



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

Estudio sobre el órgano genital del camarón blanco del
Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone), con énfasis en la
glándula androgénica

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

RODOLFO GARZA TORRES

La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2011

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

COMITÉ TUTORIAL

Co-directores:

Dr. Rafael Campos Ramos (CIBNOR, S.C.).

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez (CIBNOR, S.C.).

Tutores:

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra (CIBNOR, S.C.).

Dr. Gopal Murugan (CIBNOR, S.C.).

Dr. Gabino Adrián Rodríguez Almaraz (UANL).

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Rafael Campos Ramos.

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez.

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra.

Dr. Gopal Murugan.

Dr. Gabino Adrián Rodríguez Almaraz.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Rafael Campos Ramos.

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez.

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra.

Dr. Gopal Murugan.

Dr. Gabino Adrián Rodríguez Almaraz.

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero (Suplente).

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz (Suplente).

PREFACIO

El presente trabajo de tesis doctoral comprende los siguientes artículos publicados:

- I. Garza-Torres, R., R. Campos-Ramos, y A. M. Maeda-Martínez. (2009). Organogenesis and subsequent development of the genital organs in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 296: 136-142.

- II. Garza-Torres, R., A. M. Maeda-Martínez, D. A. Guerrero-Tortolero, H. Obregón-Barboza y R. Campos-Ramos. (2011). Description of meiosis in female and male Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology* 31 (1): 75:81.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 24 del Mes de Octubre del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio sobre el órgano genital del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone), con énfasis en la glándula androgénica"

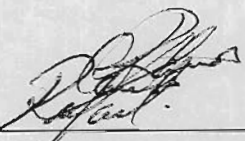
Presentada por el alumno:

Rodolfo Garza Torres

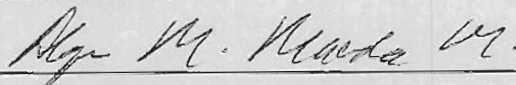
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

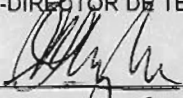
LA COMISION REVISORA



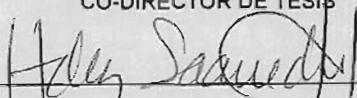
Dr. Rafael Campos Ramos
CO-DIRECTOR DE TESIS



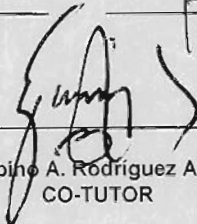
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. Gopal Murugan
CO-TUTOR



Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
CO-TUTOR



Dr. Gabino A. Rodríguez Almaráz
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

En la acuicultura, el crecimiento de las especies es la característica más importante para la rentabilidad de la industria. En peneidos existe dimorfismo sexual en donde las hembras tienen un mayor crecimiento en comparación con los machos. La reversión sexual del camarón blanco Pacífico *Litopenaeus vannamei* podría contribuir a una mayor producción en la camaronicultura a través del cultivo monosexual de hembras. En Malacostraca (isópodos, anfípodos y decápodos), el órgano responsable de determinar la masculinidad es la glándula androgénica (GA). Sin embargo, el conocimiento sobre el desarrollo, función y control de esta glándula son prácticamente nulos en especies comerciales de peneidos. Con este conocimiento se tendrían las bases para emprender ensayos de reversión sexual en el camarón blanco y finalmente integrar una biotecnología como cultivo monosexual de hembras a la industria. En el presente estudio, se realizaron 4 investigaciones concernientes al estudio de la GA en machos de camarón blanco, incluyendo el desarrollo de esta durante la organogénesis del aparato genital, su función en el mantenimiento de la espermatogénesis en relación con el ciclo de muda, el control endocrino proveniente de la glándula sinusal que se encuentra en el tallo ocular y el efecto que tiene al ser ablacionado, además de un análisis molecular de su expresión. Se describe organogénesis y el desarrollo subsecuente del órgano genital a partir de postlarvas (PL) de *L. vannamei*. El órgano genital de cada sexo se reconoció por completo a través de la disección en el día PL16. Este se observa como un lóbulo bilateral en la parte anterior al hepatopáncreas, conectados a un tubo colector que se extiende dorsalmente hacia la región posterior en forma de U invertida, de este tubo se proyectan bilateralmente 8 lóbulos, un oviducto, y un lóbulo posterior en hembras, y 7 lóbulos en el macho además de los vasos deferentes. Alrededor de PL50, se evidencia la diferenciación sexual externa con la formación del télico en hembras y los gonoporos en machos, y es cuando se forma la GA en los vasos deferentes rodeado de un tejido conectivo el cual lo conecta al 8º lóbulo testicular. La diferenciación de la gónada ocurrió a partir de PL68, en donde fue posible distinguir entre ovario y

testículo. Con el objeto de establecer una relación entre la gametogénesis y el ciclo de muda, se analizaron las etapas de la profase meiótica I en cada uno de los estadios de ecdisis en ambos sexos. Se observaron células meióticas en etapa de cigoteno, paquiteno (denotado por la completa sinapsis de sus bivalentes) y diploteno en los estadios de inter-muda, pre-muda y post-muda temprana y tardía, lo cual sugiere que no existe una relación entre esos 2 procesos. Se realizó un bioensayo para analizar el efecto de la ablación unilateral y bilateral de los tallos oculares sobre el órgano genital y la GA. La ablación en ambos grupos mostró un efecto significativo en el peso total del órgano genital con respecto al grupo control. Los conteos espermáticos se incrementaron significativamente en el grupo bilateral (6×10^6) respecto al unilateral y control (2×10^6). En cortes histológicos se logró observar en ambos grupos ablacionados, un incremento en el número de células en la GA del vaso deferente medio y el ámpula terminal, lo cual denota una hiperplasia producida una semana después de la ablación. Por último, se diseñaron oligos a partir de las secuencias nucleotídicas de la GA en decápodos reportadas en GenBank. Se obtuvieron amplificaciones de ADNc por RT-PCR en tejido del vaso deferente medio y ámpula terminal. La secuencia de este producto fue similar a las publicadas en peneidos y su traducción peptídica tiene la misma estructura del tipo-insulina que muestran los demás decápodos para la hormona de la GA. El conocimiento general que se obtuvo en este trabajo sobre la GA ayudará a próximos estudios enfocados a la producción de cultivos monosexuales en el camarón blanco.

Palabras clave: *L. vannamei*., glándula androgénica, diferenciación sexual

Dr. Rafael Campos Ramos
Co-director de tesis

Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Co-director de tesis

ABSTRACT

In aquaculture, growth is the most important characteristic for the profitability of the industry. Peneid shrimp have a gender dimorphism, where females grow larger than males. Sex reversal of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* could contribute to the mayor production of the shrimp farming trough an all-female culture. In Malacostraca (isopods, amphipods and decapods), the androgenic gland (AG) is the responsible for their maleness. However, knowledge in the development, function and control of the AG are practically null in commercially reared peneids. This knowledge can create the foundations to undertake sex reverse essays on the white shrimp and finally integrate a biotechnology that could produce a monosexual culture in shrimp. In the present work, 4 AG investigations were carried out, including its development during the organogenesis of the genital organ, its function in the maintenance of the spermatogenesis related to the molt cycle, its endocrine control from the sinus gland in the eyestalk, and the effect if ablated, plus a molecular analysis of its expression. Timing of the organogenesis and subsequent development of the genital organ of females and males of *L. vannamei* is here described. The genital organ was fully recognized from postlarve day-16 (PL16) as a bilateral lobe located in the anterior region of the midgut gland that connects to an anterior collector tube that extends dorsally towards the posterior region and forms an inverted U-shape collector. 8 lobes, an oviduct, and a posterior lobe in females and 7 lobes including the vas deferens in males, are connected bilaterally along the collector tube. Around PL50, where external gender differentiation is recognized as the thelycum in females and the gonopores in males, the AG appears along the vas deferens, surrounded by connective tissue that attaches it to the eighth testicular lobe. Gonad differentiation occurred from PL68, where it was possible to differentiate the female ovary from the male testes. The meiotic prophase I stages were analyzed in both genders on each molt stadium to establish if the gametogenesis and the molt cycle are related. Meiotic cells at zygotene, pachytene, (recognized by the complete synapsis of the bivalents) and diplotene stages were observed at inter-molt, pre-molt, and early and late post-

molt stages in all individuals, which suggests that there is no relationship between molting and the meiotic prophase. A bioassay to analyze the effect of the unilateral and bilateral eyestalk ablation over the genital organ and the AG was conducted. Ablation in both groups caused a significant effect over the total weight of the genital organ over the control group. Spermatic counts also had a significant increase in the bilateral group (6×10^6) over the unilateral and control (2×10^6). An increase in the AG cell number in the vas deferens in both ablated groups was observed through histology, which denotes that eyestalk ablation caused hypertrophy of the gland. Finally, primers were designed based on the published AG nucleotide sequences of decapods. Amplifications of cDNA by RT-PCR were amplified on vas deferens and terminal ampule tissues of *L. vannamei*. The sequence of these products was similar to those published in penaeids, and its peptide translation has the same insulin-like structure that other AG hormones in decapods have. The AG knowledge here achieved, will contribute to future studies focused on the production of all-female cultures in the white shrimp.

Key words: *L. vannamei*, androgenic gland, sexual differentiation

v

A

La Paz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Rafael Campos Ramos y el Dr. Alejandro M. Maeda Martínez.

Gracias a mi comité tutorial, la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, el Dr. Gopal Murugan y el Dr. Gabino A. Rodríguez Almaraz.

Gracias a la Dra. Elva Cortés, a la Dra. Danitzia Guerrero y a la Dra. Hortencia Barboza, gracias a Sandra de la Paz, Carlos Ceseña, Carmen Rodríguez, Eulalia Meza, Delia Rojas y Miguel Correa.

Gracias a toda mi familia, incluida Arlett.

Gracias a todos mis amigos y compañeros.

Gracias al CIBNOR y al personal de Posgrado, gracias al CONACyT por la beca otorgada (No. 166576).

Quiero dar gracias a todos por haberme ayudado a llegar hasta aquí.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Aparato genital en hembras y machos de <i>Litopenaeus vannamei</i>	5
Organogénesis del aparato genital	8
Descubrimiento e investigaciones de la glándula androgénica en malacostráceos.....	8
Relación entre la gametogénesis y el ciclo de muda en decápodos.....	15
Control neuroendocrino de la glándula androgénica	19
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
HIPÓTESIS	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
ORGANOGENESIS	27
CICLO DE MUDA Y MEIOSIS	28
ABLACIÓN DEL TALLO OCULAR E HIPERTROFIA DE LA GLÁNDULA ANDROGÉNICA ...	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31
ANÁLISIS MOLECULAR	31
RESULTADOS.....	35
ORGANOGENESIS	35
Línea de tiempo de eventos durante la diferenciación sexual interna y externa.....	35
Organogénesis de la gónada (PL12 a PL16)	35
Morfología del órgano genital.....	36
Desarrollo temprano de la gónada (PL12 a PL28).....	37
Histología del oviducto y del vaso deferente.....	37
Diferenciación sexual externa temprana (PL32 a PL44).....	38
Diferenciación sexual externa subsecuente (PL44 a PL48)	39
Organogénesis de la GA y del tejido adiposo blanco (PL48 a PL50).....	40
Desarrollo del epitelio germinal y diferenciación sexual de la gónada (PL52 a PL72)	40
Desarrollo subsecuente de los vasos deferentes y de la glándula androgénica.....	41
CICLO DE MUDA Y MEIOSIS	45
ABLACIÓN DEL TALLO OCULAR E HIPERTRÓFIA DE LA GLÁNDULA ANDROGÉNICA ...	50
ANÁLISIS MOLECULAR	56
DISCUSIÓN.....	60

ORGANOGENESIS	60
CICLO DE MUDA Y MEIOSIS	64
ABLACION DEL TALLO OCULAR E HIPERTROFIA DE LA GLANDULA ANDROGENICA ...	67
ANÁLISIS MOLECULAR	69
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES	72
LITERATURA CITADA.....	73
ANEXO	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor femenino de peneidos.....	5
Figura 2. Aparato reproductor masculino de peneidos.....	6
Figura 3. Aparato reproductor masculino.....	7
Figura 4. Vaso deferente de <i>Litopenaeus vannamei</i>	10
Figura 5. Corte longitudinal de vaso deferente distal.....	10
Figura 6. Vaso deferente de <i>Cherax destructor</i>	11
Figura 7. Localización de la expresión del gen.....	13
Figura 8. Modelos lineal de la pro-proteína (A) y en 3D de la proteína madura (B) del gen Cq-IAG.....	13
Figura 9. Modelo lineal de la pro-proteína de Mj-IAG.....	14
Figura 10. Modelo lineal de la pro-proteína (A) y en 3D de la proteína madura (B) Pm-IAG.....	15
Figura 11. Télico abierto en hembras <i>Litopenaeus vannamei</i> (A); y télico cerrado.....	17
Figura 12. Complejo sinaptonémico.....	18
Figura 13. Tallo ocular de un peneido.....	20
Figura 14. Esquema del control endócrino de la reproducción.....	21
Figura 15. Efectos de ablación del tallo ocular.....	22
Figura 16. Cambios morfológicos en urópodos de <i>L. vannamei</i>	30
Figura 17. Línea de eventos de la diferenciación sexual externa e interna.....	35
Figura 18. Órgano genital de <i>L. vannamei</i>	36
Figura 19. Órgano genital de la hembra de <i>L. vannamei</i>	37
Figura 20. Órgano genital de <i>L. vannamei</i>	39
Figura 21. Vaso deferente de <i>L. vannamei</i>	40
Figura 22. Gónada de <i>L. vannamei</i>	41
Figura 23. Órgano genital de macho de <i>L. vannamei</i>	42
Figura 24. Vaso deferente medio de <i>L. vannamei</i>	43
Figura 25. Vaso deferente de <i>L. vannamei</i>	44
Figura 26. Cromosomas en cigoteno y paquiteno de <i>L. vannamei</i>	46
Figura 27. Cromosomas en diploteno de <i>L. vannamei</i>	47
Figura 28. Cromosomas en diploteno avanzado y en mitosis de <i>L. vannamei</i>	48
Figura 29. Diámetro de los núcleos.....	49
Figura 30. Comparación del peso del órgano genital e índice genital-soático entre camarones ablacionados.....	51

Figura 31. Comparación del peso del testículo e índice gonadosomático entre camarones ablacionados	53
Figura 32. Comparación del peso del vaso deferente e índice vaso deferente entre camarones ablacionados	54
Figura 33. Comparación del peso del espermátforo y conteo espermático entre camarones ablacionados	55
Figura 34. Efecto de la ablación en <i>L. vannamei</i>	56
Figura 35. RT-PCR de <i>L. vannamei</i> usando como templado ARN total de diferentes tejidos del vaso deferente.	57
Figura 36. Análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos de la HGA	58
Figura 37. Dendrograma consenso de similitud	59

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Oligonucleótidos diseñados	32
Tabla II. Componentes para la reacción de PCR.....	33
Tabla III. Conteos espermáticos	49

INTRODUCCIÓN

En la acuicultura, el crecimiento de las especies es la característica más importante para la rentabilidad de la industria. Es por ello que es necesario tener un mejor conocimiento de la zootecnia, la fisiología reproductiva, la resistencia a enfermedades, la nutrición y la genética de la especie propuesta (Lutz, 2008).

La producción de camarón por cultivo ha alcanzado una gran importancia a nivel mundial, y es por esto que se necesitan avances científicos y tecnológicos que ayuden a incrementar el sistema productivo (Martínez-Córdova, 2002). Los peneidos presentan fertilización externa y sexos separados (gonocóricos). Su dimorfismo sexual se caracteriza principalmente por la presencia del petasma en machos y el télico en hembras (Dall *et al.*, 1990); dichas estructuras se utilizan en la identificación taxonómica de estas especies (Pérez-Farfante, 1988). Adicionalmente, se presenta también dimorfismo sexual en talla y peso durante su desarrollo, en donde las hembras crecen más rápido que los machos.

De acuerdo a las investigaciones realizadas en el CIBNOR (Campos-Ramos *et al.*, 2006; Garza-Torres, 2006), los estudios en camaronicultura enfatizan el dimorfismo sexual en el crecimiento de las especies y las posibles ventajas que ello representa para mejorar la producción a través del monocultivo de hembras. Tal es el caso del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone), en donde el dimorfismo sexual comienza alrededor de los 10 g de peso (Chow y Sandifer, 1991) y se vuelve significativo aproximadamente a los 17 g (Pérez-Rostro *et al.*, 1999).

Los estudios sobre el dimorfismo sexual, como posible ventaja en el cultivo de camarones a través del monocultivo de hembras, incluyen también a especies asiáticas como *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate) (Nakamura *et al.*, 1992; Anónimo, 1999; Li *et al.*, 2003b), *Penaeus monodon* (Fabricius) (Lumare *et al.*, 1998; Hansford y Hewitt, 1994), la especie hindú *Penaeus indicus* (H. Milne-Edwards) (Mohan y Siddeek, 1995) y *Fenneropenaeus chinensis* (Kishinouye) (Yin *et al.*, 1986; Li y Xiang, 1997; 2002; Li *et al.*, 2003a).

En los Malacostraca (isópodos, anfípodos y decápodos), tanto la determinación como la diferenciación sexual son procesos particularmente interesantes, ya que la glándula androgénica (GA), que se localiza en los conductos deferentes de los machos, es el órgano responsable de la diferenciación testicular, el desarrollo de las características sexuales secundarias y forma parte del eje endocrino reproductivo que regula la espermatogénesis. La morfología y función de esta glándula fue descrita por primera vez en el anfípodo *Orchestia gammarella* (Pallas) (Charniaux-Cotton, 1953; 1954; 1960). En langostinos como *Macrobrachium rosenbergii* (Nagamine *et al.*, 1980a,b; Sagi y Cohen, 1990; Sagi *et al.*, 1990) y acociles como *Cherax destructor* (Fowler y Leonard, 1999), *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Khalaila *et al.*, 2001; Barki *et al.*, 2003; Manor *et al.*, 2007) y *Procambarus clarkii* (Taketomi y Nishikawa, 1996), la andrectomía (remoción de los vasos deferentes del macho) y la implantación de la GA en hembras han dado resultados parciales y totales de reversión sexual de la gónada y del individuo en cuanto a sus estructuras sexuales externas. Sin embargo, el conocimiento sobre el desarrollo de la GA durante la organogénesis del aparato genital, su función en el mantenimiento de la espermatogénesis (incluyendo el control endocrino proveniente de la glándula sinusal), además de la caracterización molecular y el análisis de expresión, es prácticamente nulo en especies comerciales de peneidos. Con estos conocimientos, se tendrían las bases para emprender ensayos de reversión sexual en el camarón blanco y sería factible integrar una biotecnología, como el cultivo monosexual de hembras, en la industria de la camaronicultura.

En la presente tesis, se realizaron cuatro investigaciones concernientes al estudio de la GA en machos de camarón blanco. Dado que la GA forma parte del órgano genital en el macho, el primer estudio se enfocó al conocimiento sobre la anatomía del mismo, documentando la organogénesis a partir de postlarva y determinando el momento en que aparece la GA y sucede la diferenciación de la gónada en ovario o testículo. Dado que no se encontró información reciente sobre las hembras, éstas también se incluyeron en el estudio. Se encontró que después de 63 años de la primera descripción del órgano genital en peneidos realizada por

King (1948) y muchas otras descripciones subsecuentes revisadas por Dall *et al.* (1990), la anatomía del órgano genital en hembras estaba mal descrita; toda esta información se puede consultar en Garza-Torres *et al.* (2009).

Como segundo tema de investigación, se investigó si la espermatogénesis (y por ende la meiosis) es un proceso continuo a lo largo de los estadios del ciclo de muda, o si se trata de un desarrollo meiótico ordenado, en donde para cada estadio de muda corresponde una etapa de la profase I, tal como ocurre en decápodos de agua dulce (Sagi *et al.*, 1988; 1991; Okumura y Hara, 2004; Poljaroen *et al.*, en prensa). Para ello, se obtuvieron y analizaron cromosomas meióticos en cada uno de los estadios del ciclo de muda de camarón blanco que, adicionalmente, no estaban descritos en la literatura. De esta manera, se aclara en esta especie una controversia en la literatura, en donde se planteaba que la gametogénesis en peneidos (hembras y machos) está regulada por el ciclo de muda, lo cual se descartó en vista de los resultados que se obtuvieron en esta investigación. Asimismo, en este trabajo se corroboró que al menos en camarón blanco, la meiosis en hembras comienza una vez que la gónada en el juvenil se ha diferenciado en ovario y se detiene en metafase I, y no como habían propuesto Yano (1998) y Qiu (1986) para otras especies, en donde la meiosis comienza y antecede al desove y, por lo tanto, es dependiente del ciclo de muda; toda esta información se puede consultar en Garza-Torres *et al.* (2011).

El tercer tema de investigación, se relacionó con el control endocrino que ejerce la glándula sinusal (localizada en el pedúnculo ocular) sobre la GA, corroborando que al igual que otros decápodos (Khalaila *et al.*, 2002; Sroyraya *et al.*, 2010) la ablación (unilateral y bilateral) produce hipertrofia de la GA y, por ende, un aumento significativo en la producción de esperma. De hecho, con la hipertrofia observada en la GA se logró determinar que esta glándula continúa hasta la parte distal del ápula terminal.

Como cuarto y último tema de investigación, se logró obtener la secuencia nucleotídica del precursor de la hormona que produce la GA en camarón blanco, así como su expresión en los diferentes tejidos del órgano genital. Cabe resaltar

que durante el transcurso de este estudio doctoral en el CIBNOR, en el 2009 se dio a conocer la secuencia nucleotídica del precursor de la hormona que produce la GA en *P. monodon* en GenBank (GU208677.1) y en mayo del 2011 los datos se publicaron formalmente por investigadores australianos e israelitas (Mareddy *et al.*, 2011). En el 2010, se dio a conocer la secuencia nucleotídica del precursor de la hormona de la GA del cangrejo *Portunus pelagicos* (Rathbun) que es una especie de importancia económica en las pesquerías (Sroyraya *et al.*, 2010). De manera interesante, la secuencia de nucleotidos del precursor de este cangrejo es similar a la del langostino *Cherax*, cuando se hubiera esperado que estuviera mas relacionada con las de los peneidos por tratarse de un organismo de ambiente marino y no de agua dulce. Por último, en marzo del 2011, se dio a conocer la secuencia de nucleotidos del precursor de *M. japonicus* por investigadores japoneses (Banzai *et al.*, 2011), resultando ser muy similar a la de *P. monodon*.

Con lo anterior, la obtención de la secuencia del precursor de la hormona de la GA en *L. vannamei* por investigadores del CIBNOR, se hizo más que relevante y en esta tesis doctoral, se presenta dicha información.

Finalmente se sugieren recomendaciones para continuar con estas investigaciones.

ANTECEDENTES

Aparato genital en hembras y machos de Litopenaeus vannamei

En *Litopenaeus setiferus* (L.), la anatomía básica del aparato genital de una hembra adulta fue descrita por King (1948); en este trabajo se describe al ovario como una estructura bilateral parcialmente fusionada con lóbulos proyectados. En la actualidad, se acepta que dicho aparato consiste en un par de ovarios parcialmente fusionados (más el oviducto), cada uno con lóbulos laterales cortos que se extienden desde la región cardíaca, dorsalmente al hepatopáncreas, hasta el telson. La revisión de Dall *et al.* (1990) sobre peneidos hembras describe al ovario como dos estructuras bilaterales independientes con lóbulos proyectantes, i.e., el lóbulo anterior, de seis a ocho lóbulos laterales, y un lóbulo posterior largo, además del oviducto en el sexto lóbulo lateral (Figura 1).

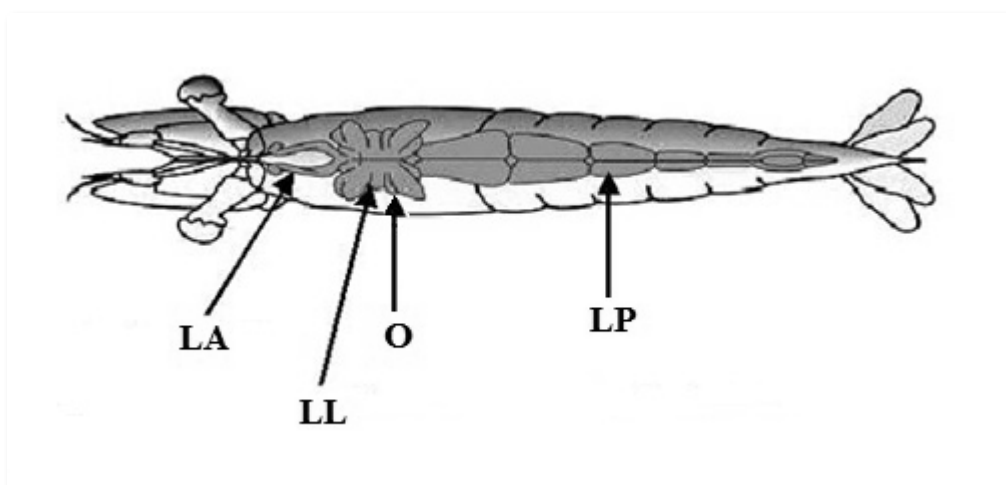


Figura 1. Aparato reproductor femenino de peneidos: lóbulos anteriores (LA); lóbulos laterales (LL); lóbulos posteriores (LP); oviducto (O) (tomado y modificado de Dall *et al.*, 1990).

De igual manera, sobre la base de la descripción original de King (1948), en peneidos la forma general del aparato reproductor masculino es similar al femenino, con la excepción de que no presenta los lóbulos posteriores. Consiste en un par de testículos, cada uno con siete u ocho lóbulos laterales, algunos

fusionados, localizados en la región cardiaca, dorsalmente al hepatopáncreas (Figura 2). Los vasos deferentes se prolongan dorsalmente desde el extremo de cada uno de los dos lóbulos testiculares y continúan lateralmente en una dirección dorso-ventral hasta llegar a las aberturas ventrales en el exterior (King, 1948; Treece y Yates, 1988; Dall *et al.*, 1990).

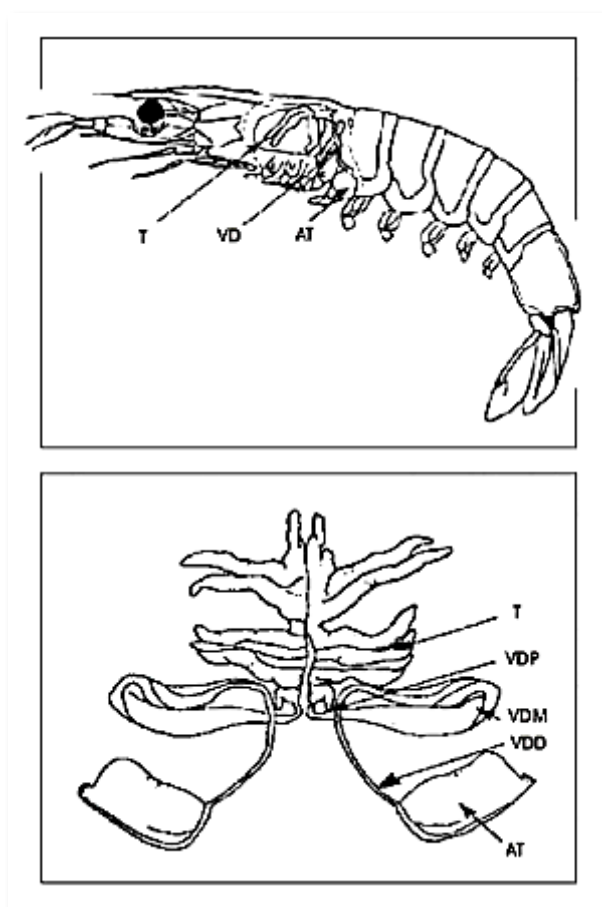


Figura 2. Aparato reproductor masculino de peneidos: testículos (T); vasos deferentes (VD); vasos deferentes proximales (VDP); vasos deferentes medios (VDM); vasos deferentes distales (VDD); ámpula terminal (AT) (tomado y modificado de King, 1948).

Sin embargo, posteriormente Chim (1983), Laubier *et al.* (1983) y Charniaux-Cotton y Payen (1985) describieron el aparato reproductor del macho de *M. japonicus*, y Chow *et al.* (1991) el de machos de *L. setiferus* y *L. vannamei* (Figura 3), coincidiendo todos que el testículo presenta ocho lóbulos testiculares

bilaterales que desembocan independientemente a un vaso colector en forma de herradura o de "U" invertida. En estos trabajos se establece que cada lóbulo testicular está compuesto de un solo tubo seminífero enrollado, en vez de varios túbulos como se había propuesto en los primeros estudios. El vaso colector bilateral continúa, ahora como vaso deferente medio proximal, con una porción corta y estrecha que asciende y se ensancha hacia la parte dorsal (vaso deferente medio ascendente), cerca de la comisura posterior del cefalotórax. El vaso deferente medio se pliega a la mitad de su longitud formando un dobléz, en donde continúa de forma descendente hacia la parte ventral (vaso deferente medio descendente) formando una estructura tipo herradura. La parte distal de cada uno de los vasos deferentes medios descendentes, se angosta formando el vaso medio deferente distal que continua como un tubo delgado, denominado vaso deferente distal, el cual llega hasta el ámpula terminal.

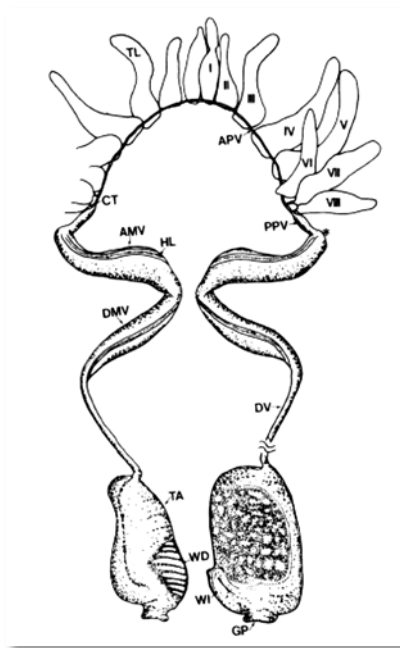


Figura 3. Aparato reproductor masculino: lóbulos testiculares (TL); tubo colector (CT); vasos deferentes anteriores proximales (APV); vasos deferentes posteriores proximales (PPV); vasos deferentes medios ascendentes (AMV); vasos deferentes medios descendentes (DMV); vasos deferentes distales (DV); ámpula terminal (TA); línea hialina en los vasos deferentes medios (HL); ducto del ámpula terminal (WI); "ala" del espermátóforo en *Litopenaeus setiferus* (WD), ausente en *Litopenaeus vannamei* (ámpula izquierda); gonoporo (GP) (tomado de Chow *et al.*, 1991).

Organogénesis del aparato genital

La organogénesis del aparato reproductivo, incluyendo la morfología de la GA y el proceso de diferenciación sexual han sido estudiados en machos de *P. japonicus* por Chim (1983), Laubier *et al.* (1983), Charniaux-Cotton y Payen (1985) y Nakamura *et al.* (1992). Estos estudios coinciden en que la organogénesis de la GA ocurre antes o en el momento de la espermatogénesis, durante el segundo mes como postlarva, mucho tiempo después de que se diferenció el sexo del individuo con la formación de la gónada indiferenciada y los vasos deferentes que identifican al macho, dentro de las dos primeras semanas del desarrollo postlarval. En ninguna otra especie de peneido se han estudiado a fondo el desarrollo del aparato reproductivo en machos, y las hembras han sido consistentemente excluidas de estos análisis, no existiendo antecedente sobre la organogénesis del oviducto y la diferenciación de la gónada en ovario.

Descubrimiento e investigaciones de la glándula androgénica en malacostráceos

En 1947 Cronin observó por primera vez la GA en un crustáceo decápodo, el cangrejo *Callinectes sapidus* (Rathbun). En Francia, Charniaux-Cotton (1954) sugirió que la GA estaba involucrada en la regulación de la diferenciación sexual y la espermatogénesis en el anfípodo *O. gammarrella*, lo cual fue posteriormente confirmado en esta especie por Legrand (1955) y Suzuki y Yamasaki (1997).

Durante las siguientes décadas, Katakura y colaboradores investigaron al isópodo *Armadillidium vulgare* (Latreille) en Japón (Katakura, 1961; Katakura *et al.*, 1975; Katakura y Hasegawa, 1983). Sus trabajos consistieron en la purificación y caracterización parcial de la hormona de la glándula androgénica (HGA) y, por primera, vez realizaron experimentos de masculinización de hembras mediante la inyección directa de extractos de la GA (Hasegawa *et al.*, 1991; Nagasawa *et al.*, 1995). Posteriormente, se obtuvo la secuencia nucleotídica del precursor de la HAG en esta especie (Martin *et al.*, 1999; Okuno *et al.*, 1999).

En California Nagamine *et al.* (1980 a, b), trabajaron con el decápodo *M. rosenbergii*, revirtiendo hembras genotípicas a machos fenotípicos (neomachos) a través de la implantación de GAs en las hembras juveniles. De igual forma, se revirtieron machos genotípicos a hembras fenotípicas (neohembras) mediante la andrectomización de los vasos deferentes. En machos de *M. japonicus*, Chim (1983), Laubier *et al.* (1983), Charniaux-Cotton y Payen (1985) y Nakamura *et al.* (1992), localizaron la GA en los vasos deferentes distales. Cabe mencionar que Charniaux-Cotton y Payen (1985), también identificaron la GA en *Penaeus keratulus* (Forsskål). En *M. japonicus*, se observa que la fase indiferenciada del aparato genital se extiende hasta el día onceavo como postlarva (Charniaux-Cotton y Payen, 1985), la diferenciación interna ocurre con la formación de los conductos deferentes del macho y la aparición de la GA es tardía, ya que se observa a partir del día 55 como postlarva (Nakamura *et al.*, 1992). Externamente, la fase indiferenciada se prolonga en toda la vida larval, hasta que la postlarva muestra una característica muy peculiar: en la cara interna del protopodito del primer par de pleópodos se forma una depresión en forma de muesca, lo cual es una característica exclusiva de los machos. Posteriormente, aparece el apéndice masculino, que se desarrolla en el segundo par de pleópodos, además, el endopodito del primer par de pleópodos se diferencia en el petasma, continuando con la aparición de gonoporos en la coxa del quinto pereiópodo.

Nagamine y Knight (1987) estudiando al acocil *P. clarkii*, lograron observar características sexuales secundarias de macho en hembras implantadas con GAs. Alfaro (1994) en *L. vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) y posteriormente Campos-Ramos *et al.* (2006) en *L. vannamei*, documentaron la localización de la GA en los vasos deferentes distales (Figura 4), y la histología de la GA en *L. vannamei* (Figura 5), la cual corresponde con la reportada en la literatura para otros malacostracos, como *C. destructor* (Fowler y Leonard, 1999) (Figura 6).

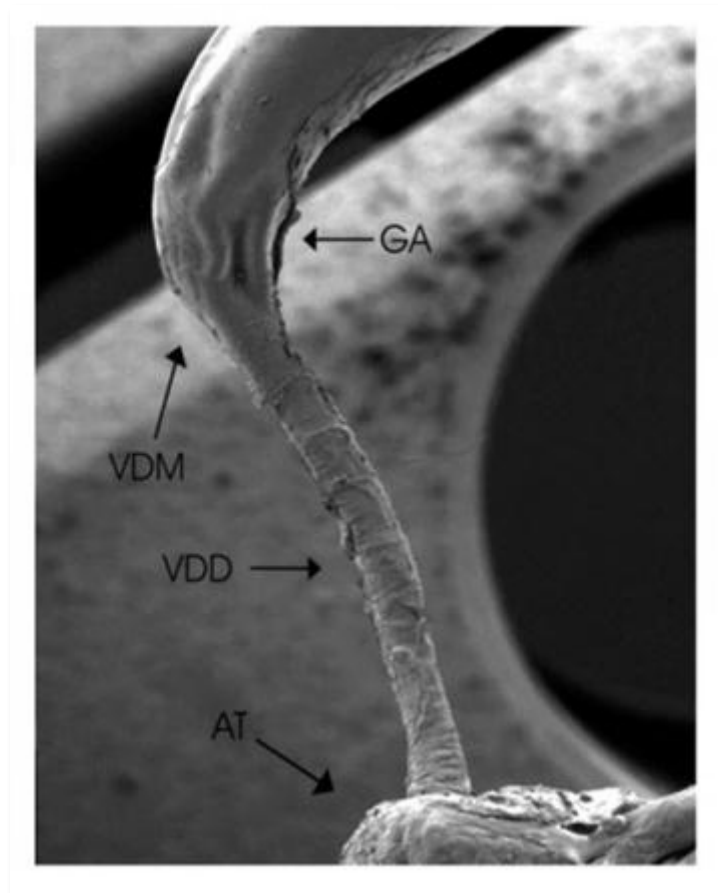


Figura 4. Vaso deferente de *Litopenaeus vannamei* por microscopía de barrido. Glándula androgénica (GA); vaso deferente medio (VDM); vaso deferente distal (VDD); ámpula terminal (AT) (tomado de Campos-Ramos *et al.*, 2006).

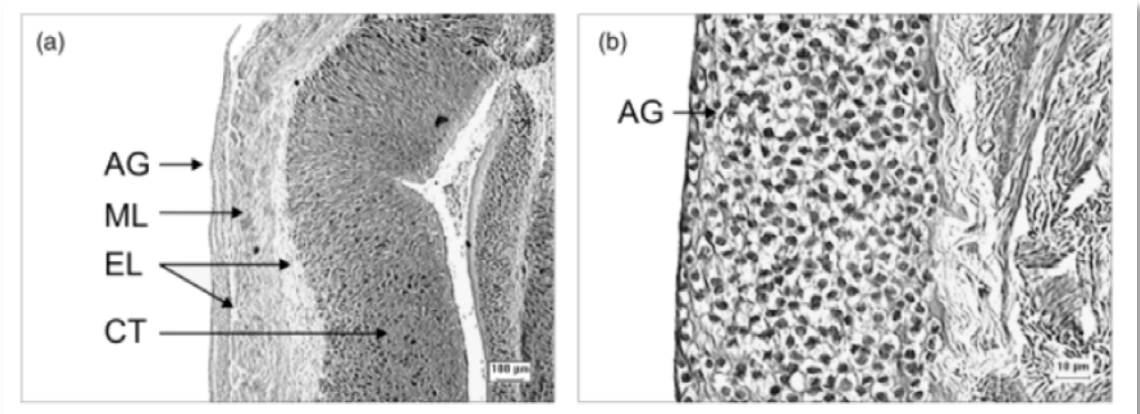


Figura 5. Corte longitudinal de vaso deferente distal de *Litopenaeus vannamei* (a). Magnificación de GA en (b). Glándula androgénica (AG); capa muscular (ML); capa epitelial (EL); tejido conjuntivo (CT) (tomado de Campos-Ramos *et al.*, 2006).

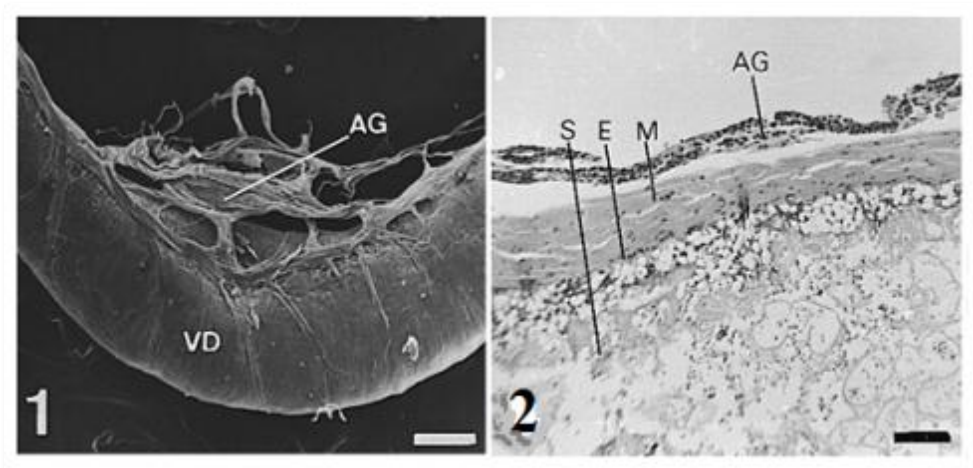


Figura 6. Vaso deferente de *Cherax destructor* por microscopía de barrido (1). Sección del vaso deferente de *C. destructor* por histología (2). Vaso deferente (VD); glándula androgénica (AG); músculo (M); epitelio (E); masa espermática (S), (tomado y modificado de Fowler y Leonard, 1999).

En *L. vannamei*, Campos-Ramos *et al.* (2006) describieron que durante el segundo mes como postlarva, después de que alcanza un peso mínimo de 150 mg (y un tamaño de 20 mm) comienzan a aparecer las estructuras externas que distinguen a las hembras de los machos, lo cual concuerda con las pocas especies de peneidos estudiadas como *M. japonicus* (Charniaux-Cotton y Payen, 1985; Nakamura *et al.*, 1992), y *F. chinensis* (Yin *et al.*, 1986; Li y Xiang, 2002). Dependiendo de qué tan favorable o desfavorable puede ser una condición ambiental (como temperatura, densidad y alimento) para los camarones, la diferenciación sexual externa ocurrirá alrededor del segundo mes. En *L. vannamei*, Campos-Ramos *et al.* (2006) documentaron la estructura de la GA como una estructura celular compacta, en paralelo al vaso deferente distal (Figuras 4 y 5), conectada a una capa muscular a través de un recubrimiento epitelial (Figura 5A). Su longitud es de ≈ 2.5 mm, es tubular, con un diámetro de ≈ 100 μm en la parte media. La masa celular está compuesta por células ovals largas, con citoplasma vacuolado y cada célula presenta un núcleo prominente (Figura 5b). Mediante microscopía de barrido, la GA se observa como un cordón pegado en la parte distal del vaso deferente medio, o bien en la parte distal del tubo eyaculador. De cada

extremo de la glándula se extienden cordones más delgados que se dirigen tanto hacia el bulbo eyaculador, como hacia el vaso deferente distal delgado (Figura 4).

En *C. quadricarinatus* Sagi *et al.* (1999) monitorearon el comienzo de la vitelogénesis utilizando pruebas de ELISA. Este estudio proveyó una herramienta exacta para investigar la influencia de la GA en la expresión de una proteína vitelogénica-específica en las hembras. Posteriormente, mediante una prueba inmunohistoquímica que detecta lipoproteínas vitelogenina-específicas, estos investigadores observaron en hembras implantadas con GAs que el proceso de vitelogénesis disminuye drásticamente (Khalaila *et al.*, 2001), lo que confirma el papel de esta glándula en la plasticidad sexual de la especie. Abdu *et al.* (2002) clonaron el ADNc de la vitelogenina de *C. quadricarinatus* y mostraron que el gen de la vitelogenina estaba presente en el hepatopáncreas de hembras durante la vitelogénesis secundaria. En los machos a los que se les removió la GA, se observaron transcritos del gen que codifica la vitelogenina, lo que indica que el gen está regulado negativamente por la GA. Mediante la implantación de GAs en hembras de *C. quadricarinatus*, Barki *et al.* (2003) lograron inhibir tanto la segunda vitelogénesis como el desarrollo de los ovarios, además ellos también observaron en ellas la aparición de características secundarias de macho.

Manor *et al.* (2007) construyeron la primera librería substractiva de ADNc de la GA de *C. quadricarinatus*. Mediante experimentos de hibridación *in situ* estos autores observaron que el gen solo se expresa en machos; estos resultados confirmaron la localización exclusiva de la expresión del gen en la GA (Figura 7). Este gen específico del sexo, fue denominado como Cq-IAG (*C. quadricarinatus* insuline-like androgenic gland factor), y produce una proteína similar a los miembros de la familia “tipo-insulina” (por ello su nombre) específica para los crustáceos decápodos machos (Figura 8). Esta proteína consta de un péptido señal, dos cadenas (A y B) además de un péptido C, que se dobla y une a las dos cadenas mediante puentes di-sulfuro en los residuos de cisteína de las cadenas.

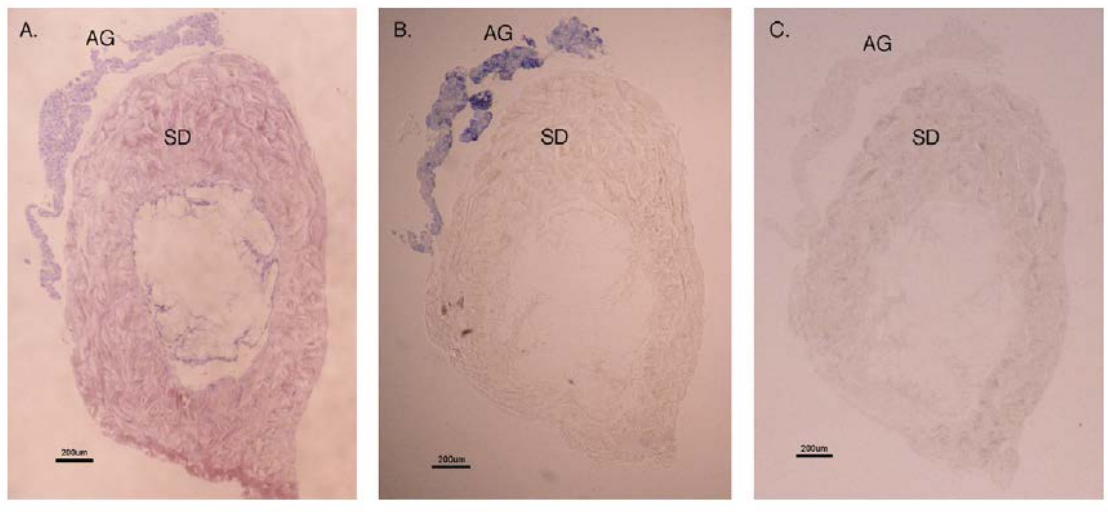


Figura 7. Localización de la expresión del gen Cq-IAG en secciones del ducto espermático (SD) y de la glándula androgénica (AG) de *Cherax quadricarinatus*. (A) tinción con hematoxilina y eosina, (B) sonda con detección (C) sonda testigo (tomado de Manor *et al.*, 2007).

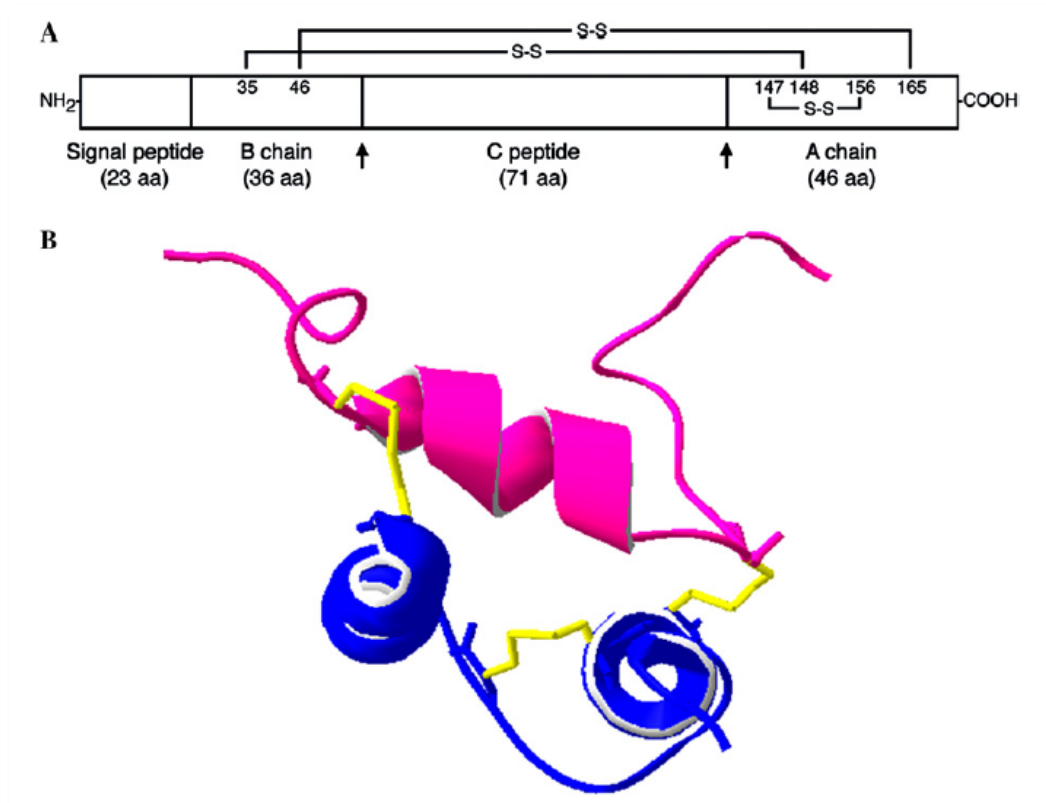


Figura 8. Modelos lineal de la pro-proteína (A) y en 3D de la proteína madura (B) del gen Cq-IAG, que presenta la estructura clásica de las insulinas (tomado de Manor *et al.*, 2007).

Ventura *et al.* (2009) crearon una librería de ADNc de GA de *M. rosenbergii* ablacionado del tallo ocular, en donde encontraron el gen específico de la GA (Mr-IAG). Para silenciar este gen, inyectaron *in vivo* dsRNA, lo cual previno temporalmente la regeneración de características secundarias sexuales, como el apéndice masculino, además del retraso en la muda y la reducción del crecimiento, de acuerdo con los parámetros para esta especie. La ablación también detuvo la espermatogénesis y el desarrollo del espermátforo del ápula terminal, además de provocar hipertrofia e hiperplasia de la GA. Sroyraya *et al.* (2010) publicaron la secuencia nucleotídica de la GA del cangrejo nadador *P. pelagicus*, basándose en la secuencia de Cq-IAG, observando entre ellas una similitud del 83%. Banzai *et al.* (2011) publicaron la secuencia de la GA de *M. japonicus* (Mj-IAG), basándose en una secuencia de 531 pb de *P. monodon* (Mareddy *et al.*, 2011) (Figura 9), encontrando una similitud del 68%.

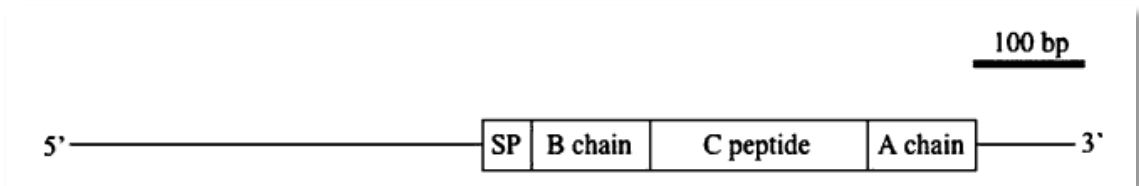


Figura 9. Modelo lineal de la pro-proteína de Mj-IAG (tomado de Banzai *et al.* (2011)).

Mareddy *et al.* (2011) publicaron la secuencia de la GA de *P. monodon* (Pm-IAG), la cual se muestra en la Figura 10, que resulta ser muy similar a la de *M. japonicus*.

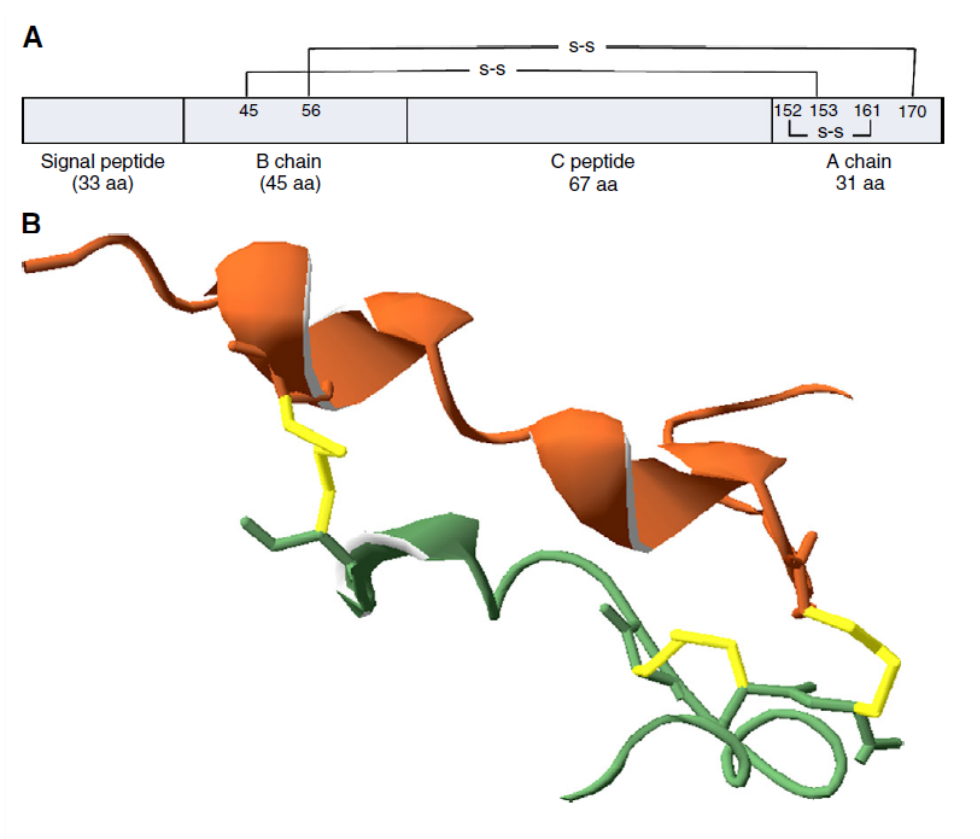


Figura 10. Modelo lineal de la pro-proteína (A) y en 3D de la proteína madura (B) Pm-IAG, la cual sostiene la estructura clásica de las insulinas (tomado de Mareddy *et al.*, 2011).

Hasta el momento existen nueve secuencias de la GA en decápodos, publicadas en la base de datos del GenBank: *Penaeus monodon* (GU208677.1), *Marsupenaeus japonicus* (AB598415.1), *Cherax quadricarinatus* (DQ851163.1), *Macrobrachium rosenbergii* (FJ409645), *Macrobrachium lar* (AB579012.1), *Portunus pelagicus* (HM459854.1), *Cherax destructor* (EU718788.1), *Palaemon paucidens* (AB588013) y *Palaemon pacificus* (AB588014.1).

Relación entre la gametogénesis y el ciclo de muda en decápodos

En camarones machos, los testículos producen espermátidas que son transportadas y acumuladas en los vasos deferentes, en donde la espermatogénesis continúa a través de los bulbos eyaculadores, y la masa de

espermatoцитos es guardada en el ámpula terminal, en donde finalmente se empaqueta por secreciones glandulares formando los espermatóforos (King, 1948). Se conoce que en decápodos la actividad espermatogénica está regulada por la circulación de la hormona de la GA (Charniaux-Cotton y Payen, 1988). Un estudio histológico mostró que la espermatogénesis en *L. vannamei* es un proceso continuo, sin relación alguna con el ciclo de muda (Heitzmann *et al.*, 1993). Por otro lado, Parnes *et al.* (2006) observaron que cada vez que el macho muda el espermatóforo “viejo” es reemplazado en el ámpula terminal por uno recién formado, es decir, que el ciclo de renovación del espermatóforo está regulado por el ciclo de la muda y, por ende, la espermatogénesis pudiera estarlo también. A este respecto, en los decápodos de agua dulce, y en langostinos y acociles, cada estadio de muda corresponde a una etapa de la profase I; esto indica una sincronía entre la meiosis y el ciclo de muda (Sagi *et al.*, 1988, 1991; Okumura y Hara, 2004; Poljaroen, *et al.*, en prensa). Adicionalmente, en *M. rosenbergii* se ha observado que durante el ciclo de muda, los niveles de la hormona de la GA se mantienen constantes, sin la regulación de un estadio específico de muda (Okumura y Hara, 2004).

El proceso de ciclo de muda y gametogénesis está ampliamente documentado en decápodos hembras, ya que el desarrollo ovárico (vitelogénesis), la maduración final y la ovulación (desove) están controlados por órganos endocrinos y neurosecretores, de acuerdo a los ciclos de muda (Qiu, 1986; Yano, 1988, 1995; Dall *et al.*, 1990).

De hecho, el comportamiento reproductivo de inseminación en camarones dependerá ciclo de la muda. En peneidos de télico cerrado como *P. monodon* y *M. japonicus* (Figura 11B), los machos maduros colocan la masa espermática en el télico de la hembra recién mudada (télico suave), y a partir de ahí, comienza la maduración del ovocito (vitelogénesis) hasta alcanzar la maduración final y el desove. Por lo tanto, en especies de télico cerrado, el apareamiento y la transferencia de esperma se dan antes de la vitelogénesis (Yano, 1988, 1995; Dall *et al.*, 1990). Por otra parte, en peneidos de télico abierto como *L. vannamei* y *L. stylirostris* (Figura 11A), los machos adhieren el espermatóforo en el télico de la

hembra con una maduración de la gónada avanzada, en etapa de inter-muda (télico duro), etapa en la que el comportamiento de apareo es un requisito indispensable para la transferencia del espermatóforo y una fertilización exitosa. Es por eso que en especies de télico abierto, el apareamiento ocurre alrededor de dos horas antes de la maduración final del ovocito y el desove, después de la vitelogénesis (Dall *et al.*, 1990; Yano, 1995).

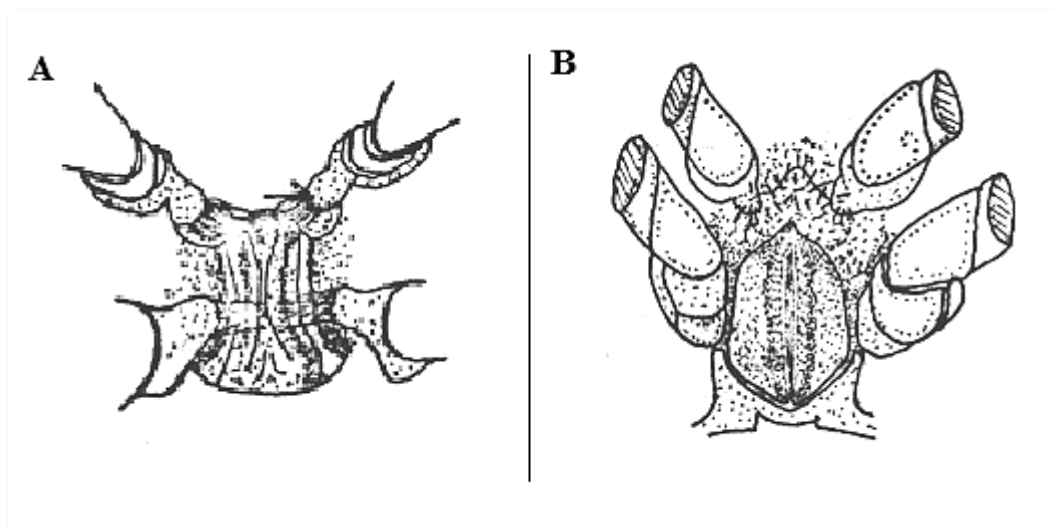


Figura 11. Télico abierto en hembras *Litopenaeus vannamei* (A); y télico cerrado en hembras *P. monodon* (B) (tomado de Pérez-Farfante, 1998).

Existe una discrepancia en cuándo comienza la meiosis I en los decápodos hembras, algunos reportes indican que comienza en el desove, asociado con la maduración final, y por ende, al ciclo de muda. Como ejemplos se pueden mencionar *M. japonicus*, en donde la ovulación y la meiosis I caracterizan la etapa de maduración de los ovocitos (Yano, 1988) y el camarón rojo *Acetes chinensis* (Hansen) en los que la meiosis I inicia en el momento del desove (Qiu, 1986). Sin embargo, otros reportes indican que la meiosis I está detenida o arrestada en metafase I, y reinicia en hembras maduras, previo al desove. En este caso, el comienzo de la meiosis I es independiente de la maduración final, del desove y del ciclo de muda. En la metafase I, el arresto de la meiosis en el ovocito se ha

documentado en *L. vannamei* utilizando sondas fluorescentes para ADN y tubulina con un microscopio confocal (Hertzler, 2005), y por histología tanto en *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Clark *et al.*, 1980) como en el langostino *M. rosenbergii* (Okumura y Aida, 2000).

Actualmente, no existen estudios extensos sobre la meiosis en crustáceos. La larga y compleja primera profase meiótica consiste de las etapas de leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diaquinesis (Strickberger, 1976; Bernhard, 1990; Loidl, 1994) e involucra tres procesos importantes: (1) El apareamiento de los cromosomas homólogos (sinapsis), (2) la recombinación genética, y (3) la segregación de los cromosomas homólogos. El complejo sinaptonémico (CS) (Figura 12) es un complejo protéico que se forma durante la primera fase meiótica, en donde ocurren la sinapsis y la recombinación genética entre cromosomas homólogos durante las fases de cigoteno y paquiteno, respectivamente (Moses, 1956; Fawcett, 1956; Carpenter, 1979; von Wettstein *et al.*, 1984; Schmekel *et al.*, 1993; Loidl, 1994).

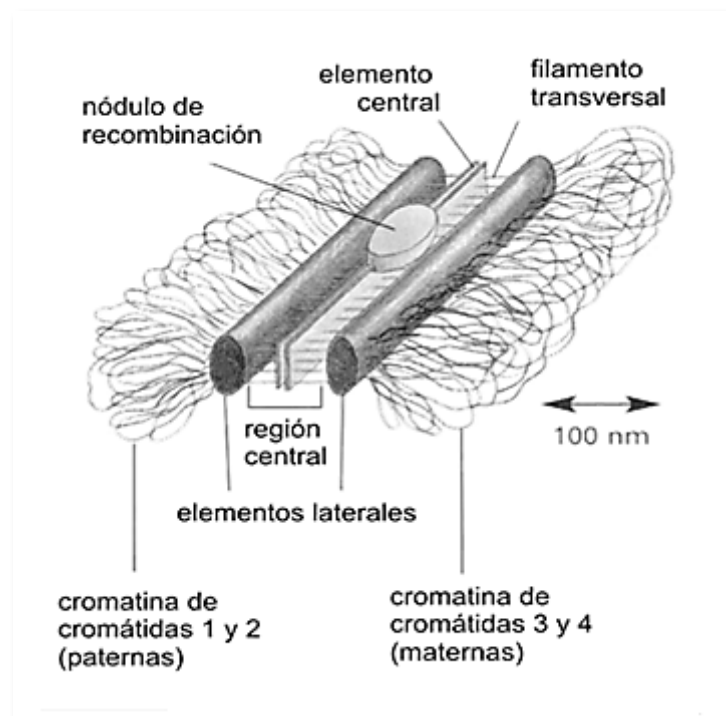


Figura 12. Complejo sinaptonémico (tomado de Alberts *et al.*, 2002).

En el camarón blanco *L. vannamei* y en otras especies de peneidos comerciales los cromosomas mitóticos han sido estudiados ampliamente (Campos-Ramos, 1997). La mayoría de las especies tienen un número diploide de 88 cromosomas, donde los cromosomas son pequeños y con una longitud descendente progresiva, lo cual hace difícil estudiar su cariotipo. Se han obtenido núcleos en diploteno de cromosomas meióticos de testículo de *M. japonicus* (Hayashi y Fujiwara, 1988), *F. chinensis* (Jixun *et al.*, 1989), *F. aztecus*, *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad) y *L. setiferus* (Chow *et al.*, 1990), y *L. vannamei* (Chow *et al.*, 1990; Campos-Ramos, 1997; Alcivar-Warren *et al.*, 2006); existe solo un reporte en ovario en la hembra de *F. chinensis* (Jixun *et al.*, 1989). El conteo de los bivalentes altamente condensados ha llevado a establecer el número haploide de las especies, confirmándolo con el número diploide anteriormente obtenido. Por otro lado, el CS ha sido analizado en triploides y diploides de *F. chinensis* (Xie *et al.*, 2008).

Control neuroendocrino de la glándula androgénica

Hoy en día, en las granjas productoras de postlarvas de camarón utilizan la técnica de la ablación del tallo ocular para inducir a la maduración a las hembras. La glándula sinusal, que se encuentra en el tallo ocular (Figuras 13 y 14), sirve como reservorio y liberador de hormonas producidas por el órgano-X. Este complejo, órgano-X/glándula sinusal, produce la hormona inhibidora de la vitelogénesis (HIV), también llamada de la gónada, y es la razón por la que la ablación crea un desbalance hormonal y provoca (en corto tiempo) la maduración de la hembra.

Otras neurohormonas se encuentran en el tallo ocular donde se almacenan y se liberan de la glándula sinusal, incluyendo la hormona inhibidora de la muda (HIM) y la hormona inhibitoria del órgano mandibular (HIOM) (Chang y Kaufman, 2005). Otras hormonas como el metilfarnesoato (MF), también llamada la hormona juvenil del crustáceo, tiene una función estimulante en la reproducción en ambos géneros; esta hormona se sintetiza en la glándula del órgano mandibular (OM). En el cangrejo araña *Libinia emarginata* (L.) Laufer *et al.* (1987) reportaron

un incremento en la producción de MF en el OM en hembras en proceso de ovogénesis. Existe una patente para el uso de la MF en la reproducción de camarón, sin la necesidad de la ablación unilateral (Patente no. 5,168,481), sin embargo, la ablación continua utilizándose comúnmente para la maduración gonádica ya que las hembras responden positivamente a ella.

Las ecdisisteroides, mejor conocidas como las hormonas de la muda, estimulan la vitelogénesis de algunos insectos. Okumura y Hara (2004) trabajaron en *M. rosenbergii* con estas hormonas, sobre la base de la analogía existente entre los sistemas endocrinólogos entre insectos y crustáceos. Sin embargo, no se ha encontrado relación entre el ecdisisteroide y la vitelogénesis, ya que los niveles de esta hormona en la hemolinfa no cambiaron entre los ciclos de muda en hembras en reproducción respecto a hembras normales (control), sugiriendo que estas hormonas no están relacionadas con la vitelogénesis.

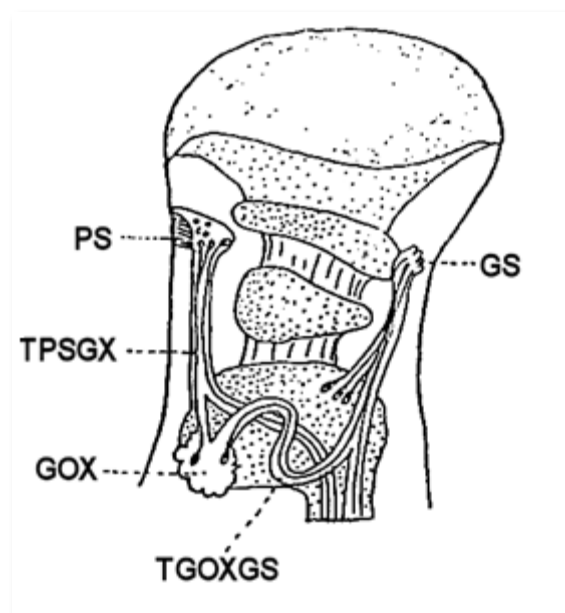


Figura 13. Tallo ocular de un peneido (Decápoda, Natantia) mostrando ganglio del órgano-X (GOX); poro sensitivo del órgano-X (PS); glándula sinusal (GS); el tracto órgano-X - glándula sinusal (TGOXGS) y el tracto del poro sensitivo del órgano-X (TPSGX) (modificado de Adiyodi y Adiyodi, 1970).

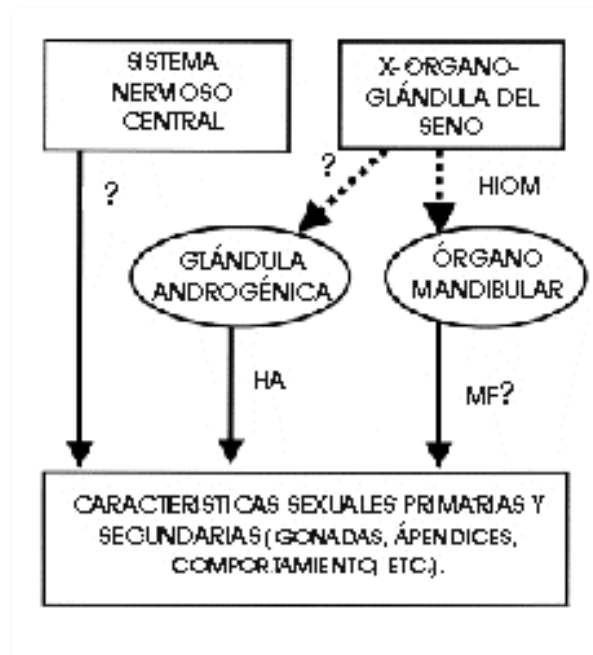


Figura 14. Esquema del control endócrino de la reproducción del macho en camarón. Hormona inhibidora del órgano mandibular (HIOM); hormona de la glándula androgénica (HA); metilfarnesoato (MF) (modificado de Okumura, 2004).

En el ámbito científico un tema interesante a discusión ha sido la presencia de feromonas en camarones, ya que Takayanagi *et al.* (1986) observaron que las hembras de *Paratya compressa* (Kemp) retrasan su desarrollo ovárico a menos de que un macho este presente o cuando se agrega un extracto de testículo al agua. También se han realizado estudios en *M. japonicus* en los que inyecciones de progesterona inducen la maduración ovárica y estimulan la secreción de vitelogenina (Yano, 1985) así como inyecciones de serotonina en decápodos (Sarojini *et al.*, 1995; Alfaro *et al.*, 2004).

En decápodos existen varias funciones fisiológicas reportadas en el complejo órgano X/glándula sinusal (dentro del tallo ocular de machos y hembras), como lo son la reproducción (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Sagi *et al.*, 1991, Subramoniam, 2000; Khalaila *et al.*, 2002; Parnes *et al.*, 2006; Huberman, 2000), el crecimiento (Hopkins, 1984) y la regeneración de miembros (Holland y Skinner, 1976; Hopkins, 1984). En langostinos, como *M. rosenbergii* (Okumura y Hara, 2004) y *C. quadricarinatus* (Khalaila *et al.*, 2002), la ablación del tallo ocular

causa hipertrofia e hiperactividad de la GA, lo que estimula la espermeación y genera espermátóforos maduros. En machos de *C. quadricarinatus* con ablación bilateral, la espermeación inicial elevada deriva, después de un tiempo, en una disminución en el peso de la gónada y en la ocurrencia de espermátocitos primarios en los lóbulos testiculares (Figura 15). En una inhibición *in vitro* de la síntesis de polipéptidos de la glándula sinusal, se encontró una ocurrencia en GA pero no en testículo, sugiriendo de esta forma un eje tallo ocular-GA-testículo (Khalaila *et al.*, 2002).

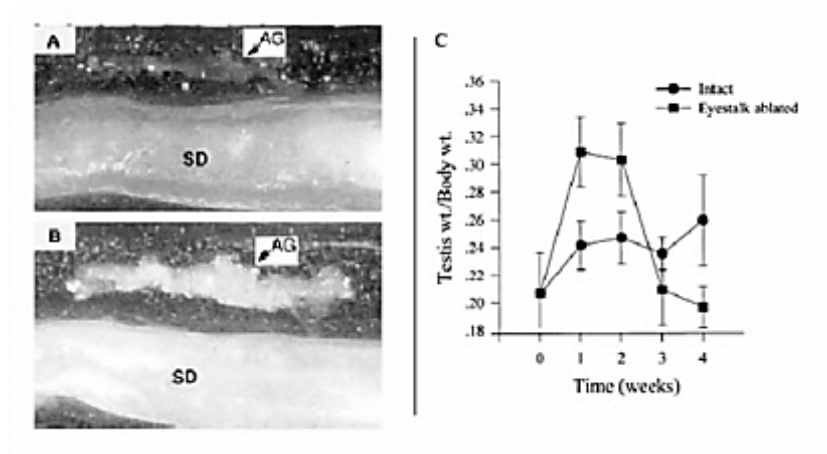


Figura 15. Efectos de ablación del tallo ocular. (A) GA de langostino intacto (B) GA de langostino ablacionado (C) gráfica representando el índice del peso gonadal en langostinos intactos y ablacionados a través del tiempo. Glándula androgénica (AG), ducto espermático (SD) (tomado y modificado de Khalaila *et al.*, 2002).

Sroyraya *et al.* (2010) ablacionaron bilateralmente al cangrejo nadador, *P. pelagicus*, y observaron un crecimiento de tres veces su tamaño normal de la GA ocho días después de la ablación.

Existe evidencia indirecta que indica que al incrementar la tasa de renovación del espermátóforo de forma manual, se incrementa la producción de gametos del macho, debido a que se observa un incremento significativo en el peso del espermátóforo, lo que incluye una mejor calidad y cantidad del esperma en camarones marinos. El mejoramiento del esperma ocurre cuando los machos

adoptan un comportamiento sexual (Parnes *et al.*, 2006), cuando son eyaculados manualmente (Alfaro y Lozano, 1993; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2004) y cuando son ablacionados unilateralmente del tallo ocular (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987,1985; Alfaro y Lozano, 1993). Aunque no existen estudios realizados en camarones, este mejoramiento pudiera ocurrir por la estimulación de la GA a falta de un control de la glándula sinusal, la cual mantiene y regula el incremento o decremento en la actividad espermatogénica. En investigaciones posteriores, sobre la cantidad y calidad espermática *L. vannamei*, se encontró que la edad óptima para el uso de machos como reproductores es cuando alcanzan los 12 meses de edad (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003), por lo que la edad del macho puede ser un factor que determina también la actividad de la GA sobre la espermatogénesis. Sin embargo, en peneidos se desconoce hasta qué punto la glándula androgénica está implicada en el eje neuroendocrino inhibitorio órgano X/glándula sinusal-glándula androgénica-testículo. De igual forma, no existen reportes científicos que analicen el papel de la glándula androgénica en la calidad y/o producción espermática (cantidad).

JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco *L. vannamei* ocupa un lugar importante en la acuicultura mundial y, en México representa la especie más importante de cultivo por lo que se requiere realizar más investigación científica acerca de esta especie. Este estudio contribuye al conocimiento de la biología y la fisiología de la reproducción en decápodos además de abordar el estudio de su diferenciación sexual. En decápodos de agua dulce, la investigación que se ha realizado es muy extensa y, en este sentido, la fisiología reproductiva de camarones marinos (específicamente la del macho) requiere de mayor atención por la comunidad científica, ya que en peneidos el papel fisiológico de la GA debe de estar bien estudiado y comprendido. En peneidos, no fue sino hasta años recientes que algo de información a nivel molecular ha emergido en la literatura científica, por lo que avances similares a los obtenidos en decápodos de agua dulce se generarán en la próxima década. Por lo anterior, tanto México como Latinoamérica deben de estar a la vanguardia en este tipo de investigaciones, para estar en la posibilidad de ofrecer, en el corto plazo, estrategias de cultivo y biotecnologías en las que a través del cultivo monosexual de hembras se incremente el rendimiento por hectárea de este crustáceo.

OBJETIVO GENERAL

Realizar estudios encaminados a analizar el desarrollo de la glándula androgénica (GA) durante la organogénesis del órgano genital, su función en la espermatogénesis y su análisis molecular en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Documentar el período de indiferenciación sexual y la anatomía del órgano genital en ambos sexos.
2. Documentar la diferenciación sexual interna, con respecto a la externa, y a la edad en número de días como postlarva.
3. Documentar el momento de aparición de la GA en los vasos deferentes del macho y el momento en que se diferencia la gónada en testículo.
4. Analizar cromosomas meióticos en los diferentes estadios de muda.
5. Realizar conteos espermáticos en espermátóforos en las diferentes etapas de muda.
6. Describir la anatomía de la GA, testículo y vaso deferente, una semana después de la ablación unilateral y bilateral del tallo ocular.
7. Analizar el efecto de la ablación sobre los diferentes tejidos del órgano genital.
8. Obtener la secuencia nucleotídica del precursor de la hormona que produce la GA y su expresión en los diferentes tejidos del órgano genital.

HIPÓTESIS

- I. Como hipótesis nula, se plantea que si la organogénesis de la gónada y vasos deferentes de machos de *M. japonicus* se lleva a cabo dentro de las primeras dos semanas de desarrollo postlarval y la glándula androgénica, seguida de la diferenciación testicular se llevan a cabo durante el segundo mes del desarrollo, entonces este proceso debe de ser similar en *L. vannamei*. Alternativamente, se plantea que los tiempos en la organogénesis del camarón blanco no corresponden al del camarón kuruma.

- II. Como hipótesis nula, se plantea que la meiosis es continua en ambos sexos, sin tener relación con la muda. Alternativamente, si la espermatogénesis en los machos está vinculada con la muda, entonces cada etapa meiótica de la profase I deberá corresponder a un estadio del ciclo de muda. En el caso de las hembras, si la meiosis se lleva a cabo previo al desove, con una ovogénesis avanzada, y por ende, vinculada con la muda, entonces no se observarán etapas meióticas en hembras inmaduras.

- III. Como hipótesis nula, se plantea que en camarón blanco no existe un eje endocrino: complejo órgano X/ glándula sinusal-GA-testículo y por ende no ocurre, ni una hipertrofia en dicha glándula, ni tampoco un incremento en la producción espermática. Alternativamente, existe un eje endocrino entre dichos órganos y por ende se observará una hipertrofia y como consecuencia se incrementará la producción espermática.

- IV. Como hipótesis nula, se plantea que en *L. vannamei*, al igual que en todos los malacostracos estudiados hasta ahora, la hormona de la glándula androgénica es del tipo-insulina. Alternativamente, dicha hormona en camarón blanco presenta una estructura molecular diferente.

MATERIALES Y MÉTODOS

ORGANOGENESIS

Las postlarvas de camarón se obtuvieron en el laboratorio de producción Acuicultura Mahr en La Paz, BCS, México. Las postlarvas, juveniles, pre-adultos y adultos fueron cultivados en el laboratorio de crustáceos del CIBNOR. Se criaron camarones desde postlarva 4 (PL4) en seis tanques de 1000 L manteniéndose con agua marina (salinidad: 36 – 38 ppm) filtrada y aireada, a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con calentadores de 300 W a una densidad de 200 camarones por tanque. Se realizaron recambios de agua del 50% tres veces por semana. Las postlarvas PL4 hasta PL20 se alimentaron tres veces al día con nauplios de artemia y micro-encapsulado comercial (250 – 500 μm); camarones de talla más grandes (>PL20) se alimentaron tres veces al día con artemia viva y congelada, hojuelas de artemia y pellets triturados. Para registrar peso (mg y g) y longitud (mm, rostrum-telson), cada cuarto día, a partir de PL4 hasta PL80, se tomaron aleatoriamente diez camarones de cada uno de los seis tanques. Se analizaron las estructuras sexuales externas (Pérez-Farfante, 1988; Campos-Ramos *et al.*, 2006) y los órganos internos (King, 1948; Kong y William, 1988; Dall *et al.*, 1990); la examinación interna y externa se llevó a cabo con un microscopio estereoscópico de disección (Olympus, Tokio, Japón). Los órganos genitales internos se tiñeron con azul de metileno comercial (Acuario Lomas) en una solución de NaCl al 0.9%. Los camarones utilizados para el análisis histológico, se fijaron en solución Davidson por 24 h y después en etanol al 70% hasta su procesamiento mediante la técnica histológica de hematoxilina-eosina (Bell y Lightner, 1988); las laminillas se analizaron con un microscopio de luz compuesto (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes fueron documentadas mediante fotografía digital y analizadas con el software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).

CICLO DE MUDA Y MEIOSIS

En camarón blanco, los estadios de muda se identificaron sobre la base de la descripción de de-Oliveira-Cesar *et al.* (2006) (Figura 16), y la identificación de las etapas meióticas se basó en las descripciones de von Wettstein *et al.* (1984) y Loidl (1994). Los órganos genitales de un grupo control (sin tratamiento) de camarones adultos (25-27 g de peso corporal) fueron disecados después de identificarse los estadios de muda. Otro grupo se inyectó con colchicina (5 µg/gr de peso corporal) después identificar los estadios de muda, disectándose 8 h después de la inyección. Cada grupo de camarones consistió de seis hembras (ovarios) y seis machos (testículos) en cada uno de los siguientes estadios de muda: post-muda tardía (Etapa B), inter-muda (Etapa C), premuda temprana (Etapa D1), y pre-muda tardía (Etapa D3). Los lóbulos de las gónadas fueron disectados y posteriormente procesados bajo dos técnicas y tres protocolos de tinción. La primera técnica fue la de secado al aire, que consiste en un shock hipotónico en agua destilada durante una hora con tres cambios posteriores de 15 minutos cada uno en solución fijadora Carnoy (3:1, metanol:ácido acético) recién preparada y fría, seguido de la disociación de tejido en ácido acético al 50%. Se prepararon tres laminillas por gónada, de acuerdo a Campos-Ramos (1997), dejando caer y reabsorbiendo inmediatamente el líquido sobre la laminilla previamente calentada a 30°C. (1) Las laminillas se tiñeron en orceína (orceína 2% en ácido acético al 45%) por 5 minutos, se lavaron dos veces en agua destilada, una en etanol y después se dejaron secar al aire. (2) Las laminillas se tiñeron con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol). La segunda técnica consistió en una pequeña modificación (adaptada a tejido gonádico de camarón) de la técnica para obtención de CS en tilapia (Campos-Ramos *et al.*, 2001), la cual consiste en cortar el tejido de la gónada con un pequeña tijera en 1 ml de solución Triton X-100 (Triton X-100 0.2%; ; pH 8.5 ajustado con tetraborato de sodio 0.01 M). La suspensión celular resultante se dejó reposar por una hora en un tubo de 1.5 mL a 4°C. Posteriormente, se transfirieron 500 µL de sobrenadante a otro tubo con 500 µL de paraformaldehído (paraformaldehído 4%, disuelto en NaOH 1 N; pH 8.5 ajustado con tetraborato de sodio 0.2 M), se mezcló suavemente y se incubó por 10 minutos a temperatura

ambiente. Sobre tres laminillas se pipetearon 100 μ L de la suspensión celular ya fijada, y se dejaron secar al aire dentro en una campana de extracción de humos. Las laminillas secas se lavaron con agua corriente, agua destilada y por último con etanol, dejándolos secar al aire. (3) Las laminillas se tiñeron con nitrato de plata al 50% (Howell y Black, 1980). Las células meióticas se fotografiaron con un microscopio compuesto equipado con fluorescencia y una cámara digital (Olympus, Tokio, Japón), mientras que la determinación del diámetro de los CS se realizó en seis núcleos de cada etapa meiótica (software Image J, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). En cada estadio de muda se registró la abundancia relativa de núcleos meióticos de la siguiente manera: \emptyset (sin núcleos presentes); + (núcleos raramente presentes); ++ (pocos núcleos presentes); +++ (núcleos comúnmente presentes); ++++ (núcleos abundantes). Para contrastar la información cualitativa obtenida de las células meióticas, en cada uno de los estadios de muda se obtuvo información cuantitativa de los vasos deferentes y espermátóforos de seis machos. Los órganos se disectaron, se cortaron en pedazos pequeños y se homogenizaron manualmente en 1 mL de agua de mar filtrada estéril y los conteos de espermatozoos se realizaron con un hemacitómetro (0.1 mm de fondo; HausserScientific, Horsham, PA). El promedio de los conteos se determinó a partir de los dos vasos deferentes y los dos espermátóforos de cada camarón.

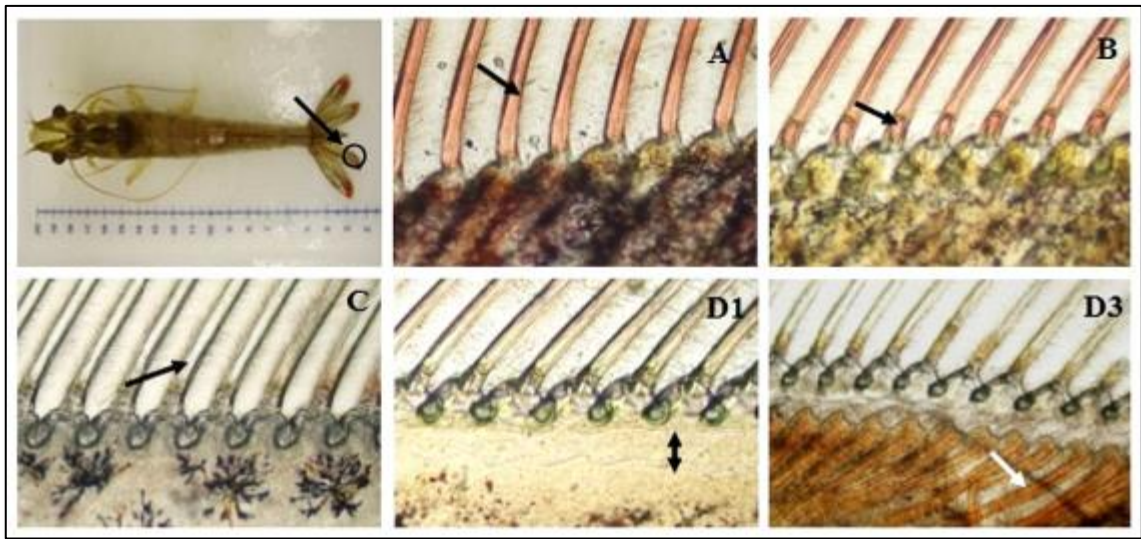


Figura 16. Cambios morfológicos en urópodos de *L. vannamei* durante el ciclo de muda. Etapa A (postmuda temprana), la flecha señala el lumen de las setas llenas de matriz; etapa B (postmuda tardía), la flecha señala la retracción de la matriz del lumen y el comienzo de la formación de conos internos; etapa C (intermuda), la flecha señala el vacío de las setas; etapa D1 (premuda temprana), la flecha señala la separación entre la cutícula y la epidermis; etapa D3 (premuda tardía), la flecha señala la formación de nuevas setas. Imágenes de urópodos a 40X, en animales de tres meses de edad (tomado de deOliveira-Cesar *et al.*, 2006).

ABLACIÓN DEL TALLO OCULAR E HIPERTROFIA DE LA GLÁNDULA ANDROGÉNICA

Mediante un corte con tijera sobre el pedúnculo ocular se ablacionaron unilateralmente cien camarones machos adultos. Tres días después, se realizó la ablación del segundo pedúnculo ocular a cincuenta de estos camarones. De esta manera, se conformaron dos grupos experimentales, uno con 50 camarones ablacionados unilateralmente y otro con 50 organismos con ablación bilateral, más un último grupo de 50 camarones no ablacionados (control); todos ellos fueron utilizados en este estudio. Después del corte, se aplicó un trozo de papel absorbente con pegamento instantáneo (Ceys) sobre la herida, para evitar hemorragia. Los organismos se mantuvieron en estanques cuadrados de concreto en el área de estanques del laboratorio de crustáceos del CIBNOR. Cada semana se muestrearon aleatoriamente 6 camarones de cada grupo, a los cuales se les determinó la longitud (cm; rostrum-telson) y el peso (g). Posteriormente, a cada

camarón se le disectó el órgano genital y se pesaron las siguientes estructuras sexuales: 1) órgano genital, 2) lóbulos testiculares y, 3) vasos deferentes con las ámpulas terminales. Adicionalmente, se registró el peso de los espermátóforos y se realizó un conteo espermático de los mismos mediante un hemacitómetro (0.1 mm de fondo; HausserScientific, Horsham, PA). El experimento duró seis semanas. Se calculó el índice gonadosomático (peso del testículo/peso corporal) X 100, el índice genital-somático (peso total del órgano genital/peso corporal) X 100, el índice del vaso deferente-somático (peso del vaso deferente/peso corporal) X 100. Los vasos deferentes con la GA de los camarones analizados en la primera semana, se fijaron en solución Davidson (Howard y Smith, 1983; Bell y Lightner, 1988) por 24 h y posteriormente en etanol (70%) para ser procesarse por la técnica hematoxilina-eosina (Bell y Lightner, 1988).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La normalidad de los datos del diámetro de los CS, los conteos espermáticos (en cada estadio de muda y en el experimento de ablación) y los pesos registrados del órgano genital, se corroboró mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y, la homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Levene con el programa Statistica 8. Los datos de cada experimento fueron analizados mediante un ANOVA, utilizando el programa SPSS ver. 16.0 (SPSS, Chicago, IL), con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Las diferencias significativas entre los tratamientos se analizaron por medio de la prueba de Tukey.

ANÁLISIS MOLECULAR

Se diseñaron una serie de oligonucleótidos (Tabla I) con el software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a partir de las secuencias de la GA de decápodos disponibles en el GenBank: *C. quadricarinatus* (DQ851163.1), *M. rosenbergii* (FJ409645) y *P. monodon* (GU208677.1). Por otra parte, se utilizaron los oligos publicados por Banzai *et al.* (2011), con los cuales amplificaron regiones

específicas de *M. japonicus* basándose en la secuencias reportadas de *P. monodon*: Jap(F)-CTTCGACTG-CGGTGACATCG y Jap(R)-ACACGTCCGCTGGCTCACGT.

Tabla I. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias reportadas de la GA en decápodos.

Nombre de Oligo	Secuencia
cherax01(R)	TAATGGAAGACGCTGGAA
cherax02(F)	ATGCTGTCCCAAACATTAC
cherax02(R)	AGAGTCAAACAAGGCAGAA
cherax03(F)	TCCAAACATTACTCAACCTG
cherax03(R)	AGATTCAAACAAGGCAGAAA
cherax04(F)	CTTCATTTCTTTGCCTCTTC
cherax04(R)	AGTGCTGCTTGTATTGICTG
macros(F)	GTGTGTTGTTCTGCTCACTC
macros(R)	TTGTGGATGGTAATGGTAAA
mono1(F)	ATGGTCCTCTCCCTGACT
mono1(R)	GTCCTCGCAATACTCCAG
mono2(F)	ATGAACCAACTCGCTGCCTC
mono2(R)	GGCTCACCAGGTGGTCTCTT
mono3(F)	TCTGCAAGACGTTTCCCACA
mono3(R)	AGTACGGGTCCTCGCAATACT
mono4(F)	AACCAACTCGCTGCCTCAC
mono4(R)	GGCTCACCAGGTGGTCTCTTA

Inicialmente, se obtuvo ARN total utilizando el método de extracción de tiocianato de guanidina ácido-fenol cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987), a partir de los siguientes tejidos: 1) la parte distal del ápula terminal (dAT), 2) la parte proximal del ápula terminal (pAT), 3) vaso deferente distal (VDD), 4) la parte distal del vaso deferente medio (dVDM) y testículo (T). Posteriormente, se sintetizó la primera hebra de ADNc usando 2.5 µg del ARN total utilizando la transcriptasa reversa clonada AMV (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc se usó como templado para la amplificación mediante PCR con

los oligonucleótidos diseñados (Tabla 1), en diluciones 1:4; 1:3, 1:2, 1:1 y 1:0, preparadas con Agua Sigma. El programa utilizado para las amplificaciones de PCR consistió de un ciclo de 3 min por 30s (desnaturalización inicial), 35 ciclos de: 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a 55°C (alineamiento), 1 min a 72°C (extensión), y un paso de extensión final de 3 min a 72°C. La amplificación del ADNc se llevó a cabo en un termociclador MJ Mini (Bio-Rad). Se prepararon mezclas de 15 µl por reacción para la amplificación, con los siguientes componentes mostrados en la Tabla II.

Tabla II. Componentes para la reacción de PCR.

Componente	Concentración Inicial	Concentración Final	Cantidad
ADNc			1 µl
10 X Buffer	10 X	1 X	1.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	0.9 µl
dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.45 µl
Primer FOW	10 pmol	0.4 pmol	0.6 µl
Primer REV	10 pmol	0.4 pmol	0.6 µl
Taq Polimerasa	5 U/uL	0.75 1-RX	0.15 µl
Agua a volumen final			15 µl

La electroforesis de los amplicones se realizó en geles de agarosa-TAE (1.5%-1%, respectivamente), a 100 V por 30 min. Posteriormente, los geles se trasladaron a bolsas plásticas resellables (Zip-lock), en donde se agregaron 100 ml de Fast Blast DNA Stain 1X (Bio-Rad), tiñiéndose con agitación suave por 5 min a temperatura ambiente. Después, se realizó un lavado con agua corriente tibia durante 10 min. Finalmente, los geles se observaron y documentaron mediante fotografía digital en un fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR). Los productos de PCR se purificaron con el kit GeneClean Turbo (MP); la secuenciación de los amplicones puros se realizó mediante el método dideoxy por el servicio GeneWiz (USA). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Pro, para

determinar la calidad de los electroferogramas y corroborar ambigüedades en las bases secuenciadas. Posteriormente, para el análisis de alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos deducidas se usó el software Clustal X ver. 1.8, usando parámetros estándar. Para la elaboración de dendogramas de similitud se utilizó el algoritmo Neighborg-Joining (NJ) implementado en el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

RESULTADOS

ORGANOGENÉISIS

Línea de tiempo de eventos durante la diferenciación sexual interna y externa

En la Figura 17 se muestra una línea de tiempo con los eventos que conforman el proceso de diferenciación sexual interna y externa en hembras y machos de camarón blanco, en la que se liga cada evento a una figura.

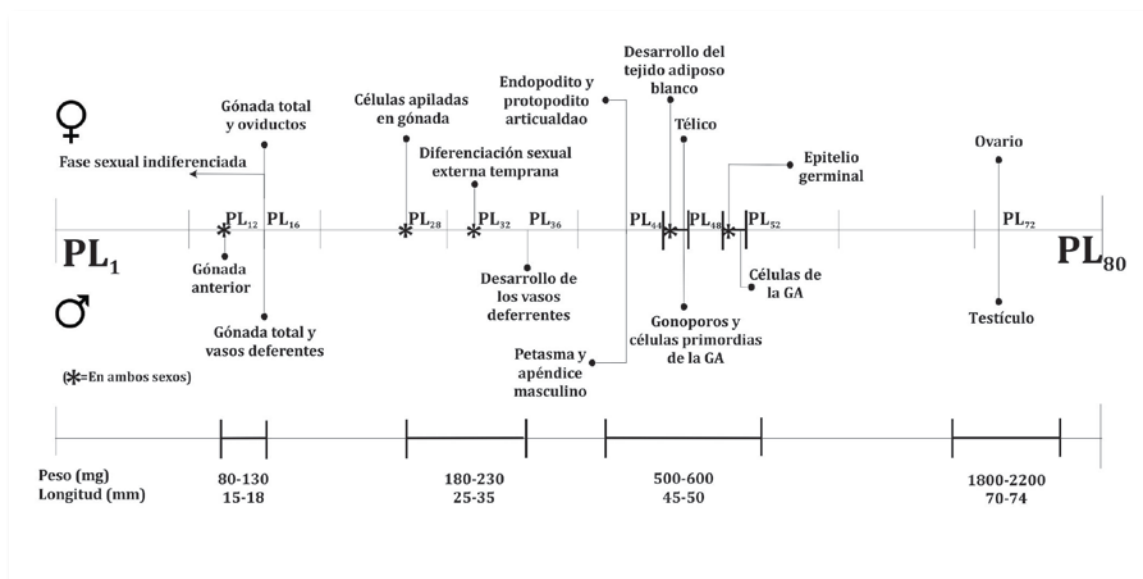


Figura 17. Línea de eventos de la diferenciación sexual externa e interna de *L. vannamei*.

Organogénesis de la gónada (PL12 a PL16)

La observación de las laminillas histológicas reveló la ausencia de gónada en PL4 y PL8. Sin embargo, a partir de PL12 la gónada se observó como una estructura bilateral localizada dorsalmente en la región anterior del hepatopáncreas. El órgano genital de cada género se reconoció por completo a través de la disección en PL16. Durante este periodo, el peso corporal del camarón osciló entre los 80 – 130 mg con una longitud de 15 – 18 mm (Figura 17).

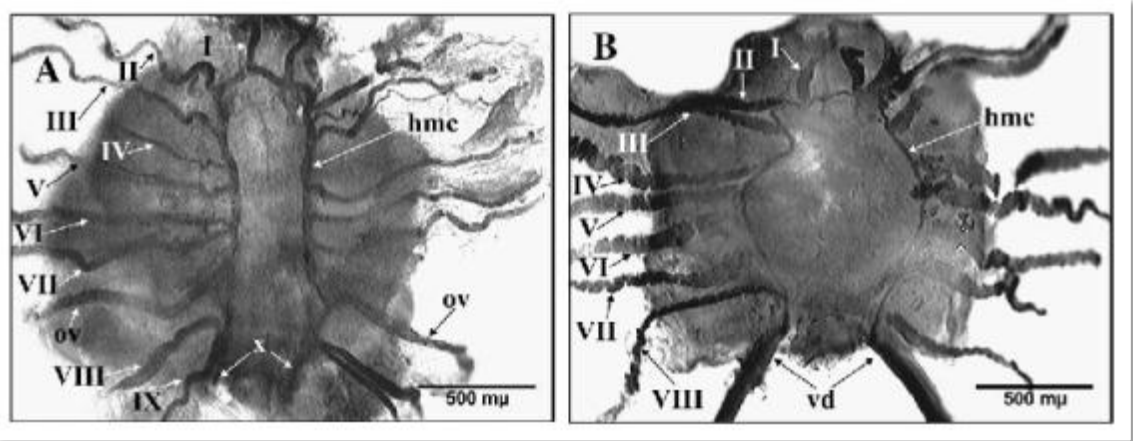


Figura 18. Órgano genital de *L. vannamei*, PL24. Vista ventral de la hembra (A) y de macho (B), localizado en la región cefalotorácica. Tubo colector en forma de herradura (hmc), lóbulos gonádicos (números romanos), oviducto (ov) y vasos deferentes (vd).

Morfología del órgano genital

Tanto en la hembra como en el macho, el primer par de lóbulos anteriores está conectado a un tubo colector que se encuentra perpendicular al eje del cuerpo, que se extiende dorsalmente hacia la región posterior del hepatopáncreas formando un tubo en forma de herradura. A lo largo, y perpendicularmente conectados a este colector, se encuentran ocho lóbulos laterales en hembras, numerados del II hasta el IX, además del oviducto bilateral (Figura 18 A), siete lóbulos laterales en los machos, numerados del II al VIII, además de los vasos deferentes (Figura 18 B); estos lóbulos se encuentran extendidos sobre la superficie del hepatopáncreas por debajo del pericardio, representando la anatomía básica de la gónada. En la hembra, el lóbulo bilateral X emerge de la región distal del tubo colector y se desarrolla dorsalmente junto con el intestino a través de los cinco segmentos abdominales durante los siguientes ocho días. Adicionalmente, en PL28 el cuarto lóbulo no se desarrolló y tuvo una regresión hasta que aparentemente fue absorbido, dejando un espacio evidente entre el tercer y quinto lóbulo, sin dejar rastro de lóbulos rudimentarios (Figura 19 A). Por lo tanto, la morfología final de la gónada de la hembra comprende un lóbulo bilateral anterior, siete lóbulos

laterales bilaterales, numerados del II al VIII, además del oviducto bilateral (Figura 19 B), y del IX lóbulo bilateral distal abdominal.

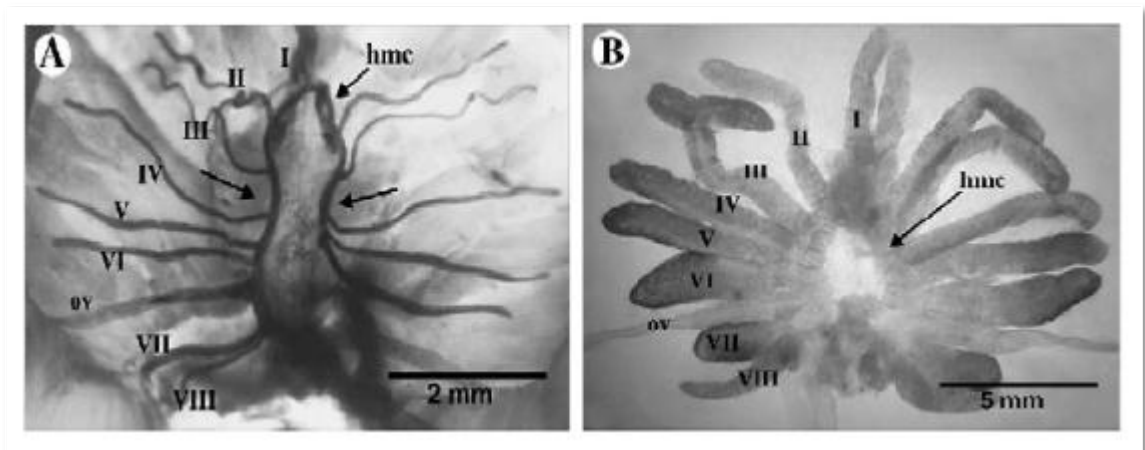


Figura 19. Órgano genital de la hembra de *L. vannamei*. (A) Vista ventral del órgano en una hembra juvenil PL80 (3 g), las flechas muestran un espacio interlobular que corresponde al cuarto lóbulo. (B) Hembra adulta (28 g) mostrando un lóbulo anterior y siete laterales (números romanos), además del oviducto (ov) y el tubo colector en forma de herradura (hmc).

Desarrollo temprano de la gónada (PL12 a PL28)

La morfología inicial del lóbulo anterior indiferenciado está compuesto por células ordenadas en forma irregular (Figura 20 A), las que para PL28 se forman en grupos de células en todos los lóbulos gonádicos (Figura 20 B).

Histología del oviducto y del vaso deferente

El oviducto bilateral es un tubo colapsado que, visto transversalmente, tiene una forma de media luna, lo que le permite distinguirse de los demás lóbulos gonádicos (Figura 20 C). Esta estructura se localiza entre los lóbulos VI y VII y continúa lateralmente sobre el hepatopáncreas, extendiéndose ventralmente hacia el musculo torácico-abdominal, al nivel del tercer periópodo. En el macho, el vaso deferente proximal surge de la parte distal del tubo colector “herradura”, detrás

del hepatopáncreas. Se extiende hacia arriba y hacia los lados, descendiendo posteriormente en paralelo con la aorta, que corre hacia abajo en el lado izquierdo del cuerpo entre el musculo torácico-abdominal y el intestino, rodeado por un tejido conectivo suelto indiferenciado (Figura 20 D). Cada vaso deferente se extiende hacia el empalme de los músculos torácico-abdominal y el flexor oblicuo abdominal, descendiendo lateral y directamente como vaso deferente distal que alcanza ventralmente la región interna de la base del quinto periópodo como una ámpula terminal primordia. Los vasos deferentes son filiformes, sin notarse aún ningún bulbo eyaculador medio, y están compuestos de células epiteliales columnares con un lumen, formando una estructura columnar y un septum longitudinal que divide al tubo en una gran cámara lineada por epitelio y con otra cámara pequeña incompleta (Figura 21). El desarrollo temprano de los vasos deferentes se observó después de PL36, cuando la región anterior se observó más amplia, diferenciándose en un vaso deferente medio que funciona como bulbo eyaculador.

Diferenciación sexual externa temprana (PL32 a PL44)

La diferenciación sexual externa temprana comienza alrededor de PL32; el peso corporal oscila entre 180-280 mg y la longitud entre 25-35 mm. Se observaron dos características externas importantes: 1) el endopodito que surge como una pequeña protuberancia con una o dos setas apicales. En el transcurso de los días, el endopodito de la hembra se amplía en la parte externa proximal-media, formando tres o cuatro setas proximales en su borde, manteniendo las apicales. En machos, en el endopodito se forman una o dos setas proximales y apicales que se pierden durante las siguientes mudas, y el endopodito se mantiene como un apéndice tubular, que posteriormente forma el petasma. 2) En hembras, el protopodito del primer par de pleópodos tiene una articulación rectangular, mientras que en machos esta articulación presenta una muesca en su región distal.

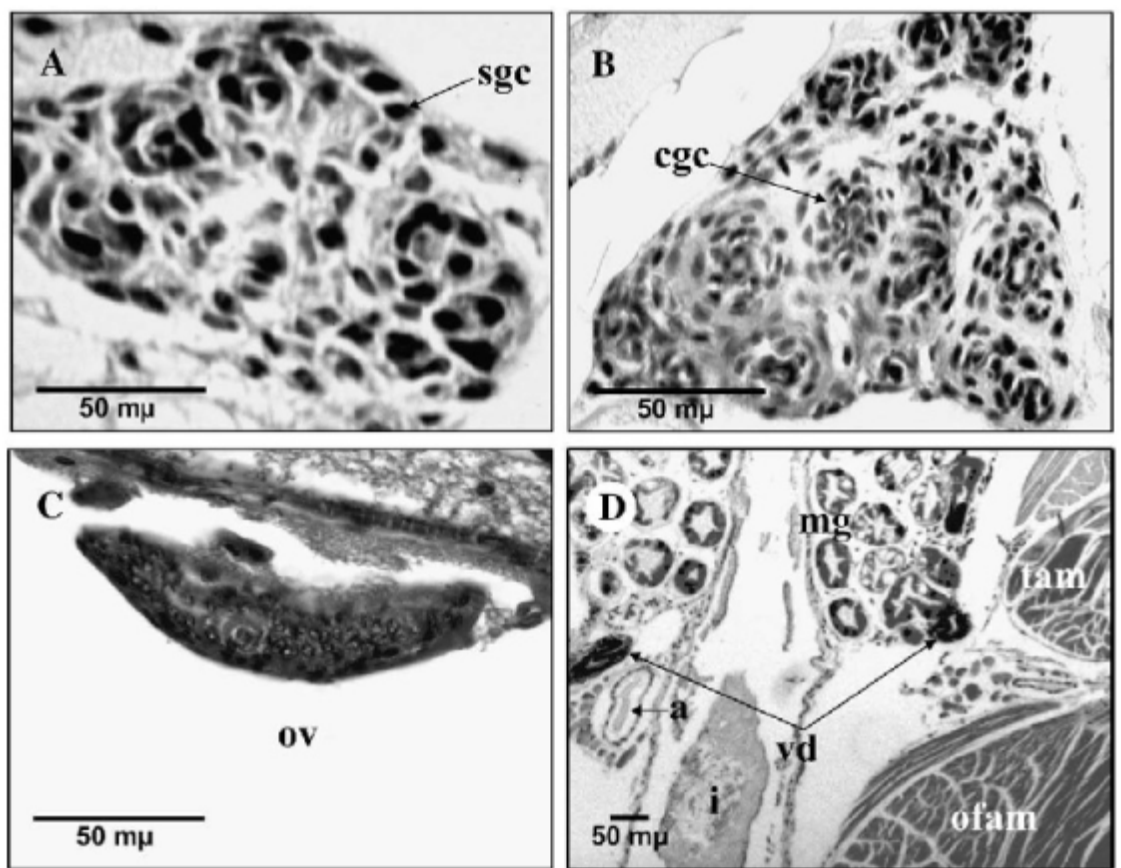


Figura 20. Órgano genital de *L. vannamei*. Corte longitudinal del lóbulo gonádico anterior en PL18 (A) y PL28 (B). Corte transversal del oviducto localizado en la parte postero-lateral del hepatopáncreas en hembras PL40 (C). Corte longitudinal de la región cefalotorácica posterior y abdominal anterior de machos PL32 (D). Aorta (a), semi-arreglos de células mesodérmicas (sgc), paquetes de células mesodérmicas (cgc), intestino (i), hepatopáncreas (mg), músculo torácico-abdominal (tam), músculo flexor-abdominal oblicuo (ofam), oviducto (vd) y vaso deferente proximal (vdp).

Diferenciación sexual externa subsecuente (PL44 a PL48)

La diferenciación sexual externa continua en PL44; con un peso corporal entre los 0.5-0.6 g y una longitud entre los 45-50 mm. En hembras, en el tético se comienzan a formar un par de crestas afiladas y oblicuas, lo que es característico de la especie, mientras que en machos comienzan a desarrollarse los gonoporos, en la coxa de quinto periópodo y los apéndices masculinos, en el segundo par de pleópodos.

Organogénesis de la GA y del tejido adiposo blanco (PL48 a PL50)

En los machos, las células primordias de la GA se forman a partir de PL45, unidas en línea, aparentemente sujetas por un tejido conectivo fibroso fino en la pared externa-posterior de cada vaso deferente, el lado que encara al músculo abdominal oblicuo (Figura 21 A). Poco después (PL52) las células ovaladas se acumulan en esta área formando el tejido de la GA (Figura 21 B).

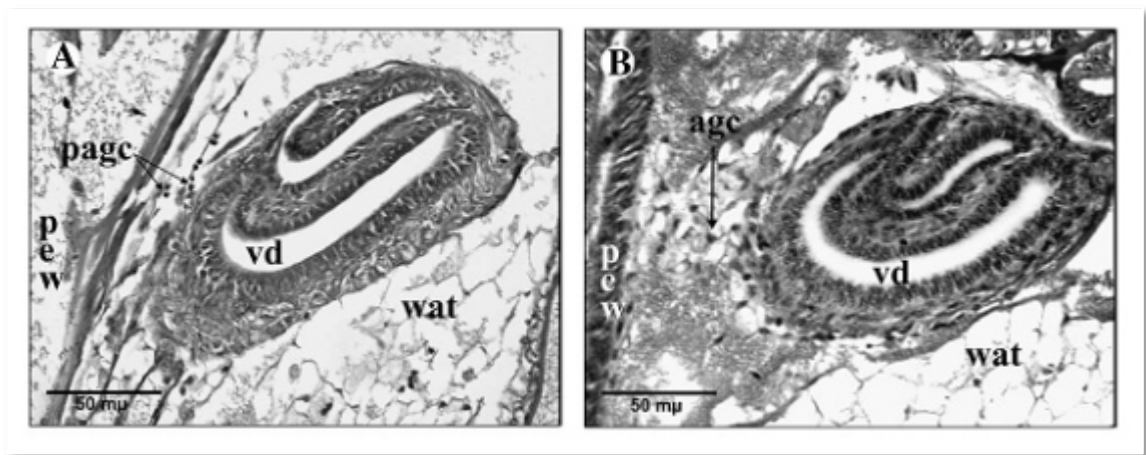


Figura 21. Vaso deferente de *L. vannamei*. Corte longitudinal de los vasos deferentes en macho PL44 (A) y en PL52 (B). Células androgénicas primordias (pagc), células de la glándula androgénica (agc), tejido adiposo blanco (wat), pared posterior externa (pew) y vaso deferente (vd).

Durante este tiempo, en hembras y machos, el tejido conectivo suelto se diferencia en un tejido adiposo blanco, llenando la cavidad que se encuentra entre la región posterior del hepatopáncreas, el músculo torácico-abdominal, el intestino y el área que rodea la aorta en el lado izquierdo del cuerpo. Los núcleos de estas células se desplazan hacia la periferia por el alto contenido graso en el citoplasma (Figura 21).

Desarrollo del epitelio germinal y diferenciación sexual de la gónada (PL52 a PL72)

Los grupos de células que se formaron en la gónada se diferencian en epitelio germinal a partir de PL52. Las células germinales son más grandes y más redondas que las células originales, y forman una estructura tubular ovalada donde las

células gonádicas se encuentran en la periferia rodeando al lumen. Sin embargo, la gónada se encuentra aún sin diferenciarse. Las células secundarias gonádicas se transforman en ovocitos primarios, los cuales comienzan un crecimiento previtelogénico primario a partir de PL72, lo que la caracteriza como una gónada femenina (Figura 22 A) a diferencia de una gónada masculina (Figura 22 B). La diferenciación de la gónada ocurre cuando ambos sexos alcanzan un peso entre 1.8-2.2 g y una longitud de 70-74 mm. En las hembras, los ovocitos alcanzan un mayor tamaño y toman una forma triangular o de pera, llenando y expandiendo los lóbulos que caracterizan al ovario. Por otro lado, los espermatocitos primarios del macho, son redondos y se encuentran estrechamente acomodados, producen las espermátidas que se transfieren hacia el lumen del lóbulo testicular; durante esta etapa la disección de cualquier lóbulo testicular mostró solo un túbulo seminífero largo.

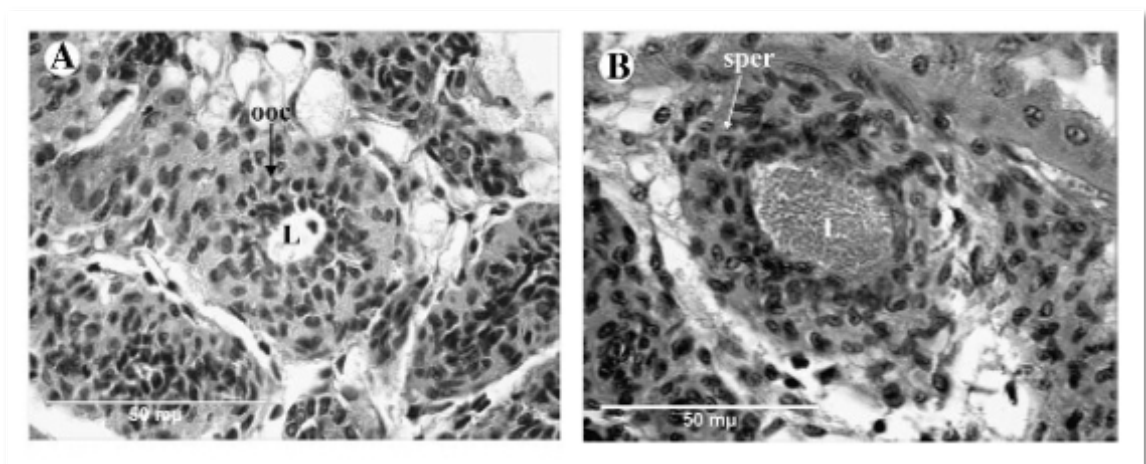


Figura 22. Gónada de *L. vannamei*. Corte longitudinal de la gónada de la hembra (A) y del macho (B) en PL72. La flecha muestra en (A) ovocitos en forma triangular o de pera (ooc), y en (B) la espermatogonia (sper) alrededor del lumen (L).

Desarrollo subsecuente de los vasos deferentes y de la glándula androgénica

En camarones juveniles la apariencia externa de la GA fue difícil de observar debido a que en organismos en este estadio la glándula es minúscula y transparente. Sin embargo, el desarrollo de tejido conectivo fue evidente en la

región media de los vasos deferentes, lo que indica la localización de la supuesta GA. El tejido conectivo del vaso deferente se encuentra también sujeto al octavo lóbulo testicular, lo que permite que el vaso y el testículo se encuentren juntos, en paralelo (Figura 23 A).

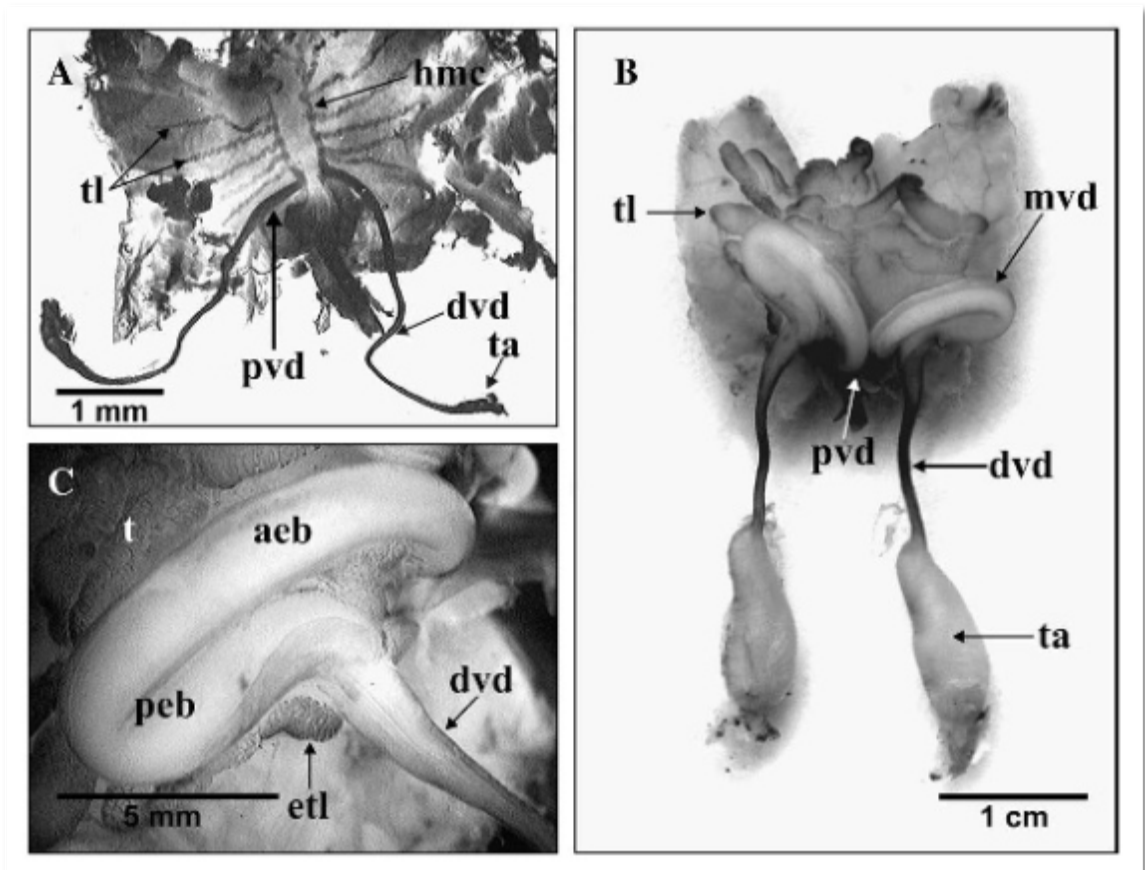


Figura 23. Órgano genital de macho de *L. vannamei*. Vista ventral del órgano genital del macho en PL48, 0.5 g (A), un adulto de 26 g (B). Detalle de los vasos deferentes de B (C). Tubo colector herradura (hmc), lóbulos testiculares (tl), bulbo eyaculador anterior (aeb), bulbo eyaculador posterior (peb), octavo lóbulo testicular (etl), vaso deferente proximal (pvd), vaso deferente medio (mvd), vaso deferente distal (dvd) y ámpula terminal (ta).

Durante el crecimiento del macho, la parte media del vaso deferente continua su desarrollo hasta convertirse en un vaso deferente medio, grande y doblado, tomando forma de herradura o de una “U” invertida (llamado de “doble fijado” por Treece y Yates, 1988). Cada uno de los vasos deferentes medios incluyen un bulbo eyaculador anterior y posterior (Figura 23 B y C). En camarones

pre-adultos y adultos, la GA se muestra como un cordón inmerso en el tejido conectivo, conectando la parte distal del bulbo eyaculador posterior con el octavo lóbulo testicular (Figura 24 A y B). Posterior a la disección del vaso deferente, bajo examinación histológica, la GA se observa como una masa delgada y compacta con células ovaladas con un núcleo prominente.

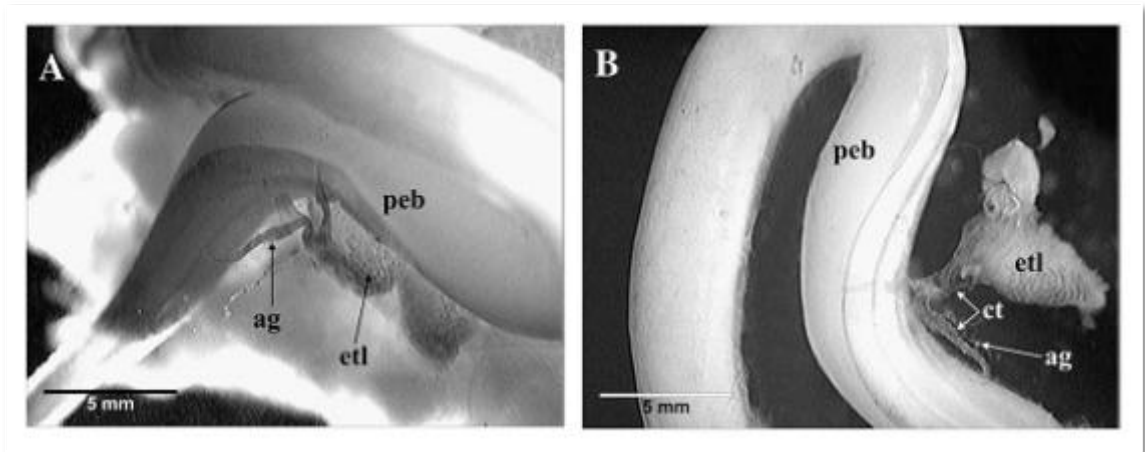


Figura 24. Vaso deferente medio de *L. vannamei*. Anatomía externa del vaso deferente medio en macho adulto mostrando la interconexión a través de un tejido conectivo (ct) entre la región distal del bulbo eyaculador posterior (peb), la glándula androgénica (ag) y el octavo lóbulo testicular (etl). Levantamiento del bulbo eyaculador posterior (A) y disección junto con el octavo lóbulo testicular (B).

En el experimento de ablación del pedúnculo ocular que se detalla más adelante, se observó hipertrofia de la GA, la cual expandió su localización a lo largo, y por la parte interna, del vaso deferente distal, rodeando el ámpula terminal y ensanchándose en su parte distal (Figura 25).

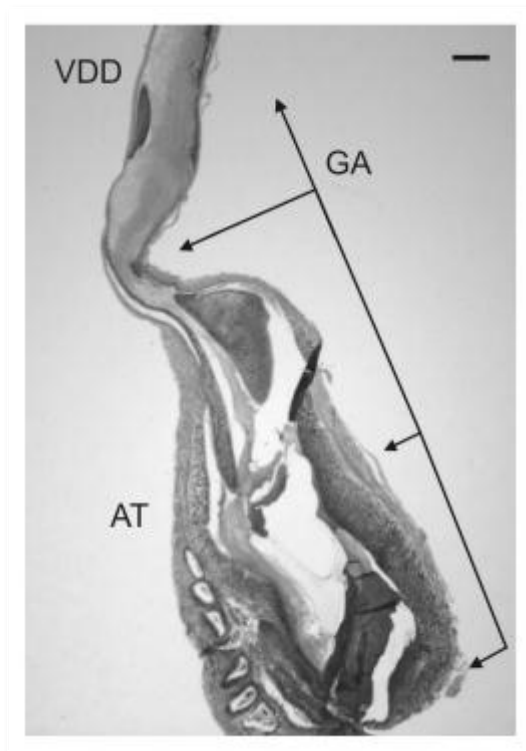


Figura 25. Vaso deferente de *L. vannamei*. Histología del vaso deferente distal (VDD) y ámpula terminal (AT). Las flechas indican el cordón de la glándula androgénica (GA). Barra = 500 μ m.

CICLO DE MUDA Y MEIOSIS

La mejor técnica para la observación de los complejos sinaptonémicos (CS) fue la de secado al aire, con tinción de orceína. Los CS no se observaron con la tinción de DAPI ni con la de nitrato de plata, previamente habiendo fijado los tejidos con paraformaldehído. La etapa de diploteno se observó más nítida bajo las técnicas de tinción de orceína y DAPI que con la de nitrato de plata. La etapa de cigoteno se diferenció de la de paquiteno ya que los cromosomas homólogos aún no se encontraban en completa sinapsis. Durante cigoteno, los bivalentes, se observaron más delgados y más largos que en paquiteno por su poca condensación de cromatina, en contraste con los bivalentes en la etapa de paquiteno, en donde se observaron completamente unidos (sinapsis).

Ambos sexos del camarón mostraron todas las etapas de la meiosis I, exceptuando la etapa de leptoteno (\emptyset). Tanto el grupo control como el tratado con colchicina, mostraron núcleos en cigoteno (++), paquiteno (++++), diploteno temprano (+) y diploteno-diaquinesis (++) . Sin embargo, en el grupo tratado fue más fácil de encontrar la etapa de diploteno. En ambos sexos, la mayoría de las células meióticas se identificaron en la etapa de paquiteno, caracterizada por los bivalentes en completa sinapsis. En el camarón, la naturaleza de los CS observados muestra a los cromosomas homólogos en sinapsis, revelando una alta densidad de cromatina y un arreglo complejo, un tanto desorganizado dentro del núcleo.

Las etapas de cigoteno (Figura 26 A y B), paquiteno (Figura 26 C y D), diploteno temprano (Figura 27 A-D) y diploteno-diaquinesis (Figura 28 A y B) se observaron en los estadios de post-muda, inter-muda y pre-muda, en ambos sexos en todos los camarones analizados. Las ovogonias (++) y espermatogonias (+++) se observaron en todos los estadios de muda, y solo los machos presentaron algunas núcleos mitóticos conteniendo 88 cromosomas (Figura 28 C y D).

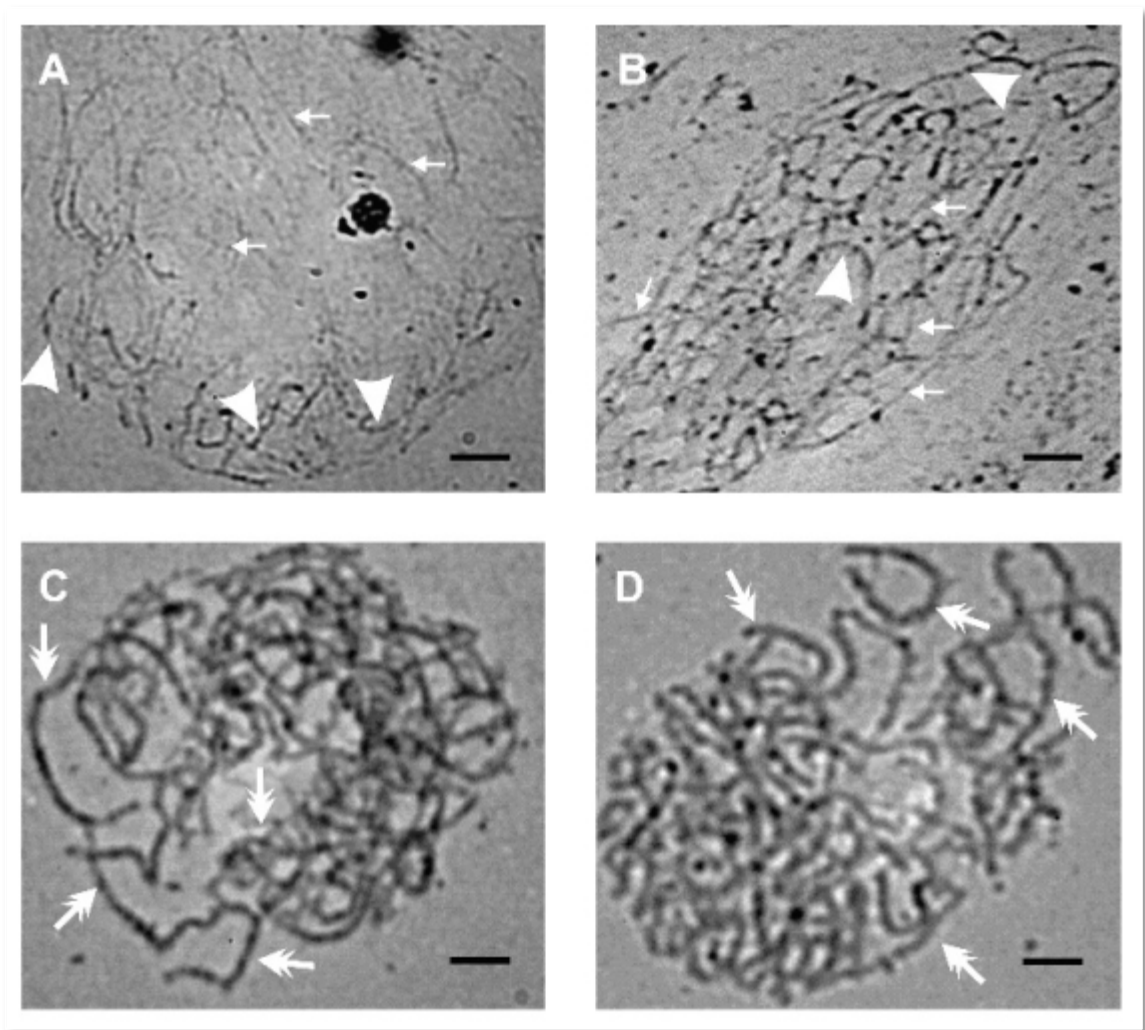


Figura 26. Cromosomas en cigoteno y paquiteno de *L. vannamei*. Complejos sinaptonémicos “enredados” en etapa de cigoteno de hembras (A) y machos (B), y en etapa de paquiteno en hembra (C) y macho (D), Técnica de tinción: orceína. Se observan los elementos laterales, en donde los cromosomas homólogos aún no han hecho sinapsis (flechas pequeñas). La sinapsis ocurre a manera de un “cierre” en una sola dirección, aparentemente de un extremo a otro (flechas grandes). Sinapsis completa en paquiteno (flechas dobles). Barra = 10 μ m.

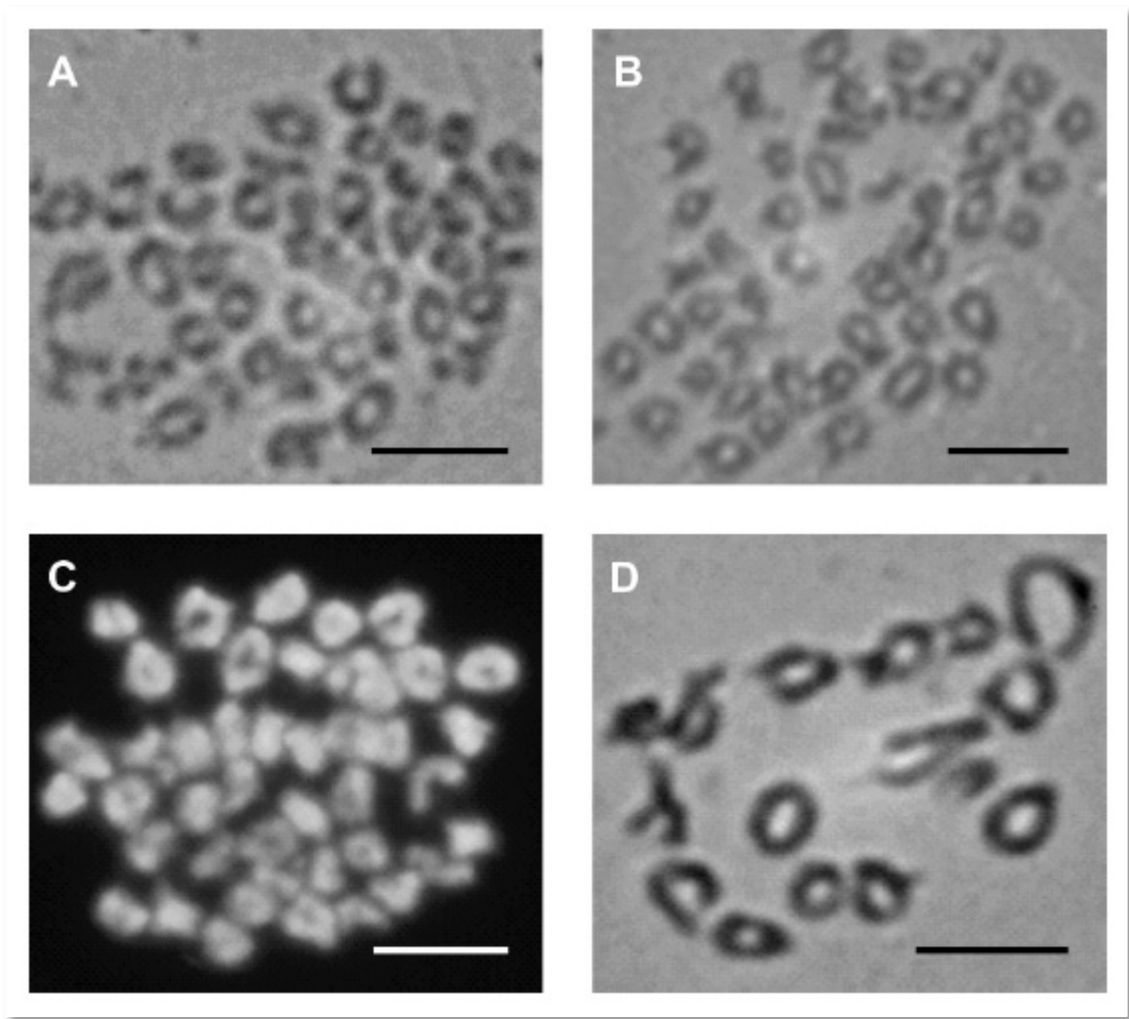


Figura 27. Cromosomas en diploteno de *L. vannamei*. Hembra (A y B) y macho (C y D) en etapa temprana de diploteno, mostrando 44 bivalentes. Técnica de tinción: A, B y D, orceína; C, DAPI. Barra = 10 µm.

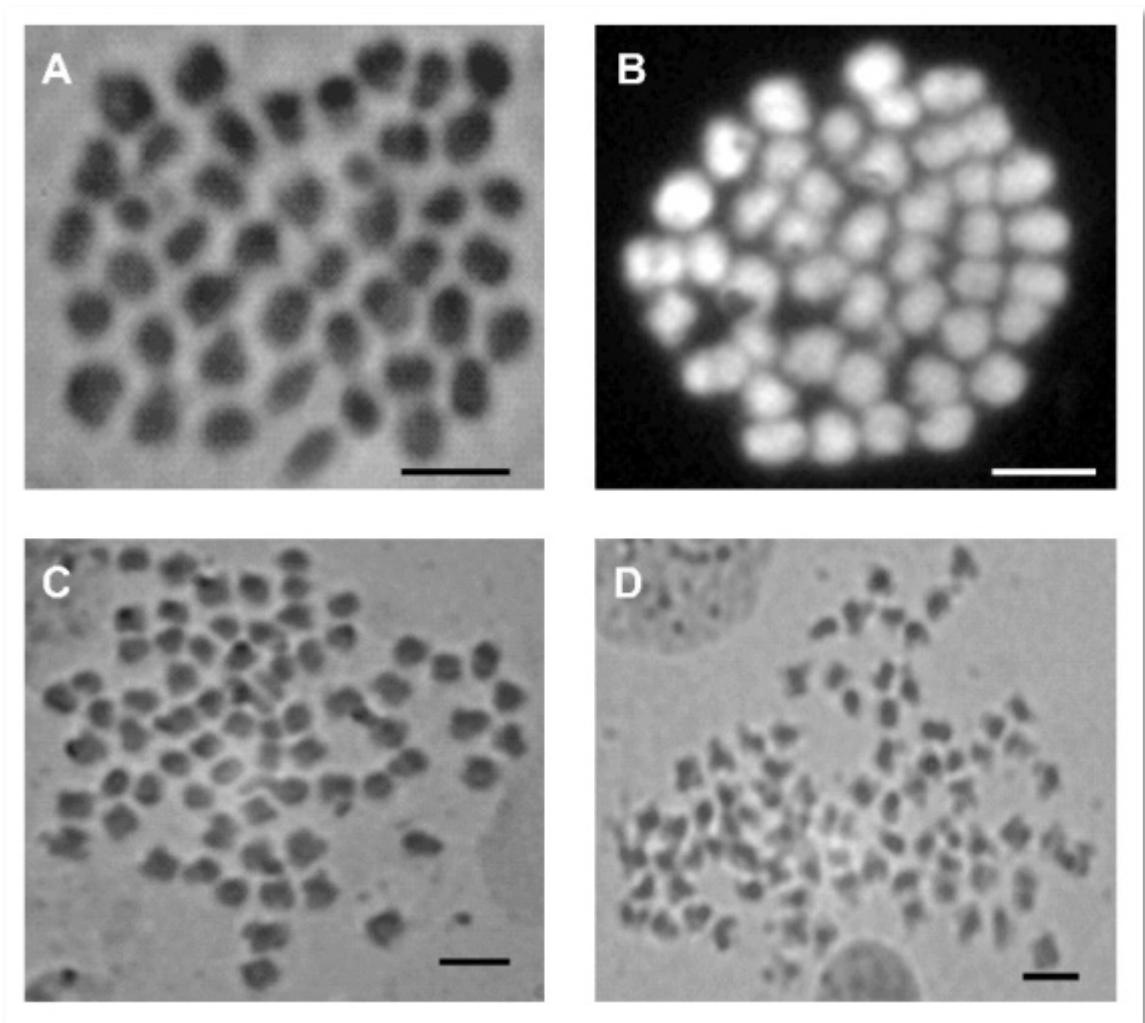


Figura 28. Cromosomas en diploteno avanzado y en mitosis de *L. vannamei*. Hembra (A) y macho (B) en etapa avanzada de diploteno, mostrando 44 bivalentes. Técnica de tinción: A, C y D, orceína; B, DAPI. Cromosomas mitóticos (C y D). Barra = 10 μ m.

Conforme la primera profase meiótica avanza hacia la etapa de diploteno, ocurre una reducción en el diámetro de los núcleos, dejando a los cromosomas homólogos unidos solo por los quiasmata (puntos de recombinación). En esta etapa fue posible determinar el número haploide de 44 cromosomas, ya que el núcleo se encontraba con el grado de condensación más alto de bivalentes. Los núcleos de diploteno (en ambos sexos) presentaron 44 bivalentes, de los que ~40 presentaron forma de anillo y el resto una forma de "v". No se observaron diferencias significativas en el diámetro de los núcleos entre ambos sexos: cigoteno

($p=0.39$); paquiteno ($p=0.19$) y diploteno ($p=0.26$). La media en diámetro de los núcleos disminuyó gradualmente a partir de cigoteno ($95 \pm 16 \mu\text{m}$ en hembras, $88 \pm 15 \mu\text{m}$ en machos), paquiteno ($66 \pm 9 \mu\text{m}$ en hembras, $60 \pm 8 \mu\text{m}$ en machos) y diploteno ($42 \pm 10 \mu\text{m}$ en hembras, $38 \pm 8 \mu\text{m}$ en machos), llegando a decrecer el diámetro de los núcleos (a lo largo de las etapas) alrededor del 50% (Figura 29). Las espermatídas (++++), y el espermatozoide inmaduro (++++), así como ovocitos previtelogénicos (+++) fueron observados comúnmente durante todo el ciclo de muda. Los conteos espermáticos en los vasos deferentes ($p=0.34$) y espermátóforos ($p=0.25$) no fueron significativamente diferentes durante los estadios de muda (Tabla III).

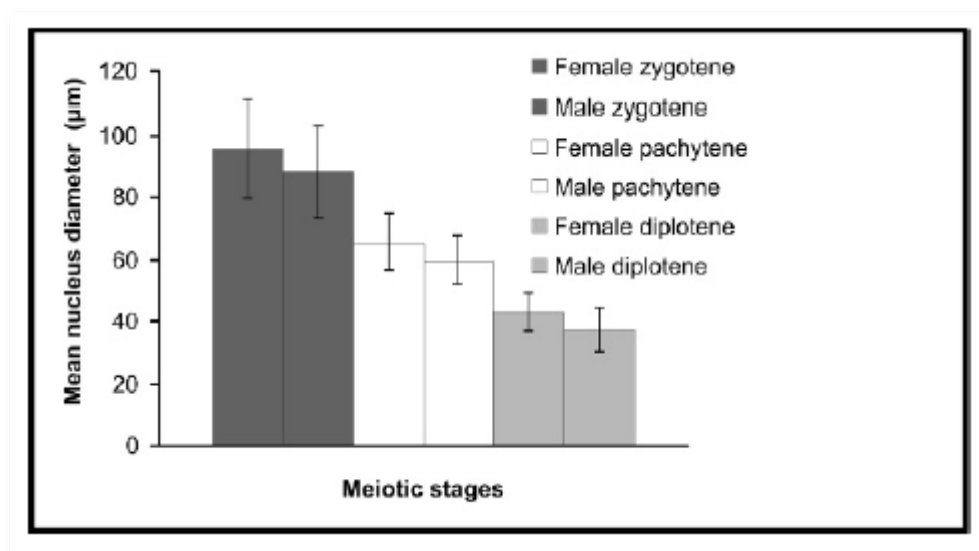


Figura 29. Diámetro de los núcleos (Media \pm DS) en etapas de cigoteno, paquiteno y diploteno en hembras y machos de *L. vannamei*.

Tabla III. Conteos espermáticos (Media \pm ES) en los vasos deferentes y en espermátóforos durante el ciclo de muda de *L. vannamei*.

X 10 ³	Etapa B postmuda	Etapa C intermuda	Etapa D1 premuda	Etapa D3 premuda
vaso deferente	1581 \pm 243	1235 \pm 329	1356 \pm 219	1437 \pm 229
espermátóforo	1837 \pm 317	1906 \pm 204	1765 \pm 212	1862 \pm 351

ABLACIÓN DEL TALLO OCULAR E HIPERTRÓFIA DE LA GLÁNDULA ANDROGÉNICA

Los resultados del bioensayo de ablación del pedúnculo ocular mostraron que el peso total del órgano genital, se incrementó significativamente en los machos ablacionados bilateralmente (referenciado como bilateral) en la primera ($p=0.03$) y segunda ($p=0.01$) semanas, con respecto a los camarones ablacionados unilateralmente (referenciado como unilateral) y los organismos control. En la tercera semana no se observaron diferencias significativas ($p=0.42$) entre los tres grupos, sin embargo, en la cuarta semana los grupos bilateral y unilateral fueron similares ($p=0.35$), mientras que el peso promedio del órgano genital de los organismos con ablación bilateral fue significativamente mayor ($p=0.04$) que el de los controles (Figura 30 A). En la quinta semana de cultivo se observó un incremento significativo del órgano genital en el grupo unilateral con respecto a los controles ($p=0.02$), mientras que en la sexta semana ambos grupos fueron similares ($p=0.36$) (Figura 30 A). Cabe señalar que el grupo de camarones bilateral tuvo una alta mortalidad y más allá de la cuarta semana de experimentación ningún organismo sobrevivió. Los resultados del índice genital-somático ajustan el peso del órgano genital respecto al peso corporal, y se observó, que solo en la primera ($p=0.01$) y cuarta ($p=0.04$) semanas se incrementó significativamente el grupo bilateral, respecto a los grupos unilateral y control. Sin embargo, el grupo bilateral fue significativamente mayor (respecto a los controles) en cada una de las cuatro semanas (1^a: $p=0.01$; 2^a: $p=0.01$; 3^a: $p=0.04$; 4^a: $p=0.03$), mientras que el unilateral lo fue únicamente en la primera ($p=0.04$) y quinta ($p=0.01$) semanas (Figura 30 B).

Respecto a los resultados del peso de los testículos, se observó que en el grupo bilateral se incrementó significativamente en la segunda ($p=0.01$) y cuarta ($p=0.04$) semanas de cultivo, respecto al grupo unilateral y control, mientras que en la tercera semana, en ambos grupos ablacionados, el peso de los testículos fue significativamente mayor que el de los del grupo control ($p=0.04$). El grupo unilateral fue significativamente mayor ($p=0.04$) que el control en la tercera semana del cultivo (Figura 31 A).

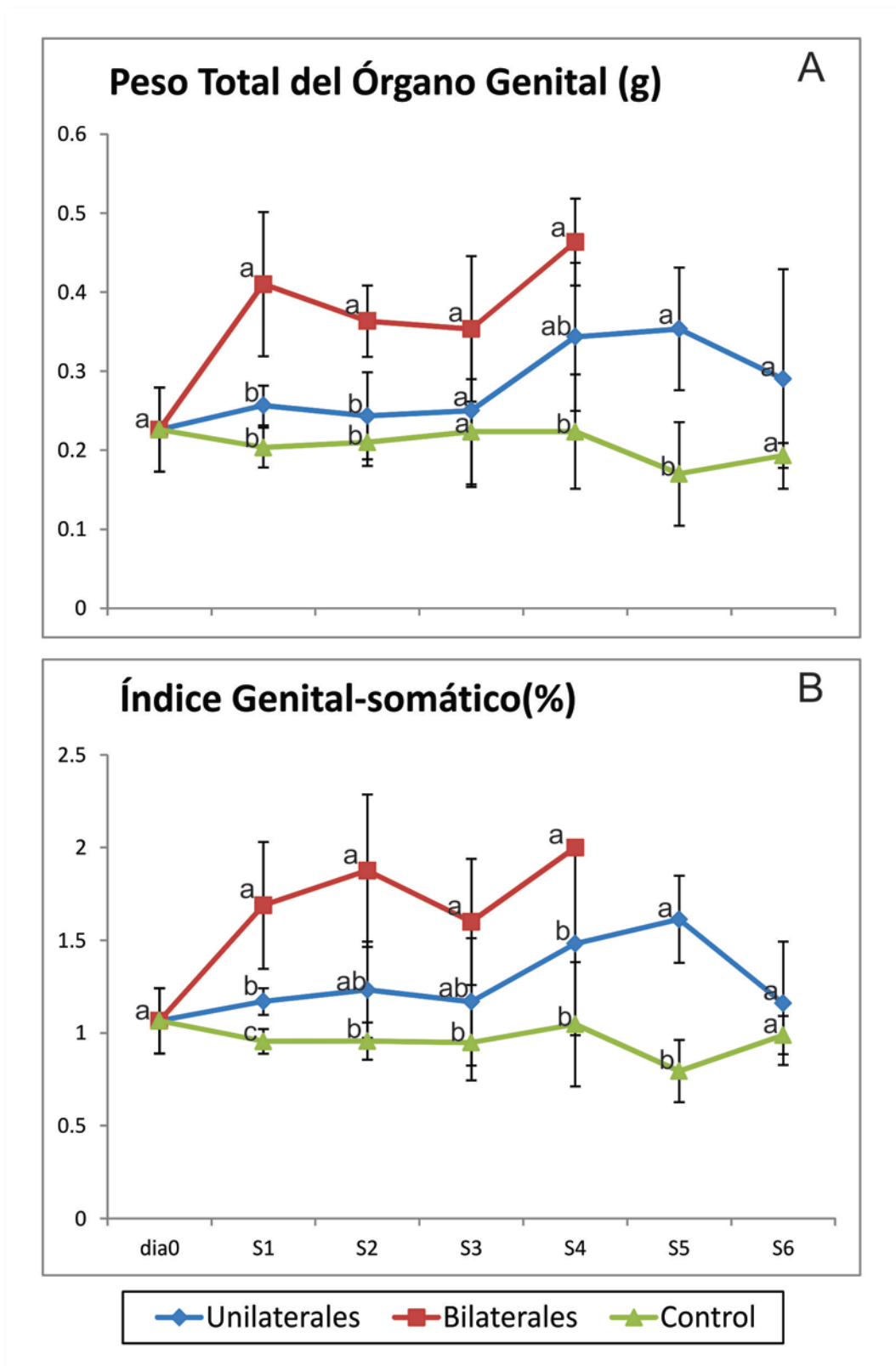


Figura 30. Comparación del peso del órgano genital e índice genital-somático entre camarones ablacionados unilateralmente, bilateralmente y controles. Semana (S). Letras minúsculas diferentes denotan una diferencia significativa.

Al ajustar el peso del testículo con respecto al peso corporal, el índice gonadosomático del grupo bilateral mostró un incremento significativo en la primera ($p=0.01$), segunda ($p=0.01$) y cuarta ($p=0.01$) semanas de cultivo, respecto a los grupos unilateral y control, mientras que en la tercera semana no existió una diferencia significativa entre los tres grupos ($p=0.66$) (Figura 31 B). Cabe señalar que tanto en el peso testicular así como en el índice gonadosomático del grupo control mostró una oscilación bien marcada: de forma descendente durante las primeras dos semanas, ascendente durante la tercera y cuarta, y descendente durante la quinta y sexta semanas (Figura 31 A y B).

Los resultados del peso del vaso deferente mostraron que no es sino hasta la cuarta semana que existió un incremento similar entre los grupos ablacionados, los cuales fueron significativamente más altos que el control ($p=0.01$) y que se mantuvieron de esta forma una semana posterior en el grupo unilateral, disminuyendo a valores similares en la sexta semana (Figura 32 A). Al ajustar el peso del vaso deferente con respecto al peso corporal, el índice del vaso deferente-somático mostró un patrón muy similar al anterior (Figura 32 B). El peso del espermatóforo mostró una tendencia ligera de incremento hacia la cuarta semana de cultivo, seguida de una ligera disminución hacia la sexta semana. Sin embargo, los datos no mostraron una diferencia significativa ($p=0.93$) en los tres grupos (Figura 33 A). El conteo de espermatozoides mostró que solamente en la cuarta semana, el grupo bilateral aumento significativamente ($p=0.01$) de 1.5×10^6 cel/espermatóforo al día cero hasta $\sim 6 \times 10^6$ cel/espermatóforo con respecto al grupo unilateral y control, los cuales se mantuvieron en $\sim 2 \times 10^6$ cel/espermatóforo durante las seis semanas de cultivo (Figura 33 B).

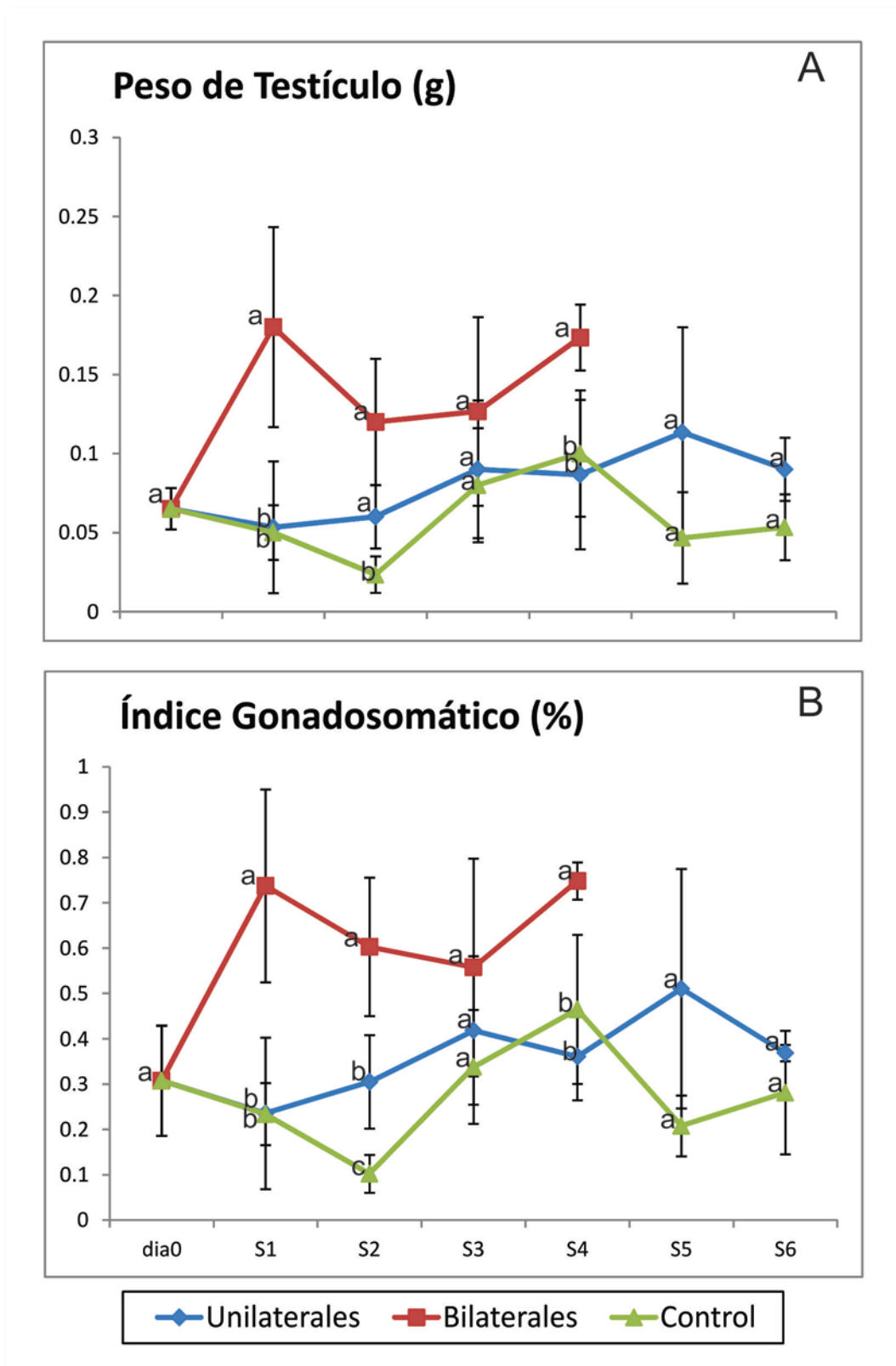


Figura 31. Comparación del peso del testículo e índice gonadosomático entre camarones ablacionados unilateralmente, bilateralmente y controles. Semana (S). Letras minúsculas diferentes denotan una diferencia significativa.

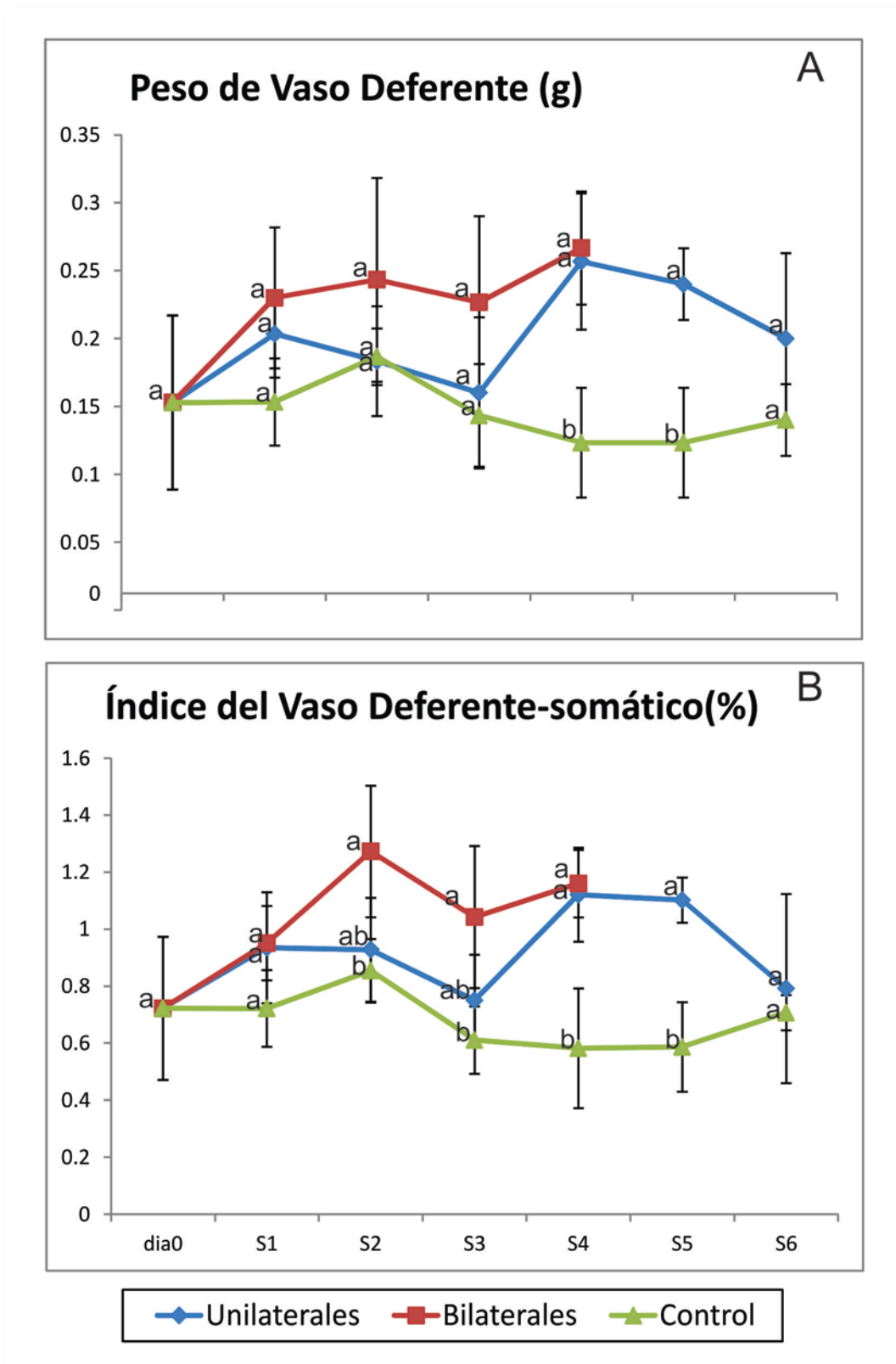


Figura 32. Comparación del peso del vaso deferente e índice vaso deferente entre camarones ablacionados unilateralmente, bilateralmente y controles. Semana (S). Letras minúsculas diferentes denotan una diferencia significativa.

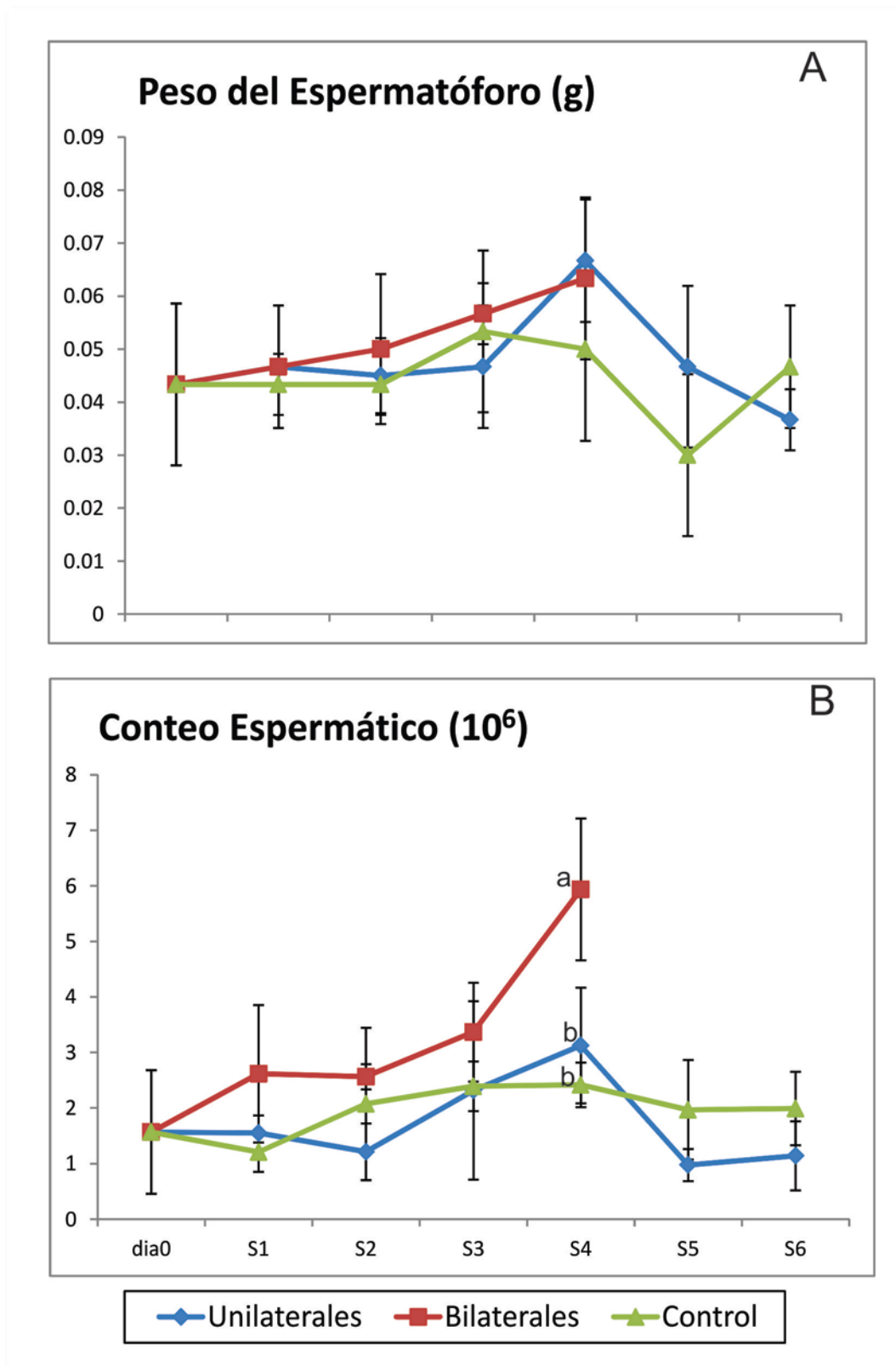


Figura 33. Comparación del peso del espermátforo y conteo espermático entre camarones ablacionados unilateralmente, bilateralmente y controles. Semana (S). Letras minúsculas diferentes denotan una diferencia significativa.

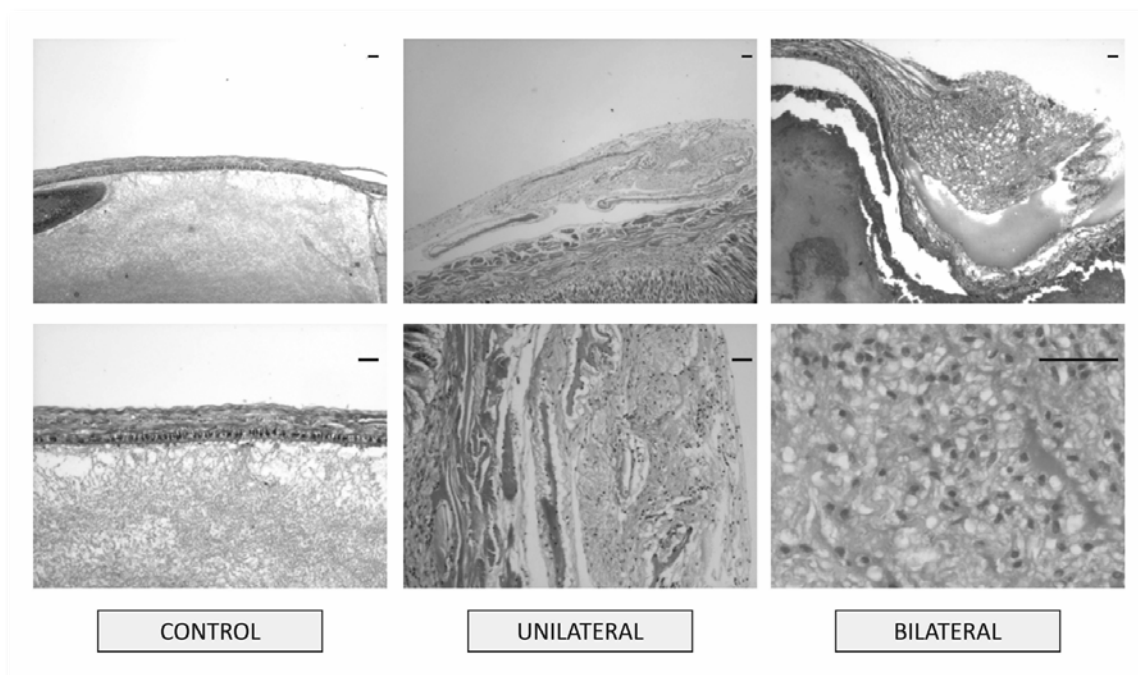


Figura 34. Efecto de la ablación en *L. vannamei*. Cortes histológicos del vaso deferente y GA en el camarón una semana después de la ablación. Barra = 100 μ m.

En los cortes histológicos se logró observar que después de una semana, tanto en el grupo de ablación unilateral como en el grupo bilateral, la GA incrementó el número de células en la parte distal del vaso deferente medio y en el ámpula terminal, lo cual denotó una hiperplasia producida por la ablación (Figura 34).

ANÁLISIS MOLECULAR

Mediante RT-PCR/secuenciación se obtuvo un fragmento de la secuencia de nucleótidos de la hormona de la GA de *L. vannamei* (Lv-IAG) utilizando los oligonucleótidos mono3F-mono3R (Tabla I). Este fragmento de aproximadamente 360 pb (~120 aa), se obtuvo cuando se usó ADNc de tejido de la ámpula terminal (AT) y de la parte distal del vaso deferente medio (dVDM) del camarón macho, como templado para la amplificación (Figura 35).

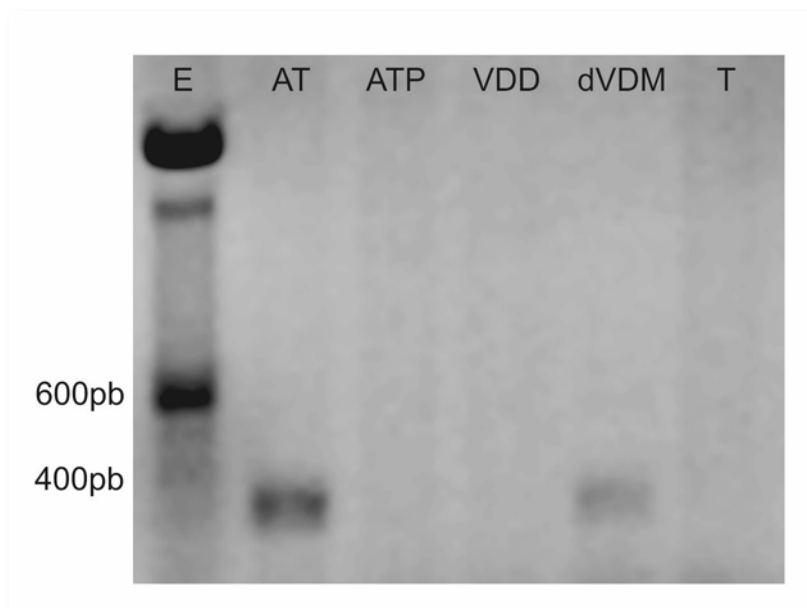


Figura 35. RT-PCR de *L. vannamei* usando como templado ARN total de diferentes tejidos del vaso deferente. Escalera (E), ámpula terminal distal (AT), ámpula terminal proximal (ATP), vaso deferente distal (VDD), parte distal del vaso deferente medio (dVDM, carril 4) y testículo (T). Gel de agarosa-TBE 1.5% teñido con Fast Blast DNA Stain (Bio-Rad).

El análisis de alineamiento de la secuencia nucleotídica de *L. vannamei* realizado con el programa Mega 5.0, mostró que existe un 87% de identidad con aquella reportada para *P. monodon* y un 80% con la de *M. japonicus*. A partir de la secuencia de nucleótidos Lv-IAG se dedujo la secuencia de aminoácidos que mediante análisis de alineamiento (Figura 36) con las secuencias de decápodos reportadas se obtuvo que: con *P. monodon* (GU208677.1) se encontró una identidad del 80%, 76% con *M. japonicus* (AB598415.1), 33% con *C. quadricarinatus* (DQ851163.1), 55% con *M. rosenbergii* (FJ409645), 37% con *M. lar* (AB579012.1), 39% con *P. pelagicus* (HM459854.1), 38% con *C. destructor* (EU718788.1), 30% con *P. paucidens* (AB588013) y 39% con *P. pacificus* (AB588014.1).

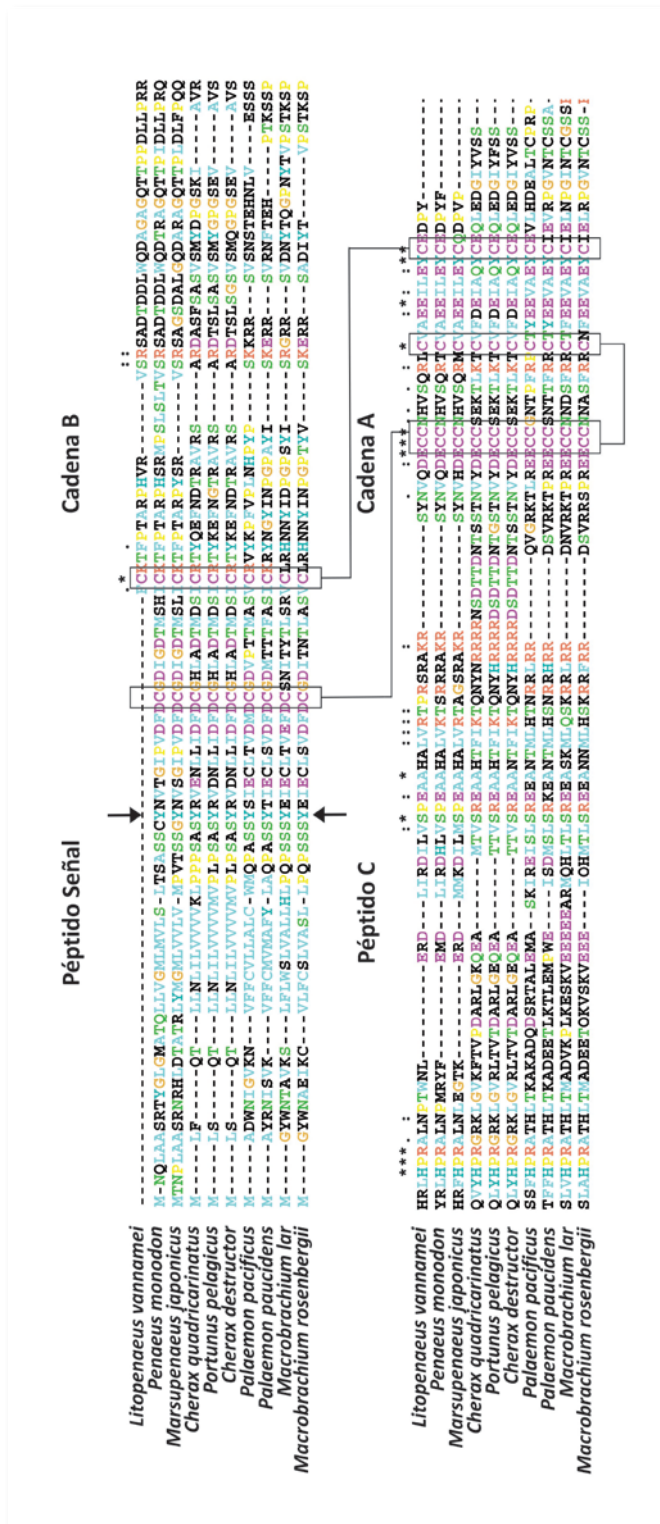


Figura 36. Análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos de la HGA reportadas en decápodos. Las flechas indican el término del péptido señal, en cajas se señalan los residuos de cisteína conservados, y en líneas los puentes de disulfuro predichos (sitios de unión de las cadenas A y B). Análisis realizado con ClustalX ver. 1.8, con parámetros estándar.

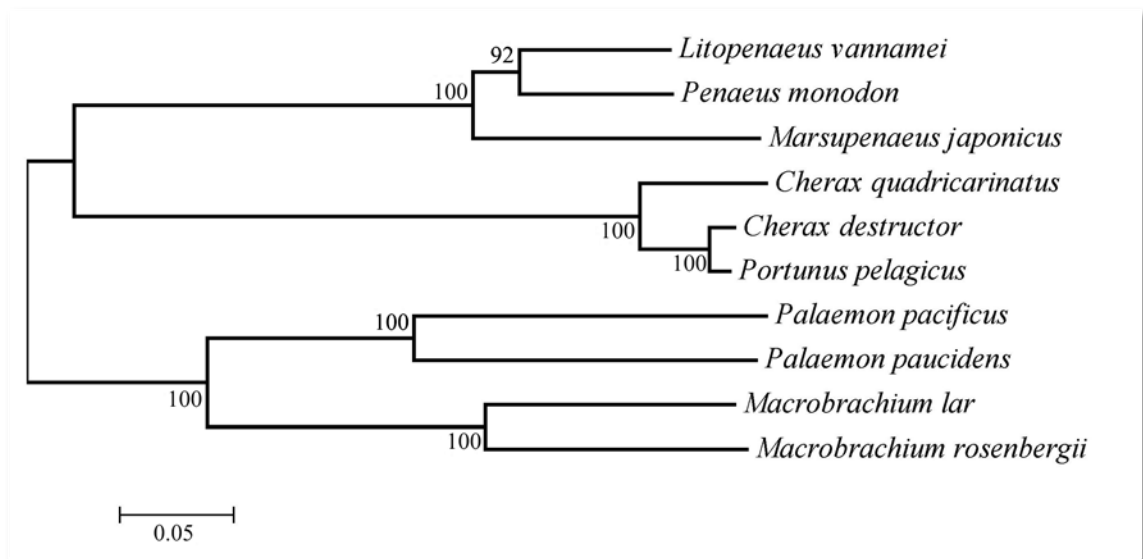


Figura 37. Dendrograma consenso de similitud, sin raíz, basado en las secuencias de aminoácidos de la HGA de *L. vannamei* y otros crustáceos decápodos. Algoritmo Neighbour-Joining (NJ) y método p-distance del programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Soporte estadístico calculado mediante 10,000 réplicas de remuestreo (bootstrap).

DISCUSIÓN

ORGANOGENÉISIS

La anatomía del órgano genital en machos de *L. vannamei* concuerda con las descripciones de *M. japonicus* de Chim (1983) y con las de *L. vannamei* y *L. setiferus* de Chow *et al.* (1991). Sin embargo, el órgano genital de las hembras de *L. vannamei* y, en general, de los peneidos descritos por King (1948) y Dall *et al.* (1990) no concuerdan con nuestras observaciones. Ambos sexos tienen una anatomía básica de lóbulos bilaterales anteriores y lóbulos laterales independientes, acomodados simétricamente a cada lado de un tubo colector en forma de herradura. Aparentemente, esta estructura es única para especies de peneidos (Laubier *et al.*, 1983; Chow *et al.*, 1991), sin embargo, esta anatomía no ha sido estudiada en otras especies.

La descripción de la organogénesis genital aquí detallada, concuerda en lo general, con los pocos estudios acerca de la morfología externa e interna, y de la diferenciación sexual en peneidos (Chim, 1983; Laubier *et al.*, 1983; Charniaux-Cotton y Payen, 1985; Chow *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1992; Campos-Ramos *et al.*, 2006). En ambos sexos, la notoria separación entre el tercer y cuarto lóbulo (ver Figura 19 A en hembras y Figura 18 B en machos) pudiera sugerir que el cuarto lóbulo bilateral se forma junto con las primeras capas de células mesodérmicas que dan la estructura a cada lóbulo gonádico. La regresión de este lóbulo no es clara, dada la dificultad del análisis de todo el órgano genital durante estas primeras etapas de desarrollo; una vez que se desarrolla la gónada en cada sexo, no hay diferencia en el desarrollo de los lóbulos gonádicos. Desde un punto de vista anatómico, la posición física del cuarto lóbulo coincide con el eje más ancho y alto del hepatopáncreas anterior, por lo tanto, si el cuarto lóbulo se desarrollara, sería más largo y externo que los otros lóbulos. En cambio, este lóbulo sufre una regresión, posiblemente por la morfología y desarrollo del hepatopáncreas.

Se sugiere que tanto para *M. japonicus* como para *L. vannamei*, el tiempo en que la postlarva se mantiene indiferenciada es muy corto después de la

metamorfosis larval. De acuerdo a Laubier *et al.* (1983), en PL8 la gónada aparece primeramente como dos masas de células germinales asociadas con células somáticas. En *L. vannamei*, las primeras estructuras gonádicas que se observaron fueron los lóbulos bilaterales anteriores, a partir de PL12; estos autores encontraron el órgano genital completo del macho en PL11. En contraste, nuestra primera identificación del oviducto y de los vasos deferentes ocurre hasta PL16. Sin embargo, la diferenciación sexual externa se lleva a cabo hasta que el camarón alcanza un peso de 0.5 g y una longitud de 45 mm, aproximadamente en PL50, lo cual coincide con el desarrollo de *M. japonicus* (Nakamura *et al.*, 1992). Esta etapa está representada y, hasta cierto punto, en sincronía por el desarrollo externo del tético de la hembra y de los gonoporos del macho, además de la aparición interna de la GA. La organogénesis de la GA en *L. vannamei* comienza en la región lateral-posterior de cada vaso deferente y el ámpula terminal, como se observa en *M. japonicus* (Nakamura *et al.*, 1992). Aparentemente, las células primordias de la GA se diferencian independientemente del tejido conectivo suelto, el que a su vez se diferencia en ambos sexos en tejido adiposo-blanco alrededor del intestino y del hepatopáncreas. Las células de la GA pudieran originarse a partir de las células mesodérmicas que forman el tejido conectivo, el cual mantiene a los lóbulos testiculares debajo del pericardio. La GA está inmersa dentro de un tejido conectivo que interconecta a los vasos deferentes y el octavo lóbulo testicular, detalle no observado previamente en *M. japonicus* (Charniaux-Cotton y Payen, 1985) o en *L. vannamei* (Alfaro, 1994; Campos-Ramos *et al.*, 2006).

De acuerdo con Charniaux-Cotton y Payen (1985), los grupos de células que se acumulan en los lóbulos gonadales son células mesodérmicas, mientras que los oviductos y vasos deferentes crecen a partir del tejido del órgano genital que se diferencia a epitelio columnar. Para PL52 (0.5 g y 45 mm), estos grupos de células forman estructuras tubulares ovaladas donde las gonias se reúnen alrededor de un lumen, lo que indica una zona germinal. De PL68 a PL72 (\approx 2 g y \approx 72 mm), los camarones muestran ovocitos primarios en desarrollo, indicando el tiempo de diferenciación de la gónada, ocho días más tarde de lo que se reporta en *M. japonicus* por Nakamura *et al.* (1992).

Como lo describe King (1948), en machos las espermatogonias se reúnen en la periferia del lóbulo testicular, mientras que en el lumen se acumulan espermátocitos secundarios y espermátidas. De acuerdo con Chow *et al.* (1991), el ciclo de producción de gametos, independiente en cada túbulo seminífero, consta de dos fases características, en donde las células sustentaculares (soporte epitelial) juegan el papel de expandir y contraer el lumen comenzando un nuevo ciclo de producción de espermátocitos primarios por la espermatogonia. Inicialmente, la primera fase, llamada *fase cuerda*, es donde la espermatogénesis esta soportada por las células sustentaculares multifuncionales y generan las espermátidas tardías; posteriormente, en la segunda es la *fase lumen*, es en la que las células sustentaculares se retractan y se alinean para formar una cavidad donde las espermátidas tardías se transfieren al vaso deferente posterior, donde la espermatogénesis continua. De acuerdo a Parnes *et al.* (2006), los machos también tiene un ciclo de muda reproductivo. La masa espermátida-espermatozoide se transporta a lo largo del vaso deferente, envuelta y almacenada en el ámpula terminal, formando el espermatóforo que será expulsado a través de los gonoporos y renovado cada ciclo de muda, si es que no existiera un comportamiento reproductivo.

De acuerdo con Campos-Ramos *et al.* (2006), *L. vannamei* posee un sistema de determinación sexual genético estable no influenciado por condiciones medioambientales. El tamaño de los camarones sirvió de guía para el seguimiento al desarrollo sexual bajo las condiciones de crianza de ese estudio. Sin embargo, también se encontró que la diferenciación externa ocurre durante el mismo tiempo bajo dos condiciones de temperatura diferentes (27° y 32°C), donde el tamaño del camarón fue variable, y que también la diferenciación en condiciones de temperaturas menores (18°C) y condiciones biológicas y ambientales desfavorables pudieran retrasarla. Por lo tanto, el tamaño no debe tomarse como factor para la determinación sexual. Es necesario identificar las estructuras sexuales internas y externas, las cuales se resumen en la figura 17. Aunque la GA es única para malacostracos, existe evidencia que en dos especies de peneidos esta glándula no está involucrada en la diferenciación y determinación sexual, ya que el

sexo se diferencia antes de que esta se desarrolle, poco después de la transformación larval.

Probablemente, la interconexión entre los vasos deferentes y el testículo está relacionada con la espermatogénesis y la maduración del testículo, o algún otro proceso regulatorio de inhibición del ovario, ya que la gametogénesis comienza después de que la GA se forma. Como se muestra en este estudio, ya hay evidencia de que en peneidos, la GA está involucrada con el eje endocrino tallo ocular-GA- testículo, como se reporta para *C. quadricarinatus* (Khalaila *et al.*, 2002).

En langostinos en hembras implantadas con GA se ha observado una inducción de la masculinización, la aparición de características secundarias sexuales y la inhibición de la vitelogénesis; mientras que en machos juveniles la andrectomía induce a la feminización (vitelogénesis). Esta estrategia de inducción de la reversión sexual para producir cultivos monosexuales en langostinos como en *M. roosebergii*, está bien documentada en la literatura (Nagamine *et al.*, 1980a, b; Sagi *et al.*, 1990; Aflalo *et al.*, 2006). En contraste, Li y Xiang (1997) trataron de revertir el sexo en *F. chinensis* sin obtener resultados. Este experimento fallido puede relacionarse con la falta de conocimientos adecuados del proceso de diferenciación sexual en peneidos comparados con los de langostinos. Aún se desconoce si la implantación y andrectomización de la GA en camarones tenga éxito para promover la reversión sexual; ciertamente, trabajos previos y el que aquí se presenta deberán tomarse en cuenta. En este trabajo se concluye que, en ambos sexos de *L. vannamei*, la diferenciación externa se desarrolla alrededor de 15-20 días antes de la diferenciación de la gónada. En teoría, en el camarón blanco cuando se observa la diferenciación externa, cualquier procedimiento quirúrgico de los vasos deferentes o la implantación de GA a las hembras, comprometerá el camino de la diferenciación de la gónada, que es básicamente el mismo principio biotecnológico de reversión sexual utilizado en *M. roosebergii*.

CICLO DE MUDA Y MEIOSIS

En el camarón blanco, las células meióticas en la gónada mostraron las características generales de la primera profase observadas en eucariontes. Los CS de las células gonádicas se obtuvieron bajo la técnica de secado al aire, usando Carnoy como fijador y orceína como tinción, gracias a la alta densidad de cromatina de los bivalentes. Esta técnica fue más fácil de procesar en comparación con la de fijación con paraformaldehído y plata como tinción, lo que es comúnmente utilizado para el estudio de varias especies. En términos de esparcir los núcleos, las técnicas utilizadas fueron útiles para separar los bivalentes. La gran cantidad de bivalentes con un arreglo enredado en el núcleo, no permitió la medición y reconocimiento de cada bivalente, y mucho menos, de un bivalente relacionado con el sexo, si es que existiera. Por este arreglo desordenado de los CS y la baja resolución de las técnicas, no se pudieron observar otras estructuras de los bivalentes, como cinetocoros y placas de anclaje. En ambos sexos, la mayoría de las células meióticas se observaron en paquiteno, reconocida por la completa sinapsis de los bivalentes, lo cual soporta las observaciones histológicas de Heitzmann *et al.* (1993) en machos de *L. vannamei*. Xie *et al.* (2008), al analizar mediante microscopía electrónica de barrido los CS de *F. chinensis* diploides y triploides, observaron el mismo arreglo enredado de bivalentes sin revelar más características. Los autores acentuaron lo extremadamente difícil que es localizar un núcleo bien disperso para analizar. Dado lo anterior, se requiere de una mejora a la técnica en gónada de camarones, específicamente, un método para dispersar los bivalentes.

En este estudio se encontró que en hembras de *L. vannamei* el comienzo de la meiosis I es continuo, por lo tanto, ocurre de manera independiente de la vitelogénesis, la maduración final y el desove, y por consiguiente del ciclo de muda. Hertzler (2005) ha documentado hembras en desove la fase de arresto de los ovocitos en metafase I. De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de organogénesis, el crecimiento primario previtelogénicos en la hembra del camarón blanco ocurre alrededor de PL70, lo cual distingue la diferenciación gonádica de la hembra. Es por eso que se sugiere que la meiosis I ocurre después de la

diferenciación ovárica en juveniles y que el ovario continúa almacenando ovocitos arrestados en el crecimiento previtelogénico. En edad adulta, y bajo condiciones reproductivas, ocurre la maduración del ovocito secundario (vitelogenina) y en el momento del desove, el ovocito continúa con la meiosis. La separación del primer cuerpo polar meiótico es evidente alrededor de los siete minutos después de la ovulación en el camarón blanco (Dumas y Campos-Ramos, 1999). De acuerdo con Bernhard (1990), en la mayoría de los invertebrados existe un arresto de ovocitos en metafase I, incluyendo artrópodos, anélidos y algunos moluscos y tunicados. Algunos reportes indican que en decápodos hembras, la meiosis I en los ovocitos comienza en el momento del desove (Qiu, 1986; Yano, 1988); esto todavía se encuentra en controversia y requiere de confirmación.

El presente estudio, también confirma que en machos la meiosis (espermatogénesis) de *L. vannamei* es continua, y no se relaciona con las etapas de muda, lo cual concuerda con las observaciones de Heitzmann *et al.* (1993). Por lo tanto, la producción de gametos por la meiosis (no relacionado con la muda) y la liberación del esperma caduco (relacionado con la muda) son dos procesos fisiológicos diferentes (Heitzmann *et al.*, 1993; Parnes *et al.*, 2006). En otros decápodos, como en el langostino *M. rosenbergii* de morfotipo tenaza roja, la síntesis de ADN en testículo en la etapa de pre-muda es al menos tres veces mayor cuando se compara con la etapa de inter-muda del morfotipo tenaza azul (Sagi *et al.*, 1988, 1991). También en esta especie, las etapas de la profase I coinciden con los estadios de la muda (Poljaroen *et al.*, en prensa). Por lo tanto, no existe ninguna regla general que indique que la espermatogénesis es continua en todas las especies de decápodos.

El genoma diploide en el camarón blanco está compuesto por 88 cromosomas (Campos-Ramos, 1997), y su número haploide consta de 44 bivalentes (Chow *et al.*, 1990; Campos-Ramos, 1997; Alcivar-Warren *et al.*, 2006). De acuerdo a Campos-Ramos (1997), el cariotipo tentativo es $4m + 10sm + 56st + 18t$. La mayoría de estos cromosomas son subtlocéntricos y telocéntricos (37 pares), los cuales aparentemente tienen una configuración de anillo durante la fase temprana de diploteno lo que representa dos intercambios o “crossovers” por

bivalente por meiosis. Los otros siete pares de cromosomas que presentan una configuración tipo “v” y donde ocurre un solo intercambio, pudieran ser metacéntricos o submetacéntricos. Estas observaciones sugieren que en ambos sexos existe recombinación en la mayoría de los bivalentes, lo que es un escenario común en animales gonocóricos, ya que la meiosis aquiasmatica raramente se presenta. Marcadores ligados al sexo mapeados en el genoma materno de *M. japonicus* (Li *et al.*, 2003b) y de *L. vannamei* (Zhang *et al.*, 2007) sugieren que existe un bivalente involucrado a la determinación sexual, lo que implica que la hembra es el sexo heterogamético en estas especies.

La determinación sexual en crustáceos gonocóricos es principalmente a través de cromosomas sexuales (Charniaux-Cotton, 1960; Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton, 1982). Se ha encontrado evidencia de genes ligados al sexo mediante el fenotipo ojo-blanco de la *Artemia franciscana* (Kellogg) bisexual, el cual está ligado al sexo de la hembra en el cromosoma W (Bowen, 1963; 1965; Bowen *et al.*, 1966). Entre los cromosomas, la recombinación obligada es durante la profase I (paquiteno), mientras que la restauración del cigoto diploide WZ toma lugar durante la segunda división meiótica en *Artemia parthenogenetica* (Bowen y Sterling, 1978; Campos-Ramos *et al.*, 2006b). Al parecer, en langostinos y camarones peneidos, también es común la determinación sexual de tipo WZ.

En camarones marinos, como *F. chinensis* (Li *et al.*, 2003a) y *M. japonicus* (Coman *et al.*, 2008) se ha logrado exitosamente la inducción a la triploidía. Li *et al.* (2003a) observaron un sesgo hacia hembras en proporción 4:1 en camarones triploides. Coman *et al.* (2008) observaron una población triploide de puras hembras y plantearon que no era posible explicar el mecanismo de determinación sexual, como se describe en peces. Ellos propusieron un cromosoma W sobredominante y un genotipo letal ZZZ. Esta explicación pareciera controversial ya que el camarón macho triploide si existe, como se encontró en *F. chinensis* con citometría de flujo (Li *et al.*, 2003a) y con el análisis de CS (Xie *et al.*, 2008). Una alternativa a la hipótesis de los genotipos dominantes y letales, es la recombinación entre cromosomas sexuales, ya que explica mejor el sesgo en la proporción hacia hembras, como se muestra en especies de peces que tiene un

sistema WZ/ZZ, e. g., la tilapia azul *Oreochromis aureus* (Steindachner) (Penman *et al.*, 1987; Mair *et al.*, 1991). En cualquier caso, la proporción de sexos en triploides sugiere la existencia de un cromosoma sexual en peneidos, requiriendo futuras investigaciones de determinación sexual.

ABLACION DEL TALLO OCULAR E HIPERTROFIA DE LA GLÁNDULA ANDROGÉNICA

Derivados de los experimentos de ablación, los resultados mostraron un incremento del peso del órgano genital muy acentuado, en donde el peso del testículo se incrementó significativamente en los grupos unilateral y bilateral, principalmente durante las dos primeras semanas de cultivo. Este resultado, conjuntamente con la hipertrofia de la GA, conlleva a sugerir que las espermatogonias fueron estimuladas por una hiperactividad de la GA, que fue desinhibida de la acción regulatoria de la glándula sinusal. Entonces, en este proceso, las espermatogonias entran en actividad mitótica para la producción de más espermatogonias y espermatocitos primarios, los que continuaron con la espermatogénesis. De esta manera, el incremento en peso del testículo se debió a un incremento en células germinales y meióticas, lo que demuestra un eje endocrino glándula sinusal-GA-testículo. Sin embargo, para la cuarta semana de cultivo, los camarones bilaterales ya habían muerto por lo que no fue posible continuar con el seguimiento experimental. El grupo unilateral tuvo una mejor supervivencia y mostró que para la quinta y sexta semanas, el peso del testículo fue similar al de los controles, lo que sugiere que la estimulación temprana de la GA es temporal y, subsecuentemente, la espermatogénesis disminuye o bien se deteriora. Estas observaciones están de acuerdo con Khalaila *et al.* (2002) quienes documentaron un incremento en el tamaño de la GA de *C. quadricarinatus* después de la primera semana de ablación bilateral. Posteriormente, el peso de la GA disminuyó sustantivamente al término de la tercera semana, en comparación con langostinos controles. El incremento en el peso de los vasos deferentes se atribuyó a que las espermátidas producidas en los lóbulos testiculares, por la estimulación de espermatogonias, continuaron su desarrollo en los vasos deferentes. Cabe

resaltar que no fue hasta la cuarta semana que se observó un incremento similar en los grupos ablacionados, que fue significativamente más alto que el del control. El incremento del peso de los vasos deferentes coincidió con el incremento de esperma en el espermatóforo del grupo bilateral, lo que significa que la masa espermática se desarrolló desde los vasos deferentes y terminó como espermatóforo. Sin embargo, esto no ocurrió con el grupo unilateral; se sugiere que la masa espermática permanece en los vasos deferentes durante la quinta y sexta semanas, y que la formación del espermatóforo ocurriere quizás a partir de la séptima semana. En este sentido, el grupo unilateral tendería a un mayor tiempo de respuesta en la producción de esperma con respecto al grupo bilateral.

Los resultados del grupo control mostraron una oscilación en la espermatogénesis en el contexto de que la producción de gametos disminuyó en la primera y segunda semanas en los lóbulos testiculares, lo cual corresponde a la transferencia de espermátidas a los vasos deferentes durante la segunda semana, volviendo a incrementarse hacia la cuarta semana para volver a disminuir hacia la sexta semana, posiblemente con el proceso de renovación de espermatóforo a través de la muda. Esta oscilación se observó invertida en el grupo bilateral a durante las cuatro semanas, mientras que no fue del todo oscilante en el grupo unilateral. Se observa que el peso del espermatóforo no es un indicador de cambio. Sin embargo, esto se pudo deber a que la concentración de esperma no fue mayor a los 5 o 6 millones en el grupo bilateral, con respecto a los grupos unilateral y control. Cabe mencionar que la concentración de esperma de un reproductor macho de 35 g en condiciones reproductivas, fluctúa alrededor de los 20 millones de esperma por espermatóforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985). Los pesos y conteos que reporta Ceballos-Vásquez *et al.* (2003), con camarones de 12 meses de edad (38 g) coinciden con los datos obtenidos en los controles de este estudio. Sin embargo, Ceballos-Vásquez *et al.* (2004), observaron una concentración de esperma de entre 25 y 30 millones por espermatóforo en camarones reproductores, lo cual es mucho mayor en comparación con nuestras muestras. Los autores discuten que el conteo espermático pudiera estar relacionado con el peso y no con la edad, por consiguiente la calidad espermática depende de las

condiciones de los cultivos (alimentación, temperatura y densidad). Alfaro y Lozano (1993), encontraron en camarones ablacionados unilateralmente un incremento significativo en el conteo espermático en espermatóforo con respecto a controles, lo cual no coincide con nuestros resultados; sin embargo, en este estudio se observó una tendencia al incremento en el conteo de esperma hacia la séptima semana.

ANÁLISIS MOLECULAR

El éxito en la obtención de amplicones (por RT-PCR) a partir de ARN total de la ámpula terminal de *L. vannamei* concuerda con los resultados obtenidos con planteamientos metodológicos similares en *C. quadricarinatus* (Manor *et al.*, 2007) y *P. monodon* (Mareddy *et al.*, 2011). Sin embargo, en *M. japonicus* (Banzai *et al.*, 2011), el amplicón que corresponde al precursor de la GA se obtuvo a partir de ARN total de la ámpula terminal distal, el ámpula terminal proximal, del vaso deferente distal y de la parte distal del vaso medio. En *L. vannamei* se usó ARN total de ATD y dVDM, pero no se obtuvieron productos usando tejidos de ATP y VVD. De acuerdo a las observaciones histológicas reportadas en este trabajo, la GA se observa con un mayor tamaño en la parte distal del ámpula terminal en comparación con el vaso deferente distal y medio, por lo que es posible que la obtención de amplicones sea más factible al usar este tejido o este influenciada por el estado reproductivo del camarón disectado.

Dado que el vaso deferente distal es un tubo delgado y atraviesa el músculo torácico-abdominal, la GA se presenta como una cuerda muy delgada, que conecta y comunica la parte mayor y más ancha (que se encuentra en el ámpula terminal) con la parte ubicada en la parte distal del vaso deferente medio, dándole una forma de “auriculares”. En la secuencia de aminoácidos traducida de camarón blanco que se muestra alineada con nueve secuencias de precursores de la hormona de la GA en decápodos en la Figura 26), se puede observar la estructura típica de los miembros de la familia de las tipo-insulinas, conformadas por una cadena A, los

residuos de cisteína (C) en posición, uno doble y dos sencillos; una cadena B y entre ellas un péptido C.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (obtenida y deducida, respectivamente) mostraron mayor identidad con aquellas de *P. monodon* y *M. japonicus* que con las de los demás decápodos reportados, y las relaciones que se muestran en el dendrograma (Figura 37), concuerdan desde el punto de vista filogenético, ya que *L. vannamei*, *P. monodon* y *M. japonicus* son de la familia Penaeidae, *C. quadricarinatus* y *C. destructor* de la familia Parastacidae, *P. pacificus* de la familia Palaemonidae y *P. pelagicus* de la Portunidae.

Con los genes de la familia Pro-insulina reportados, que aparentemente solo se expresan en la GA de machos decápodos, se podrá demostrar el proceso molecular de la diferenciación sexual, con la finalidad de generar de nuevas estrategias técnicas para la reversión sexual en camarones comerciales. Desde una perspectiva de regulación genética, este estudio pudiera tener implicaciones importantes, ya que permitiría establecer con detalle el desarrollo, diferenciación y cambios estructurales del órgano genital en futuras investigaciones moleculares aplicados a la acuicultura.

CONCLUSIONES

- En *L. vannamei* el periodo de indiferenciación sexual comprende las primeras dos semanas como postlarva (PL12-PL16).
- El órgano genital de la hembra del camarón blanco comprende bilateralmente 1 lóbulo anterior, 8 laterales, 1 oviducto y 1 lóbulo posterior.
- El órgano genital del camarón blanco macho comprende bilateralmente 1 lóbulo anterior, 7 laterales y 1 conducto deferente.
- La GA comienza a formarse a partir PL48 y se encuentra interconectada en un tejido conectivo entre la base del bulbo eyaculador (CDM) y el 8º lóbulo testicular.
- En camarón blanco, la gónada se diferencia, ya sea en ovario o testículo, a partir de PL72.
- En *L. vannamei* la meiosis no es regulada por el ciclo de muda en ambos sexos.
- La ablación unilateral y bilateral del tallo ocular en camarón blanco provoca la hiperplasia de la GA.
- Se sugiere la existencia de un eje endócrino Tallo ocular (Eje órgano x/ glándula sinusal)- GA-Testículo en camarón blanco.
- La secuencia nucleotídica del precursor de la hormona de la GA del camarón blanco es similar a la de los peneidos.
- La secuencia de aminoácidos del precursor de la hormona producida por la GA del camarón blanco es similar en estructura a la de los demás decápodos y corresponde al grupo de las tipo-insulina (insulin-like).

RECOMENDACIONES

La continuación lógica de estos estudios deberá ser la caracterización del gen que codifica la hormona de la GA en *L. vannamei*, como punto de partida para futuros trabajos que involucren la dinámica de expresión del gen durante la diferenciación sexual así como su efecto con la ablación del pedúnculo ocular.

Se recomienda la elaboración de sondas moleculares para su uso en trabajos encaminados a la localización de los sitios de síntesis de la GA en tejidos, así como para intentar la localización del gen en cromosomas meióticos, que ayuden a determinar la existencia de posibles cromosomas sexuales.

Mediante el conocimiento de la secuencia de este gen es posible la generación de ARN de interferencia (ARNi) con el que se pudiera bloquear la expresión del gen que codifica la hormona de la GA, teniendo como objetivo la reversión sexual del camarón blanco.

LITERATURA CITADA

- Abdu, U., C. Davis, I. Khalaila, y A. Sagi. (2002). The vitellogenin cDNA of *Cherax quadricarinatus* encodes a lipoprotein with calcium binding ability, and its expression is induced following the removal of the androgenic gland in a sexually plastic system. *General and Comparative Endocrinology* 127: 263–272.
- Adiyodi K. G. y R. G. Adiyodi. (1970). Endocrine control of reproduction in decapod crustacean. *Biological Reviews* 45:121–164.
- Aflalo, E.D., T. Hoang, V. H. Nguyen, Q. Lam, D.M. Nguyen, Q.S. Trinh, S. Raviv y A. Sagi. (2006). A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 256: 468–478.
- Alberts, B; A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. (2002) “Molecular Biology of the Cell”. Garland Science. 4a edición. New York. 1,392 pp.
- Alcivar-Warren, A., D. Meehan-Meola, Y. Wang, X. Guo, L. Zhou, J. Xiang, S. Moss, S. Arce, W. Warren, Z. Xu y B. Kireina. (2006). Isolation and mapping of telomeric pentanucleotide (TAACC)_n repeats of the pacific white leg shrimp, *Penaeus vannamei*, using fluorescence in situ hybridization. *Marine Biotechnology* 8 (5): 467:480.
- Alfaro, J. (1994). Ultraestructure of the androgenic gland, spermatogenesis and oogenesis in marine shrimps (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical* 42 (2): 121-129.
- Alfaro, J. y X. Lozano. (1993). Development and Deterioration of Spermatophores in Pond-Reared *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 24: 522–529.
- Alfaro, J., G. Zuniga y J. Komen. (2004). Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and a dopamine antagonist,

spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 236: 511-522.

- Anónimo. (1999). Shrimp gene difficulties. *Fish Farming International*. 27 (8): 5.
- Banzai, K., N. Ishizaka, K. Asahina, K. Suitoh, S. Izumi y T. Ohira. (2011). Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*; and analysis of its expression. *Fisheries Science* 77(3): 329-335.
- Barki, A., I. Karplus, I. Khalaila, R. Manor y Sagi A. (2003). Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish. *Journal of Experimental Biology*. 206, 1791-1797.
- Bell T.A. y D.V. Lightner. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology. Allen Press, Kansas, USA.
- Bernhard, J. (1990). Meiosis, En: P. W. Barlow, J. B. L. Bard, y D. L. Kirk (eds.), Developmental and Cell Biology Series. Cambridge University Press.
- Bowen, S. (1963). The genetics of *Artemia salina*. 11. White, a sex-linked mutation. *The Biological Bulletin* 124: 17-23.
- Bowen, S. (1965) The Genetics of *Artemia salina*. V. Crossing over between the X and Y Chromosomes. *Genetics* 52(3): 695–710.
- Bowen, S. y G. Sterling. (1978). Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 *Artemia* populations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 61 (4): 593-595.
- Bowen, S., J. Hanson, P. Dowling y M-C. Poon. (1966). The genetics of *Artemia salina*. VI. Summary of mutations. *The Biological Bulletin* 131: 230-250.
- Campos-Ramos, R. (1997). Chromosome studies on the marine shrimps *Penaeus vannamei* and *P. californiensis* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 17(4): 666-673.

- Campos-Ramos, R., A. M. Maeda-Martínez, H. Obregón-Barboza, G. Murugan, y D. A. Guerrero-Tortolero. (2006b). First report of gynandromorphy in parthenogenetic artemia (branchiopoda: anostraca). *Journal of Crustacean Biology* 26(2):107-112.
- Campos-Ramos, R., R. Garza-Torres, D. A. Guerrero-Tortolero, A. M. Maeda-Martínez y H. Obregón-Barboza. (2006). Environmental sex determination, external sex differentiation and structure of the androgenic gland in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 37(15): 1583–1593.
- Campos-Ramos, R., S. C. Harvey, J. S. Masabanda, L. Carrasco, D.K. Griffin, B. J. McAndrew, N. R. Bromage y D. J. Penman. (2001). Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis. *Genetica* 111: 142-153.
- Carpenter, A. T. C. (1979). Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92: 511-541.
- Ceballos-Vázquez, B. P., B. Aparicio-Simón, E. Palacios y I. S. Racotta (2004). Sperm quality over consecutive spermatophore regenerations in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 35: 178–188.
- Ceballos-Vázquez, B. P., C. Rosas y I. S. Racotta. (2003). Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 228: 141-151.
- Chang, E. S. y W. R. Kaufman. (2005). Endocrinology of Crustacea and Chelicerata. *En: Comprehensive molecular insect science*. Elseviere B. V., Oxford, 805—842.
- Charniaux-Cotton, H. (1953). Étude du déterminisme des caractères sexuels secondaires par castration chirurgicale et implantation d'ovaire chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*). *Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences* 236: 141-143.

- Charniaux-Cotton, H. (1954). Discovery in an amphipod crustacean (*Orchestia gammarella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences* 239(13): 780-2.
- Charniaux-Cotton, H. (1960). Sex determination. In: *The Physiology of Crustacea, Vol. I, Metabolism and Growth* (ed. by H.W. Talbot), pp. 441- 447. Academic Press, New York.
- Charniaux-Cotton, H. y G. Payen. (1985). Sex differentiation. In: *The Biology of Crustacea. Vol. 9. Integuments, Pigments and Hormonal Processes*. pp. 217-299. Academic Press, New York, USA.
- Charniaux-Cotton, H. y G. Payen. (1988). Crustacean reproduction. In: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. pp. 279-303. Alan R. Liss, Inc.
- Chim, L. (1983). La morphogénèse sexuelle, la gamétogénèse et leur contrôle neurohormonal chez la Crevette *Penaeus japonicus* Bate utilisation de l'aspartate transcarbamylyase comme indice de croissance de l'appareil génital. Thèse de 3è cycle, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 107 pp.
- Chomczynski P. y N. Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, (1): 156-159.
- Chow, S. y P.A. Sandifer. (1991). Differences in growth, morphometric traits and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. *Aquaculture* 92, 165-178.
- Chow, S., W. J. Dougherty y P.A. Sandifer. (1991). Unusual testicular lobe system in the white shrimps, *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1761) and *P. vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaeidae); a new character for Dendobranchiata? *Crustaceana* 60, 304–318.
- Chow, S., W.J. Dougherty y P.A. Sandifer. (1990). Meiotic Chromosome Complements and Nuclear DNA Contents of Four Species of Shrimps of the Genus *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology* 10: 29-36.

- Coman, F. E., M. J. Sellars, B. J. Norris, G. J. Coman y N. P. Preston. (2008). The effects of triploidy on *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate) survival, growth and gender when compared to diploid siblings. *Aquaculture* 276: 50-59.
- Cronin, L. E. (1947). Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathburn. *Journal of Morphology and Embryology* 81: 209-239.
- Dall, W., B.J Hill, P.C. Rothlisberg, y D.J. Sharples. (1990). *The Biology of the Penaeidae. Advances in Marine Biology*, Vol. 27. 487p. Academic Press, London.
- de Oliveira-Cesar, J. R., B. Zhao, S. Malecha, H. Ako y J. Yang. (2006). Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture* 261:688-694.
- Dumas S., y R. Campos-Ramos. (1999). Triploidy induction in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 30:621-624.
- Fawcett, D. W. (1956). The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *Journal of Biophysics, Biochemistry, and Cytology* 2: 403-406.
- Fowler, R. J. y B.V. Leonard. (1999). The structure and function of the androgenic gland in *Cherax destructor*. *Aquaculture* 171: 135-148.
- Garza-Torres, R. (2006). Determinación sexual medioambiental, diferenciación sexual externa y estructura de la glándula androgénica en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Tesis de Maestría. La Paz, B. C. S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 85pp.
- Garza-Torres, R., R. Campos-Ramos, y A. M. Maeda-Martínez. (2009). Organogenesis and subsequent development of the genital organs in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 296: 136-142.
- Garza-Torres, R., A. M. Maeda-Martínez, D. A. Guerrero-Tortolero, H. Obregón-Barboza y R. Campos-Ramos (2011). Description of meiosis in

female and male Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology* 31 (1): 75:81.

- Ginsburger-Vogel, T. y H. Charniaux-Cotton. (1982). *Sex determination. The Biology of Crustacea. Vol 2.* Academic Press Inc., New York, USA.
- Hansford, S.W. y D.R. Hewitt. (1994). Growth and nutrient digestibility by male and female *Penaeus monodon*: evidence of sexual dimorphism. *Aquaculture* 125: 147-154.
- Hasegawa, Y., K. Haino-Fukushima y Y. Katakura. (1991). An immunoassay for the androgenic gland hormone of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Invertebrate Reproduction and Development* 20:59–66.
- Heitzmann, J.C., A. Diter y AQUACOP. (1993). Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture* 116: 91-98.
- Hertzler, P.L. (2005). Timing of meiotic maturation and first mitosis in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 36: 570-576.
- Holland, H., y D. Skinner. (1976). Interactions between molting and regeneration in the land crab. *The Biological Bulletin*.150: 222-240.
- Hopkins, P. (1984). Growth and regeneration patterns in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *The Biological Bulletin* 163: 301-319.
- Howard D.W. y C.S. Smith. (1983). Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole, Massachusetts.
- Howell, W. M., y D. A. Black. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1- step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191: 191-208.
- Jixun, D., Z. Quanqi, y B. Zhenmin. (1989). Karyotype studies on *Penaeus orientalis*. *Journal of Ocean University of Quindao* 19: 97-103.

- Katakura, Y. (1961). Hormonal control of development of sexual characters in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. *Annotationes Zoologicae Japonenses* 34:197–199.
- Katakura, Y. y Y. Hasegawa. (1983). Masculinization of females of the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, following injections of an active extract of the androgenic gland. *General and Comparative Endocrinology* 48:57–62.
- Katakura, Y., Y. Fujimaki y K. Unno. (1975). Partial purification and characterization of androgenic gland hormone from the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. *Annotationes Zoologicae Japonenses* 48:203–209.
- Khalaila, I. R. Manor, S. Weil, Y. Granot, R. Keller y A. Sagi. (2002). The eyestalk–androgenic gland–testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology* 127 (2): 147-156
- Khalaila, I., T. Katz, U. Abdu, G. Yehezkel y A. Sagi. (2001). Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology* 121, 242-249.
- King, J. E. (1948). A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *The Biological Bulletin* 94: 244-262.
- Laubier, A., L. Chim y G. G. Payen. (1983). Morphogenesis sexuelle et regulation hormonale de l'activite genitale chez la crevette *penaeus japonicus* en elevage. *Bases biologiques de l'aquaculture* 1: 195-206.
- Laufer, H., M. Landau, D. W. Borst, y E. Homola. (1987). Methyl farnesoate: its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean. *Insect Biochemistry* 17, 1123–1127.
- Legrand, J. J. (1955). Rôle endocrinien de l'ovaire dans la différenciation des oostégites chez les Crustacés Isopodes terrestres. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 241:1083–1087.
- Leung-Trujillo, J. R. y A. L. Lawrence. (1985). The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Mariculture Society* 16: 258–266.

- Leung-Trujillo, J. R. y A. L. Lawrence. (1987). Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65:363-370.
- Li, F. y J. Xiang. (1997). Preliminary studies on form, structure and function of androgenic gland in *Penaeus chinensis*. *Chinese Science Bulletin* 42: 499–503.
- Li, F. y J. Xiang. (2002). Study on early sex differentiation of *Penaeus chinensis*. *Studia Marina Sinica/Haiyang Kexue Jikan* 44: 101-105.
- Li, F., J. Xiang, X. Zhang, L. Zhou, Ch. Zhang y Ch. Wu. (2003a). Gonad development characteristics and sex ratio in triploid Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Marine Biotechnology* 5: 528-535.
- Li, Y., K. Byrne, E. Miggiano, V. Whan, S. Moore, S. Keys, P. Crocos, N. Preston y S. Lehnert. (2003b). Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219: 143-156.
- Loidl, J. (1994). Cytological aspects of meiotic recombination. *Experientia* 50: 285-294.
- Lumare, F., G. Scordella y V. Zonno. (1998). Morphometric study of *P. monodon* Fabricius, 1798, farmed in a fishery Valle of the Po River Delta (north east coast of Italy). *Oebalia Taranto* 24: 131-143.
- Lutz, C. G. (2008). Practical Genetics for Aquaculture, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 235pp.
- Mair, G. C., A. G. Scott, D. J. Penman, D. O. F. Skibinski, y J. A. Beardmore. (1991). Sex determination in the genus *Oreochromis*: 2. Sex reversal, hybridisation, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* Steindachner. *Theoretical Applied Genetics* 82: 153-160.
- Manor, R., S. Weil, S. Oren, L. Glazer, E. D. Aflalo, T. Ventura, V. Chalifa-Caspi, M. Lapidot y A. Sagi. (2007). Insulin and gender: An insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of male crayfish. *General and Comparative Endocrinology* 150: 326-336.
- Mareddy, V. R., O. Rosen, H. B. Thaggard, R. Manor, A. V. Kuballa, E. D. Aflalo, A. Sagi, B. Paterson y A. Elizur. (2011). Isolation and characterization of the

complete cDNA sequence encoding a putative insulin-like peptide from the androgenic gland of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 318 (3-4): 364-370.

- Martin, G., O. Sorokine, M. Moniatte, P. Bullet, C. Hetru y A. VanDorselaer. (1999). The structure of glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillium vulgare*. *European Journal of Biochemistry* 262: 727-736.
- Martínez-Córdova, L. R. (2002). Camaronicultura: Avances y tendencias. AGT EDITOR.S.A. México. 180pp.
- Mohan, R. y M. Siddeek. (1995). Biology of Indian white shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards (Decapoda, Penaeidae) in the Gulf of Masira, Sultanate of Oman. *Archiv für Hydrobiologie* 135(2):259-270.
- Moses, M. I. (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *Journal of Biophysics, Biochemistry, and Cytology* 2: 215-218.
- Nagamine, C. y A.W. Knight. (1987). Masculinization of female crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *International Journal of Invertebrate Reproduction* 11:77-85.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti y G. Paxman. (1980b). Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), by androgenic gland implantation. *General and Comparative Endocrinology* 41: 442-457.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti y G. Paxman. (1980a). Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a non hermaphroditic decapod. *General and Comparative Endocrinology* 41: 423-441.
- Nagasawa, H., Y. Hasegawa, K. Haino-Fukushima, H. Hatayama, T. Yanagisaway Y. Katakura. (1995). Isolation and structural determination of seminal vesicle-specific peptides of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 59:1246-1250.

- Nakamura, K., N. Matsuzaki and K. Yonekura. (1992). Organogenesis of genital organs and androgenic gland in kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2261-2267.
- Okumura, T. (2004). Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *Japan Agriculture Research* 38 (1) 49-54.
- Okumura, T. y K. Aida. (2000). Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Sciences* 66: 678-685.
- Okumura, T. y M Hara. (2004). Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zoological Society of Japan* 21(6):621-628.
- Okuno, A., Y. Haseaga, Y. Katakura y H. Nagasawa. (1999). Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the terrestrial isopod *Armadillium vulgare*. *Biochemecial and Biophysical Research Communications* 264: 419-423.
- Parnes, S., Raviv, S., Scechter, A., Sagi, A. (2006). Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *Journal of Experimental Biology* 209: 4974-4983.
- Penman, D. J., M. S. Shah, J. A. Beardmore, y D. O. F. Skibinski. (1987). Sex ratios of gynogenetic and triploid tilapia. pp. 267-276. In, K. Tiews (ed.), *Proceedings of the World Symposium of Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture*. Bordeaux, May 27-30, 1986. Vol II. Heeneman, Berlin.
- Pérez-Farfante, I. (1988). Illustrated key to penaeoid shrimps of commerce in the Americas. *NOAA Technical Report NMFS 64*. 500 pp.
- Pérez-Rostro, C. I., J. L. Ramírez y A. M. Ibarra. (1999). Maternal and cage effects on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 30: 681-693.

- Poljaroen, J., Y. Tinikul, I. Phoungpetchara, W. Kankoun, S. Suwansa-ard, T. Siangcham, P. Meeratana, S. F. Cummins, P. Sretarugsa, P. J. Hanna y P. Sobhon. (en Prensa) The effects of biogenic amines, gonadotropin-releasing hormones and corazonin on spermatogenesis in sexually mature small giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), *Aquaculture*.
- Qiu, C. (1986). Observations on the ovulation process of the red flagellated shrimp *Acetes chinensis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 4: 372-378.
- Sagi, A., Y. Milner y D. Cohen. (1988). Spermatogenesis and sperm storage in the testes of behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). *Biological Bulletin* 174: 330-336.
- Sagi, A. y D. Cohen. (1990). Growth, maturation and progeny of sex reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquaculture* 21: 87-90.
- Sagi, A., D. Cohen y Y. Milner. (1990). Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology* 77: 15-22.
- Sagi, A., I. Khalaila, U. Abdu, R. Shoukrun, y S. Weil. (1999). A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology* 115: 37-45.
- Sagi, A., L. Karp, Y. Milner, D. Cohen, A. M. Kuris, y E. S. Chang. (1991). Testicularthymidine incorporation in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Molt cycle variation and ecdysteroid effects in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 259: 229-237.
- Sarojini, R., R. Nagabhushanam y M. Fingerman. (1995). Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: An in vivo and in vitro study. *Journal of Experimental Zoology* 271: 395-400.

- Schmekel, K., J. Wahrman, y B. Daneholt. (1993). Solitary and synaptonemal complex-associated recombination nodules in pro-nurse cells during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 102: 396- 402.
- Sroyraya, M., C. Chotwiwatthanakun, M. J. Stewart, N. Soonklang, N. Kornthong, I. Phoungpetchara, P. J. Hanna y P. Sobhon. (2010). Bilateral eyestalk ablation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, produces hypertrophy of the androgenic gland and an increase of cells producing insulin-like androgenic gland hormone. *Tissue and Cell* 42 (5): 293-300.
- Strickberger, M. W. (1976). Genetics. 2nd ed. MacMillan, New York. 914 pp.
- Subramoniam, T. (2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. En: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 125: 135-156.
- Suzuki, S. y K. Yamasaki. (1997). Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). *General and Comparative Endocrinology* 107:136–146.
- Takayanagi, H., Y. Yamamoto y N. Takeda. (1986). Ovary-stimulating pheromone in the freshwater shrimp, *Paratya compressa*. *Journal of Experimental Zoology* 240: 397–400.
- Taketomi, Y. y S. Nishikawa. (1996). Implantation of androgenic glands into immature female crayfish, *Procambarus clarkii*, with masculinization of sexual characteristics. *Journal of Crustacean Biology* 16(2): 232-239.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, y S. Kumar. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731–2739.
- Treece, G. D. y M.E. Yates. (1998). Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae. *Marine Advisory Service, Sea Grant College Program, Texas A & M University*. 75pp.
- Ventura, T., R. Manor, E. D. Aflalo, S. Weil, S. Raviv, L. Glazer y A. Sagi. (2009). Temporal Silencing of an Androgenic Gland-Specific Insulin-Like

Gene Affecting Phenotypical Gender Differences and Spermatogenesis. *Endocrinology* 150:1278-1286.

- Xie, Y., F. Li, C. Zhang, K. Yu y J. Xiang. (2008). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of diploid and triploid Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Tissue and Cell* 40: 343-350.
- Yano, I. (1985). Induced ovarian maturation and spawning in greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture* 47 (2-3): 223-229.
- Yano, I. (1988). Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology* 99:547-553.
- Yano, I. (1995). Final oocyte maturation, spawning and mating in penaeid shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 193 (1-2): 113-118.
- Yin, Z. F., W. B. Song, L. Ma y J. P. Yu. (1986). Studies on the development and differentiation of external genital organs of *P. orientalis*. *Transactions of Oceanology and Limnology* 4: 56-61.
- Zhang, L., C. Yang, Y. Zhang, L. Li, X. Zhang, Q. Zhang, y J. Xiang. (2007). A genetic linkage map of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetica* 131: 37-49.