



La suplementación de ácidos biliares en la dieta mejora la sobrevivencia y respuesta inmune de *Penaeus vannamei*

Dietary bile acid supplementation improves survival and immune response of *Penaeus vannamei*

Percy Yacila-Silva¹; Milton Sócola-Sunción¹; Edgar López-Landavery^{2, *}

1 Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes. Ciudad Universitaria, Av. Universitaria S/N, Tumbes, Perú.

2 Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción, Universidad Nacional del Santa. Av. Pacífico 508, Nuevo Chimbote, Perú.

*Autor correspondiente: elopez@uns.edu.pe (E. López-Landavery).

ORCID de los autores:

P. Yacila-Silva: <https://orcid.org/0009-0005-5636-9012>

M. Sócola-Sunción: <https://orcid.org/0000-0001-9392-5499>

E. López-Landavery: <https://orcid.org/0000-0001-8086-2425>

RESUMEN

Ácidos biliares fueron adicionados en la dieta de *Penaeus vannamei* para evaluar el efecto sobre su crecimiento, sobrevivencia y respuesta inmune. Se evaluaron dosis de 750, 2250 y 3750 ppm en la dieta, incluido un tratamiento control sin adición de ácidos biliares, durante un periodo de 28 días. Los resultados indicaron que no hubo diferencia significativa en el crecimiento, conteo de hemocitos totales, concentración de la enzima fenol oxidasa y del anión superóxido entre tratamientos ($p > 0,05$). No obstante, la suplementación de ácidos biliares indujo una mayor sobrevivencia y mayor producción de proteínas plasmáticas en el tratamiento de 2250 ppm ($p < 0,05$). Asimismo, la inclusión de ácidos biliares en la dieta a razón de 2250 ppm promovió un mayor nivel de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos. Con base en lo anterior, se concluye que la suplementación de la dieta comercial de *Penaeus vannamei* con ácidos biliares a una concentración de 2250 ppm promueve una mayor sobrevivencia, producción de proteínas plasmáticas y mejora el contenido de lípidos presentes en los túbulos hepatopancreáticos.

Palabras clave: Ácido biliar; *Penaeus vannamei*; Respuesta inmune; Sobrevivencia.

ABSTRACT

Bile acids were added to the *Penaeus vannamei* diet to evaluate their effect on the growth, survival, and immune response. Dietary doses of 750, 2250, and 3750 ppm, including control treatment without adding bile acids, were evaluated over 28 days. The results indicated no significant difference in growth, total hemocyte count, phenol oxidase enzyme concentration, and superoxide anion between treatments ($p > 0.05$). However, bile acid supplementation induced a high survival and higher plasma protein production at 2250 ppm treatment ($p < 0.05$). Likewise, including bile acids in the diet at a rate of 2250 ppm promoted a higher content of lipids in the hepatopancreatic tubules. Based on the above, it is concluded that supplementing the commercial diet of *Penaeus vannamei* with bile acids at a concentration of 2250 ppm promotes high survival and plasma protein production and improves the lipid content in the hepatopancreatic tubules.

Keywords: Bile acid; *Penaeus vannamei*; Immune response; Survival.

Recibido: 09-04-2024.

Aceptado: 09-08-2024.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la acuicultura ha crecido considerablemente como un sector estratégico en la producción de alimentos (Pauly & Zeller, 2016). Asimismo, es el sector de producción animal con la mayor tasa de crecimiento a nivel mundial (FAO, 2020). No obstante, una mayor demanda de productos acuícolas ha resultado en mayores niveles de producción, principalmente a través de sistemas intensivos, con la aparición de nuevos desafíos.

Después de la producción de peces, el cultivo de langostino representa la actividad más importante a nivel mundial, y en Perú y Ecuador representa la actividad acuícola más importante. Ello, genera grandes divisas y puestos de trabajo. Sin embargo, la productividad del cultivo de *Penaeus vannamei* dependen de una óptima alimentación y nutrición, así como de un monitoreo y control eficiente de las enfermedades virales y bacterianas para evitar pérdidas económicas. Lo anterior, refleja la necesidad de implementar estrategias que permitan mejorar de manera sostenida el manejo de los sistemas de producción.

En los últimos años, una estrategia que ha ganado aceptación a nivel comercial se basa en la aplicación de aditivos en el agua o el alimento, ya sea para mejorar la calidad del agua o promover un mejor desempeño de los organismos. Uno de esos aditivos que actualmente se están usando en el alimento son los ácidos biliares. Los langostinos no pueden sintetizar los ácidos biliares *de novo* y sólo pueden obtenerlos a través del alimento. Como tal, los ácidos biliares son componentes de la bilis, se secretan en el intestino proximal donde actúan como surfactantes al emulsionar los lípidos en micelas, mejorando su proceso de digestión debido a que genera más sitios de acción para la lipasa (Lijima et al., 1998; Chandra, 2018).

La acción emulsificante de los ácidos biliares se genera al unirse con sales de sodio y potasio para formar sales biliares, que forman micelas que se mezclan con fosfolípidos y colesterol. Lo anterior no sólo incrementa la digestión y absorción del colesterol sino también de vitaminas liposolubles, carotenoides y astaxantinas (Chiang, 2017a; Sallam et al., 2017). A nivel de hepatopáncreas, los ácidos biliares se unen con glicina y taurina para formar puentes de ácidos biliares, que son absorbidos por las paredes intestinales favoreciendo su salud y estructura morfológica (Li & Apte, 2015).

Varios estudios han reportado el efecto positivo de la inclusión de ácidos biliares en la dieta de *P. vannamei* sobre el crecimiento y la respuesta inmune (Kumar et al., 2019; Su et al., 2021; Li et al., 2023a). También, se ha comprobado que la adición de ácidos biliares en dietas con bajos niveles de inclusión de harina de pescado mejora el crecimiento (Xie et al., 2021; Wang et al., 2023). No

obstante, son escasos los reportes sobre la efectividad de estos ácidos biliares agregados artesanalmente a alimentos balanceados comerciales que se caracterizan por tener altos niveles de inclusión de harina de pescado.

Recientemente, ha sido reportado que la suplementación con ácido quenodeoxicólico a razón de 600 ppm en dietas para *P. vannamei* conteniendo harina de *Clostridium autoethanogenum*, como reemplazo parcial de harina de pescado, mejoró significativamente el crecimiento, el metabolismo de lípidos y de esteroides, además de la salud del hepatopáncreas (Shi et al., 2023). Otro estudio indica que además de la suplementación de ácidos biliares en la dieta de *Macrobrachium rosenbergii*, es importante mantener una microbiota balanceada, de manera que los ácidos biliares y ácidos grasos de cadena corta que producen favorezcan la salud intestinal y el sistema inmune (Zheng et al., 2024).

La respuesta inmune en crustáceos se da a través de una combinación de tejidos, células y un sistema de moléculas que cumplen un rol defensivo contra infecciones de potenciales agentes patógenos, así como de sustancias que puedan ocasionar algún tipo de daño (Cajas et al., 2020). En este contexto, los hemocitos son cruciales en la respuesta inmune y están involucrados en diversos procesos tales como la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y mediación de la citotoxicidad. Avances en el estudio de hemocitos y la purificación de factores involucrados en las reacciones de defensa muestran que el sistema de activación de la profenoloxidasas y otros factores asociados son mediadores vitales de la inmunidad en crustáceos (Cerenius et al., 2010; Kulkarni et al., 2021).

Varios autores indican que los parámetros hematológicos más empleados como indicadores de salud en crustáceos son: (1) Hemogramas, (2) Tiempo de coagulación de la hemolinfa, (3) Actividad de la enzima fenol oxidasa (PO), (4) Índice de fagocitosis, (5) Producción de radicales de oxígeno (ROIs), (6) actividad antimicrobiana, (7) título aglutinante del plasma y (8) concentración de proteínas totales de la hemolinfa (Barracco et al., 2014; Huang et al., 2020).

La potencial efectividad de los ácidos biliares agregados de manera artesanal en alimentos balanceados comerciales conduciría a una aplicación práctica en la alimentación de *P. vannamei*. Esto implicaría una mejora en la eficiencia alimenticia, mantener la calidad del agua y fortalecer su sistema inmune. Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de la adición de ácidos biliares en el alimento balanceado comercial sobre el crecimiento, sobrevivencia y la respuesta inmune de *P. vannamei*.

METODOLOGÍA

Obtención de juveniles de *Penaeus vannamei*

Cuatrocientos veinte juveniles de *P. vannamei* con un peso promedio de $5,8 \pm 0,19$ g fueron obtenidos

del Centro de Producción Acuícola de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (Figura 1a). Previo al inicio del experimento, los langostinos

fueron aclimatados durante dos semanas a la temperatura ($\sim 27^{\circ}\text{C}$) y alimentación con balanceado comercial (4 raciones al día, 40% proteína).

Origen de los ácidos biliares

El producto comercial (Runeon II 75%) utilizado en esta investigación tuvo como ingrediente activo 75% de ácidos biliares (ácido quenodesoxicólico y ácido cólico) y un 25% de almidón de maíz como transportador. Está diseñado para promover la digestión y absorción de grasas y vitaminas liposolubles, proteger al hígado y a la vesícula biliar, apoyar la salud animal, aumentar la utilización de la dieta y reducir el costo de la alimentación. En crustáceos, se recomiendan dosis de 1 a 3 kg por tonelada de alimento.

Inclusión de los ácidos biliares en el alimento

Se utilizó alimento comercial extruido con niveles de proteína de 40% (0,8 mm Ø) y 35% (1,2 mm Ø), respectivamente. La preparación del alimento con la inclusión de los ácidos biliares se realizó diariamente. Para ello, inicialmente se elaboró una mezcla de ligante con agua en relación 4:1. La mezcla se utilizó a razón de 40 mL/kg de alimento. Posteriormente, se agregó la cantidad correspondiente de ácidos biliares en función de los tratamientos: control, 750 ppm, 2250 ppm y 3750 ppm. El mezclado fue realizado hasta humedecer uniformemente el alimento. Previo a su distribución en los tanques experimentales, el alimento fue secado a temperatura ambiente durante 2 h.

Ensayo con *Penaeus vannamei*

El diseño experimental para evaluar el efecto de la adición de ácidos biliares en el alimento sobre el crecimiento y la respuesta inmune de *P. vannamei* fue un diseño completamente aleatorizado. Estuvo compuesto de 4 tratamientos y 3 réplicas biológicas, generando 12 unidades experimentales equivalentes a tanques circulares de 1,5 m³ de capacidad con aireación mecánica. La densidad inicial fue de 35 juveniles/m³ y la ración diaria de alimento fue dividida en 4 dosis y suministradas a

las 8 am, 12 m, 3 pm y 6 pm. El ensayo duró 28 días (Figura 1b).

Crecimiento y sobrevivencia de *P. vannamei*

Las muestras de langostino fueron tomadas aleatoriamente una vez por semana. El peso promedio se determinó mediante el método gravimétrico con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso promedio (g)} = \frac{\text{Peso total de muestra (g)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de individuos en muestra}}$$

El incremento de peso semanal se calculó restando el peso del langostino al final de cada semana con el peso final de la semana anterior. La sobrevivencia semanal se calculó considerando el número de organismos vivos respecto al número inicial que representó el 100%.

Parámetros inmunológicos de *P. vannamei*

Para la toma de muestra de hemolinfa, se siguió el procedimiento del Laboratorio Ecobiotech LAB SAC. Para ello, se dejó de alimentar 12 horas antes del muestreo. Luego, la temperatura del agua fue llevada a 5 °C durante 5 min y se extrajo de 100 a 300 µL de hemolinfa de la base del quinto periópodo de cada organismo. Para la extracción, se utilizó una jeringa hipodérmica de 1 mL (aguja 25 G x 16 mm) conteniendo 500 µL de solución anticoagulante SIC-EDTA refrigerada (2-8 °C). Las muestras fueron diluidas con solución anticoagulante y mantenidas en hielo hasta su análisis.

El conteo de hemocitos se realizó con la cámara Neubauer (Morales & Cuellar-Anjel, 2014), la concentración de proteínas plasmáticas totales se cuantificó mediante el método colorimétrico de Biuret usando kits de análisis QCA (Gornall et al, 1949), la cuantificación de fenol-oxidasas total con el método de oxidación L-DOPA (Hernández-López et al, 1996) y la cuantificación del anión superóxido por el método de reducción de NBT (Song & Hsieh, 1994). Los cuatro parámetros inmunológicos fueron evaluados al inicio y final del ensayo.



Figura 1. Ejemplares de *Penaeus vannamei* al inicio (a) y final del experimento (b). La coloración de los organismos y el grado de llenura del hepatopáncreas e intestino indican un adecuado estado de salud.

Calidad de agua y análisis en fresco

Las variables de calidad de agua como temperatura, oxígeno disuelto, pH, alcalinidad, salinidad y amoníaco se midieron con base en las recomendaciones de Rojas et al. (2005, Tabla 1). Para el análisis en fresco, las características como el nivel de lípidos en hepatopáncreas, el grado de infestación por ectoparásitos en branquias y el nivel de gregarinas en intestino fueron determinados con base en lo reportado por Morales y Cuellar-Anjel (2014). Las muestras en fresco fueron observadas directamente en el microscopio, iniciando con el objetivo de menor aumento (4x) y finalizando con el de mayor aumento (10x). Dada la naturaleza de

los tejidos, primero se analizó hepatopáncreas, luego branquias y finalmente intestino.

Análisis estadístico

Las asunciones de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron evaluadas con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Para determinar diferencias significativas en el crecimiento, sobrevivencia y parámetros inmunológicos, un análisis de varianza (ANOVA) de una vía fue realizada con un nivel de significancia de 0,05. Cuando hubo diferencias significativas, la prueba de Duncan fue aplicada con $p < 0,05$. Los análisis fueron realizados con el programa SPSS.

Tabla 1

Horarios, frecuencia, instrumento o método de la toma de parámetros de calidad de agua de los tanques durante el ensayo

Parámetro	Horario y Frecuencia	Instrumento o método
Temperatura	6:00 h y 18:00 h, diariamente	Termómetro YSI Pro 20
Alcalinidad	6:00, semanalmente	Espectrofotometría/YSI 9100
Salinidad	12:00 h, semanalmente	Refractómetro manual
Oxígeno disuelto	6:00 h y 18:00 h, diariamente	Salinómetro 0-100 ppt Stx-3 Vee Gee Oxímetro YSI Pro 20
Potencial de hidrógeno (pH)	12:00 h, semanalmente	Potenciómetro portátil DPH-2
Amoníaco	12:00 h, semanalmente	Espectrofotometría/YSI 9100

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y sobrevivencia de *P. vannamei*

Durante el ensayo, el peso promedio y el incremento de peso semanal no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$, Tabla 2) entre el control y los tratamientos. Ello indica que la adición de ácidos biliares en el alimento no influyó en el crecimiento de los organismos. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Su et al. (2021), quienes lograron mejorar el crecimiento de *P. vannamei* alimentado con dietas con alto contenido de harina de pescado, similares a los alimentos balanceados comerciales, con dosis de 200 y 300 ppm de ácidos biliares. Asimismo, en dietas con bajo nivel de harina de pescado (10%), el mejor crecimiento se obtuvo a 600 ppm (Li et al., 2023). Esta discrepancia podría deberse a las dosis usadas en esta investigación, las cuales fueron altas (750 – 3750 ppm). Otro estudio reportando diferencias no significativas en el crecimiento de *P. vannamei* entre el control y el tratamiento, usó una dosis de 1000 ppm de ácidos biliares en el alimento (Granda, 2022). Lo anterior, sugiere que dosis elevadas de ácidos biliares en el alimento no tienen un efecto promotor en el crecimiento de *P. vannamei*, debido a que podrían causar daño oxidativo al organismo a partir de concentraciones de 500 ppm (Su et al., 2021). El análisis estadístico mostró que la sobrevivencia promedio final presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), siendo mayor a 750 y 2250 ppm, con 93,9% y 96,9%, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados difieren de los

reportados por Su et al. (2021), quienes no encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia. No obstante, y al menos bajo nuestras condiciones experimentales, niveles intermedios de ácidos biliares en el alimento favorecieron una mayor sobrevivencia, probablemente debido a una mayor estimulación del sistema inmune, como ha ido reportado recién-temente (Kumar et al., 2019; Li et al., 2023a).

Parámetros inmunológicos de *P. vannamei*

El conteo final de hemocitos y su variación no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). No obstante, el nivel de hemocitos, de 10^8 células/mL, fue superior a las 10^6 células/mL reportado en un estudio con adición de ácidos biliares en dietas con alto contenido de harina de pescado (Su et al., 2021). Esta diferencia indica que el sistema inmune estuvo estimulado, no por los ácidos biliares, sino por los niveles de temperatura alcanzados en el ensayo (26,2 a 27,8 °C). Dichos valores están muy cerca de 28 °C, temperatura a la cual se obtuvo el mayor valor de los parámetros inmunológicos en el rango térmico para el cultivo de *P. vannamei* (Martín Ríos et al., 2022). La concentración de proteínas plasmáticas hacia el final del ensayo fue significativamente mayor a 2250 ppm de ácido biliar en la dieta ($p < 0,05$, Tabla 3). No obstante, su variación con respecto al inicio del ensayo no mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos conteniendo ácidos biliares ($p > 0,05$).

Tabla 2

Peso promedio final, incremento de peso y sobrevivencia de *Penaeus vannamei* alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares. Promedios con superíndice diferente indica diferencias significativas

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Peso promedio final (g)	Incremento de peso promedio (g)	Sobrevivencia final (%)
Control	10,27 ^a ± 0,21	4,56 ^a ± 0,23	89,8 ^a ± 1,5
750	10,07 ^a ± 0,40	4,39 ^a ± 0,62	93,9 ^b ± 1,4
2250	10,80 ^a ± 0,72	5,05 ^a ± 0,84	96,9 ^c ± 0,5
3750	9,98 ^a ± 0,72	4,09 ^a ± 0,65	91,0 ^a ± 0,6

Tabla 3

Concentración de proteínas plasmáticas y variación de la concentración de proteínas plasmáticas de *Penaeus vannamei* alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares. Promedios con superíndice diferente indica diferencias significativas

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Concentración de proteínas plasmáticas (mg/mL)	Variación de la concentración de proteínas plasmáticas (mg/mL)
Control	119,57 ^a ± 1,35	5,13 ^{ab} ± 1,82
750	124,22 ^b ± 1,28	5,53 ^{ab} ± 2,17
2250	126,86 ^c ± 1,00	8,78 ^b ± 2,53
3750	120,88 ^a ± 0,98	4,25 ^a ± 2,31

La concentración final de proteína plasmática sugiere que hay un efecto promotor de los ácidos biliares sobre este parámetro, estimulando el sistema inmune. Las concentraciones de proteína plasmática obtenidas en este estudio están dentro del rango de 100 a 130 mg/mL establecido para *P. vannamei* (Gullian, 2001; Molina et al., 2001). Un aspecto relevante es que al obtener niveles normales de este parámetro inmunológico en el tratamiento control, demuestra que el alimento balanceado cubre los requerimientos nutricionales necesarios para mantener los niveles apropiados de proteínas plasmáticas en *P. vannamei*, y que la adición de ácidos biliares a razón de 2 250 ppm en el alimento aumenta la concentración de estas proteínas.

La concentración de fenoloxidasas en la hemolinfa al final del ensayo no mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos ($p > 0,05$). En contraste, su variación en el tiempo fue significativa ($p < 0,05$), con un mayor diferencial a 2250 ppm (Tabla 4). Si bien, hubo un efecto de la adición de ácidos biliares en el alimento sobre la variación de la fenoloxidasa, ésta representa alrededor del 2%; lo que implica valores muy bajos y una diferencia no tan clara entre los tratamientos. No obstante, los valores obtenidos de fenoloxidasa se encuentran dentro de los rangos normal (200-350 mD.O) y alto (350-500 mD.O) establecidos para *P. vannamei* (Gullian, 2001; Molina et al., 2001). Los valores relativamente altos de fenoloxidasa, tanto en los tratamientos como en el control, puede

deberse a los niveles alcanzados de factores abióticos como la temperatura cercana a los 28 °C por tiempo prolongado, salinidades entre 5‰ y 25‰, oxígeno disuelto en niveles adecuados y niveles bajos de amonio (Martín Ríos et al., 2022). La concentración de anión superóxido en la hemolinfa presentó el mismo patrón que la fenoloxidasa, con diferencias significativas sólo en la variación a lo largo del tiempo ($p < 0,05$, Tabla 5) y con el mayor diferencial a 2250 ppm. Asimismo, los valores finales de anión superóxido obtenidos en este estudio se encontraron dentro del rango establecido como bueno (1,5-2,0 D.O) para *P. vannamei* (Gullian, 2001; Molina et al., 2001), excepto para el control. Los niveles adecuados de anión superóxido se explicarían por los niveles apropiados de oxígeno disuelto, pues en condiciones de hipoxia, la concentración del anión superóxido disminuye (Martín Ríos et al., 2022). Aquí, es importante destacar que, aunque se ha establecido un valor mínimo en condiciones fisiológicas normales, es necesario establecer un valor máximo. Ello, debido a que las especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido, en concentraciones elevadas pueden causar peroxidación lipídica y alterar la integridad estructural de las membranas celulares, lo que lleva a la liberación masiva de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en la hemolinfa, pudiendo causar daño oxidativo en el hepatopáncreas (Su et al., 2021).

Tabla 4

Concentración final de fenoloxidasas y variación de la concentración de fenoloxidasas en la hemolinfa de *Penaeus vannamei* alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares. Promedios con superíndice diferente indica diferencias significativas

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Concentración final de fenoloxidasa (mD.O)	Variación de la concentración de fenoloxidasa (mg/mL)
Control	370 ^a ± 10	5 ^a ± 1,1
750	349 ^b ± 18	7 ^{bc} ± 1,1
2250	378 ^c ± 18	8 ^c ± 1,5
3750	335 ^a ± 14	6 ^{ab} ± 1,1

Tabla 5

Concentración final del anión superóxido dismutasa y variación de la concentración del anión superóxido en la hemolinfa de *Penaeus vannamei* alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares. Promedios con superíndice diferente indica diferencias significativas

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Concentración final de anión superóxido (D.O)	Variación de la concentración de anión superóxido (D.O)
Control	1,45 ^a ± 0,13	0,26 ^a ± 0,04
750	1,64 ^a ± 0,02	0,39 ^{ab} ± 0,05
2250	1,65 ^a ± 0,09	0,53 ^b ± 0,14
3750	1,63 ^a ± 0,03	0,37 ^a ± 0,04

Calidad de agua y análisis en fresco

Los parámetros físicos y químicos de la calidad de agua fluctuaron dentro de los valores establecidos para el cultivo de *P. vannamei* (Instituto Nacional de Pesca, 2018), excepto el amoníaco, que fue incrementando durante el ensayo. El oxígeno disuelto varió de 3,9 a 4,4 mg/L por la mañana y de 4,5 a 5,1 mg/L por la tarde. La temperatura osciló de 26,2 a 27,8 °C por la mañana y de 26,9 a 28,5 °C por la tarde. El pH fluctuó entre 7,4 y 7,8, la alcalinidad de 140 a 205 mg/L, la salinidad de 21 a 22 ‰ y el amoníaco (NH₃) de 0,05 mg/L al inicio del ensayo, hasta 0,39 mg/L al final del ensayo. Aunque el amoníaco excedió el nivel óptimo de 0,1 mg/L, no tuvo un efecto negativo sobre la sobrevivencia de *P. vannamei*.

Respecto al análisis en fresco, realizado al inicio y

final del ensayo, el grado y nivel de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos de los organismos empezó con G1 (0% a 85% de lípidos) en todos los tratamientos y terminó con G3 (90% a 96% de lípidos), excepto en la dosis de 2 250 ppm, que alcanzó el G4 (96% a 100% de lípidos). Con esta dosis de ácidos biliares, se alcanza los requerimientos óptimos necesarios en el organismo, para que alcance el nivel más alto de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos. Para esto, las dietas no solamente deben cubrir los requerimientos de sustancias grasas, sino que también se absorban eficientemente en el intestino, siendo necesario que estas grasas previamente se emulsifiquen; proceso que es realizado por los ácidos biliares (Tacon, 1989; Mukhopadhyay y Maitra, 2004; Romano et al., 2019).

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la suplementación de ácidos biliares en la dieta de *Penaeus vannamei* a razón de 2250 ppm favoreció la sobrevivencia e indujo un mayor nivel de producción de proteínas plasmáticas en la hemolinfa, fortaleciendo su sistema inmune. Otro aspecto importante, es el hecho de que la suplementación con estos componentes, sobre todo a 2250 ppm, mantiene altos niveles de contenido lipídico en el hepatopáncreas, lo que favorece la salud de éste órgano clave y asegura una adecuada digestión y

asimilación de nutrientes. Dos aspectos importantes para estudios posteriores sería evaluar el nivel de expresión de los genes relacionados con el sistema inmune y los procesos digestivos a nivel de hemolinfa y hepatopáncreas, respectivamente; así como la modulación de la comunidad microbiana en el intestino de manera que nos permitan comprender de manera integral el efecto de la suplementación de los ácidos biliares sobre el desempeño biológico de los organismos bajo condiciones comerciales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo durante el desarrollo del ensayo, a los estudiantes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (FIPCM) de la Universidad Nacional de Tumbes: Fiorella Ramírez, Mónica Manrique, Abel Chiroque

y Jairo Reyes. Al Dr. Oscar Mendoza, decano de la FIPCM, por facilitarnos el uso de las instalaciones para desarrollar el presente trabajo. Al Ing. Holger Barahona, Gerente de la empresa Aquafertil por facilitarnos los ácidos biliares (Runeon II 75%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barracco, M. A., Perazzolo, L. M., & Rosa, R. D. (2014). Avances en la Inmunología del Camarón. En: Morales, V.; Cuellar-Angel, J. (Eds). *Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos*. 2nd ed. Panamá: CYTED, 237-308.
- Cajas, S., Yamashita, E. y Soligo, T. (2020). Cómo modular y fortalecer el sistema inmune del camarón y obtener una mejor respuesta frente a los desafíos de estrés y enfermedades mediante una óptima nutrición vitamínica. *Revista Cámara Nacional de Acuicultura*. Edición 135 junio 2020. 38-41 pp.
- Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H. P., & Soderhall, I. (2010). Crustacean immunity. *Invertebrate immunity*, 239-259.
- Chandra, P. (2018). Importancia del aditivo para piensos "ácido biliar" en la nutrición del camarón y sus propiedades funcionales para la práctica de cultivo sostenible. Engormix. <https://en.engormix.com/feedmachinery/articles/importance-feed-additive-bile-t43043.html>.
- Chiang, J. Y., (2017a). Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Research* 6, 2029. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12449.1>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem*, 177(2), 751-766.
- Granda, E. (2022). Uso de enzimas digestivas y ácidos biliares obtenidos de *Oreochromis sp.* aplicados en cultivos de

- Penaeus vannamei* a baja salinidad [Tesis para título de Ingeniero Acuicultor]. Universidad Técnica de Machala.
- Gullian K., M. (2001). Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei* [Tesis de maestría]. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., & Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Phys. C*, 113C, 61-66. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0)
- Huang, Z., Aweya, J. J., Tran, N. T., Li, S., Yao, D., & Zhang, Y. (2020). Modulation of crustacean innate immune response by amino acids and their metabolites: inferences from other species. *Frontiers in immunology*, 11, 574721. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574721>
- Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil Uthaman, S., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Kooloth Valappil, R. (2021). Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 431-459. <https://doi.org/10.1111/raq.12482>
- Kumar, R., Hann, T., Chang, Ch., Tung, T., Lin, S., Lo, Ch. & Wang, H. (2019). Bile acid and bile acid transporters are involved in the pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Cellular Microbiology*, 22, e13127. <https://doi.org/10.1111/cmi.13127>
- Li, T., & Apte, U. (2015). Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. *Adv. Pharmacol.*, 74, 263-302. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.04.003>
- Martín Ríos, L. D., Corrales Barrios, Y., González Salotén, M., Carrillo Farnés, O., Cabrera Alarcón, H., Arenal Cruz, A. (2022). Principales factores que modifican el sistema inmune en camarones peneidos estrategias para un cultivo sostenible. *Revista de Producción Animal*, 34(1). <https://revistas.reduc.edu.co/indexp/rpa/article/view/e4037>
- Molina, C., Rodríguez, J. & Echeverría, F. (2001). Efectos combinados de la Vitamina C y E dietéticas en la inmunorespuesta del juvenil *Litopenaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. *Boletín Informativo Quincenal CENAIM Informa*. 15 octubre.
- Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (2014). Guía Técnica: Patología e inmunología de camarones penaeidos. 2da ed. OIRSA, Panamá.
- Mukhopadhyay, S. & Maitra, U. (2004). Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*, 87(12), 1666-1683.
- Li, X., Li, H., Qu, K., Liu, Y., Chi, S., Yang, Q., ... & Xie, S. (2023). Dietary bile acids promote sterol metabolism, bile acids enterohepatic circulation, and apoptosis in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animal Feed Science and Technology*, 303, 115710. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115710>
- Li, X., Shi, M., Chen, L., Zhang, S., Chi, S., Dong, X., Deng, J., Tan, B. & Xie, S. (2023a). Effects of bile acids supplemented into low fishmeal diet on growth, molting, and intestinal health of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 29, 101491. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101491>
- Lijima, N., Tanaka, S. & Ota Y. (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18, 59-69. <https://doi.org/10.1023/A:1007725513389>
- Pauly D., & Zeller D. (2016). Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nature communications*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms10244>
- Rojas, A. A., Haws, M. C. y Cabanillas, J. A. (2005). Buenas Prácticas de Manejo Para el Cultivo de Camarón. The David and Lucile Packard Foundation. EU Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-95- 0030-05).
- Romano, N., Kumar, V., Yang, G., Kajbaf, K., Rubio, M. B., Overturf, K., Brezas, A. & Hardy, R. (2019). Bile acid metabolism in fish: disturbances caused by fishmeal alternatives and some mitigating effects from dietary bile inclusions. *Reviews in Aquaculture*, 1-26. <https://doi.org/10.1111/raq.12410>
- Sallam, A., Mansour, A., Srouf, T. & Goda, A. (2017). Effects of different carotenoid supplementation sources with or without sodium taurocholate on growth, feed utilization, carotenoid content and antioxidant status in fry of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture Research*, 48, 3848-3858. <https://doi.org/10.1111/are.13212>
- Shi, M., Zheng, C., Sun, Y., Li, X., He, G., Cao, J., ... & Xie, S. (2023). Effects of dietary chenodeoxycholic acid supplementation in a low fishmeal diet containing *Clostridium autoethanogenum* protein on growth, lipid and cholesterol metabolism, and hepatopancreas health of *Litopenaeus vannamei*. *Animals*, 13(13), 2109. <https://doi.org/10.3390/ani13132109>
- Song, Y. L. and Hsieh, Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18, 201-209. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)90012-4)
- Su, Ch., Liu, X., Li, J., Zhang, M., Pan, L., Lu, Y., Wang, Y. & Ding, Y. (2021). Effects of bile acids on the growth performance, lipid metabolism, non-specific immunity and intestinal microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 27(6), 2029-2041. <https://doi.org/10.1111/anu.13338>
- Tacon, A. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. <https://www.fao.org/3/ab492s/AB492S01.htm#I>
- Wang, Y., Xu, Z., Li, M., Shuai, K., Lei, L., Li, X. & Leng, X. (2023). Supplemental bile acids in low fishmeal diet improved the growth, nutrient utilization of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Reports*, 28, 101452. <https://doi.org/10.1111/anu.13338>
- Xie, S., Wei, D., Tian, L. & Liu, Y. (2021). Dietary supplementation of chenodeoxycholic acid improved the growth performance, immune response and intestinal health of juvenile *Penaeus monodon* fed a low fishmeal diet. *Aquaculture Reports*, 20, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100773>
- Zheng, X., Xu, X., Liu, M., Yang, J., Yuan, M., Sun, C., ... & Liu, B. (2024). Bile acid and short chain fatty acid metabolism of gut microbiota mediate high-fat diet induced intestinal barrier damage in *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 146, 109376. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109376>