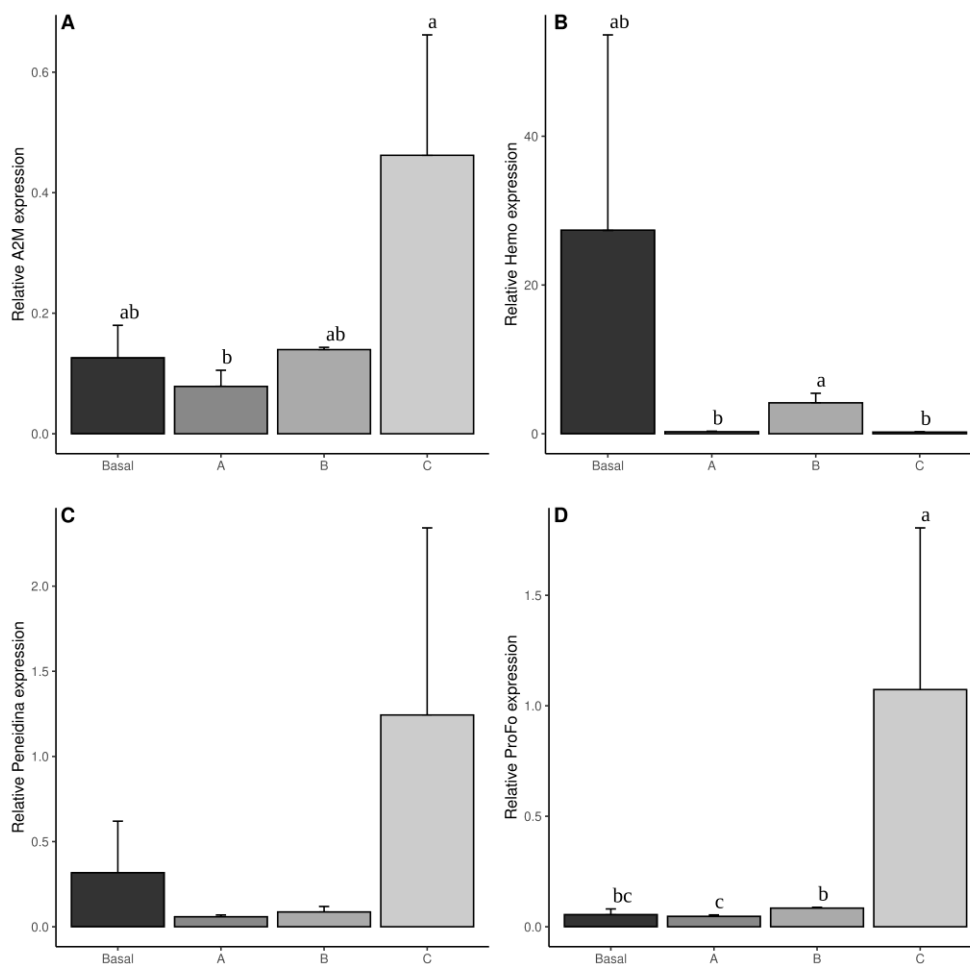


Fig. 5. Expresión relativa de los genes del sistema inmune en aparato reproductor de individuos machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes concentraciones de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia  $p < 0.05$ .

Para las tres enzimas antioxidantes, la expresión relativa fue menor en los individuos alimentados con la dieta basal (SOD, 0.0668; CAT, 0.3866; Gpx, 0.2083) seguido de los individuos alimentados con la dieta A (SOD, 0.0191; CAT, 1.0323; Gpx, 1.2319), aunque no mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). La mayor expresión relativa fue en los individuos alimentados con la dieta C (SOD, 3.5557; CAT, 2.6400; Gpx 1.9072) (Figura 6).

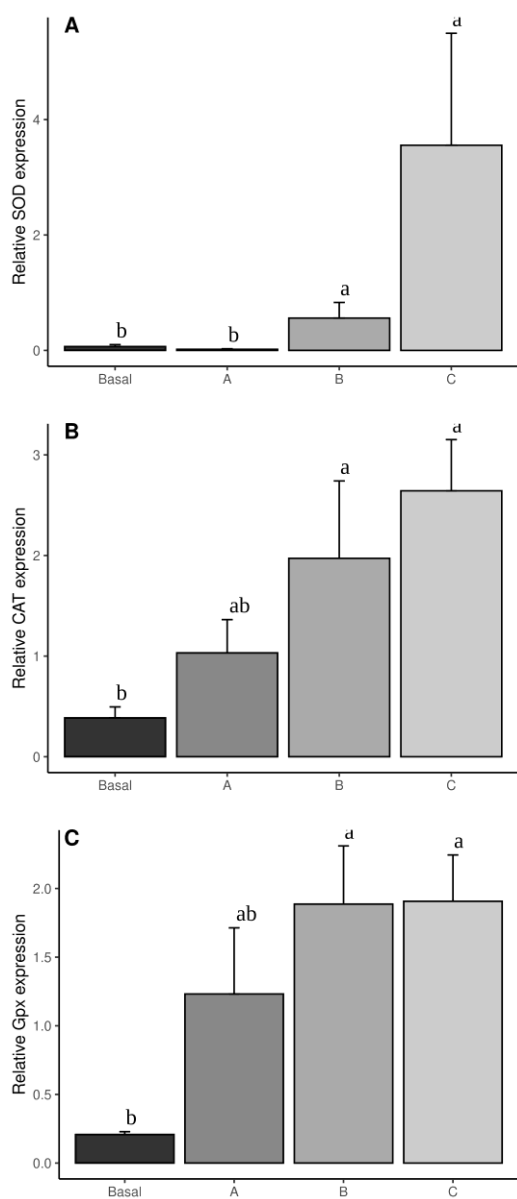


Fig. 6. Expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, Gpx) en aparato reproductor de individuos machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes concentraciones de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia  $p < 0.05$ .

#### 4. Discusión

Los resultados de nuestro estudio indican que los individuos alimentados con la dieta A, conformada por la dieta basal suplementada con 894 mg/kg de vitamina E, fueron los que mostraron una mayor cantidad y calidad espermática superando a la dieta basal, la cual no tiene vitamina E adicional, aunque no se mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Nuestro resultado concuerda con lo reportado en un estudio con machos reproductores de *Litopenaeus setiferus* alimentados con una dieta deficiente en vitamina E donde se encontró que estos individuos tenían un porcentaje significativamente menor de espermatozoides normales, en comparación con los camarones alimentados con una dieta que contenía vitamina E (Chamberlain, 1988).

Otro ejemplo que coincide con nuestros resultados es el estudio realizado con machos de la especie *Panaeus monodon* donde los autores encontraron que al emplear vitamina E en la dieta en una concentración de 200 mg/kg se observó un incremento del peso del espermatóforo, la cantidad de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales comparado con individuos alimentados con una dieta sin el suplemento de vitamina E (Jiang *et al.*, 2020).

Un resultado que concuerda con lo obtenido en nuestro trabajo es un estudio realizado con *Litopenaeus vannamei* donde evaluaron la influencia de la eliminación selectiva de algunos componentes de la dieta basal de maduración y los autores observaron que la cantidad de espermatozoides de camarones alimentados con la dieta control (la cual contenía mezcla de vitaminas, incluyendo la vitamina E) fue significativamente mayor que la de los camarones alimentados con la dieta sin vitaminas ( $4.6 \pm 3.2$  million sperm cell y  $1.7 \pm 2.6$  million sperm cells respectivamente) (Leung-Trujillo and Lawrence 1988).

Los resultados de nuestro trabajo y las demás investigaciones mencionadas anteriormente pueden deberse a la capacidad antioxidante que tiene la vitamina E que logró controlar el estrés oxidativo, atenuando así los efectos negativos que tiene la oxidación sobre la calidad espermática.

Para explicar el control del estrés oxidativo en camarones alimentados con la dieta A comparado con la dieta basal analicemos los parámetros metabólicos, bioquímicos y moleculares estudiados. Los niveles de colesterol, triglicéridos y ProFo en hemolinfa disminuyeron en los individuos alimentados con la dieta A comparados con aquellos sometidos a la dieta basal, aunque solo hubo diferencias significativas para los triglicéridos ( $p < 0.05$ ) (Figura 2).

Las enzimas antioxidantes son inducibles por lo que una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos sugiere menos radicales libres y en ese caso, cabe esperarse que haya una menor actividad de enzimas antioxidantes. Esto se corrobora en nuestro estudio ya que en el aparato reproductor de individuos alimentados con la dieta A se obtuvieron menores valores de actividad enzimática para SOD, CAT y Gpx, comparado con los individuos alimentados con la dieta basal, aunque solo para la glutatión peroxidasa hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 4).

Este resultado coincide con un estudio realizado con *Litopenaeus vannamei* donde evaluaron los efectos de dos concentraciones de vitamina E (100 y 300 mg/kg) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y Gpx. Los resultados indicaron que la actividad más baja de las tres enzimas antioxidantes se obtuvo en individuos alimentados con la dieta suplementada con 300 mg/kg de vitamina E (He *et al.*, 1993). Esto sugiere que con esta concentración de vitamina E se logra un estado fisiológico adecuado donde debe haber pocos radicales libres en la hemolinfa.

Además, la expresión relativa del gen que codifica para SOD es menor en individuos alimentados con la dieta A comparado con la dieta basal, lo que indica que hubo una menor transcripción de ese gen en el aparato reproductor, posiblemente, ante un estado fisiológico con pocos radicales libres. Los valores de expresión relativa de los genes que codifican para CAT y Gpx en aparato reproductor de individuos alimentados con la dieta A son numéricamente superiores a los obtenidos en individuos con la dieta basal, aunque no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). (Figura 5).

La peroxidación lipídica también fue menor en los individuos de la dieta A en comparación con los individuos alimentados con la dieta basal, aunque no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Este proceso metabólico trae consigo afectaciones, ya que los radicales libres interactúan con los electrones libres de los lípidos que están en las membranas celulares desestabilizándolas. Los agentes antioxidantes son capaces de atrapar los radicales libres e impedir que se unan a los lípidos de las membranas ayudando a la terminación de la reacción de peroxidación (Marnett, 1999). Se conoce que las membranas mitocondriales de las células musculares y del hepatopáncrea de *Litopenaeus vannamei* son más susceptibles a la peroxidación de los ácidos grasos cuando la dieta es deficiente en vitaminas (He & Lawrence, 1993).

Si analizamos la expresión relativa de los genes del sistema inmune evaluados en nuestro estudio (A2M, Hc, Pen y ProFo) podemos ver que en todos los casos los transcritos de estos genes en el



aparato reproductor es menor en individuos alimentados con la dieta A con respecto a los individuos alimentados con la dieta basal. Esto sugiere que la dieta A contribuye a que los individuos tengan un buen estado fisiológico donde no es necesario la activación del sistema inmune. Sin embargo, en la dieta C donde hay indicios de estrés oxidativo (mayor cantidad de triglicéridos, mayor actividad de enzimas antioxidantes, mayor peroxidación de lípidos) hubo una mayor expresión de los transcritos de A2M, Pen y ProFo.

Es claro en nuestros resultados que hay un valor óptimo de vitamina E (894 mg/kg) que garantiza el control del estrés oxidativo y permite una mayor calidad espermática y por encima de este valor se obtiene un efecto contrario.

Por otra parte en nuestro estudio también encontramos que en las dietas B (suplementada con 1639 mg/kg de vitamina E) y dieta C (suplementada con 2384 mg/kg de vitamina E) el incremento en la cantidad de vitamina E tuvo un efecto contrario observándose una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) de la cantidad y la calidad del espermatozoide lo cual sugiere que el efecto antioxidante de la vitamina E está regulado por ciertos límites, por lo que es un error pensar que siempre que se adicione más vitamina E se obtendrá una mayor calidad espermática.

Un resultado similar se obtuvo en un estudio realizado con la especie *Panaeus monodon* donde emplearon tres concentraciones de vitamina E (200, 600 y 1000 mg/kg) y se observó que la cantidad de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales fue superior en individuos alimentados con 200 mg/kg de vitamina E con respecto a la dieta control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo; estas variables disminuyeron cuando se aumentó la concentración de vitamina E a 600 y 1000 mg/kg (Jiang *et al.*, 2020). Los autores consideraron estas concentraciones como un exceso de vitamina E para sus condiciones experimentales.

El exceso de vitamina también se ha reportado en un estudio realizado con individuos juveniles y adultos de la especie *Artemesia longinaris* Bate (Penaeidae) donde se observó una menor tasa de crecimiento corporal, supervivencia y además afectaciones histológicas del hepatopáncrea en los animales alimentados con una dieta suplementada con 3000 mg/kg de vitamina E. Los autores consideraron que era una cantidad excesiva y establecieron el nivel óptimo de vitamina E para *Artemesia longinaris* en 1500 mg/kg (Fernández, 2002).

Para explicar la disminución de la calidad espermática en las dietas B y C a partir de nuestros datos experimentales podemos decir que hubo un incremento de los triglicéridos en la hemolinfa fundamentalmente en individuos de la dieta C ( $p < 0.05$ ) al igual que de colesterol, aunque con éste

último no hubo diferencias significativas con las demás dietas. Además, en la dieta B se obtuvieron los mayores valores de profenoloxidasa (ProFo) (figura 2). Las dietas B y C presentaron los mayores valores en la actividad de SOD que es una enzima inducible que actúa cuando hay altas concentraciones de radicales libres. La Gpx también tuvo una gran actividad en individuos alimentados con las dietas B y C (casi el doble de la actividad de individuos alimentados con la dieta A) lo cual indica la presencia de peróxidos en la hemolinfa (Figura 4).

Si analizamos la expresión de los genes del sistema inmune podemos ver que en los individuos alimentados con la dieta C todos los genes mostraron una mayor expresión relativa excepto hemocianina, esto apunta a una condición fisiológica desfavorable (figura 5). La expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) es mucho mayor en individuos de las dietas B y C (figura 6) lo cual sugiere que fisiológicamente se está estimulando la ruta de transcripción de estos genes para la síntesis de proteínas antioxidantes. Esto suele suceder ante un escenario de estrés oxidativo y posiblemente es lo que haya causado una disminución de la cantidad y calidad espermática en individuos alimentados con las dietas B y C (figura 1).

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan una valiosa información para la reformulación y la optimización de las dietas utilizadas para machos reproductores de *L. vannamei*. Nos permitirá además proponer una cantidad de vitamina E óptima para machos reproductores basada en la cantidad y calidad espermática en condiciones de cultivo.

## 5. Conclusiones

El empleo de la dieta A compuesta por el alimento basal (G. Gax) suplementado con 894 mg/kg de vitamina E favoreció la cantidad y la calidad espermática de machos reproductores de *L. vannamei* comparada con individuos alimentados con la dieta basal sin suplemento vitamínico. El incremento de la calidad espermática estuvo asociado a la disminución de triglicéridos en la hemolinfa. Además, menor actividad de enzimas antioxidantes y expresión de los genes del sistema inmune en el aparato reproductor. Todo esto apunta a que los individuos sometidos a esta dieta tenían un estado fisiológico favorable.

Contrariamente, la cantidad y calidad espermática disminuyó considerablemente cuando las cantidades de vitamina E se incrementaron en las dietas B (1639 mg/kg de vitamina E) y C (2384 mg/kg de vitamina E). La disminución de la calidad espermática estuvo relacionada con un

incremento en los triglicéridos en la hemolinfa, incremento de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y Gpx y además un incremento de los transcritos de los genes del sistema inmune (A2M, Pen y ProFo) en el aparato reproductor sugiriendo una condición fisiológica de estrés oxidativo.

Existe un valor óptimo de vitamina E con el cuál se puede controlar el estrés oxidativo y mejorar la cantidad y calidad espermática. Sin embargo, con cantidades de vitamina E superiores se obtiene una disminución de la cantidad y calidad espermática.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan una valiosa información para la reformulación y la optimización de las dietas utilizadas para machos reproductores de *L. vannamei* en cultivo. Sugerimos la dieta basal G. Gax suplementada con 894 mg/kg de vitamina E con el objetivo de controlar el estrés oxidativo y una mayor protección del aparato reproductor para lograr una buena cantidad y calidad espermática.

## Referencias

- Aguilera-Rivera D, Prieto-Davó A, Rodríguez-Fuentes G, Escalante-Herrera K, Hernández-López J, Chávez-Sánchez C, Rodríguez-Canul R, Gaxiola G\*. 2018. Immune response of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. Journal of World Aquaculture Society (DOI: 10.1111/jwas.12543).
- Braga A, Lopes D, Magalhães V, Klosterhoff MC, Romano LA, Poersch LH, Wasielesky W. 2018b. Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. Aquaculture 486:64-67.
- Braga, A., Lopes, D. L., Magalhaes, V., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2015). Use of biofloc technology during the pre-maturation period of *Litopenaeus vannamei* males: effect of feeds with different protein levels on the spermatophore and sperm quality. Aquaculture research, 46(8), 1965-1973.
- Cahu, C., Fakhfakh, M., Quazuguel, P., 1991. Effect of dietary  $\alpha$ -tocopherol level on reproduction of *Penaeus indicus*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. Eds., LARVI '91—Fish and Crustacean Ž. Larviculture Symposium, Special Publication, vol. 15, European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 242–244.
- Cahu, C.L., Cuzan, G., Quazuguel, P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 112 3–4, 417–424.
- Chamberlain, G.W., 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. Ph.D. Thesis, Department of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A & M University, USA.
- Chamberlain G.W. and Lawrence A.L., 1981. Maturation, reproduction and growth of *P. vannamei* and *P.stylirostris* fed natural diets. Journal of the World Aquaculture Society, 12:209-224.
- Chen,H. 1983. Recent advances in nutrition of *Penaeus monodon*. Journal of the World Aquaculture Society, 24: 231-240.
- Dibyajyoti Banerjee, U.K. Madhusoodanan, M. Sharanabasappa, Sandip Ghosh, Jose Jacob. 2003. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. Clinica Chimica Acta 337, 147 – 152
- Fennuci, Jorge Lino y Analía Fernández Jiménez. 2004. Acción de las vitaminas en las dietas de camarones penaeoideos. Avances en nutrición acuícola. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo. Sonora. Mexico.
- Fernández Gimenez, A. V. 2002. Requerimiento de vitaminas liposolubles A y E en la dieta del camarón *Artemesia longinaris* Bate, 1888 y el langostino *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888). Web [https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/BDUBAFCEN\\_5f892a442f313e83f3b18e6719b242de/Cite](https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/BDUBAFCEN_5f892a442f313e83f3b18e6719b242de/Cite)
- Haiqi He, Addison L.Lawrence, RuiyuLiu. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). [Aquaculture, Volume 103, Issue 2](#), 1. Pages 177-185.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. En: Aquaculture 166, pags. 181-212. DOI: 10.1016/s0044-8486(98)00298-1.
- He.H. & Lawrence.A.L. 1993b. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 118: 245-255.

- He.H. 8. Lawrence.A.L. 1994. Effects of dietary vitamins A and O3 on growth and survival of *Penaeus vannamei*. Book of Abstracts World Aquaculture'94; New Orleans, Louisiana, USA, 112.
- He.H.; Lawrence,A.L. 8. Liu,R. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 103: 177-185.
- Jiang, S., Liu, D., Zhou, F., (...), Yang, L., Jiang, S. 2020. Effect of vitamin E on spermatophore regeneration and quality of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Research*. 51(6), pp. 2197-2204.
- Kanazawa,A. 1985. Nutrition of penaeid prawn and shrimp. In: Taki,Y.; Primavera,L.H. and Lobrera,J.A. (eds.). Proceedings of the First International Conference on Culture of Penaeid prawn/Shrimp Aquacult. Dept. Southeast Asian Fish. Dev. Center. Iloilo,Philippines, 123-130.
- Leung-Trujillo, J. R. and A. L. Lawrence. 1988. The effect of ascorbic acid on sperm and spermatophore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. *Journal of the World Aquaculture Society* 19:46<sup>a</sup>
- Leung-Trujillo, J., Lawrence, A.L., 1988. The effect of ascorbic acid on sperm and spermatophore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. *J. World Aquac. Soc.* 19, 46 A.
- Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Marnett LJ. *Mutation research* 1999 Mar 8;424(1-2):83-95.
- Parnes, S; S. Raviv; A. Shechter; A. Sagi. 2006. Males also have their time of the month; Cycle disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in the marine shrimp. *J. exp. Biol.* 209: 4984-4983.
- Pascual C, Sánchez A, Zenteno E, Cuzon G, Gxiola G, Brito R, Gelabert R, Hidalgo E, Rosas C. 2006. Biochemical, Physiological and Immunological changes during, starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultura* 251, 416-429.
- Pérez J. 2005. Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio (Tesis para Doctor en Ciencias). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, México
- Perez-Velazquez M, González-Félix ML, Lawrence AL, Bray WA, Gatlin III DM. 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal World Aquaculture Society* 34:92-98.
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M.A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y CiveraCerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22. Mérida.
- Roeland Wouters, Patrick Lavens, Julia Nieto, Patrick Sorgeloos. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*. 202(1-2):1-21.
- Roeland Wouters, Patrick Lavens, Julia Nieto, Patrick Sorgeloos. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* 202, 1–21.
- Tacon,A.G.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp-A training manual. 1- The essential nutrients. FAO support to the Regional Aquaculture Activities for Latin America and the Caribbean Project GCP/RLA/O75/ITA. Brasilia, Brasil, 208pp.
- Wouters, R., Gómez, L., Lavens, P., Calderón, J., 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. *J. Shellfish Res.* 18 (2), 651–656.

- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderon, J., 1999b. Contenido de lípidos y vitaminas en reproductores silvestres durante la maduración ovarica y en nauplios de *Penaeus vannamei*. Proceedings of the Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference, Guayaquil, Ecuador, Fundacion CENAIM-ESPOL, CDRom.
- Arshadi, A., Gharaei, A., Mirdar Harijani, J. 2020. Effect of dietary vitamin E on reproductive performance and vitellogenin gene expression in broodstock of *Litopenaeus vannamei*. Iranian Journal of Fisheries Sciences . 19(5), pp. 2475-2492.
- Li, Y., Fan, B., Huang, Y., (...), Zhang, M., Zhao, Y. 2018. Effects of dietary vitamin E on reproductive performance and antioxidant capacity of *Macrobrachium nipponense* female shrimp. Aquaculture Nutrition. 24(6), pp. 1698-1708
- Nguyen, B.T., Koshio, S., Sakiyama, K., (...), Ishikawa, M., Yokoyama, S. 2012. Effects of dietary vitamins C and E and their interactions on reproductive performance, larval quality and tissue vitamin contents in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate Aquaculture 334-337, pp. 73-81
- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J. 2001. Aquaculture Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation Open Access 198(3-4), pp. 307-323.