

ARTICULO DE REVISIÓN

MADURACIÓN Y REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO DEL CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS SCHMITTI* BURKENROAD EN CUBA.

Maturation and reproduction in captivity of the white shrimp Litopenaeus schmitti Burkenroad in Cuba.

Laida Ramos^{1*}, Mayte González¹, Yuliet Morera¹ y Tania Rodríguez-Ramos²

¹ Centro de Investigaciones Marinas – Universidad de La Habana. Calle 16, No. 114, entre 1ra y 3ra, Miramar, La Habana, CP 11300, Cuba.

² Department of Biology, University of Waterloo, 200 University Ave. West, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1.

* Autor para correspondencia:
laida@cim.uh.cu

Recibido: 6.12.2018

Aceptado: 12.2.2019

RESUMEN

La experiencia cubana en la camaronicultura como industria comenzó en 1987 con el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, especie autóctona cuya producción de semilla llegó a alcanzar 2338 t en el año 2000. Para hacer posible el programa de la camaronicultura en Cuba, fue necesario realizar estudios básicos y aplicados que permitieran el cultivo a escala comercial. En este artículo se presenta una recopilación de los principales resultados obtenidos durante más de veinte años de investigaciones. Entre los primeros logros obtenidos estuvieron la inducción de la maduración, la reproducción y el desove en condiciones de cautiverio y posteriormente el cierre del ciclo de cultivo. Colateralmente tomando como patrón a poblaciones silvestres se estudiaron las variaciones bioquímicas asociadas a la maduración ovárica de las hembras, obteniendo así información de utilidad para la selección de dietas, tanto frescas como balanceadas. Los resultados de aplicación inmediata se relacionaron con la búsqueda de indicadores de calidad de los reproductores asociados con la calidad y cantidad de células espermáticas, la composición bioquímica de los tejidos y efectores de la respuesta inmune innata. La caracterización morfológica del pedúnculo ocular y la localización del complejo neurosecretor órgano x-glándula sinusal posibilitaron realizar estudios de sus neuropéptidos hormonales, relacionados con el control endocrino de la reproducción en crustáceos decápodos. El conjunto de resultados que se muestran en esta revisión contribuyó a la obtención de una tecnología original para lograr la reproducción de *L.schmitti* en ciclo cerrado en Cuba y sentó las bases para a partir del año 2003 adecuar e implantar dicha tecnología en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*.

PALABRAS CLAVE: camarón blanco, progenitores, maduración, reproducción, neurohormonas, *Litopenaeus schmitti*.

ABSTRACT

*Cuban experience in shrimp farming as an industry started in 1987 with the white shrimp *Litopenaeus schmitti*, an autochthonous specie whose seed production reached 2338 t in 2000. For making possible the program of shrimp farming in Cuba, it was required to carry out basic and applied studies that would allowed commercial scale cultivation. This article proposes a compilation of the main results obtained during more than twenty years of research in this matter. Among the first achievements were the induction of maturation, reproduction and spawning in captivity conditions and then the closure of the production cycle. Collaterally, taking wild populations as a standard, studies of biochemical variations associated with the ovarian maturation of the females were performed, yielding useful information to select diets, both fresh and pelleted. Results of immediate application were correlated with the search of quality indicators in the breeders associated with the sperm quantity and quality, the biochemical composition of the tissues and effectors of the innate immune response. The morphological characterization of the eyestalk and the localization of the neurosecretory complex Organ X-Sinus gland made it possible to perform studies of its hormonal neuropeptides associated to the endocrine control of reproduction in decapod crustaceans. The set of results displayed in this review contributed to reaching an original technology to achieve the reproduction of *L. schmitti* in a closed cycle in Cuba and established the foundations for starting in 2003 to adapt and implement this technology in *L. vannamei*.*

KEY WORDS: *white shrimp, broodstock, maturation, reproduction, neurohormones, Litopenaeus schmitti.*

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, es un recurso pesquero exportable de gran importancia en Cuba por lo que las notables disminuciones de sus capturas comerciales en las últimas décadas

llevaron a buscar soluciones alternativas mediante el desarrollo de la industria de la camaronicultura.

Estudios diversos a escala de laboratorio relacionados con la reproducción de camarones peneidos nativos de importancia comercial tuvieron sus inicios en 1983 en el Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de La Habana (CIM-UH). En 1986 se creó un Programa Nacional para el Cultivo de Camarones por la Academia de Ciencias de Cuba (ACC) que reunió a especialistas de instituciones diversas entre las cuales se encontraba el CIM-UH para obtener e implementar a corto plazo la tecnología de cultivo del camarón *L. schmitti*. La temática de la reproducción en especial fue liderada por el CIM-UH contando con la valiosa colaboración del Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP) y la entonces Empresa Nacional de Camaronicultura (ENC).

Se comenzaron investigaciones a escala piloto en un centro de la ENC de Santa Cruz del Sur, Camagüey, donde se obtuvieron los primeros resultados relacionados con la obtención de desoves y la inducción de la maduración gonadal. En un inicio los desoves se obtenían a partir de hembras grávidas colectadas en el medio natural mediante arrastres de quince minutos en barcos arrastreros comerciales. Uno de los primeros problemas presentados en la obtención de larvas fue la escasez de hembras silvestres grávidas copuladas, por lo que luego de realizar ensayos de fecundación artificial se obtuvo un método original para la especie en cuestión, que resultó ser una solución efectiva para la obtención de desoves viables en una primera etapa.

Una independencia parcial del medio natural se obtuvo al obtener e introducir la técnica de inducción a la maduración

ovárica, la obtención de la cópula natural y el desove a escala comercial en el centro de desove de Manzanillo, Granma en 1987 a partir de reproductores silvestres.

La independencia total del medio natural se obtuvo al cerrar el ciclo de cultivo en el año 1990 y diversos estudios fueron enfocados a evaluar la respuesta reproductiva de los progenitores producidos en ciclo cerrado.

La inducción de la maduración gonadal en condiciones de cautiverio se hace posible mediante la manipulación hormonal, nutricional y ambiental.

Entre los métodos mundialmente establecidos de manipulación hormonal se encuentra la ablación unilateral de los pedúnculos oculares de los camarones. Con la ablación ocular se disminuyen los niveles circulantes de la hormona inhibidora de las gónadas, de modo que es posible favorecer los mecanismos reproductivos (Quackenbush, 1986, Keller, 1992, Huberman, 2000).

Un aspecto muy importante que se tiene en cuenta es la manipulación ambiental, que simula las características ambientales de la temporada reproductiva de esta especie e incluye factores abióticos como la luz, principalmente intensidad y fotoperiodo, la temperatura, el pH, la salinidad, el oxígeno disuelto y elementos nitrogenados. La manipulación nutricional es otro aspecto a tener en cuenta y que influye principalmente en la calidad y cantidad de huevos desovados, así como en la calidad y sobrevivencia de las larvas (Bray and Lawrence, 1992).

Colateralmente a las investigaciones de carácter aplicado se realizaron variados estudios básicos dirigidos a obtener información sobre las variaciones bioquímicas de los ovarios durante el proceso de la maduración utilizando progenitores silvestres,

información que resultó de utilidad para seleccionar fuentes de alimento adecuadas, así como para elaborar dietas secas.

El estudio morfológico de los pedúnculos oculares, permitió la localización del complejo neurosecretor órgano x-glándula sinusal e iniciar estudios relacionados con las neurohormonas implicadas en el control de la reproducción, información útil para continuar con la optimización de los resultados ya introducidos y generalizados.

En el presente trabajo se presenta una revisión de los resultados más destacados obtenidos en el tema de la maduración y reproducción en condiciones de cautiverio de *L. schmitti*, que contribuyeron a la obtención, introducción y generalización de dicha tecnología en Cuba, así como a su posterior optimización.

Se demostró que es posible incrementar la potencialidad de los métodos de maduración/reproducción de *L. schmitti* mediante el estudio de la biología reproductiva de las poblaciones silvestres y el conocimiento del proceso de maduración de las hembras a nivel molecular y celular (Ramos, 1996).

El conjunto de resultados presentados en esta revisión contribuyó a que la industria de la camaricultura cubana se hiciera realidad, iniciándose en 1987 con la producción de 28 t y alcanzando en el año 2000 la captura máxima de 2 338 t de una de las dos especies autóctonas de gran interés comercial para Cuba, el camarón blanco *L. schmitti*.

A partir de la experiencia adquirida en los primeros años de la camaricultura en Cuba, en el año 2003 fue posible adecuar rápidamente la tecnología de *L. schmitti*, a la reproducción en ciclo cerrado de *L. vannamei*, única especie de camarón cultivada en la actualidad en el país y que en el año 2017 llegó a una producción de 5589,3 t.

FECUNDACIÓN Y VIABILIDAD DE DESOVES DE HEMBRAS SILVESTRES.

La obtención de desoves viables de acuerdo a las necesidades de la producción de post-larvas de los centros de desove, fue una de las tareas priorizadas en los primeros años de la camaronicultura en Cuba.

En sus inicios se dependía de la obtención de desovadoras silvestres capturadas grávidas y copuladas. Como todos los camarones peneidos de tético abierto, *L. schmitti* pierde fácilmente el espermátforo durante la captura y el traslado de las desovadoras al laboratorio, lo cual afectaba la obtención de larvas por el número insuficiente de hembras copuladas y por lo tanto de nauplios. Se trabajó en la obtención de un método novedoso para la fecundación artificial de las hembras de *L. schmitti* no copuladas que consiste en la colocación de la masa de esperma disecada de las dos ámpulas terminales de machos maduros en la región anterior de la placa coxal del tercer par de pereiópodos. En 1986 a escala piloto se obtuvieron desoves viables con dicho método, con hembras de alrededor de 40 g y porcentajes de eclosión máximos del 69 % (Ramos, 1990). Dicho método, aún con una viabilidad en los desoves menor que la de las hembras copuladas naturalmente, representó una excelente alternativa para aumentar la producción de nauplios en la etapa inicial y fue exitosamente aplicado a escala comercial en el centro de desove de Manzanillo Granma, durante su puesta en marcha en el año 1987.

MADURACIÓN Y REPRODUCCIÓN EN LOS CENTROS DE DESOVE DE LA CAMARONICULTURA

La inducción de la maduración mediante manipulación hormonal utilizando la ablación unilateral del pedúnculo ocular

se obtuvo a escala de laboratorio para *L. schmitti* en 1986 con un período de latencia mínimo para el desove de 3 a 4 días (Ramos y Primavera, 1986), teniendo como antecedentes similares resultados obtenidos en la otra especie autóctona de importancia comercial en Cuba, el camarón rosado *Farfantepenaeus notialis* (Ramos y González, 1983).

Los primeros resultados de la reproducción en cautiverio de *L. schmitti* en Cuba a escala comercial a partir de progenitores silvestres se reportaron por Ramos *et al.* (1994). Estos autores obtuvieron maduración gonadal y cópula natural en salas de maduración utilizando tanques circulares de 10 m² de superficie, con una altura del agua de 35cm, colocando seis camarones por metro cuadrado con una relación de sexos 1:1. La temperatura se mantuvo alrededor de los 28 °C, en salas cerradas, sin embargo, al no existir equipamiento para su control podían ocurrir fluctuaciones en dependencia de las variaciones ambientales. La iluminación era artificial con un fotoperiodo controlado de 14 horas luz:10 horas de oscuridad y una intensidad de luz máxima de 150 lux. La salinidad era de 35±1 ups. El recambio de agua diario en los tanques de maduración era de 200 % diario con un sistema abierto de agua de mar filtrada previamente por arena (20 µm). Como método de manipulación hormonal fue utilizada la ablación ocular unilateral de los pedúnculos oculares, obteniendo un período de latencia entre los 3 y 4 días hasta la ocurrencia del desove en las hembras ablacionadas, así como en aquellas no ablacionadas que eran colocadas en estadios tempranos de maduración ovárica (II-III).

Al no poder controlar la temperatura se observó una tendencia a la existencia de

dos picos reproductivos en la producción de nauplios, siendo el primero entre los meses de febrero y julio con un máximo en mayo y el segundo entre octubre y enero con un máximo en noviembre, lo cual coincide con los picos reproductivos descritos por Guitart *et al.* (1985) para la especie en el medio natural y que se considera estén relacionados con la elevación de las temperaturas del invierno al verano el primero y a una ligera disminución de las mismas a principios del invierno.

La maduración, cópula natural y desove de *L. schmitti* fueron también reportadas utilizando hembras ablacionadas y no ablacionadas mediante la utilización de iluminación natural en tanques exteriores rectangulares de hormigón de 15,4 m de largo y 2,4 m de ancho. Un mayor número de desoves por hembra fue obtenido con las ablacionadas, las cuales sin embargo presentaron una menor supervivencia durante el ciclo productivo (Artiles *et al.*, 1999).

La frecuencia de la cópula natural en los tanques de las salas de maduración se ha relacionado con la relación de sexos empleada. Por ejemplo se reportó un incremento de la cópula natural al emplear una relación de 1 hembra: 1,5 machos (Pérez-Jar y Ramos, 1992). Sin embargo, más adelante Pérez-Jar *et al.* (2007a) no encontraron diferencias significativas en la frecuencia de la cópula natural ni en la producción de huevos y nauplios por desove al evaluar la respuesta reproductiva de *L. schmitti* entre el sistema de tanques unisexuales (donde diariamente se seleccionan las hembras grávidas para colocar en los tanques de machos y luego del desove son devueltas a los tanques de hembras) y el sistema de tanques mixtos.

Una vez consolidada la tecnología de obtención de la maduración, cópula natural

y desove en condiciones de cautiverio el siguiente paso fue lograr cerrar el ciclo de cultivo.

CIERRE DEL CICLO DE CULTIVO Y DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE PROGENITORES CULTIVADOS EN CAUTIVERIO

El cierre del ciclo de cultivo de *L. schmitti* en Cuba se cerró a escala comercial en 1990 y los resultados relacionados con este trabajo en los primeros años fueron publicados por Ramos *et al.* (1995). Estos autores obtuvieron progenitores en tres fases de cría a partir de postlarvas en estanques de tierra y sistema semi-intensivo. El peso promedio obtenido a los 10 meses de cría fue de 51,2 g para las hembras y 33,8 g para los machos. Con dichos resultados Cuba resultó ser uno de los primeros países de la región que contó con dicha tecnología, indispensable para lograr la independencia total del medio natural, además de posibilitar el trabajo con especies no nativas y dar paso a estudios de selección y mejoramiento genético.

La respuesta reproductiva de los progenitores silvestres ha sido tenida en cuenta para lograr resultados semejantes al utilizar reproductores criados en cautiverio. En este sentido se han realizado diversos estudios. Ramos *et al.* (1995) determinaron un mejor desempeño reproductivo en las salas de maduración de los centros de desove cuando se utilizaban hembras ablacionadas y machos intactos (sin inducción de la regeneración manual de los espermatóforos) y cuando se utilizaban hembras ablacionadas copuladas por machos silvestres. Estos resultados sugerían que la calidad de los progenitores machos criados en cautiverio debía ser mejorada.

Para valorar la influencia de la edad en la respuesta o desempeño reproductivo de

los progenitores cautivos, se realizaron varios estudios. Por ejemplo, se evaluaron los resultados productivos de un mismo lote de progenitores a los siete y nueve meses de cría en tanques de maduración con hembras ablacionadas y sistema unisexual. Los reproductores de siete meses de engorde tenían como peso promedio 38,28 g las hembras y 29,15 g los machos, mientras que, a los nueve meses de engorde, las hembras tenían 46,6 g y los machos 36,0 g. Se concluyó que ambos lotes estaban aptos para la reproducción, sin embargo, los valores mayores de producción de huevos y nauplios por desove al mes, se obtuvieron en los reproductores de nueve meses de edad (Bécquer *et al.*, 1994).

Colateralmente Betancourt *et al.* (1994) haciendo una evaluación de la calidad espermática de reproductores machos con cinco, siete y nueve meses de engorde, recomendaron la utilización de los machos a partir de los siete meses, basándose en indicadores de calidad tales como el número total de células espermáticas y el porcentaje de células espermáticas vivas normales. Dichos indicadores de calidad son aún utilizados en los centros de desove como criterio de selección en los bancos de progenitores y en las salas de maduración, con el fin de reemplazar a los machos de insuficiente calidad, para garantizar mantener los indicadores productivos requeridos.

A partir de estos resultados Pérez-Jar y Jaime (1995) compararon la respuesta reproductiva en tanques mixtos con relación de sexos 1,0 hembras: 1,5 machos entre progenitores de diez meses de cría, con otro grupo formado por hembras de diez meses y machos de siete meses de cría. Los mejores resultados productivos se obtuvieron al utilizar hembras de diez meses con machos de siete meses de cría, lo cual confirmó que

los machos pueden ser utilizados en las salas de maduración a partir de los siete meses de engorde y no necesitan ciclos de engorde más largos

Pérez-Jar *et al.* (1997) evaluaron el desempeño reproductivo de cuatro generaciones de *L. schmitti* obtenidas en ciclo cerrado, resultando que los indicadores de productividad de los tanques de maduración (número de desoves y nauplios por hembra al mes) y los valores promedio de huevos y nauplios por hembra resultaron similares y en ocasiones hasta superiores a los obtenidos a partir de progenitores silvestres.

El cierre del ciclo de cultivo permitió mediante el empleo de marcadores moleculares, iniciar trabajos de variabilidad genética, ofreciendo así criterios para la realización de cruces en la formación de los diferentes lotes de bancos de progenitores. De igual modo se pudieron iniciar estudios de mejoramiento genético por crías selectivas (Bécquer *et al.*, 2002; Bécquer, 2005).

VARIACIONES BIOQUÍMICAS RELATIVAS AL PROCESO DE MADURACIÓN OVÁRICA

Conociendo la composición bioquímica del ovario se pueden deducir aproximadamente los requerimientos dietéticos específicos para el proceso de maduración de las hembras, lo cual tiene su aplicación tanto en la selección de fuentes de alimento fresco que cubran las necesidades nutricionales de los reproductores como en la formulación de dietas artificiales. A continuación se relacionan los resultados más importantes obtenidos en este sentido para *L. schmitti*.

AGUA

En el ovario la maduración se relacionó con una pérdida significativa del 10 % del agua

hasta los índices gonadosomáticos (IGS) comprendidos entre tres y cuatro, para luego estabilizarse en un valor medio del 70,9%. En el hepatopáncreas la pérdida de agua seguía un comportamiento similar a la del ovario, siendo más pronunciada hasta un IGS de cuatro, para luego sufrir una estabilización. La deshidratación en este caso fue del 3,9% del inicio al final de la maduración (Marangos *et al.*, 1988).

LÍPIDOS

Los lípidos totales se incrementaron linealmente de 1,3 a 39,8 mg/10g de peso del animal desde un IGS de 0,8 hasta 7,4. En los ovarios alrededor del 50 % de los lípidos son polares, siendo los fosfolípidos mayoritarios, con un incremento casi lineal según avanza el ciclo de maduración. La fracción lipídica neutra de este órgano está constituida principalmente por triacilglicerol y por esteroides, cuya acumulación fue continua durante la vitelogenénesis. Los ácidos grasos saturados más representados son el palmítico 16:0 y esteárico 18:0 y de los monoinsaturados fueron el palmitoleico 16:1w7 y oleico 18:1w9. Se observó la presencia de los ácidos linolénico (18:3w3) y linoleico (18:2w6) así como de los eicosapentaenoico (20:5w3), araquidónico (20:4w6) y docosahexaenoico (22:6w3). De forma general los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) representaron el 16 % de los ácidos grasos totales y la relación w3: w6 durante la maduración fue de 1,2 (Ramos *et al.*, 1996).

PROTEÍNAS

La hemolinfa mostró un incremento del 40 % de las proteínas totales que coincide con el inicio de la vitelogenénesis secundaria. Del inicio al final de la maduración las proteínas de la hemolinfa aumentaron un 47,5 %. Las proteínas totales aumentaron

alrededor de un 14 % en el hepatopáncreas, estabilizándose desde un IGS entre tres y cuatro hasta el final de la maduración. En el ovario la concentración de proteínas totales aumentó un 40 % (de 93 a 154 mg/g de peso fresco de órgano) (Marangos *et al.*, 1988).

Se comenzaron a realizar algunos ensayos de purificación de la lipovitelina de *L. schmitti* a partir de ovarios maduros (estadio IV), encontrando mediante electroforesis de proteínas nativas dos bandas de 450 kDa y 550 kDa y con electroforesis desnaturante seis bandas de 180, 160, 100, 97, 84 y 45 kDa (Huberman *et al.*, 2000a).

AMINOÁCIDOS

En el ovario los aminoácidos libres totales (AALT) disminuyeron desde 272.4 $\mu\text{mol/g}$ PS (peso seco) hasta 83 $\mu\text{mol/g}$ PS entre los índices gonadosomáticos (IGS) de 0,8 y 7,1. En el hepatopáncreas los AALT se incrementan un 33,4 % desde un IGS de 0,8 hasta 4,0 para luego estabilizarse en un IGS de 7,1. En la hemolinfa se obtuvo un incremento máximo de 3,74 $\mu\text{mol/mL}$ en un IGS de 3,3. Los AAL que más varían en el ovario son la arginina, la glicina, el ácido glutámico y la lisina, en el hepatopáncreas la lisina y la glicina y por último en la hemolinfa la lisina, la arginina y la glicina. (Marangos *et al.*, 1989). Dichos autores consideraron que las amplitudes de la variación de los AALT en los diferentes tejidos reflejaban la intensidad del metabolismo de transformación o de síntesis de las proteínas.

CAROTENOIDES

Los carotenoides totales en *L. schmitti* se incrementaron a partir de un IGS de 2,3 durante la maduración de los ovarios pasando de 190 a 1630 $\mu\text{g/g}$ de peso seco de un IGS de 0,8 a 7,5. Son cuatro

los pigmentos carotenoides principales que estaban presentes en este órgano: el β -caroteno, la equinona, la zeaxantina y la astaxantina. La astaxantina resultó ser el pigmento más abundante en su forma libre y monoesterificada. Expresando cada carotenoide como porcentaje de los carotenoides totales, se observó una disminución del β -caroteno, la equinona y la zeaxantina a favor del incremento de la astaxantina. En el hepatopáncreas los carotenoides totales alcanzaron un máximo de 588,2 $\mu\text{g/g}$ para un IGS de 2,2 para luego disminuir hasta 391 $\mu\text{g/g}$ y estabilizarse. Se identificaron cuatro pigmentos carotenoides en este órgano, representados por el β -caroteno, la cantaxantina, la astaxantina y la zeaxantina en su forma libre y monoesterificada. La zeaxantina total alcanzó a constituir un 93,8% de los carotenoides totales del órgano a partir de un IGS de 2,5 correspondiendo las variaciones más significativas a la forma monoesterificada, la cual llegó a representar un 86,2% de la zeaxantina total, mientras que se produjo una disminución de la cantaxantina, la forma libre de la zeaxantina y el β -caroteno (Vincent *et al.*, 1988 a, 1988 b 1989).

En términos generales teniendo en cuenta los estudios anteriores de la composición bioquímica de los ovarios durante el transcurso de la maduración, se observó un incremento de las proteínas y los lípidos, así como de los carotenoides, que se relacionó con una pérdida de agua significativa del ovario. En cuanto a los aminoácidos se observó que en la etapa inicial de la maduración disminuyeron. En el hepatopáncreas no hubo variaciones acentuadas de peso ni pérdida de agua durante la maduración, sin embargo los resultados indicaron una posible movilización de reservas hacia los ovarios en los primeros estadios de

maduración. El papel del hepatopáncreas en la movilización de reservas dependía de la especie, resaltando siempre la importancia del aporte alimentario para hacer frente a la alta demanda nutricional requerida para la reproducción (Ramos, 1996).

El conocimiento sobre los requerimientos nutricionales de los camarones peneidos durante el proceso de reproducción, a través de estudios bioquímicos y dietas experimentales, muestra en general la importancia de los lípidos, vitaminas y carotenoides. Sin embargo, dicho conocimiento se encuentra limitado por la ausencia de estudios con dietas purificadas y semipurificadas que determinen el efecto de los nutrientes sobre la maduración ovárica, la reproducción y la calidad de la descendencia (Wouters *et al.*, 2001).

ALIMENTACIÓN

El alimento fresco/congelado se compone generalmente de una combinación de calamar, bivalvos, biomasa de artemia, poliquetos marinos a razón del 15-20% de la biomasa total dividido entre cuatro a seis raciones diarias. El calamar siempre está presente en las dietas, el resto puede variar en dependencia de las posibilidades del suministro (Pérez-Jar y Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1994; Artiles *et al.*, 1999, Pérez-Jar *et al.* 2007a, García-Galano y Carrillo-Farnés, 2015).

Gelabert *et al.* (2003) proponen complementar el alimento fresco de los reproductores con biomasa viva de *Artemia franciscana* como una opción para incrementar la producción de nauplios. Dichos autores encontraron que la sustitución del 11% en la ración diaria del alimento fresco de *L. schmitti* por *A. franciscana*, propiciaba un incremento de 3,5 veces en las cópulas naturales.

Con respecto a la inclusión en la alimentación de los reproductores de dietas formuladas, se observó que en *L. schmitti*, la respuesta reproductiva medida por el número total de desoves y el porcentaje de eclosión fue mayor cuando el alimento fresco se combinó con un 3% de la biomasa total ofrecida en dos raciones de una dieta balanceada experimental compuesta por un 7% de aceite de hígado de bacalao y una combinación de harinas de pescado, camarón, trigo, soya y levadura torula, (36% de proteína bruta, 10,4% de lípidos totales) en relación con otras dos dietas balanceadas compuestas por proporciones semejantes de proteínas, variando solamente el contenido y tipo de lípidos totales. Con niveles de lípidos entre 6-7 %, estos parámetros fueron significativamente inferiores, pudiendo esta respuesta estar relacionada con contenidos más bajos de ácidos grasos polinsaturados de la serie w3. (Ramos y García, 1992; García-Galano y Carrillo-Farnés, 2015).

Más adelante en la misma especie se compararon los resultados sobre la respuesta reproductiva de dos dietas comerciales de maduración (Nippai 52,79% proteínas, 6,14 % de lípidos) y Madutec (40% proteínas, 8 % de lípidos) con una dieta balanceada (54,8% de proteínas y 7,3% de lípidos) obteniendo con esta última el mayor número de cópulas naturales, desoves y nauplios producidos por día (Pérez-Jar *et al.*, 1996).

La ausencia de la infraestructura necesaria y la dificultad en la obtención de las materias primas ha impedido la producción comercial de dietas balanceadas, por lo que los trabajos de investigación relacionados con el uso de dietas artificiales en el país actualmente no se aplican, sino que se importan los piensos necesarios para las diferentes etapas de la cadena productiva del cultivo.

INDICADORES DE CALIDAD

En cualquier sistema de cultivo la búsqueda de indicadores morfológicos y fisiológicos de calidad es esencial para garantizar la calidad del producto y disminuir las pérdidas a causa de enfermedades.

Entre éstos se encuentran los indicadores de calidad espermática: el número de células espermáticas por espermatóforo, el número de células de esperma vivas y el número de células de esperma vivas normales, los cuales son esenciales para evaluar la calidad de los reproductores machos. También merecen especial atención los marcadores de la respuesta inmune por ofrecer una alternativa en la evaluación del estado de salud del camarón y la detección de estadios tempranos de infección tanto en hembras como en machos. Los marcadores de la respuesta inmune que se han evaluado como indicadores de calidad en *L. schmitti* son el conteo de hemocitos totales, los títulos de hemoaglutinación de la hemolinfa, la actividad óxido nítrico sintasa y la actividad fenoloxidasa. Estos marcadores han sido estudiados en camarones de *L. schmitti* en diferentes condiciones de estrés, ya sea a causa de cambios en parámetros ambientales como amonio disuelto y temperatura, del uso prolongado en la sala de maduración o por la exposición a productos bacterianos (Marrero *et al.*, 2002, Pérez-Jar *et al.*, 2006, Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008, Rodríguez Ramos *et al.*, 2016).

En este sentido se demostró el efecto del estrés producido por el incremento de la temperatura del agua sobre los títulos de hemoaglutinación, las proteínas totales en la hemolinfa e indicadores de calidad espermática en machos cautivos que fueron mantenidos a 30°C (Ramos *et al.*, 2000). Estos autores obtuvieron que después de 15 días de estrés por altas temperaturas, el 83 % de

los machos presentaban menor actividad hemoaglutinante de la hemolinfa al comparar con los controles, el 100% tenía bajo número de células espermáticas por espermátforo, el 92 % tenía bajos porcentajes de espermato vivo y el 100 % de dichas células espermáticas vivas presentaron alta frecuencia de anomalías. Los efectos de las altas temperaturas (30°C) fueron también comprobados a partir de las seis horas, al obtener una disminución en las proteínas totales de la hemolinfa y un deterioro de la calidad espermática en los machos cautivos. Sin embargo, los títulos de hemoaglutinación no fueron afectados después de seis horas de estrés por incremento de la temperatura del agua (Ramos *et al.*, 2000).

Rodríguez-Ramos *et al.* (2001) sugirieron que los títulos de hemoaglutinación entre cero y ocho pueden ser considerados bajos, mientras que títulos mayores de 16 pueden ser considerados altos. Teniendo en cuenta este análisis estos autores obtuvieron que los machos con 15 millones o más de células espermáticas por espermátforo y 85 % de espermato vivo, tienen predominantemente títulos altos. Estos resultados sugirieron que existe una relación directa entre la calidad espermática y la actividad hemoaglutinante de la hemolinfa y que ambos pueden ser utilizados para evaluar la calidad en machos de *L. schmitti*. La utilización de estos indicadores fue recomendada a la dirección de los centros de la camaricultura de Cuba como una herramienta sencilla y de bajo costo, que no implica el sacrificio de los animales utilizados.

El efecto de altas concentraciones de amonio (5 mg/L) sobre el conteo de hemocitos totales, la actividad fenoloxidasas y los títulos de hemoaglutinación fueron evaluados en adultos de *L. schmitti*

(Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008). Estos autores no encontraron diferencias en los niveles de actividad fenoloxidasas ni en los títulos de hemoaglutinación al comparar animales tratados con animales controles. Sin embargo, el conteo de hemocitos totales disminuyó un 66 % después de 72 horas de comenzada la exposición a amonio.

A propósito de la duración del ciclo productivo de *L. schmitti* en las salas de maduración, Pérez-Jar *et al.* (2006, 2007b) observaron una disminución en los indicadores de calidad espermática, en las concentraciones de glucosa y proteínas circulantes en la hemolinfa, así como en el número de hemocitos totales, la actividad fenoloxidasas y la actividad hemoaglutinante de la hemolinfa en machos que fueron usados como reproductores durante 60 días en la nave de maduración. Estos resultados indicaron un desgaste fisiológico en los machos de *L. schmitti* después de 60 días de vida productiva, por lo que se sugirió su reemplazo pasados los 30 días de actividad reproductiva. Los machos provenientes de los bancos de reproductores conservaron una mejor calidad espermática al compararlos con los machos silvestres, aunque los indicadores de la respuesta inmune y los niveles de glucosa y proteína circulantes no fueron diferentes significativamente entre machos de diferentes orígenes.

El estudio del efecto de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) es importante para estimar la capacidad de respuesta de los camarones antes de la aparición y proliferación de un patógeno. Uno de los PMAPs ampliamente utilizado en diversos organismos para simular una infección bacteriana es el LPS, el cual es un lipopolisacárido presente en la pared externa de bacterias Gram negativa. En estudios realizados con adultos de *L. schmitti* se demostró

que los camarones inyectados con LPS de *E. coli* muestran una mayor actividad óxido nítrico sintasa, no varían la actividad hemaglutinante de la hemolinfa y sufren una disminución en la actividad fenoloxidasa así como en el número de hemocitos totales circulantes en las primeras 24 horas después de la inyección (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Marrero *et al.*, (2002) quienes observaron un incremento en el número total de hemocitos después de 10 horas de la inyección con LPS de *E. coli*.

La participación de la óxido nítrico sintasa en la respuesta contra bacterias también se demostró en *L. vannamei* (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2016). Estos autores obtuvieron una reducción en la actividad antibacteriana de la hemolinfa contra *Aeromonas hydrophila* cuando los camarones fueron inyectados con un anticuerpo policlonal anti óxido nítrico sintasa.

La búsqueda de indicadores de calidad continúa siendo una prioridad para garantizar trabajar con reproductores que se encuentren en buenas condiciones de salud y que sean capaces a su vez de optimizar la cantidad y calidad de las primeras larvas, los nauplios.

ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL PEDÚNCULO OCULAR: LOCALIZACIÓN DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

Suárez *et al.* (1996) describieron la morfología del pedúnculo ocular de *L. schmitti* y localizaron la ubicación de la glándula sinusal. De acuerdo con estos autores los ganglios ópticos se encuentran localizados hacia el centro, debajo de la retina y en la zona interior del ojo. De la región distal a la proximal se distinguen cuatro regiones: *lamina ganglionaris*, *medulla externa*, *medulla interna* y *medulla terminalis*. La

glándula sinusal fue ubicada en la región dorso lateral interna del pedúnculo ocular, entre la *medulla externa* y la *medulla interna*. En animales vivos, su aspecto es digitiforme y de una coloración azul iridiscente que la diferencia del tejido nervioso que la circunda, de color blanco opaco.

Con la utilización de cortes semifinos y el uso de fijadores de microscopía electrónica, se confirmó la identidad de la glándula sinusal, con la observación de un lumen central o laguna de hemolinfa, rodeado de terminales axónicas con cúmulos de gránulos de neurosecreción.

En la *medulla terminalis* se encontró una agrupación de células con somas gigantes y núcleo evidente que se corresponden con el órgano X, neuronas cuyas prolongaciones axónicas ramificadas se dirigen a la zona de la glándula sinusal donde serían liberadas las hormonas peptídicas. De la *medulla terminalis* surge el nervio óptico que se extiende a todo lo largo del pedúnculo ocular. Esta médula presenta al igual que las otras capilares y lagunas de hemolinfa.

La caracterización morfológica del pedúnculo ocular de *L. schmitti*, incluyendo la ubicación del complejo neurosecretor órgano X-glándula sinusal, coincide con la de otros decápodos, encontrando solo particularidades en la ubicación de los ganglios ópticos, lo cual parece ser una característica constante de peneidos, ya que también fue observada por los autores en *L. vannamei*, *L. setiferus* y *Farfantepenaeus duorarum*.

La ubicación correcta de la glándula sinusal en el pedúnculo ocular permitió contar en los primeros tiempos con un método seguro para su eliminación, estandarizando en la producción un tipo de ablación parcial recomendado por Primavera (1978), que consistía en realizar una incisión en el globo ocular para facilitar su posterior

vaciado haciendo presión en el mismo con los dedos índice y pulgar, método mucho menos agresivo que la ablación total del pedúnculo ocular la cual aún muchos laboratorios de producción de postlarvas de otros países continúan empleando.

En Cuba se logró estandarizar más adelante a escala comercial la maduración ovárica de *L. schmitti* y posteriormente la de *L. vannamei* sin realizar la ablación ocular, desencadenando los mecanismos hormonales que favorecen la reproducción mediante manipulación nutricional y ambiental, a partir de los primeros resultados obtenidos en este sentido por Ramos *et al.* (1994) y Artiles *et al.* (1999).

La localización de la glándula sinusal a su vez facilitó el camino para el estudio de sus neuropéptidos hormonales con vistas a valorar diversos métodos alternativos a la ablación ocular para la inducción de la maduración gonadal.

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEUROPEPTIDOS HORMONALES DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

El desarrollo alcanzado en la camaricultura exigía estudios cada vez más novedosos con vistas a enfrentar nuevos retos. Resultaba necesario el conocimiento de la estructura-función de los neuropéptidos de la familia de las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos (HHC). Estas hormonas juegan un importante papel en el metabolismo y la fisiología influyendo directamente sobre la muda, el crecimiento, la reproducción, el metabolismo de la glucosa y lípidos, entre otras funciones.

HORMONA HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTÁCEOS (HHC)

La Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (HHC) es el componente

mayoritario de la familia que lleva su nombre y su función principal es regular el nivel de glucosa en la hemolinfa.

En *L. schmitti* a partir de extractos crudos de glándulas sinusales se aislaron y purificaron siete péptidos candidatos a ser componentes de la familia HHC de *L. schmitti*, identificados por la posición de los residuos de cisteína (Huberman *et al.*, 1997).

Más adelante se aisló y caracterizó un péptido cuya masa fue de 8359 k Da cuya actividad hiperglucemiante fue demostrada en un bioensayo homólogo. El bioensayo consistió en inyectar el equivalente a tres glándulas sinusales del extracto hormonal purificado a camarones que fueron bilateralmente ablacionados, los cuales mostraron valores glicémicos significativamente mayores que los camarones del grupo inyectados con solución salina. La HHC tiene su extremo N-terminal libre, y el C-terminal amidado y seis residuos de cisteína en posiciones conservadas en relación a otras HHC descritas. Este resultado fue el primer reporte de una neurohormona de la glándula sinusal de *L. schmitti* (Huberman *et al.*, 2000b).

Teniendo en cuenta que la purificación de los neuropéptidos a partir de su fuente natural de expresión requiere de cientos de pedúnculos oculares de camarón, la obtención del ADN complementario (ADNc) que codifica para la HHC del pedúnculo ocular era una alternativa para obtener suficientes cantidades en formas biológicamente activas para posteriores estudios biológicos en camarones peneidos.

Conociendo entonces la secuencia aminoácídica de la HHC de *L. schmitti* (Huberman *et al.*, 2000b), se diseñaron oligonucleótidos degenerados para aislar el ADNc de la HHC en esta especie. Como resultado se obtuvo por primera vez el ADNc de 216 pares de bases que codifica para la región madura

de la HHC de *L. schmitti*. Los análisis de secuencia del fragmento amplificado por Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP) revelaron una alta homología con otras HHC reportadas en camarones peneidos. Cada secuencia presentó 72 aminoácidos, seis de los cuales eran cisteínas en posiciones idénticas. El análisis de la expresión tejido-específica de la HHC estaba Northern blot, mostró que el ARN mensajero (ARNm) de la HHC está presente en el pedúnculo ocular pero no se encuentra en músculo y estómago. Sin embargo, el análisis semicuantitativo de TR-RCP reveló su presencia en los tres tejidos (Lugo *et al.*, 2006).

Para contar con suficiente cantidad de la HHC biológicamente activa, se clonó el ADNc (216pb) de la HHC de *L. schmitti* en el vector de expresión pTYB2. Como resultado se obtuvo la HHC recombinante expresada en *Escherichia coli* como proteína de fusión a la inteína, con 63 kDa y formando parte de los cuerpos de inclusión. La HHC recombinante mostró capacidad para incrementar el nivel de glucosa en la hemolinfa en un ensayo heterólogo *in vivo* utilizando a *L. vannamei*. Los animales con ablación bilateral del pedúnculo ocular inyectados con la HHC recombinante mostraron una actividad hiperglucemiantesemejante a la mostrada por el grupo de animales sin ablación ocular inyectados con PBS. Mientras que se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosa al grupo control negativo que consistió en animales con ablación bilateral del pedúnculo ocular inyectados con la proteína inteína o PBS. Este resultado proporcionó una alternativa para obtener proteína soluble biológicamente activa para estudios posteriores en la familia HHC (Morera *et al.*, 2013).

Por otra parte, se comprobó la efectividad del mecanismo del ARN de interferencia (ARNi) para realizar estudios de funcionalidad en camarón adulto *in vivo* por primera vez, pues constituye el primer paso para determinar la función de genes desconocidos (Doran and Helliwell, 2009). Para ello se sintetizó un ARN doble cadena (ARNdc) a partir del ADNc de la HHC de *L. schmitti*. Su capacidad para silenciar la expresión del gen de la HHC se determinó por análisis de su función biológica principal y del transcrito de la HHC. Se constató la disminución significativa del nivel de glucosa en la hemolinfa respecto a los grupos controles negativos tratados con un ARNdc no relacionado y solución salina. Los resultados de Northern blot y TR-RCP semicuantitativo mostraron el silenciamiento del ARNm de la HHC 24 horas post-inyección solamente en el grupo tratado con ARNdc de la HHC (Lugo *et al.*, 2006). Este resultado mostró la capacidad del ARNi de interrumpir el mecanismo funcional de la HHC, por lo que también es una alternativa para el estudio de los miembros de la familia HHC (Estrada *et al.*, 2007).

HORMONA INHIBIDORA DE LAS GÓNADAS (HIG)

Una vez que dejó de cultivarse *L. schmitti* en el país, se continuaron los estudios de las neurohormonas relacionadas directamente con el control de la reproducción con *L. vannamei*. Siguiendo la metodología empleada para obtener la HHC por vía recombinante en *L. schmitti*, se inició el estudio de la hormona inhibidora de las gónadas (HIG). Se obtuvieron así los primeros resultados de la caracterización estructural de la HIG en el camarón *L. vannamei*. La secuencia parcial de 138pb del gen de la HIG fue obtenida por TR-RCP y utilizando oligonucleótidos específicos de *Penaeus*

monodon. A partir de la secuencia parcial se diseñaron nuevos oligonucleótidos específicos para las siguientes reacciones de TR-RCP anidada. Se obtuvo la secuencia completa de la HIG de *L.vannamei* con 839pb. El análisis bioinformático mostró alta homología (92%) con la del camarón *P. monodon* (Morera *et al.*, 2011).

Existen variados estudios enfocados a la obtención de nuevos métodos de inducción de la maduración gonadal de camarones peneidos, para llegar a optimizar los resultados obtenidos mediante la ablación ocular, el cual continúa siendo el método aplicado más generalizado en la camaronicultura mundial. La actualización de de los estudios realizados ha sido considerada en revisiones recientes del tema de endocrinología de crustáceos decápodos (González *et al.*, 2018b).

MÉTODOS ALTERNATIVOS RELACIONADOS CON LA MANIPULACIÓN DE LOS MECANISMOS REPRODUCTIVOS EN CAMARONES PENEIDOS.

Entre los principales resultados obtenidos en los últimos años que podrían contribuir a la obtención de nuevos métodos aplicados de inducción a la maduración y reproducción de camarones peneidos se encuentran:

La inhibición de la hormona inhibidora de las gónadas (HIG) por silenciamiento génico mediante la técnica de ARNi en *P. monodon* (Das *et al.*, 2015) y *L. vannamei* (Feijó *et al.*, 2016).

La neutralización de la HIG de *P. monodon* con anticuerpos monoclonales anti HIG (Treerttrakool *et al.*, 2014) y con anticuerpos policlonales anti HIG (Vrinda *et al.*, 2017, González *et al.*, 2017). en *L. vannamei*.

Otros estudios reportan la estimulación ovárica en camarones peneidos mediante el suministro de factores hormonales o

neurotransmisores tales como: la hormona inhibidora de la muda tipo II (HIM II) de *L. vannamei* (Luo *et al.*, 2015; González *et al.*, 2018a), la hormona concentradora del pigmento rojo (HCPR) combinada con la serotonina (5-HT) en *L. vannamei* (Cheen *et al.*, 2018), la 5-HT combinada con la ablación ocular de *Penaeus indicus* (Tomy *et al.*, 2016), la octopamina en *L. vannamei* (Tinikul *et al.*, 2015), los esteroides sexuales (estrógenos y progesterona) en *L. vannamei*, (Li *et al.*, 2015; Subramoniam, 2017), la hormona liberadora de gonadotropina proveniente de pulpo y lamprea en *L. vannamei* (Tinikul *et al.*, 2014).

En *P.indicus* el farnesoato de metilo, sesquiterpeno muy similar a la hormona juvenil III de los insectos cuyo precursor es el ácido farnesoico, mostró su función estimuladora de la vitelogénesis (Nagaraju *et al.*, 2002).

Se pueden estimular además los mecanismos reproductivos mediante manipulación nutricional. Por ejemplo la utilización de *Ulva clathrata* como aditivo de dietas frescas de calamar en la alimentación de reproductores en los laboratorios de producción de postlarvas, mejora el desempeño reproductivo de *L. vannamei* (Corral-Rosales *et al.*, 2018 a,b), la alimentación de los reproductores con poliquetos *Perinereis* sp. resulta ser una fuente de esteroides sexuales que favorecen la calidad de los machos en *P. monodon* (Leelatanawit *et al.*, 2014), la adición de ácido araquidónico (C:20:4w6) en las dietas artificiales de la última fase del engorde de progenitores favorece la respuesta reproductiva de *L. vannamei* (Xu *et al.*, 2017) y el uso de la tecnología de BIOFLOC en la cría intensiva de bancos de progenitores de *F. duorarum* favorece la respuesta reproductiva en la etapa de maduración (Emerenciano *et al.*, 2014).

CONSIDERACIONES GENERALES

El conjunto de resultados expuestos hizo posible obtener una tecnología eficiente para la maduración y la reproducción de *L. schmitti* en los centros de desove de la camaricultura. La experiencia adquirida en la maduración y reproducción de *L. schmitti*, facilitó la adecuación de las tecnologías a la reproducción controlada en ciclo cerrado de *L. vannamei*, especie foránea introducida al país por presentar indicadores productivos más elevados y que desde 2003 es la única especie cultivada en Cuba. A pesar de que mundialmente *L. vannamei* es el camarón más cultivado en la actualidad, el poder retomar especies nativas cuya tecnología de cultivo se domina como es el caso de *L. schmitti* continúa siendo una alternativa viable.

Entre los principales temas de investigación sugeridos para dar continuidad a los trabajos realizados y optimizar los resultados actuales en la maduración y la reproducción de camarones peneidos en Cuba se encuentran: obtener progenitores de cultivo saludables y nutricionalmente preparados que garanticen la obtención de descendencias de calidad. Seleccionar e implementar nuevos métodos de inducción de la maduración y reproducción económicamente viables. Realizar estudios de requerimientos nutricionales de reproductores que posibiliten el uso de alimentos frescos o congelados de calidad en las unidades de maduración, así como la formulación de dietas que minimicen o sustituyan el alimento fresco. Continuar con la búsqueda de indicadores de calidad de los reproductores, que permitan optimizar los resultados productivos actuales.

REFERENCIAS

- ARTILES, M. A., REGUEIRA, E. y PÉREZ, L. (1999). Maduración y reproducción de *Penaeus schmitti* utilizando hembras ablacionadas y no ablacionadas bajo iluminación natural. *Rev. Invest. Mar.* 20 (1-3), 93-102.
- BÉCQUER, U., RAMOS, L. y BETANCOURT, A. (1994). Respuesta reproductiva de *Penaeus schmitti* a los siete y nueve meses de edad. *Rev. Invest. Mar.* 15 (3), 256-261.
- BÉCQUER, U., DÍAZ, R., HERNÁNDEZ, N., AZANZA, J., ESPINOSA, G., BORRELL, Y., ... GUERRERO, C. (2002). La genética del cultivo del camarón *Penaeus schmitti* en Cuba: Resultados y perspectivas. *Rev. Acuacult. Ecuador*, 33-36.
- BÉCQUER, U. (2005). *Heredabilidad y correlaciones genéticas y fenotípicas para caracteres de crecimiento en el camarón blanco Litopenaeus schmitti (Burkenroad, 1936)*. (Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas), Universidad de la Habana, Cuba.
- BETANCOURT, A., RAMOS, L., TAMAYO, A., CARBALLO, N., BÉCQUER, U., y TORRES, M. (1994). Calidad de la esperma de *Penaeus schmitti* en condiciones de cautiverio. *Rev. Invest. Mar.* 15 (3), 251-255.
- BRAY, W.A., & LAWRENCE, A.L. (1992) *Marine Shrimp culture: principles and practices*. Reproduction of *Penaeus* species in captivity, editors Fast AW., L James Lester. Chapter 5, 93-170 pp.
- CHEN, H.-Y, KANG, B. J., SULTANA, Z. & WILDER, M. N. (2018). Molecular cloning of red pigment-concentrating hormone (RPCH) from eyestalks of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Evaluation of the effects of the hormone on ovarian growth and the influence of serotonin (5-HT) on its expression. *Aquaculture*, 495, 232-240.
- CORRAL-ROSALES, D.C., PALACIOS, E., RICQUE-MARIE, D., & CRUZ-SUÁREZ, L.E.

- (2018a). Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquacult. Res.*, *49*, 1053-1059. DOI: 10.1111/are.13554.
- CORRAL-ROSALES, D.C., CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., RODRÍGUEZ-JARAMILLO, C. & PALACIOS, E. (2018b). Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquacult. Res.*, DOI: 10.1111/are.13839.
- DAS, R., KRISHNA, G., PRIYADARSHI, H., GIREESH-BABU, P., PAVAN-KUMAR, A., RAJENDRAN, K.V., ... CHAUDHARI, A. (2015). Captive maturation studies in *Penaeus monodon* by GIH silencing using constitutively expressed long hairpin RNA. *Aquaculture* *448*, 512-520.
- DORAN, T. & HELLIWELL, C. (2009). *RNA interference: methods for plants and animals*. Collingwood, Vic.: CSIRO Publishing 2008. CAB International.
- EMERENCIANO M., CUZON, G., AREVALO, M., & GAXIOLA, G. (2014). Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquacult. Res.*, *45*, 1713-1726.
- ESTRADA M.P., LUGO, J.M., ACOSTA, J., CARPIO, Y., BORROTO, I., MORERA ... HUBERMAN, A. (2007). A novel mechanism of RNA interference to demonstrate gene functions in aquatic organisms. *B. Aplicada*, *24* (2), 178-182.
- FEIJÓ R.G., BRAGA, A.L., LANES, C.F.C., FIGUEIREDO, M.A., ROMANO, L.A., KLOSTERHOFF, M.C. ... MARINS, L.F. (2016). Silencing of gonad-inhibiting hormone transcripts in *Litopenaeus vannamei* females by use of the RNA interference technology. *Mar. Biotechnol.*, *18*, 117-123 doi: 10.1007/s10126-015-9676-2.
- GARCÍA-GALANO, T. y CARRILLO-FARNÉS, O. (2015). Nutrición del camarón blanco, *Litopenaeus schmitti* Burkenroad: 25 años de investigación científica. *Rev. Invest. Mar.* *35* (2), 24-40.
- GELABERT, R., RAMOS, L., OREYANA, M., MASCARÓ, M., SÁNCHEZ, A., SOTO, L. A. ... ROSAS, C. (2003). The effect of including *Artemia franciscana* biomass in the diet of *Litopenaeus setiferus* and *Litopenaeus schmitti* broodstock. *Rev. Invest. Mar.* *24* (1), 29-40.
- GONZÁLEZ, M., RAMOS, L., MORERA, Y., LUGO, J. M., BOLÍVAR, J. ESTRADA, M. P. & CARPIO, Y. (2017). *Induction of ovarian maturation using a polyclonal antibody specific to GIH in the Pacific White Shrimp Litopenaeus vannamei*. Biotecnología Habana, Varadero, Cuba 3-6 de diciembre 2018.
- GONZÁLEZ, M., CARPIO, Y., ESTRADA, M.P., RODRÍGUEZ-RAMOS, T., BETANCOURT, J.L. & RAMOS, L. (2018a). *Mature Peptide of molt-inhibiting hormone (MIH-II) produced in E.coli induced spawning in the Pacific White shrimp Litopenaeus vannamei*. BioAqua 2018, Varadero. 28 octubre al 1ro de noviembre, 2018, pp. 35.
- GONZÁLEZ M. M., BETANCOURT, J. L. y RAMOS, L. (2018b). Endocrinología de la reproducción en crustáceos decápodos (Crustacea: Decapoda): Avances científicos y perspectivas futuras. *Rev. Invest. Mar.* *38*(2), 1-27.
- GUITART, B., GONZÁLEZ, E., FRAGA, I. y REYES, R. (1985). Áreas y épocas de desove de los camarones *Penaeus notialis*

- y *Penaeus schmitti* en la plataforma cubana. *Rev. Cub. Invest. Pesq.* 10 (3-4), 58-77.
- HUBERMAN, A., AGUILAR, M.B., NAVARRO, I., RAMOS, L. & FERNÁNDEZ, I. (1997). *Two families of neuropeptide hormones from the sinus glands of Procambarus bouvieri and Penaeus schmitti*. XIII International Congress of Comparative Endocrinology. Yokohama, Japón. 16-21 de nov., pp.37-42.
- HUBERMAN, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191, 191-208.
- HUBERMAN, A., RAMOS, L. & MITRE, I. B. (2000a). *Lipoviletllin from the caribbean shrimp, Litopenaeus schmitti*. The Crustacean Society 2000 Summer Meeting, Puerto Vallarta, México, junio 26-28.
- HUBERMAN, A., AGUILAR, M.B., NAVARRO-QUIROGA, I., RAMOS, L., FERNÁNDEZ, I., WHITE, F.M. & HUNT, D.F., (2000b). A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Peptides* 21, 331-338.
- KELLER, R. (1992). Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects. *Experientia* 48, 439-448.
- LEELATANAWIT, R., UAWISETHATHANA, U., KHUDET, J., KLANCHUI, A., PHOMKLAD, S., WONGTRIPOP, S. ... KAROONUTHAISIRI, N. (2014). Effects of polychaetes (*Perinereis nuntia*) on sperm performance of the domesticated black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 433, 266-275.
- LI, G.L., CHEN, H.P., DENG, S.P., YE, M., JIANG, S., CHAN, S.F. & ZHU, C.H. (2015). In vivo and in vitro inhibitory action of 17 β -estradiol and environmental estrogen 4-nonylphenol on gonad-inhibiting hormone (GIH) expression in the eye-stalks of *Litopenaeus vannamei*. *Genet. and Mol. Res.*, 14 (4), 14056-14065.
- LUGO J.M., MORERA, Y., RODRIGUEZ-RAMOS, T., RAMOS, L., HUBERMAN, A. & ESTRADA, M.P. (2006). Molecular cloning and characterization of the crustacean hyperglycaemic hormone cDNA from *Litopenaeus schmitti*. Functional analysis by double-stranded RNA interference technique. *FEBS Journal*, 273, 5669-5677.
- LUO, X., CHEN, T., ZHONGA, M., JIANGA, X., ZHANGA, L., RENA, CH. & HUA, CH. (2015). Differential regulation of hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression by two putative molt-inhibiting hormones (MIH1/2) in Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Peptides*, 68, 58-63.
- QUACKENBUSH, L.S. (1986). Crustacean endocrinology, a review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 2271-2282.
- MARANGOS, C., RAMOS, L. & OLIVA, M. (1988). Variations des teneurs en proteines de l'hemolymph, de l'hépatopancreas et de l'ovaire de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys*, 96, 179-190.
- MARANGOS, C., RAMOS, L. and OLIVA, M. (1989). Variations des teneurs en acides aminés libres de l'ovaire, de l'hépatopancreas et de l'hémolymph de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne (Crustacea, Penaeidae). *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys* 97 :95-106.
- MARRERO, J., ESPINOSA, G. ALONSO, M.E., BÉCQUER, U., BORRELL, Y., RODRÍGUEZ-RAMOS, T. y BEATRIZ, M. (2002). Efecto del polisacárido sobre el número de hemocitos y la producción de óxido nítrico en el camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*). *Rev. Invest. Mar.* 23 (3), 221-227.

- MORERA Y, LUGO., J.M, BOLIVAR, J., RODRIGUEZ-RAMOS, T., HUBERMAN, A., PENDÓN, C., ... ESTRADA, M. P. (2011). *Molecular cloning of a key neuropeptide for reproduction control in Litopenaeus vannamei, the Gonad Inhibiting hormone*. Congreso Biotecnología Habana 2011, 28 de noviembre al 3 de diciembre.
- MORERA, Y., LUGO, J. M. , RAMOS, L., RODRIGUEZ-RAMOS, T., HUBERMAN, A. & ESTRADA, M.P. (2013). A chimeric recombinant crustacean hyperglycemic hormone from *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad) obtained as C-terminus fusion protein boost hemolymph glucose concentration in *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Res.*, 44 (7), 1066-1075.
- NAGARAJU G.P.C., RAMAMURTHI, R. & REDDY, P.S. (2002). Methyl farnesoate stimulates ovarian growth in *Penaeus indicus*. En Harikumar, V.S. (Ed.), *Recent trends in biotechnology, Agrobios I*, 85-89.
- PÉREZ-JAR, L y RAMOS, L. (1992). Determinación de la proporción de sexos del camarón blanco *Penaeus schmitti* en tanques de maduración inducida para el incremento de la cópula natural. *Rev. Invest. Mar.*, 13 (2), 167-176.
- PÉREZ-JAR, L. y JAIME, B. (1995). Respuesta reproductiva de progenitores de *Penaeus schmitti* al utilizar machos de diferentes edades de cultivo. *Rev. Invest. Mar.* 16 (1-3), 69-73.
- PÉREZ-JAR, L., JAIME, B. y GARCÍA, T. (1996). Efecto de dietas pelletizadas en la respuesta reproductiva de progenitores de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 17 (1), 221-227.
- PÉREZ-JAR, L., SAMADA, S. y ESPEJO, Y. M. (1997). Producción y empleo de cuatro generaciones parentales del camarón blanco *Penaeus schmitti* en ciclo cerrado. *Rev. Invest. Mar.* (2), 169-177.
- PÉREZ-JAR, L., RODRÍGUEZ-RAMOS, T., RAMOS, L., GUERRA-BORREGO, Y. & RACOTTA, I. S. (2006). Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*, 252, 591-597.
- PÉREZ-JAR, L., RAMOS, L., RACOTTA, I.S., GUERRERO, C. y ACEBEDO, A. (2007a). Desempeño reproductivo de progenitores de *Litopenaeus schmitti* en tanques unisexos y mixtos en condiciones comerciales. *Rev. Invest. Mar.* 28 (2), 151-158.
- PÉREZ-JAR, L., RAMOS, L., PALACIOS, E. & RACOTTA, I. S. (2007b). Reproductive performance and sperm quality in wild and pond reared southern White shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductivity activity. *Rev. Invest. Mar.* 28 (3), 237-246.
- PRIMAVERA, J. H. (1978). Induced maturation and spawning in five-month old *Penaeus monodon* Fabricius by eyestalk ablation. *Aquaculture*, 13, 355-359.
- RAMOS, L. y GONZÁLEZ, A. (1983): Inducción artificial a la maduración gonadal en hembras de *Penaeus notialis* Pérez Farfante, 1967 por oculoctomía. *Rev. Invest. Mar.* 4 (1), 33-61.
- RAMOS, L. & PRIMAVERA, J.H. (1986). *Induced maturation in ablated Penaeus notialis and Penaeus schmitti*. The First Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas. 26-31 mayo, pp.697-700.
- RAMOS, L. (1990). Fecundación artificial del camarón blanco *Penaeus schmitti*: Fecundidad y viabilidad de desoves. *Rev. Invest. Mar.* 1 (2), 157-166.

- RAMOS, L. y GARCÍA, T. (1992). Maduración y reproducción de *Penaeus schmitti*, utilizando como complemento de la alimentación diferentes dietas artificiales. *Rev. Invest. Mar.*, XIII (2), 159-166.
- RAMOS, L., MOLINA, J. MA., PÉREZ-JAR, L. y TORRES, B. (1994). Producción de nauplios de *Penaeus schmitti* en instalaciones comerciales de maduración en Cuba. *Rev. Invest. Mar.*, 15 (1), 28-38.
- RAMOS, L., ESPEJO, M., SAMADA, S. & PÉREZ-JAR, L. (1995). Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. *JWAS*, 26 (2), 183-187.
- Ramos, L. (1996). *Fisiología y bioquímica de la reproducción del camarón blanco Penaeus schmitti: Su relevancia productiva*. (Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas), Universidad de la Habana, Cuba.
- RAMOS, L., VÁZQUEZ BOUCARD, C., OLIVA, M. y FERNÁNDEZ, I. (1996). Variaciones en el contenido de lípidos totales, clases de lípidos y ácidos grasos durante la maduración ovárica en los camarones *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. *Rev. Invest. Mar.*, 17 (2-3), 159-168.
- RAMOS, L., ESPINOSA, G., BÉCQUER, U. y BORRELL, Y. (2000). *Criterios de calidad de machos domesticados del camarón blanco Litopenaeus schmitti*. IV Congreso Latinoamericano de Acuicultura y Exhibición, Ciudad de Panamá 25-28 de octubre, pp.42.
- RODRÍGUEZ-RAMOS, T., BORRELL, Y., RAMOS, L., BÉCQUER, U. y ESPINOSA, G. (2001). Aplicación de la actividad hemoaglutinante de la hemolinfa de *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 22 (3), 235-240.
- RODRÍGUEZ-RAMOS, T., ESPINOSA, G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., GOLLAS-GALVÁN, T., MARRERO, J., BORRELL, Y., ... ALONSO, M. (2008). Effects of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 274, 118-125.
- RODRÍGUEZ-RAMOS, T., CARPIO, Y., BOLÍVAR, J., GÓMEZ, L., ESTRADA, M. P. & PENDON, C. (2016). Nitric oxide synthase-dependent immune response against gram negative bacteria in a crustacean, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 50, 50-55.
- SUÁREZ, O., RAMOS, L., MARTÍNEZ, L. y HUBERMAN, A. (1996). Morfología del pedúnculo ocular de los camarones *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. *Rev. Invest. Mar.*, 17 (2-3), 145-154.
- SUBRAMONIAM, T. (2017). Steroidal Control of Vitellogenesis in Crustacea: A New Understanding for Improving Shrimp Hatchery Production. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, 83 (3), 595-610
- TINIKUL, Y., POLJAROEN, J., TINIKUL, R., ANURACPREEDA, P., CHOTWIWATTHANAKUN, CH., SENIN, N. ... SOBHON, P. (2014). Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development. *Aquaculture*, 420-421, 79-88.
- TINIKUL Y., POLJAROEN, J., TINIKUL, R., CHOTWIWATTHANAKUN, C. ANURACPREEDA, P., HANNA, P.J. & SOBHON, P. (2015) Alterations in the levels and distribution of octopamine in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its possible role in ovarian development. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 210, 12-22.
- TOMY, SH., SAIKRITHI, P., JAMES, N., BALASUBRAMANIAN, C.P., PANIGRAHI, A., OTTA,

- S. K., ... PONNIAHC, A.G. (2016). Serotonin induced changes in the expression of ovarian gene network in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 452, 239–246.
- TREERATTRAKOOL, S., BOONCHOY, CH., URTGAMA, S., PANYIM, S. & UDOMKIT, A. (2014). Functional characterization of recombinant gonad-inhibiting hormone (GIH) and implication of antibody neutralization on induction of ovarian maturation in marine shrimp. *Aquaculture*, 428-429, 166-173.
- VINCENT, M., RAMOS, L. & OLIVA, M. (1988a). Variations des pigments caroténoïdes totaux dans l'ovaire et l'hépatopancréas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. *Biochem. Syst. Ecol.*, 16 (4), 431-436.
- VINCENT, M., RAMOS, L. & OLIVA, M. (1988b). Variations qualitatives et quantitatives des pigments carotenoides dans l'ovaire et l'hépatopancréas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, 96, 155-164.
- VINCENT, M., RAMOS, L. & OLIVA, M. (1989). Variations de la composition en acides gras et des monoesters de zeaxanthine et d'astaxanthine dans l'ovaire et l'hépatopancréas de *Penaeus schmitti* au cours de l'ovogenèse. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, 97, 71-78.
- VRINDA, S., JASMIN, C., SIVAKUMAR, K.C., SEENA, J., BLESSY, J., ROSAMMA, P. & BRIGHT SINGH, I. S. (2017). Regulating gonad inhibition and vitellogenin/vitelin induction in *Penaeus monodon* using mature GIH fusion protein and polyclonal antisera. *Comp. Biochem. Physiol. (A Physiol.)*, 203, 167-178.
- WOUTERS, R. LAVENS, P., NIETO, J. & SORGELOOS, P. (2001). Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202, 1-21.
- XU, H., ZHANG, Y., LUO, K., MENG, X., LUAN, SH., CAO, B. ... KONG, J. (2017). Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 479, 556-563.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Ramos, L., González, M., Morera, Y. y Rodríguez-Ramos, T. (2019). Maduración y reproducción en cautiverio del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* Burkenroad en Cuba. *Rev. Invest. Mar.*, 39 (1), 1-20.