

Evaluación del método de enfriamiento en dos pasos como eutanasia asistida en juveniles de *Penaeus vannamei*

Evaluation of the two-step cooling method as an assisted euthanasia procedure in juvenile *Penaeus vannamei*

María Soledad Morales-Covarrubias^{1*}, Frida Stephania Silva-Alonso¹, María del Carmen Bolán-Mejía¹, Carolina Elizondo-Ovares²,
Rosario Martínez-Yáñez³

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Mazatlán, Sinaloa, México.

²Servicio Nacional de Salud Animal – Ministerio de Agricultura y Ganadería; Programa Nacional de Salud Acuícola. Heredia, Costa Rica.

³Laboratorio de Acuicultura. División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. Ex-Hacienda El Copal, Irapuato, Guanajuato, México

*Autor para correspondencia: marisol@ciad.mx

RESUMEN

Este estudio evaluó el impacto del manejo previo y el método de eutanasia por enfriamiento rápido en dos pasos sobre el bienestar de juveniles tempranos del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*). La investigación se centró en identificar alteraciones externas e internas asociadas al estrés fisiológico en organismos sometidos a diferentes densidades de cultivo: baja (1/2 L), media (10/20 L) y alta (30/20 L), durante un periodo de 72 horas antes de aplicar el procedimiento de eutanasia asistida. El protocolo consistió en exponer los camarones a una toalla fría (2°C) hasta inducir un estado de hipoactividad, seguido de inmersión en agua a la misma temperatura. Se utilizaron como confirmación de eutanasia indicadores como la opacidad muscular, inmovilidad de dendrobranquias y ausencia de movimiento del escafognatito. Los resultados mostraron que solo en la condición de alta densidad los camarones presentaron signos externos evidentes de estrés (opacidad muscular, antenas rojas, letargia y mortalidad parcial). En contraste, los tratamientos de baja y media densidad no evidenciaron deterioro significativo del bienestar, tanto en observaciones externas como en análisis inmunológicos y antioxidantes (hemocitos, SOD, GPx, CAT). La evaluación estadística mediante PCA y PERMANOVA no reveló diferencias significativas en los biomarcadores internos entre densidades baja y media. Asimismo, el Índice de Estrés Fisiológico no presentó variaciones estadísticamente significativas entre estos grupos. Los hallazgos respaldan el uso del enfriamiento rápido en dos pasos como método eficaz, humanitario y científicamente válido para la eutanasia de juveniles de *P. vannamei*, bajo condiciones de laboratorio. Además, se sugiere que densidades de hasta 10 individuos·L⁻¹ no comprometen el bienestar fisiológico de los organismos, lo que permite su uso en experimentación sin inducir estrés medible.

Palabras clave: *Penaeus vannamei*; eutanasia; bienestar animal; indicadores externos; análisis inmunológicos; parámetros biológicos

ABSTRACT

This study evaluated the impact of prior handling and a two-step rapid cooling euthanasia method on the welfare of early juveniles of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). The research focused on identifying external and internal alterations associated with physiological stress in organisms subjected to different stocking densities: low (1/2 L), medium (10/20 L), and high (30/20 L) over 72 hours before applying the assisted euthanasia procedure. The euthanasia protocol involved exposing the shrimp to a cold towel (2°C) to induce a state of hypoactivity, followed by immersion in water at the same temperature. Indicators such as muscle opacity, immobility of dendrobranchiae, and absence of scaphognathite movement were used to confirm death. Results showed that only under high-density conditions did shrimp exhibit clear external signs of stress (muscle opacity, red antennae, lethargy, and partial mortality). In contrast, the low and medium density treatments did not show significant deterioration in welfare, either in external observations or in immunological and antioxidant analyses (hemocytes, SOD, GPx, CAT). Statistical evaluation using PCA and PERMANOVA revealed no significant differences in internal biomarkers between low and medium densities. Similarly, the Physiological Stress Index showed no statistically significant variation between these groups. The findings support the use of the two-step rapid cooling method as an effective, humane, and scientifically valid euthanasia technique for *P. vannamei* juveniles under laboratory conditions. Furthermore, it is suggested that densities of up to 10 individuals·L⁻¹ do not compromise the organisms' physiological welfare, allowing their use in experimentation without inducing measurable stress.

Keywords: *Penaeus vannamei*; euthanasia; animal welfare; external indicators; immunological analyses; biological parameters

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarones peneidos entre ellos el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) representa una de las actividades acuícolas de mayor crecimiento a nivel mundial, constituyéndose como una de las más relevantes del sector productivo en México, tanto por su volumen como por la generación de divisas mediante exportaciones. La producción acuícola global alcanzó un récord de 130,9 millones de toneladas en 2022, lo que refleja el papel fundamental de esta actividad en la seguridad alimentaria mundial, de acuerdo con el informe *Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura* [1].

El aumento en la demanda del mercado ha llevado a los productores de camarón a incrementar la densidad de siembra, lo que a su vez ha deteriorado la calidad del agua y desestabilizado el ecosistema donde habitan estos organismos. Esto provoca estrés en los camarones y favorece la aparición de enfermedades infecciosas, particularmente aquellas causadas por patógenos oportunistas [2]. Entre estos, las bacterias del género *Vibrio* se destacan como los principales agentes etiológicos responsables de importantes pérdidas económicas en la industria camaronera [3]. Para el control de estas infecciones bacterianas se han empleado tanto fármacos convencionales como alternativas a los antibióticos, las cuales suelen ser evaluadas en laboratorios mediante infecciones experimentales bajo condiciones controladas, con el fin de determinar su eficacia y dosificación.

La experimentación animal se define como cualquier actividad cuyo objetivo sea dilucidar o demostrar fenómenos biológicos en animales, incluyendo procedimientos científicos o experimentales que puedan comprometer su bienestar y causar dolor, sufrimiento, angustia o daño [4]. Los animales de laboratorio se utilizan ampliamente en estudios de biotecnología, particularmente en la industria médico-farmacéutica, para el desarrollo de productos biológicos como vacunas, anticuerpos monoclonales y medicamentos, evaluando su seguridad y eficacia. La experimentación animal ha sido fundamental en numerosos avances médicos recientes y permite comprender las respuestas fisiológicas del organismo ante agresiones, infecciones o intoxicaciones experimentales [5].

El uso de animales como modelos experimentales resulta, en muchos casos, indispensable; sin embargo, es imperativo proporcionarles cuidados adecuados y minimizar su sufrimiento, tanto por razones éticas como legales y científicas. Asimismo, se debe procurar el uso del menor número posible de animales y fomentar la implementación de métodos alternativos que generen información comparable [6].

En años recientes, la evidencia científica sobre la capacidad de los invertebrados para percibir dolor ha suscitado un creciente interés por su bienestar, incluyendo la atención veterinaria [7, 8, 9]. En este contexto, la eutanasia se ha convertido en un procedimiento comúnmente utilizado en invertebrados, ya sea como punto final en investigaciones o por razones relacionadas con su calidad de vida. Garantizar una muerte sin sufrimiento, libre de comportamientos aversivos, es esencial y constituye un componente central tanto del bienestar animal como de la medicina veterinaria [10].

Las Directrices para la Eutanasia de Animales de la Asociación Médica Veterinaria Estadounidense (AVMA, 2020) recomiendan diversos métodos para invertebrados, incluyendo técnicas de uno y dos pasos [10]. Las técnicas de un solo paso consisten en la sobredosis de anestésicos (inyectables o inhalados), mientras que las técnicas de dos pasos combinan anestesia previa con un método secundario químico o físico, como la inmersión en alcohol o formalina, ebullición o congelación [10, 11].

La congelación ha sido empleada anecdóticamente como método de inducción de inconsciencia o como eutanasia de un solo paso y algunas investigaciones han evaluado la respuesta fisiológica de los invertebrados a temperaturas frías [11, 12]. Su uso también ha sido respaldado en procedimientos no invasivos, tales como la toma de imágenes fotográficas o radiográficas [13]. En el caso de los camarones y, en general, de los crustáceos, las manifestaciones de dolor no están tan bien definidas como en los vertebrados. No obstante, estudios recientes aportan evidencia de que estos organismos pueden experimentar dolor y estrés de manera análoga a los vertebrados [13].

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la utilidad y el efecto del método de enfriamiento en dos pasos en juveniles de camarón (*Penaeus vannamei*) como alternativa de término de eutanasia asistida, con el propósito de reducir el estrés durante la experimentación científica y promover el bienestar animal en el manejo de crustáceos bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración ética

El manejo de los organismos se realizó siguiendo los protocolos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) [14].

Aclimatación de los animales

Antes del ensayo, se retiraron 10 camarones [15] de un lote (100 juveniles) para determinar su estado sanitario mediante análisis bacteriológico, análisis de frotis húmedo [15, 16, 17]. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con kits comerciales (IQ2000TM GeneReach Biotechnology Corp., Taiwán) y análisis histológico para la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y la bacteria de la hepatopancreatitis necrosante (NHPB) [16, 17].

Bioensayo

Se llevó a cabo un bioensayo de estrés por densidad durante 72 h, utilizando camarones de 3–4 g (Báscula BOECO, modelo 27054141, EE. UU), libres de patógenos detectables y en etapa de intermuda [16, 17]. El experimento se realizó en acuarios de vidrio con capacidad de 20 L, bajo tres condiciones de densidad:

- **Baja densidad (A):** 1 camarón en 2 L de agua de mar, con 30 réplicas;
- **Densidad media (B):** 10 camarones en 20 L, con 3 réplicas;

- **Alta densidad (C):** 20 camarones en 20 L, también con 3 réplicas.

Todos los acuarios contaron con aireación constante. Las condiciones fisicoquímicas del agua se mantuvieron constantes durante el ensayo: temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad del 30 ‰, pH entre 7.5 y 8.0, concentración de amonio $< 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y oxígeno disuelto entre 6 y $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los camarones fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial (Camaronina®, pellet de 2.38 mm, 35 % de proteína), a una tasa del 4 % del peso corporal durante las 72 h del ensayo. Las heces y el alimento no consumido se retiraron mediante sifoneo. Al término del periodo experimental, se tomaron muestras de hemolinfa y hepatopáncreas para la realización de hemogramas y la determinación de los siguientes biomarcadores de estrés oxidativo: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG, disulfuro de glutatión).

Indicadores externos de bienestar

Como parte del enfoque para evaluar el bienestar de los camarones en la fase previa a la muerte asistida, se identificaron alteraciones macroscópicas (indicadores externos) y conductuales, siguiendo el modelo EPI-DOM propuesto para la evaluación integral del bienestar animal [18], y en concordancia con lo reportado previamente para esta especie [16, 17]. Se cuantificaron los individuos que presentaron cambios morfofisiológicos y conductuales compatibles con estrés fisiológico.

Los indicadores fueron seleccionados con base en su alta visibilidad, relevancia práctica y su asociación con condiciones adversas de manejo. Los signos externos evaluados incluyeron la coloración blanquecina de los segmentos abdominales y el enrojecimiento de las antenas (FIG. 1).

En cuanto a los indicadores conductuales, se consideraron la permanencia prolongada en el fondo del acuario interpretable como letargia o debilidad y la clasificación del animal como moribundo, definida como la reducción extrema o ausencia de movilidad reactiva frente a estímulos externos, limitándose al movimiento de las branquias.

Las observaciones se realizaron al término del tercer día, inmediatamente antes del procedimiento de eutanasia. Los

datos obtenidos se expresaron como frecuencias absolutas y proporciones por tratamiento. Este enfoque permitió una evaluación objetiva de la expresión externa de posibles estados de compromiso fisiológico inducidos por el manejo.

Proceso de eutanasia en dos pasos y obtención de muestras de hemolinfa

Para la práctica de eutanasia asistida en dos etapas, los camarones fueron retirados de los acuarios y colocados individualmente sobre una toalla enfriada a una temperatura de 2°C (FIG. 2). Esta disminución de temperatura induce un estado de hipo metabolismo que reduce la actividad motora del animal, disminuyendo su excitabilidad y niveles de estrés, lo que facilita una eutanasia rápida y humanitaria. El procedimiento se denomina “dos etapas” debido a que, una vez que el único movimiento observable es el del escafnatito, los organismos se transfieren a un recipiente que contiene un litro de agua a 2°C . En este medio, los camarones permanecen inmóviles en el fondo, presentando rigidez corporal, coloración blanquecina generalizada y ausencia total de movimiento del escafnatito, lo que confirma su fallecimiento.

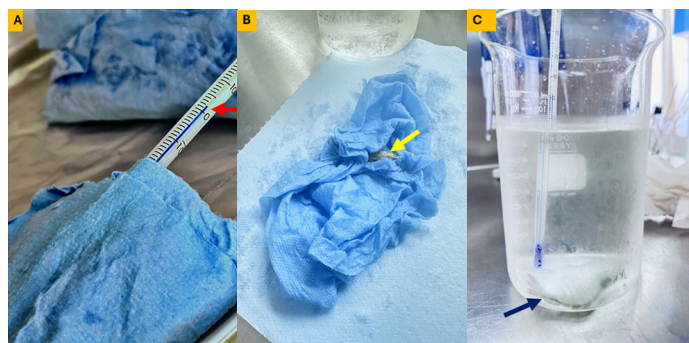


FIGURA 2. A: Eutanasia asistida en dos pasos: A) los camarones son colocados de manera individual en una toalla a temperatura de 2°C (flecha roja). B) La baja temperatura sirve para tranquilizar al camarón (flecha amarilla), reduciendo su actividad y llevándolo a un estado de menor excitabilidad y estrés. C) Al final cuando el camarón (*Penaeus vannamei*) solo mueve el escafnatito es transferido a un contenedor con un litro de agua a 2°C (flecha azul), donde permanece en el fondo con rigidez corporal (flecha negra), coloración blanquecina total y paralización del escafnatito

Para la obtención de hemolinfa, los camarones fueron igualmente extraídos de los acuarios y colocados individualmente sobre una toalla a 2°C (FIG. 3). Posteriormente, se realizó la extracción de hemolinfa desde el seno ventral del organismo, ubicado en la base del primer segmento abdominal. La hemolinfa obtenida fue inmediatamente mezclada con solución anticoagulante Alsever (MAS A3551, Sigma) en una proporción 1:1.

Indicadores internos de bienestar

Como indicadores internos de bienestar [18], se evaluaron variables inmunológicas y antioxidantes. El recuento total de hemocitos ($\text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$) se realizó utilizando una Cámara de Neubauer (hemocitómetro, ISOLAB-DEU), siguiendo la metodología descrita previamente [19]. Los hemocitos se observaron en el hemocitómetro con un aumento de $100\times$, mediante contraste de



FIGURA 1. A: juveniles de *Penaeus vannamei* (camarón blanco) con permanencia en el fondo (sin moverse) y opacidad muscular (flecha roja). B: Juvenil de camarón blanco con antenas rojas (flecha amarilla), músculo opaco (flecha roja) y permanencia en el fondo sin nadar

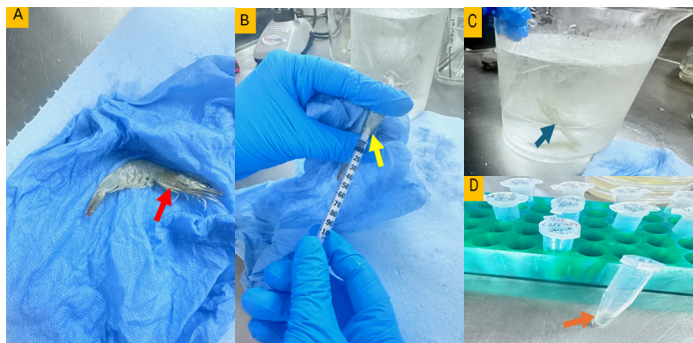


FIGURA 3. A: Extracción de hemolinfa el camarón es colocado en una toalla a temperatura de 2°C, la baja temperatura sirve para tranquilizar al camarón (flecha roja), reduciendo su actividad y llevándolo a un estado de menor excitabilidad y estrés. B: La hemolinfa se extrae del seno ventral del organismo (flecha amarilla) y se mezcló con solución anticoagulante (flecha naranja). C: Al finalizar la extracción de hemolinfa y el camarón solo mueve el escafognatito, es transferido a un contenedor con un litro de agua a 2°C donde permanece en el fondo con rigidez corporal (flecha azul), coloración blanquecina total y paralización del escafognatito.

fases, y se contaron manualmente en 25 cuadrículas utilizando un microscopio óptico (Olympus BX60, EE. UU.) equipado con una cámara digital (Infinity 2) para documentación. El recuento diferencial de hemocitos (DHC), que incluyó granulocitos densos y semidensos, así como células hialinas, se llevó a cabo según el protocolo descrito por Chen *et al.* [20].

En cuanto a las enzimas antioxidantes, la actividad de SOD se determinó mediante un kit colorimétrico de Sigma-Aldrich (19160 SOD Determination Kit), conforme a las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la reducción del tetrazolio WST, que genera un compuesto coloreado detectable a 450 nm, utilizando un lector de microplacas (Multiskan, ThermoScientific, China). La actividad de glutatión peroxidasa (GPx) se evaluó con el kit de ensayo de Cayman Chemical (Glutathione Peroxidase Assay Kit), de acuerdo con las indicaciones del fabricante, midiendo la absorbancia a 340 nm en el mismo lector de microplacas. Finalmente, la actividad de catalasa se determinó empleando el kit de Cayman Chemical (Catalase Assay Kit), según las instrucciones proporcionadas, registrando la absorbancia a 540 nm con el lector de microplacas (Multiskan, ThermoScientific, China).

Análisis estadístico

Debido a la estructura del diseño experimental, en la que los tratamientos de densidad media y alta se aplicaron en acuarios grupales ($n = 3$ acuarios por grupo) y considerando que los camarones dentro de un mismo acuario no constituyen unidades experimentales independientes, no se realizaron análisis estadísticos inferenciales para dichas condiciones. En su lugar, los datos se presentan de manera descriptiva, mediante frecuencias absolutas y proporciones (%) de camarones que manifestaron cada uno de los indicadores externos de bienestar evaluados. Esta decisión se fundamenta en la necesidad de evitar la pseudoreplicación [21], garantizando un enfoque estadístico ético y alineado con los principios de validez inferencial. Las tendencias observadas se interpretan como indicios consistentes de efectos asociados a la densidad, en el marco de un diseño experimental controlado de naturaleza observacional.

Para las variables identificadas como indicadores externos de bienestar, se utilizó un modelo lineal general (GLM) con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento sobre las variables registradas [21, 22]. En este modelo, el tratamiento (densidad) se incluyó como efecto fijo, mientras que los acuarios se modelaron como efectos aleatorios anidados dentro del tratamiento. Esta estructura permitió controlar la variabilidad entre unidades experimentales grupales y minimizar el riesgo de pseudoreplicación. La variable dependiente fue el tiempo (en segundos) hasta la manifestación de cada uno de los indicadores observados. Se asumió una distribución normal de los residuos y se verificaron los supuestos del modelo, así como la adecuación del ajuste mediante análisis de residuos.

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + (A/T)_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} : tiempo observado para el camarón k , en acuario j , del tratamiento i
- μ : media general
- T_i : efecto fijo del tratamiento
- $(A/T)_{j(i)}$: efecto aleatorio del acuario anidado dentro del tratamiento
- ε_{ijk} : error residual

En cuanto a las variables inmunológicas y antioxidantes (indicadores internos), como fase exploratoria inicial, se estandarizaron los datos [23]. Las variables con respuesta positiva al estrés fisiológico se transformaron utilizando la fórmula:

$$\gg \text{IFD variable} = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$$

Mientras que aquellas con respuesta negativa al estrés fisiológico se transformaron con:

$$\gg \text{IFD variable} = 1 - ((X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}))$$

Esta transformación permitió estandarizar las distintas escalas y sentidos fisiológicos, generando valores entre 0 (respuesta con menor estrés fisiológico) y 1 (mayor estrés fisiológico). Una vez los datos transformados, se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA) [24] para observar posibles patrones de agrupamiento y disminuir la dimensionalidad de las variables del estudio. Posteriormente, para evaluar diferencias multivariadas entre tratamientos, se aplicó un análisis de varianza multivariado por permutación (PERMANOVA) [25], utilizando una matriz de disimilitudes euclidianas y con base en 9.999 permutaciones aleatorias, lo que permitió una estimación robusta del valor de p mediante pruebas no paramétricas. El análisis se realizó utilizando promedios por unidad experimental (acuario) para garantizar la independencia estadística entre observaciones, evitando así problemas de pseudoreplicación, complementando el análisis exploratorio previo.

Adicionalmente, se construyó un Índice de Estrés Fisiológico (IEF) a partir de la suma directa de las variables inmunológicas y antioxidantes previamente transformadas y que resultaron con mayor peso en el PCA [26]. Se tomaron todos los datos normalizados en una escala entre 0 y 1 (descrito previamente), para asegurar comparabilidad y contribuir con igual peso al índice compuesto. La distribución del IEF fue evaluada mediante indicadores de sesgo y curtosis, confirmando la normalidad de los datos. Para mantener una unidad experimental válida, se utilizaron los promedios por acuario ($n = 3$ por tratamiento), lo que garantizó la independencia estadística entre observaciones. Posteriormente, se aplicó una prueba de t de Student para muestras independientes [27] con el fin de comparar los valores del IEF entre tratamientos en la respuesta fisiológica integrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros fisicoquímicos del agua son de gran relevancia en los sistemas de acuicultura, ya que influyen directamente en el crecimiento, metabolismo y todas las funciones fisiológicas de los camarones. En la presente investigación, los parámetros evaluados (oxígeno disuelto entre $5,44 \pm 0,3$ y $5,84 \pm 0,73$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, y temperatura de $28,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$) no mostraron variaciones significativas que generaran condiciones adversas para el cultivo, manteniéndose dentro de los intervalos considerados óptimos para la especie [28].

Como parte de una evaluación exploratoria, se analizaron indicadores externos y conductuales de bienestar animal en camarones sometidos a distintas densidades durante el periodo previo a la implementación del procedimiento de eutanasia asistida en dos etapas. No se registraron indicadores negativos en los tratamientos con densidad baja y media. En contraste, los camarones expuestos a alta densidad (30 individuos por 20 litros) presentaron frecuencias elevadas de signos compatibles con un estado de estrés fisiológico severo: el 100 % de los animales exhibió opacidad muscular y enrojecimiento de las antenas, el 63,3 % permaneció en el fondo del acuario y el 24,4 % se encontraba moribundo al momento del muestreo (TABLA I).

Estos resultados, aunque de carácter descriptivo, evidencian un efecto marcado de la densidad como factor de riesgo para el bienestar animal en camarones y aportan información preliminar sobre la relevancia del manejo pre-mortem asistida. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo referido por Lightner y Redman [29], quienes destacan que la alta densidad, junto con factores abióticos y bióticos, puede inducir estrés en los cultivos de camarón, manifestado externamente mediante

opacidad muscular, decoloración, necrosis cuticular, reducción del apetito, disminución del crecimiento, comportamiento anómalo y, en casos severos, mortalidad. De manera similar, Kotiya y Vadher [30] señalan que, en condiciones de cultivo intensivo, la densidad de animales por unidad de volumen es un factor crítico, ya que favorece la acumulación de productos de desecho y el incremento de compuestos tóxicos en el agua, lo que genera un entorno desfavorable para los camarones. En los tres indicadores estudiados, opacidad muscular total (OMT), dendrobranquias sin movimiento (DsM) y escafognatito sin movimiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (OMT: $F = 0,56$; $P = 0,9432$; DsM: $F = 0,33$; $P = 0,9984$; Muerte: $F = 0,50$; $P = 0,9693$). El componente de varianza asociado a los acuarios anidados dentro del tratamiento fue negativo en los tres casos, lo que indica que no se detectó una estructura de agrupamiento a nivel de acuario dentro del modelo. Asimismo, los valores de R^2 ajustado fueron cercanos a cero, señalando que el modelo no explicó la variabilidad observada de forma significativa. La distribución de residuos y el valor del estadístico de Durbin-Watson mostraron que no hubo problemas de autocorrelación ni violaciones graves de los supuestos del modelo.

En la FIG.4, se muestra el tiempo (promedios $\pm$ EE) en el que se observaron los tres indicadores de estrés fisiológico en camarones tras la aplicación de la muerte asistida en dos pasos (toalla húmeda 2°C y contenedor con agua a 2°C).

Los indicadores considerados fueron: OMT, DsM y escafognatito sin movimiento (muerte). Bajo condiciones de toalla húmeda 2°C , el tiempo promedio de aparición de OMT fue de $83,6 \pm 1,2$ s, mientras que en contenedor con agua a 2°C fue de $74,0 \pm 3,0$ s. Para DsM, los tiempos registrados fueron de $147,4 \pm 1,2$ s (toalla húmeda) y $140,7 \pm 2,5$ s (contenedor), y para el indicador de muerte fueron $153,0 \pm 1,9$ s. Aunque se observa una tendencia leve hacia una

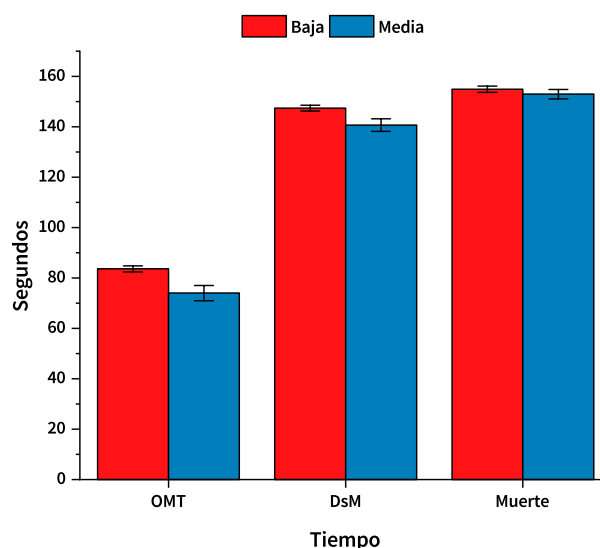


FIGURA 4. Tiempo de aparición de tres indicadores de estrés fisiológico en *Penaeus vannamei* durante un protocolo de eutanasia asistida en dos pasos (toalla a 2°C , seguido de inmersión en agua a 2°C). Se evaluaron: opacidad muscular total (OMT), inmovilidad de las dendrobranquias (DsM) e inmovilidad del escafognatito (muerte). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos de densidad (GLM, $P > 0,05$; medias $\pm$ EE)

TABLA I

Indicadores externos y conductuales de bienestar en camarones bajo diferentes densidades previas a la eutanasia asistida en dos fases

Tratamiento (densidad animal·L ⁻¹)	n	¹ Opacidad muscular	¹ Antenas rojas	² En el fondo	² Moribundos
Baja (1/2 L)	30	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Media (10/20 L)	30	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Alta (30/20 L)	90	90 (100,0 %)	90 (100,0 %)	57 (63,3 %)	(24,4 %)

¹Indicador Externo: Opacidad muscular y antenas rojas; ²Conductuales: en el fondo y moribundos

aparición más temprana de los indicadores en la toalla húmeda, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los tratamientos (GLM, $P > 0,05$, en todos los casos).

La Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad a los Animales (RSPCA) [31], aprueba como un método humano para aturdir camarones tropicales el choque térmico, lo que implica la inmersión de los animales en agua salada con una temperatura inferior a 4°C (agua helada o suspensión de hielo) con una duración de mínimo recomendado de inmersión de 20 min donde se asegura que todos los movimientos de camarón se detengan, en este trabajo los organismos tuvieron una eutanasia asistida en 2 pasos con un tiempo total de aproximadamente 6,25 min en juveniles de camarón blanco (3 – 4 g) por debajo de lo recomendado por RSPCA así como también se comprobaron con indicadores fisiológicos como: OMT, DsM y muy especialmente que el escafognatito estuviera sin movimiento para estar seguros de su eutanasia. Con respecto a la eutanasia, las Directrices de la Asociación Médica Veterinaria Americana [8] recomiendan un enfoque en dos pasos para la eutanasia de invertebrados acuáticos. En el primer paso, se induce la insensibilización del animal, mientras que en el segundo, se destruye de manera química o física el encéfalo los ganglios principales. Este protocolo asegura una muerte rápida, evitando cualquier traumatismo previo a la pérdida de conciencia, lo cual se considera esencial para una eutanasia ética.

Tras comprobar que las respuestas negativas al manejo solo se presentaron bajo condiciones de hacinamiento severo (tratamiento de alta densidad), se optó por centrar el análisis posterior en los tratamientos donde los camarones no mostraron signos de deterioro, con el objetivo de explorar en detalle las demás variables evaluadas.

Previo al análisis de las variables inmunológicas y antioxidantes, los datos fueron estandarizados con el objetivo de eliminar la unidad de medida. Las variables estudiadas fueron divididas en positivas y negativas para realizar una interpretación lógica acorde a la respuesta de estrés fisiológico, quedando agrupadas en positivas: aquellas variables que son directamente proporcionales (a mayor valor mayor estrés), siendo, hemocitos totales, hialinos y semigranulares, también, aquellas de estrés oxidativo como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y SOD, y negativa: aquella variable que es inversamente proporcional (a menor valor mayor estrés), como, hemocitos granulares. Además, para

garantizar la homogeneidad de las unidades experimentales y evitar pseudoreplicación, se unificó el nivel de análisis en ambos tratamientos de densidad.

En el tratamiento de media densidad, cada acuario ($n = 3$) fue considerado como una unidad experimental independiente. Con el fin de establecer una comparación válida y equilibrada, los datos del tratamiento de baja densidad ($n = 30$; 1 camarón por acuario) se agruparon en tres conjuntos de diez individuos, calculándose un valor promedio para cada grupo. Esta estrategia permitió una adecuada integración en los análisis multivariados. Posteriormente, se realizó un PCA con el objetivo de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos e identificar las variables con mayor peso en la variabilidad observada (TABLA II).

El PCA mostró que los primeros tres componentes explicaron el 98,42 % de la varianza total de los datos, con el primer y segundo componente explicando el 47,41 % y 33,55 % respectivamente. Esto indica que las principales fuentes de variación multivariable pueden representarse de forma efectiva en un plano bidimensional (PC1 $\times$ PC2). El modelo fue construido a partir de promedios por acuario, lo que garantizó la equivalencia de unidades experimentales entre tratamientos. En el análisis de componentes principales, las variables con mayor peso en la primera componente (PC1, 47,41 % de varianza) fueron CAT (0,709), SOD (0,467) y GPx (-0,461), todas relacionadas con la respuesta antioxidante. En el segundo componente (PC2, 33,55 %), destacaron GPx (0,543), SOD (0,489) y hemocitos granulares (0,436), además de un peso negativo de los hemocitos totales (-0,432). Estos resultados sugieren que la separación multivariada entre tratamientos está principalmente influida por la activación de respuestas antioxidantes, con un aporte secundario de variables inmunológicas.

En la FIG. 5, se muestra el gráfico de PCA generado a partir de las variables bioquímicas y celulares evaluadas como indicadores internos de bienestar en *Penaeus vannamei* expuestos a dos tratamientos de densidad: baja (azul) y media (rojo).

El eje PC1 explicó el 47,41 % de la varianza y el eje PC2 el 33,55 %, sumando un 80,95 % de la varianza total. Se observa una separación clara entre tratamientos, lo que sugiere diferencias multivariadas en la respuesta fisiológica frente a las condiciones experimentales.

TABLA II
Análisis de Componentes Principales (PCA) de parámetros inmunológicos y antioxidantes en camarones bajo diferentes densidades de manejo previo a la eutanasia

PC	Eigenvalor	% varianza	% total varianza explicada	Peso del componente	PC 1	PC 2
1	0,16440	47,41	47,41	¹ Hemocitos totales	-0,11673	-0,43228
2	0,11634	33,55	80,95	¹ Hemocitos hialinos	-0,18535	0,17792
3	0,06058	17,47	98,42	¹ Hemocitos semigranulares	0,11749	-0,22282
4	0,00438	1,26	99,68	¹ Hemocitos granulares	-0,07040	0,43612
5	0,00110	0,32	100,00	² Catalasa (CAT)	0,70928	0,08616
				² Glutatión peroxidasa (GPx)	-0,46051	0,54315
				² Superóxido dismutasa (SOD)	0,46702	0,48909

PC: Componentes Principales; ¹Variables Inmunológicas; ²Variables Antioxidantes; PC1: Primera Componente; PC2: Segunda Componente

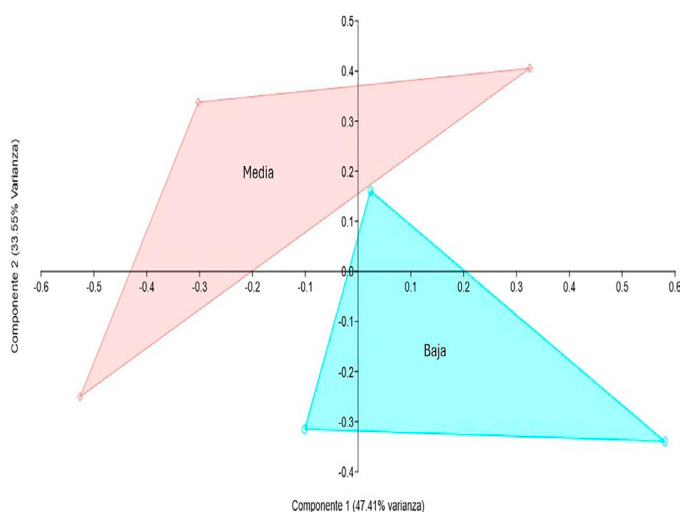


FIGURA 5. El PCA de indicadores internos de bienestar en *Penaeus vannamei* sometidos a dos tratamientos de densidad (baja y media). Cada punto representa el promedio por unidad experimental (acuario). El primer componente (PC1) explicó el 47,41 % de la varianza y el segundo (PC2) el 33,55 %, acumulando un 80,95 % de la varianza total. El análisis PERMANOVA (9.999 permutaciones) no mostró diferencias significativas entre tratamientos (pseudo $F = 0,9762$; $P = 0,4943$)

La representación se construyó utilizando el promedio por unidad experimental (acuario), con el fin de preservar la independencia estadística entre observaciones. Posteriormente, se aplicó un PERMANOVA para contrastar estadísticamente la diferencia entre grupos observada en el PCA. El análisis, realizado con 9.999 permutaciones, no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos de densidad (pseudo $F = 0,9762$; $P = 0,4943$), lo que indica que las respuestas fisiológicas multivariadas de los grupos no fueron estadísticamente distinguibles en el espacio multivariado considerado, pese a la separación aparente observada en el biplot del PCA.

En cuanto al análisis del IEF, fue calculado como la suma de variables transformadas en cada acuario con mayor peso, acorde al análisis de componentes principales (hemocitos totales, granulares, CAT, GPx y SOD; (TABLA II), lo que permitió evaluar globalmente la respuesta fisiológica. La media ($\pm$ EE) del índice fue ligeramente mayor en el tratamiento de densidad baja en comparación con el de densidad media, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (t de Student, $P = 0,4840$), lo cual, concuerda con los resultados previamente obtenidos mediante PERMANOVA. La distribución de los datos y la representación gráfica (FIG. 6) sugieren una variabilidad mayor en el grupo de baja densidad, a pesar de la similitud general en los niveles de estrés fisiológico integrados entre ambos grupos.

Se ha observado que el incremento en la densidad de cultivo de camarones puede contribuir a la disminución del conteo total de hemocitos, la actividad fagocítica y las actividades enzimáticas de fenoloxidas, lisozima, catalasa y superóxido dismutasa en *Palaemonetes sinensis* [32, 32]. De manera similar, estudios realizados en *Penaeus vannamei* han reportado una reducción en la actividad de enzimas como la SOD y la CAT bajo condiciones de alta densidad, así como un aumento en la expresión de genes relacionados con el estrés, como la proteína HSP70, en

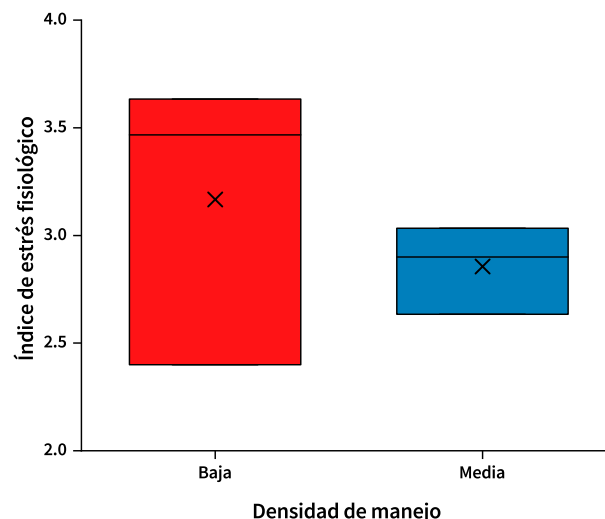


FIGURA 6. Índice de Estrés Fisiológico (IEF) en *Penaeus vannamei* bajo tratamientos de densidad baja y media densidad. El IEF se calculó como la suma de los valores transformados (escala 0–1) de variables fisiológicas: hemocitos totales, hemocitos granulares, actividad de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD). Los datos representan el promedio por unidad experimental (acuario), con $n = 3$ por tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre grupos (t de Student, $P = 0,4840$)

el hepatopáncreas [34]. No obstante, la información disponible sobre el efecto de diferentes densidades de cultivo en camarones peneidos es limitada [35], especialmente en relación con estos parámetros inmunológicos.

Las actividades de THC, PO, SOD y lisozimas se han empleado previamente como indicadores del estado de salud en organismos acuáticos [36]. Por ejemplo, la actividad de SOD ha sido utilizada para evaluar la condición fisiológica de juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* [38], mientras que las actividades de THC y PO se han aplicado para analizar las respuestas inmunitarias inespecíficas en *Penaeus vannamei* [37, 38]. Además, la densidad de siembra influye significativamente en el rendimiento del crecimiento del camarón, principalmente mediante su impacto en la ingesta alimentaria y la actividad enzimática [30].

El CTH no se vio afectado por la densidad de siembra de *Penaeus vannamei*. En el presente estudio, los indicadores inmunitarios no específicos, como el THC, la CAT, la GPx y la SOD, mostraron una tendencia a disminuir con el incremento de la densidad. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las actividades de THC, CAT, GPx y SOD entre los grupos con densidades de 1 y 10 individuos·L⁻¹. Estos resultados sugieren que una densidad poblacional de hasta 10 individuos·L⁻¹ no ejerce un efecto significativo sobre la respuesta inmunitaria ni sobre el estrés fisiológico de los organismos.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observaron alteraciones en los indicadores externos de bienestar como opacidad muscular, enrojecimiento de antenas y mortalidad únicamente en la condición de alta densidad. En contraste, las densidades baja y media no presentaron tales alteraciones, lo que justifica su uso

en experimentos fisiológicos, al minimizar el sesgo por deterioro del bienestar. El método de eutanasia en dos etapas resultó efectivo, provocando el término de la vida de los camarones por enfriamiento a 2°C. Se utilizaron como indicadores de bienestar la opacidad muscular total, la ausencia de movimiento en las dendobranquias y, de manera especialmente relevante, la inmovilidad del escafognatito, confirmando la eutanasia del organismo. Por tanto, este método se recomienda para la eutanasia de camarones en estudios experimentales.

El aumento de densidad de 1 a 10 individuos·L⁻¹ no afectó significativamente a los indicadores evaluados, lo que sugiere que la densidad media no fue suficiente para inducir un deterioro fisiológico medible en el intervalo de tiempo considerado. Estos hallazgos indican que, hasta cierto punto, el manejo grupal de camarones no compromete su bienestar fisiológico, siempre que se evite el hacinamiento extremo. Además, el sistema multivariado de evaluación empleado podría adaptarse como herramienta operativa para la vigilancia del bienestar en acuicultura comercial. Cabe destacar que las alteraciones en los indicadores externos de bienestar (opacidad, muerte, antenas rojas) se observaron únicamente en la condición de alta densidad. Se sugiere realizar futuras evaluaciones de bienestar (empleando los mismos o similares indicadores), utilizando una densidad media de siembra, pero extendiendo el periodo de aclimatación y manteniendo condiciones ambientales estables, incluyendo el uso de acuarios con forma y capacidad uniformes como unidades experimentales.

Conflictos de interés

No existen conflictos de intereses entre los autores del presente documento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). El estado mundial de la pesca y la acuicultura [Internet]. Roma (Italia): El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. 2025 [consultado 12 Jun. 2025]; p. 278. doi: <https://doi.org/p87c>
- [2] Leano EM, Lavilla-Pitogo CR, Paner MG. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* [Internet]. 1988; 164(1-4):367-374. doi: <https://doi.org/dnxj3s>
- [3] Santiago M, Espinosa A, Bermúdez M. Uso de antibióticos en la camaricultura. *Rev. Mex. Cienc. Farmac.* [Internet]. 2009 [consultado 12 Jun. 2025]; 40(3):22-32. Disponible en: <https://goo.su/zcfmjE>
- [4] Boada-Saña M, Colom-Comí A, Castelló-Echeverría N. La experimentación animal. [Internet]. 2012 [consultado 13 Jun 2025]; 1-202. Disponible en: <https://goo.su/ovoVc4N>
- [5] Hernández-Luna PV, Ruiz-Zermeño AA, Saldaña-Pérez L, Romero-Mata JT, García-Munguía CA, Hernández AA. Importancia de factores relacionados con el bienestar animal para animales de experimentación. *Tem. Selec. Vet. Zootec.* [Internet]. 2022; 14:1-13. doi: <https://doi.org/p87d>
- [6] Garcés-Giraldo LF, Giraldo-Zuluaga C. Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Rev. Lasallista Investig.* [Internet]. 2012 [Consultado 15 de Jun 2025]; 9(1):159-166. Disponible en: <https://goo.su/3mXVz9>
- [7] Tucker SM, Balko JA, Smith DC, Minter LJ, Houck EL. Investigation of euthanasia techniques in four species of cockroaches. *PeerJ.* [Internet]. 2023; 11:e16199. doi: <https://doi.org/p87f>
- [8] Drinkwater E, Robinson EJH, Hart AG. Keeping invertebrate research ethical in a landscape of shifting public opinion. *Methods Ecol. Evol.* [Internet]. 2019; 10(8):1265-1273. doi: <https://doi.org/gjs8mj>
- [9] Elwood RW. Evidence for pain in decapod crustaceans. *Anim. Welf.* [Internet]. 2012; 21(S2):23-27. doi: <https://doi.org/f32hcp>
- [10] American Veterinary Medical Association (AVMA). AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 Edition [Internet]. Schaumburg (IL, USA): AVMA. 2020 [consultado 15 Jun 2025]; 121 p. Disponible en: <https://goo.su/x0o2kS>
- [11] Braun ME, Heatley JJ, Chitty J. Clinical techniques of invertebrates. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* [Internet]. 2006; 9(2):205-221. doi: <https://doi.org/bh78fn>
- [12] Cooper JE. Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. *ILAR J.* [Internet]. 2011; 52(2):196-204. doi: <https://doi.org/gnpnmp>
- [13] Conte F, Voslarova E, Vecerek V, Elwood RW, Coluccio P, Pugliese M, Passantino A. Humane slaughter of edible decapod crustaceans. *Animals* [Internet]. 2021; 11(4):1089. doi: <https://doi.org/p87g>
- [14] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *DIARIO OFICIAL* [Internet]. 2001 [consultado 13 Jun 2025]; 107-165. Disponible en: <https://goo.su/gTRYD>
- [15] Ramírez-Azpilcueta BA, García-Aguilar N, Puello-Cruz AC, Bolán-Mejía MC, Gómez-Gil B, Osuna-Ruiz I, Morales-Covarrubias MS. Therapeutic, histopathological, and non-specific immune status effect of *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* hydroalcoholic extract against *Vibrio harveyi* and *Vibrio campbellii* in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* [Internet]. 2023; 51(4): 543-555. doi: <https://doi.org/p87h>
- [16] Morales-Covarrubias MS. Enfermedades del camarón: Detección mediante análisis en fresco e histopatología. 2da ed. Ciudad de México (México): Editorial Trillas; 2010.
- [17] Lightner D. A handbook of shrimp pathology and Diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Louisiana (USA): World Aquaculture Society; 1996.
- [18] Martínez-Yáñez R, Mora-Medina P, Albertos-Alpuche PJ. EPI-DOM approach for comprehensive assessment of integral animal welfare. *Front. Anim. Sci.* [Internet]. 2025; 6:1495149. doi: <https://doi.org/p87k>

- [19] Le Moullac G, Le Groumellec M, Ansquer D, Froissard S, Levy P, AQUACOP. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol. [Internet]. 1997; 7(3):227–234. doi: <https://doi.org/b4dqm2>
- [20] Chen YY, Kitikiew S, Yeh ST, Chen JC. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received fucoidan exhibit a defense against *Vibrio alginolyticus* and WSSV despite their recovery of immune parameters to background levels. Fish Shellfish Immunol. [Internet]. 2016; 59:414–426. doi: <https://doi.org/p87n>
- [21] Hurlbert SH. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. Ecol. Monogr. [Internet]. 1984; 54(2):187–211. doi: <https://doi.org/c37ccj>
- [22] Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Nueva York (USA): Springer; 2009.
- [23] Segnini SE. Fundamentos de Bioestadística. Mérida (Venezuela): Universidad de los Andes; 2004.
- [24] Johnson RA, Wichern DW. Applied Multivariate Statistical Analysis. 5ta. ed. Nueva Jersey (USA): Prentice Hall; 2002.
- [25] Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol. [Internet]. 2001; 26(1):32–46. doi: <https://doi.org/cdwcns>
- [26] Dunn JC, Cole EF, Quinn JL. Personality and parasites: sex-dependent associations between avian malaria infection and multiple behavioural traits. Behav. Ecol. Sociobiol. [Internet]. 2011; 65:1459–1471. doi: <https://doi.org/fsbchkh>
- [27] Ruxton GD. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. Behav. Ecol. [Internet]. 2006. 17(4): 688–690. doi: <https://doi.org/bwgs7v>
- [28] Brock J, Main KL. A guide to the common problems and diseases of cultured "*Penaeus vannamei*". Louisiana (USA): World Aquaculture Society; 1994.
- [29] Lightner DV, Redman RM. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 1998; 164(1–4):201–220. doi: <https://doi.org/c3pxk9>
- [30] Kotiya AS, Vadher KH. Effect of different stocking density on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in summer crop in province of Gujarat State, India. J. Exp. Zool. India. [Internet]. 2021; 24:261–275. Disponible en: <https://goo.su/hsFtl>
- [31] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. Responding to the government's consultation on health and harmony: The future for food, farming and the environment in Green Brexit. Horsham (UK): Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals; 2018 [consultado 15 Jun 2025]. Disponible en: <https://goo.su/lB2FUSZ>
- [32] Ríos M, Corrales-Barrios Y, González-Salotén M, Carrillo-Farnés O, Cabrera-Alarcón H, Arenal-Cruz A. Principales factores que modifican el sistema inmune en camarones peneidos estrategias para un cultivo sostenible. Rev. Prod. Anim. [Internet]. 2022 [consultado 15 Jun 2025]; 34(1):e4037. Disponible en: <https://goo.su/kn2Id>
- [33] Dong J, Zhao YY, Yu YH, Sun N, Li YD, Wei H, Yang ZQ, Li XD, Li L. Effect of stocking density on growth performance, digestive enzyme activities, and nonspecific immune parameters of *Palaemonetes sinensis*. Fish Shellfish Immunol. [Internet]. 2018; 73:37–41. doi: <https://doi.org/gc3pw2>
- [34] Gao Y, He Z, Zhao B, Li Z, He J, Lee, J, Chu Z. Effect of stocking density on growth, oxidative stress and HSP 70 of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. [Internet]. 2017; 17(5):877–884. doi: <https://doi.org/p87s>
- [35] Kotiya AS, Vadher KH. Effect of different stocking density on growth, survival on *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in summer and monsoon crop in province of Gujarat States in India. J. Surv. Fish. Sci. [Internet]. 2021 [consultado 3 Jun 2025]; 7(3):71–99. Available in: <https://goo.su/lg8G9>
- [36] Liu KF, Chiu CH, Shiu YL, Cheng W, Liu CH. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol. [Internet]. 2010; 28(5–6):837 – 844. doi: <https://doi.org/b2bkmd>
- [37] Anaya-Rosas RE, Rivas-Vega EM, Miranda-Baeza A, Piña-Valdez P, Nieves-Soto M. Effects of a co-culture of marine algae and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the growth, survival and immune response of shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot virus (WSSV). Fish Shellfish Immunol. [Internet]. 2019; 87:136–143. doi: <https://doi.org/p87w>
- [38] Luna-González A, Moreno-Herrera JT, Campa-Córdova AI, González-Ocampo HA, Fierro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P, Bueno-Ibarra MA. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. Lat. Am. J. Aquat. Res. [Internet]. 2013; 41(5):898–907. doi: <https://doi.org/p87x>