

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y GESTION AMBIENTAL



**Efecto de los ácidos biliares en el crecimiento, sobrevivencia y
respuesta inmunológica en juveniles de *Penaeus vannamei***

TESIS

**Para optar el grado académico de Maestro en Acuicultura y
Gestión Ambiental**

Autor: Percy Orlando Yacila Silva

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y GESTION AMBIENTAL



Efecto de los ácidos biliares en el crecimiento, sobrevivencia y respuesta inmunológica en juveniles de *Penaeus vannamei*

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Saldarriaga Yacila, David Edilberto (presidente)

Mtro. Noblecilla Retamozo, Paul Ricardo (secretario)

Mtro. García Camizan, Ronald (vocal)

Mg. Sócola Sunción, Milton Sandro (vocal)

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y GESTION AMBIENTAL



Efecto de los ácidos biliares en el crecimiento, sobrevivencia y respuesta inmune de *Penaeus vannamei*

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Br. Percy Orlando Yacila Silva (autor)

Mg. Milton Sandro Sócola Sunción (asesor)

Tumbes, 2024

ACTA DE SUSTENTACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes – Perú

"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los Veinti dos días del mes de marzo del ...2024... siendo las 10 horas y 05 minutos, en el aula N° 02 de la Escuela de Posgrado, se reunieron el jurado calificador de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes designado con resolución N° 120- 2023/UNTUMBES-EPG-D, del 27 de marzo de 2023: **Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila** (presidente), **Mg. Paúl Ricardo Noblecilla Retamozo** (secretario), el **Mg. Ronald García Camizán** (vocal), y como vocal y asesor al **Mg. Milton Sandro Sócola Sunción**.

Se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de tesis titulada: **EFFECTO DE LOS ÁCIDOS BILIARES EN EL CRECIMIENTO, SOBREVIVENCIA Y RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN JUVENILES DE *Penaeus vannamei***, para optar el grado académico de **MAESTRO EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL**, presentado por el:

Bach. PERCY ORLANDO YACILA SILVA

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación el jurado, según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al: Maestrando, aprobado con calificativo de MUY BUENA.

En consecuencia, queda APROBADO, para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del grado académico de Maestro en Acuicultura y Gestión Ambiental, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Texto Único Ordenado del Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados Titulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las ...11:00... horas y 30 minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de público asistente.

Tumbes, 22 de marzo de 2024

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
DNI N°: 00320699
ORCID N° 0000-0002-4919-8607
Presidente

Mg. Paul Ricardo Noblecilla Retamozo
DNI N° 00371122
ORCID N° 0000-0003-1901-7462
Secretario

Mg. Ronald García Camizán
DNI N°: 70521447
ORCID N° 0000-0002-2717-2860
Vocal

REPORTE TURNITIN

Efecto de los ácidos biliares en el crecimiento, sobrevivencia y respuesta inmune de *Penaeus vannamei*

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

11%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	9%
2	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	aquahoy.com Fuente de Internet	1%
4	Submitted to Monash University Trabajo del estudiante	<1%
5	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.unia.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.unu.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	<1%

9	adoc.site Fuente de Internet	<1 %
10	doaj.org Fuente de Internet	<1 %
11	brill.com Fuente de Internet	<1 %
12	revistabypc.org.ar Fuente de Internet	<1 %
13	www.crc.uri.edu Fuente de Internet	<1 %
14	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
15	repositoriodigital.uns.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
16	webidu.idu.gov.co Fuente de Internet	<1 %
17	1library.co Fuente de Internet	<1 %
18	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	<1 %
19	www.doccity.com Fuente de Internet	<1 %
20	www.dspace.espol.edu.ec	

	Fuente de Internet	<1 %
21	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
22	Submitted to UC, Boulder Trabajo del estudiante	<1 %
23	posgrados.cicese.mx Fuente de Internet	<1 %
24	repositorio.ual.es Fuente de Internet	<1 %
25	Menglin Shi, Xinzhou Yao, Kangyuan Qu, Yucheng Liu, Beiping Tan, Shiwei Xie. "Effects of taurine supplementation in low fishmeal diet on growth, immunity and intestinal health of <i>Litopenaeus vannamei</i> ", <i>Aquaculture Reports</i> , 2023 Publicación	<1 %
26	cenaim.espol.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
27	moam.info Fuente de Internet	<1 %
28	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
29	purl.org Fuente de Internet	<1 %

30	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
31	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
32	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
33	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %

P. Col

Excluir citas Activo
Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 15 words

DEDICATORIA

Este informe está dedicado a Dios por nunca dejar que me rinda en los momentos más difíciles.

A mis padres Artemio Yacila Espinoza (+) y Elena Silva Herrera por el apoyo incondicional que me brindaron desde el inicio de esta carrera; ellos son los que me impulsan a seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por darme las fuerzas suficientes para poder superar esta etapa de mi vida, por nunca dejar que me rinda en los momentos más difíciles.

Un agradecimiento a cada una de las personas que me apoyaron durante la ejecución del proyecto de investigación, como son el señor decano de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, mi asesor académico, estudiantes colaboradores y empresa Fertiaqua.

ÍNDICE

RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
2.1. Bases teórico-científicas	19
2.1.1. Hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i>	19
2.1.2. Acido biliar y bilis. - función.....	19
2.1.3. Estructura del ácido biliar.....	20
2.1.4. Respuesta inmune e inmunoestimulantes en <i>P. vannamei</i>	21
2.2. Antecedentes	25
2.3. Definición de términos básicos.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	31
3.1. Lugar de ejecución.....	31
3.2. Tipo y diseño de investigación	32
3.3. Población y muestra.....	32
3.3.1. Población	32
3.3.2. Muestra	32
3.4. Características del producto comercial que contiene ácido biliar.....	33
3.5. Preparación del alimento con inclusión del ácido biliar.	33
3.6. Cultivo de <i>P. vannamei</i>	34
3.7. Crecimiento y sobrevivencia del langostino.	35
3.8. Parámetros inmunológicos del langostino.....	36
3.9. Parámetros de calidad de agua y patológicos.....	36
3.10. Procesamiento y análisis de datos.	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza.	39
4.2. Crecimiento y sobrevivencia del langostino.	39
4.3. Parámetros inmunológicos del langostino.....	42
4.4. Parámetros de calidad de agua y patológicos.....	46
V. CONCLUSIONES.....	48
VI. RECOMENDACIONES	49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Horarios, frecuencia, instrumento o método de la toma de parámetros de calidad de agua de los tanques de cultivo experimental.....	34
Tabla 2. Peso promedio final, incremento de peso y sobrevivencia de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.	38
Tabla 3. Conteo de hemocitos e incremento de hemocitos de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.	39
Tabla 4. Concentración de proteínas plasmáticas y variación de la concentración de proteínas plasmáticas de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.....	41
Tabla 5. Concentración final de fenoloxidasa y variación de la concentración de fenoloxidasa de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.	42
Tabla 6. Concentración final de anión superóxido y variación de la concentración de anión superóxido en la hemolinfa de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de: (a) Alcohol biliar de 27 carbonos, (b) ácido biliar de 27 carbonos y (c) ácido biliar de 24 carbonos. Esquema tomado de Romano et al. (2019).....	17
Figura 2. Fotografía satelital del lugar de ejecución del proyecto en el Taller de Recursos Acuáticos II encerrado en rojo (Imagen capturada de Google Earth, 2023).	28
Figura 3. Esquema de la distribución aleatoria de los tratamientos en los tanques experimentales que se encontraban formando dos columnas por seis filas dentro del ambiente del taller Recursos Acuáticos II de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.....	32
Figura 4. Crecimiento de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.	37
Figura 5. Supervivencia de <i>P. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Peso promedio, biomasa y sobrevivencia de <i>P. vannamei</i> alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.	53
Anexo 2. Parámetros inmunológicos de <i>P. vannamei</i> alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.	54
Anexo 3. Prueba de normalidad de datos de Shapiro-Wilk en los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino sometido a cuatro dosis de ácidos biliares en la dieta (incluido el control), según SPSS, versión 24.	55
Anexo 4. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene en datos de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino sometido a cuatro dosis de ácidos biliares en la dieta (incluido el control), según SPSS, versión 24.	56
Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino sometido a cuatro dosis de ácidos biliares en la dieta (incluido el control), según SPSS, versión 24.	57
Anexo 6. Subgrupos según la prueba post hoc Duncan ($\alpha=0,05$) de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino que arrojaron diferencia significativa ($p<0,05$) entre los tratamientos según ANOVA, utilizando el programa computacional SPSS, versión 24.	59
Anexo 7. Parámetros físicos y químicos de calidad de agua durante el cultivo experimental de <i>P. vannamei</i> alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.	60
Anexo 8. Parámetros patológicos de <i>P. vannamei</i> alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.	61

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron los efectos de la adición de ácidos biliares en alimento balanceado comercial sobre el crecimiento, sobrevivencia y la respuesta inmunológica en juveniles de *Penaeus vannamei*. Se probaron dosis de 750, 2 250 y 3 750 ppm en alimento balanceado comercial, comparativas con un control 0 ppm. Se utilizaron langostinos con un peso promedio de 5,8 g a una densidad inicial de 35 juveniles/m³. Estos fueron distribuidos aleatoriamente en 12 tanques circulares (tres por cada dosis) de PVC de 1,5 m³ de capacidad total, provistos de aireación mecánica por un periodo de cultivo de 28 días. Los resultados indicaron que no hubo diferencia significativa ($p>0,05$) en el crecimiento, conteo de hemocitos totales, concentración de la enzima fenoloxidasa y del anión superóxido, a favor de las dosis de ácidos biliares frente al control. Pero sí hubo diferencia significativa ($p<0,05$) en la sobrevivencia y la concentración de proteínas plasmáticas a favor de la dosis de 2 250 ppm respecto al control y las otras dosis; encontrándose los valores de estos parámetros inmunológicos en niveles aceptables de un individuo sano. También, los ácidos biliares adicionados en dosis de 2 250 ppm al alimento balanceado evidenciaron mejoramiento del nivel de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos. Se concluyó que los ácidos biliares agregados artesanalmente en el alimento balanceado comercial en la dosis de 2 250 ppm mejoraron la sobrevivencia, la concentración de proteínas plasmáticas y el nivel de lípidos de los túbulos hepatopancreáticos del langostino.

Palabras clave: ácido biliar, respuesta inmunológica, *Penaeus vannamei*, supervivencia.

ABSTRACT

In this work, the effects of the addition of bile acids in commercial balanced feed on the growth, survival and immune response of *Penaeus vannamei* were studied. Doses of 0, 750, 2 250 and 3 750 ppm were tested in commercial balanced feed. Prawns with an average weight of 5.8 g were used at an initial density of 35 juveniles/m³. These were randomly distributed in 12 circular PVC tanks (three for each dose) with a total capacity of 1.5 m³, provided with mechanical aeration for a culture period of 28 days. The results indicated that there was no significant difference ($\alpha > 0.05$) in shrimp growth, total hemocyte count, concentration of the enzyme phenoloxidase and superoxide anion, in favor of the doses of bile acids compared to the control. But there was a significant difference ($\alpha < 0.05$) in survival and plasma protein concentration in favor of the 2 250 ppm dose compared to the control and the other doses. However, the values of these immunological parameters were at acceptable levels for a healthy shrimp. Also, the bile acids added to the balanced feed showed that they could improve the lipid level in the hepatopancreatic tubules of the shrimp and the degree of infestation by *Zoothamnium* sp.; but not the degree of gregarine/trophozoite infestation. It is concluded that the bile acids added by hand in the commercial balanced feed at the dose of 2 250 ppm improve the survival and the concentration of plasma proteins of the shrimp.

Keywords: bile acid, immune response, *Penaeus vannamei*, survival.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Un recurso cultivable que ha crecido de manera exponencial en todas las latitudes es el langostino *Penaeus vannamei*. Es una industria que genera grandes divisas. Sin embargo, la productividad de estos cultivos depende de una óptima alimentación y nutrición de la especie; así como también, del control de las enfermedades para evitar pérdidas económicas. Por este motivo, es necesario implementar estrategias eficaces que permitan mejorar los parámetros productivos en los sistemas de producción.

Muchas estrategias están basadas en el manejo del estanque de cultivo; otras en la aplicación de sustancias o aditivos en agua de cultivo; así como también, en el alimento. Uno de estos aditivos en los alimentos que actualmente se están estudiando son los ácidos biliares.

Los ácidos biliares exógenos, como aditivos alimentarios en la dieta de *P. vannamei*, optimizan la utilización y digestión eficiente de las grasas y proporcionan más energía a partir de la sustancia grasa; así como también, incrementan el rendimiento en crecimiento, disminuyen los costos de alimentación y protegen la salud intestinal y hepática, de la misma forma contribuyen a la acuicultura sostenible, al aumentar la eficiencia de los piensos (Chandra, 2018).

Al respecto, se ha evaluado la adición de ácidos biliares en la dieta para *P. vannamei* y sus efectos positivos sobre el crecimiento y otros parámetros; además, se han logrado resultados alentadores sobre los efectos en la respuesta inmunitaria (Li et al., 2023a, Su et al., 2021 y Kumar et al., 2019) y otros parámetros bioquímicos (Su et al., 2021 y Li et al., 2023b). También, se ha comprobado que la adición de ácidos biliares en dietas bajas en harina de pescado, mejoran el crecimiento corporal del langostino (Wang et al., 2023, Li et al., 2023 y Xie et al., 2021); sin embargo, no se ha demostrado la efectividad de estos ácidos agregados

artesanalmente a alimentos balanceados comerciales cuya elaboración está basada en niveles altos en harina de pescado.

Es posible lograr efectos positivos de los ácidos biliares adicionados a alimentos balanceados; pues Su et al. (2021) ha demostrado que estos ácidos mejoran el crecimiento del langostino utilizando dietas altas en harina de pescado; similares a dietas comerciales.

La efectividad de estos ácidos agregados artesanalmente en alimentos balanceados comerciales, conducen a una aplicación práctica en la alimentación del langostino. Esto implica una mejora en la eficiencia del alimento, mantener la calidad de agua, mejorar los parámetros productivos y fortalecer el sistema inmunológicos del langostino.

Por tal razón, este trabajo plantea como objetivo: determinar el efecto de la adición de ácidos biliares a razón de 0, 750, 2 250 y 3 750 g/kg de alimento balanceado comercial sobre el crecimiento, sobrevivencia y la respuesta inmune de *P. vannamei*.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Bases teórico-científicas

2.1.1. Hepatopáncreas de *P. vannamei*.

Weel (1973) afirma que desde aproximadamente 1960, el término hepatopáncreas se ha utilizado cada vez más para designar la glándula digestiva, que se encuentra en muchos moluscos y crustáceos. Manifiesta que, anteriormente, este órgano se conocía ampliamente como glándula del intestino medio.

Aunque este investigador no está de acuerdo con el término hepatopáncreas por cuanto este órgano no realiza la función de un verdadero hígado como el de los vertebrados que produce bilis, acepta que este órgano produce una gran cantidad de enzimas digestivas como un verdadero páncreas; así como también, sustancias similares a los ácidos biliares con funciones emulsificantes.

2.1.2. Acido biliar y bilis. - función.

Los ácidos biliares son componentes de la bilis. Tienen como función ayudar en la digestión y absorción de las grasas de los alimentos en el proceso digestivo (Tacon, 1989). La bilis es un líquido de color amarillo verdoso que producen las células hepáticas y mejora la eficacia de la digestión de los lípidos; actuando como emulsionante; siendo esencial para activar las lipasas (Romano et al., 2019).

Los ácidos biliares son anfífilos faciales derivados del colesterol responsables de la solubilización del colesterol y la grasa mediante la formación de micelas mixtas con fosfolípidos (Mukhopadhyay and Maitra, 2004).

Figura 1

Estructura química de: (a) Alcohol biliar de 27 carbonos, (b) ácido biliar de 27 carbonos y (c) ácido biliar de 24 carbonos. Esquema tomado de Romano et al. (2019).

Los ácidos biliares son sorprendentemente diversos en un sentido estructural y en diferentes especies difieren químicamente en tres aspectos: estructura de la cadena lateral, estereoquímica de la fusión del anillo A/B y distribución del número, posición y estereoquímica de los grupos hidroxilo en el núcleo esteroide (Mukhopadhyay and Maitra, 2004).

Los ácidos biliares se sintetizan a partir del colesterol e implican una serie de pasos complejos tanto en el núcleo esteroide como en la cadena lateral. Esta biosíntesis implica al menos cinco pasos en cada uno (núcleo y cadena lateral). Dado que estos pasos pueden, en principio, ocurrir en cualquier orden, la elucidación de los pasos individuales de la biosíntesis de ácidos biliares no es sencilla (Mukhopadhyay and Maitra, 2004).

2.1.4. Respuesta inmune e inmunoestimulantes en *P. vannamei*.

Cajas et al. (2020) indican que la respuesta inmune es una composición de tejidos, células y un sistema de moléculas que cumplen el rol defensivo en el organismo contra infecciones de agentes, así como de otras sustancias que puedan ocasionar daño. Agrega que el langostino, como todo crustáceo, no posee una memoria inmunológica sistema inmune adaptativo (capacidad de memoria inmunológica) el cual, sí está presente en peces y vertebrados. Así mismo, manifiestan que otros nutrientes como elementos traza, vitaminas, y ácidos grasos poliinsaturados, mejoran la respuesta inmunológica del langostino.

Morales y Cuéllar-Ángel (2014), señalan que los principales sistemas de defensa actualmente reconocidos en los crustáceos son: (1) Reconocimiento del no-propio por proteínas de reconocimiento patrón y Dscam; (2) Señalización y activación de los hemocitos; (3)

Respuestas inmunocelulares (fagocitosis, formación de cápsulas y nódulos, infiltración y trampas extracelulares de ácidos nucleicos); (4) Producción de moléculas antimicrobianas (Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y péptidos antimicrobianos); (5) Melanización mediada por el sistema de activación de la profenoloxidasasa (proPO) y (6) Defensas antivirales (citocinas análogas a interferones, sistema RNA de interferencia, apoptosis y autofagia).

Así mismo, los autores antes mencionados, indican que estas herramientas vienen siendo utilizadas como indicadores de salud. Los parámetros hemato-inmunológicos más comúnmente empleados en crustáceos son: (1) Hemogramas (conteo total y diferencial de hemocitos), (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.

Molina et al. (2001) manifiestan como valores de parámetros inmunológicos aceptables los siguientes: En la actividad antibacteriana, la inhibición normal debe estar entre el 40 y 60%; la cuantificación del anión superóxido (O_2^-) consideran valores menores o igual a 1, como ausencia de generación de superóxido; valores mayores 1,2 son aceptables, los óptimos se encuentran encima de 1,5; la cuantificación de proteínas plasmáticas en animales saludables es mayor o igual a 100 mg/ml; el conteo de hemocitos debe ser una media de 20 millones por mililitro en un juvenil saludable.

Cárcamo-Aréchiga et al. (2015), manifiestan que el exoesqueleto es donde se inicia el proceso de protección, tal es así que, si algún patógeno rebasa esta barrera, tendrá que enfrentar una fila de factores inmunológicos derivados de plasma y hemocitos, donde se generarán una serie de acciones para lograr eliminarlos y poder desarrollar una afección en el hospedero. Por tal motivo, se debate el rol de los hemocitos, la señalización y la fagocitosis, como también los procesos

inmersos en la expresión de las proteínas plasmáticas, como la lisozima, tripsina, α 2-macroglobulina, fenol oxidasa, y los péptidos antimicrobianos.

Fonseca (2013), indica que los invertebrados, específicamente los crustáceos como los langostinos, carecen de respuesta inmunológica específica para contra restar presencia de agentes infecciosos, por lo que han desarrollado un alto y eficiente sistema de defensa inespecífico, siendo sus principales componentes los hemocitos circulantes y también varias proteínas de defensa, pero al no lograr desarrollar una facultad de memoria inmune, el empleo de vacunas se dificulta.

Fierro-Coronado et al. (2018) evaluó una levadura y bacterias ácido lácticas como inmunoestimulantes en langostinos infectados con virus de la mancha blanca (WSSV), concluyendo que los inmunoestimulantes microbianos afectan disminuyendo la tasa porcentual de infección por WSSV en *P. vannamei*, cuando están infectados con baja carga viral tratándolos cada tres días.

Medina (2018) evaluó de la incorporación de harina de *Dunaliella* sp. al alimento de *P. vannamei* cuyo objetivo fue reducir la tasa de mortalidad al ser infectados con *V. parahaemolyticus* y, concluye que en cuanto a la expresión genética de SOD se encontraron diferencias significativas ($p < 5\%$) al día 7 en organismos alimentados con *Dunaliella* sp. y beta-glucano y una expresión cuatro veces superior que el control. Concluye que la inclusión de *Dunaliella* sp. presentó positivamente un efecto en la sobrevivencia, respuesta fisiológica e inmune durante una infección con la bacteria *V. parahaemolyticus*.

Rueda (2018), realizó el estudio aplicando inmunes estimulantes en la dieta para langostinos con tres tratamientos: T1, Control con vitaminas; T2, Beta glucanos 125 ppm, nucleótidos 112 ppm - vitaminas y T3, Beta glucanos 250 ppm - nucleótidos ppm mg/kg - vitaminas. Todos los inmunes estimulantes fueron incorporados en el alimento paletizado

para *P. vannamei*, por un período de 30 días. Los parámetros peso final, biomasa final, sobrevivencia y factor de conversión alimenticio no presentaron diferencia significativa estadísticamente, los parámetros inmunológicos Conteo total de hemocitos - THC (hemocitos/ml), Tasa de sal de tetrazolio (NBT), Actividad fenol oxidasa, Hemocitos granulados (hemocitos/ml), Hemocitos semi granulados (hemocitos/ml) y los Hemocitos hialinos (hemocitos/ml) presentaron un ligero aumento en el tratamiento 3 respecto al tratamiento control.

López (2020) determinó que también la calidad de la materia prima en el alimento balanceado afecta significativamente en la respuesta inmune; pues, reemplazando aceite de pescado (sardina y salmón) por aceite de canola, encontró un efecto negativo en el rendimiento productivo de juveniles de *P. vannamei* experimentados en 28 días; la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos se vio afectado significativamente, así mismo con el sistema inmunológico, fosforilación oxidativa, proteínas estructurales, marcadores asociados al desarrollo, contracción muscular y crecimiento.

Weiss et al. (2019), probaron harina de semillas de lupino (*Lupinus angustifolius*) como componente de la dieta de *Penaeus vannamei*, en niveles de inclusión de 0, 100, 200 y 300 g kg⁻¹ que complementaban el componente harina de pescado, y un alimento comercial como referencia general. La sobrevivencia no difirió significativamente entre los grupos. El rendimiento del crecimiento se vio significativamente afectado en camarones alimentados con dietas que contenían más de 100 g kg⁻¹ de harina de lupino. La suplementación con harina de lupino no afectó el contenido de proteína de hemolinfa, mientras que las concentraciones de glucosa y acilglicéridos variaron entre los tratamientos y fueron más altas en los animales alimentados con una dieta de 100 g kg⁻¹ de harina de lupino. La actividad de la fenoloxidasas fue mayor en los camarones alimentados con una dieta de 100 g kg⁻¹ de harina de lupino, lo que indica un mejor estado inmunológico.

Wang (2020), manifiesta que la expresión genética a nivel del sistema inmune se ve afectada durante la fluctuación de temperatura entre 13 y 28 grados centígrados en el cultivo de langostinos. Encontró que las expresiones relativas de los genes de mucina (Muc) permanecieron estables; asimismo, las expresiones del receptor 4 como peaje (TLR), inmunodeficiencia (IMD) y la profenoloxidasa (proPO) disminuyeron significativamente después de la exposición a temperatura baja; en tanto que, después del aumento de temperatura, la expresión de TLR, IMD, lisozima (Ly) y proPO aumentaron significativamente.

Yasmine (2021), indica que la aplicación de inmunoestimulantes es la base para la protección táctica del cultivo de langostino. Por lo tanto, las variaciones en la expresión génica de cinco genes inmune atribuibles (profenoloxidasa, serina proteinasa, transglutaminasa, lisozima y superóxido dismutasa) fueron evaluados con un alimento suplementado con *Bacillus subtilis*, sugiriendo finalmente que la aplicación transitoria de *B. subtilis* para *P. vannamei* mejora el sistema inmunológico, y su estado inmunológico está equilibrado y todo en contra *V. parahaemolyticus* por respuestas defensivas rápidas y tempranas.

2.2. Antecedentes

Granda (2022) evaluó el efecto de enzimas digestivas naturales y ácidos biliares extraídos de tilapia *Oreochromis* sp., sobre el crecimiento y la cantidad de bacterias totales en *P. vannamei*. Para esto, utilizó 1 g de esta sustancia por kilogramo de alimento en dos dosis por día. Concluyó que, respecto a la biomasa final, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos; pero en la carga bacteriana, hubo diferencia significativa entre la mezcla de enzimas digestivas y el control, pero no con los ácidos biliares; así como también, no hubo diferencia significativa entre éstos y el control.

Wang et al. (2023) investigaron los efectos de agregar ácidos biliares a una dieta baja en harina de pescado sobre el crecimiento, la utilización de nutrientes y los parámetros bioquímicos séricos de *P. vannamei*. Primero,

formularon una dieta de control positivo y negativo para contener 200 g/kg de harina de pescado (FM20) y 140 g/kg de FM (FM14), respectivamente. Luego, agregaron ácidos biliares a la dieta FM14 en niveles de inclusión de 75 (BA75), 150 (BA150) y 300 (BA300) mg/kg. Concluyeron que la adición de 150 mg/kg de ácidos biliares a una dieta baja en harina de pescado (140 g/kg FM) podría mejorar el rendimiento del crecimiento y la utilización de nutrientes del camarón blanco.

Li et al. (2023a) evaluaron el reemplazo de la harina de pescado con concentrados de proteína de semilla de soja y algodón y la suplementación dietética de ácidos biliares en el rendimiento del crecimiento, la inmunidad, la muda y la salud intestinal de *P. vannamei*. Formularon seis dietas: dieta alta en harina de pescado (HFM, 25% harina de pescado), dieta baja en harina de pescado (LFM, 10% harina de pescado), LBA1 (LFM + 0,15 g kg⁻¹ ácidos biliares), LBA2 (LFM + 0,3 g kg⁻¹ ácidos biliares), LBA3 (LFM + 0,6 g kg⁻¹ ácidos biliares) y LBA4 (LFM + 0,9 g kg⁻¹ ácidos biliares). Concluyeron que la suplementación con ácidos biliares aumentó la expresión de genes relacionados con la inmunidad y la muda, mejoró la salud intestinal y mejoró el rendimiento de crecimiento del langostino alimentado con una dieta baja en harina de pescado.

Li et al. (2023b) estudiaron los efectos de la suplementación con ácidos biliares en dietas bajas en harina de pescado sobre el metabolismo de los esteroides, la circulación entero hepática de los ácidos biliares, el perfil de ácidos biliares y la apoptosis en el camarón blanco del Pacífico *P. vannamei*. En este experimento formularon seis dietas: dieta HFM (25 % de harina de pescado), dieta LFM (10 % de harina de pescado) y LFM suplementada con cuatro niveles (0,15, 0,3, 0,6 y 0,9 g kg⁻¹) de ácidos biliares, que fueron LBA1, LBA2, LBA3 y LBA4, respectivamente. Concluyeron que los ácidos biliares mejoraron el crecimiento, promovieron el metabolismo de los esteroides, mejoraron la circulación entero hepática y redujeron la apoptosis en langostinos con dietas bajas en harina de pescado.

Kumar et al. (2019) exploraron el papel de los ácidos biliares y los transportadores de ácidos biliares en la infección por la enfermedad de

necrosis hepatopancreática aguda en el camarón blanco *P. vannamei* (AHPND). Los resultados muestran que la virulencia de *V. parahaemolyticus* que causa AHPND está regulada positivamente por los ácidos biliares y que el transportador de ácidos biliares de sodio apical y los ácidos biliares en el estómago del camarón tienen papeles importantes en la patogénesis de AHPND.

Su et al. (2021) estudiaron los efectos de los ácidos biliares en dietas altas en harina de pescado sobre el crecimiento, el metabolismo de los lípidos, la inmunidad no específica y la microbiota intestinal del camarón blanco del Pacífico *P. vannamei*. Formularon cinco dietas para contener 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,5 g kg⁻¹ (control, BA1, BA2, BA3 y BA4 de ácidos biliares, respectivamente). Encontraron que el grupo BA2 tuvo el mayor peso final y aumento de peso del langostino. Además, los ácidos biliares mejoran la respuesta inmune; en tanto que, 0,5 g kg⁻¹ de ácidos biliares podrían causar daño oxidativo a los camarones. La diversidad y riqueza de la microbiota intestinal se vieron significativamente alteradas por los ácidos biliares. Finalmente, recomiendan la dieta suplementada con ácidos biliares a 0,2 g kg⁻¹.

Su et al. (2022) investigaron los efectos interactivos del colesterol (CHO) y los ácidos biliares (BA) en la dieta sobre el crecimiento, el metabolismo de los lípidos, la respuesta inmune y la microbiota intestinal de *P. vannamei* y explorar el efecto ahorrador de los BA sobre el CHO en las dietas de camarones. Tanto el CHO como los BA en la dieta afectaron significativamente los índices bioquímicos séricos (colesterol total, triglicéridos, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad) y aumentaron las actividades de proteasa y lipasa hepatopancreáticas ($p < 0,05$). Sólo la suplementación con BA mejoró significativamente la capacidad antioxidante (capacidad antioxidante total, actividad de superóxido dismutasa y contenido de glutatión) del hepatopáncreas ($p < 0,05$).

Xie et al. (2021) sostienen que el metabolismo de los ácidos biliares en los animales acuáticos generalmente se suprime cuando la harina de pescado (FM) se reemplaza por proteínas vegetales. Evaluaron los efectos de la

suplementación dietética con ácido chenodesoxicólico (CDCA) sobre el crecimiento, la respuesta inmune y la salud intestinal de *Penaeus monodon* alimentados con una dieta baja en FM. Formularon tres dietas: dieta alta en FM (25 %) (HF), dieta baja en FM (15 %) (LF) y dieta baja en FM suplementada con 0,1 % de CDCA (LFC). Determinaron que los langostinos alimentados con la Dieta LF mostraron un menor aumento de peso y eficiencia alimenticia que los alimentados con la Dieta HF; asimismo, indicaron que la suplementación dietética de CDCA en una dieta baja en FM mejoró el rendimiento del crecimiento, la respuesta inmune y la salud intestinal de los camarones.

2.3. Definición de términos básicos.

2.3.1. Ácidos biliares.

“Los ácidos biliares son formados y concentrados por el hígado, y son secretados por el hígado a la bilis, y de aquí pasan al tracto gastrointestinal (duodeno) vía conducto biliar, donde actúan como emulsificantes biológicos de gran importancia. Ayudan a solubilizar los glóbulos de grasa del alimento, de tal modo que las enzimas hidrosolubles o lipasas, pueden reaccionar con las moléculas de grasa y desdoblarlas para facilitar la absorción de la grasa” (Tacon, 1989, p. 3).

2.3.2. Respuesta inmunitaria.

“La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica y por ello, su principal actividad consiste en diferenciar y eliminar todo material no propio de sus tejidos. Los crustáceos no poseen respuestas inmunes específicas contra agentes infecciosos y su función defensiva se basa en un desarrollado sistema de defensa inespecífico, basado en hemocitos circulantes y en varias proteínas de defensa” (Fonseca et al., 2013, p. 68).

2.3.3. Inmunidad.

“La inmunidad de un organismo es el estado de resistencia natural o adquirida frente a una determinada enfermedad o al ataque de un

agente infeccioso o tóxico. En el caso del camarón, ésta recae en la inmunidad innata, en donde los sistemas humoral y celular juegan papeles muy importantes en la defensa de los organismos” (Cárcamo-Aréchiga et al. 2015, p. 32).

2.3.4. Actividad fenoloxidasa.

“La enzima fenoloxidasa (PO por sus siglas en Inglés), se encuentra confinada en el interior de los hemocitos del camarón y juega un papel crucial en la cascada inmunológica que se activa cuando es reconocida una sustancia como cuerpo extraño (antígeno)” (Morales y Cuellar-Anjel, 2014, p. 78).

“La actividad fenoloxidasa, es la responsable de la melanización observada en los procesos inflamatorios de los artrópodos, manchas negras en los animales” (Molina et al., 2001, p. 1).

2.3.5. Cuantificación del anión superóxido.

“La fagocitosis es la ingestión y degradación de microbios invasores por parte de células especializadas, es la reacción de defensa celular más común y constituye la primera línea de defensa una vez que un cuerpo extraño ha pasado la cutícula. Paralelo a este mecanismo se encuentra un proceso de destrucción llamado choque respiratorio que es propio de las células fagocitarias maduras, este proceso se manifiesta como un incremento en la actividad metabólica de la célula y una producción de radicales de oxígeno tóxicos, entre estos el anión superóxido” (Molina et al., 2001, p. 1).

2.3.6. Cuantificación de proteínas plasmáticas.

“Es la determinación del número total de proteínas presentes en el plasma. La concentración de proteínas plasmáticas es un indicador importante del estado fisiológico del animal” (Molina et al., 2001, p. 1).

“Este parámetro es utilizado para evaluar el estado sanitario de los camarones. Sin embargo, entre el 60 y el 97% de las proteínas plasmáticas totales está compuesto por hemocianina (pigmento extracelular que transporta el oxígeno a los tejidos del camarón). Por

esta razón, cambios importantes en la concentración de la hemocianina, afectan directamente los valores obtenidos para proteínas plasmáticas (Morales y Cuellar-Anjel, 2014, p. 78).

2.3.7. Hemograma.

“El hemograma consiste en realizar un conteo total o diferencial de los hemocitos en la hemolinfa, para establecer una relación entre los valores obtenidos y las condiciones de salud de los camarones examinados (o de sus poblaciones de origen)” (Cuellar- et al. 2001, p. 1).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Lugar de ejecución

La ejecución de esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Taller de Recursos Acuáticos II de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la localidad de Puerto Pizarro, distrito y provincia de Tumbes, en las coordenadas geográficas: -3,504470 y -80,393300 (figura 2).



Figura 2

Fotografía satelital del lugar de ejecución del proyecto en el Taller de Recursos Acuáticos II encerrado en rojo (Imagen capturada de Google Earth, 2023).

3.2. Tipo y diseño de investigación

Aplicada: Porque al demostrarse que las propiedades favorables de los ácidos biliares, pueden ser utilizados en forma práctica e inmediata en el cultivo de langostino para mejorar la producción.

Experimental: Porque la demostración se llevó a cabo mediante un experimento utilizándose tres concentraciones de los ácidos biliares, como tratamientos, en la dieta del langostino.

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

La población estuvo conformada por 420 langostinos *P. vannamei* con un peso promedio de 5,8 g por individuo; obtenidos del Centro de Producción Acuícola de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.

3.3.2. Muestra

El tamaño de muestra de langostinos para determinar el peso promedio y los parámetros inmunológicos fue de 10 a 15 individuos juveniles por tanque de cultivo experimental. Para la sobrevivencia se tomó toda la población de cada tanque.

El tamaño de la muestra, para una población de 420 juveniles, fue calculado mediante la fórmula de Schaeffer et al. (1987):

$$n = \frac{N Z^2 (p q)}{e^2 (N-1) + Z^2 (p q)}$$

Donde:

n : Tamaño de la muestra

z : Nivel de confianza (1,96)

p : Proporción de la población con las características deseada (éxito)

q : Proporción de la población sin las características deseadas (fracaso)

e : Nivel de error dispuesto a cometer (0,05)

N : Tamaño de la población (420)

Obteniéndose $n=202$. Luego fue necesario hacer un reajuste por cuanto el valor “f” calculado mediante la siguiente fórmula, fue superior al 5% (48%).

$$N_0 = \frac{n}{1 + n/N}$$

Donde:

N_0 : Tamaño de la muestra reajustada

n : Tamaño de la muestra (202)

N : Tamaño de la población (420)

El tamaño de la muestra reajustada fue de 136 individuos; que para cada tanque fue de 11 individuos.

3.4. Características del producto comercial que contiene ácido biliar.

El producto comercial utilizado para esta investigación contiene como ingrediente activo 75% de ácidos biliares (ácido chenodesoxicólico y ácido cólico) y un 25% de almidón de maíz como transportador. Las características de este producto están disponibles en <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2023/04/RSU-21-04-2023.pdf>. Ha sido 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. El producto podría ser ampliamente utilizado en la alimentación para todas las especies de animales como aves de corral, ganado, acuicultura, animales de compañía, etc. En crustáceos se recomienda dosis de 1 a 3 kg por tonelada de alimento.

3.5. Preparación del alimento con inclusión del ácido biliar.

Se utilizó un alimento comercial extruido con niveles mínimos de proteína de 40% y 35% y en presentaciones de 0,8 y 1,2 mm de diámetro, respectivamente. Tuvieron un mínimo de 6% de grasa, un máximo de 5% de fibra cruda, un máximo de 12% de cenizas y un máximo de 12% humedad.

Para su elaboración se utilizaron harinas de oleaginosas, proteína de animales terrestres, subproductos de grano, aceite, macro minerales, concentrado de proteínas, gluten, aminoácidos, vitaminas, aglutinantes y pre mezcla de minerales. Las características del alimento balanceado se encuentran en la etiqueta del producto y está disponible en <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2023/04/RSU-21-04-2023.pdf>.

La preparación del alimento balanceado con inclusión de los ácidos biliares se realizó diariamente; para ello se elaboró una mezcla de ligante con agua en una relación 80/20, que fue utilizada para ligar los ingredientes (ácidos biliares y alimento) en proporción de 40 ml de solución ligante por kilogramo de alimento balanceado. A esta mezcla se le agregó la cantidad correspondiente de ácidos biliares de acuerdo a cada tratamiento (control, 750 ppm, 2 250 ppm y 3 750 ppm). El mezclado fue realizado hasta humedecer uniformemente el alimento. Posteriormente se llevó a secado al medio ambiente por dos horas para finalmente distribuirlo al langostino de los tanques experimentales.

3.6. Cultivo de *P. vannamei*.

Los juveniles fueron distribuidos aleatoriamente en 12 tanques circulares de PVC de 1,5 m³ de capacidad total, provistos de aireación mecánica. Estos tanques constituyeron las unidades experimentales de los cuatro tratamientos con tres repeticiones por cada uno. La densidad inicial fue 35 juveniles/m³. La ración diaria de alimento balanceado fue dividida en cuatro dosis, suministradas en los horarios de 8 am, 12 m, 3 pm y 6 pm. La designación del tratamiento a cada tanque se hizo aleatoriamente (figura 3). El periodo de cultivo fue de 28 días.



Figura 3

Esquema de la distribución aleatoria de los tratamientos en los tanques experimentales que se encontraban formando dos columnas por seis filas dentro del ambiente del taller Recursos Acuáticos II de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.

3.7. Crecimiento y sobrevivencia del langostino.

Las muestras de langostino de cada tanque fueron tomadas aleatoriamente una vez por semana. La cantidad de langostinos que se tomaron fue el tamaño de la muestra indicada anteriormente. El peso promedio se determinó por método gravimétrico con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso promedio (g)} = \text{peso total (g) por muestra} / \text{organismos por muestra}$$

El incremento de peso en cada semana fue calculado restando el peso del langostino al final de la semana con el peso final de la semana anterior.

La sobrevivencia semanal fue determinada contando el total de individuos de cada tanque experimental. Luego, este valor fue llevado términos de porcentaje, considerando a la población inicial como 100%.

3.8. Parámetros inmunológicos del langostino.

Para la toma de muestras de hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* se siguió el protocolo sugerido por el laboratorio de análisis particular Ecobiotech LAB SAC: Se dejó de alimentar 12 horas antes del muestreo; el langostino fue llevado gradualmente a 5 °C de temperatura del agua con aireación y se mantuvo así por 5 minutos; se extrajo de 100 a 300 uL de hemolinfa por langostino de la base del quinto periópodo utilizando una jeringa hipodérmica desechable de 1 mL con aguja 25 G x 16 mm provista de 500 uL de solución anticoagulante SIC-EDTA fría (2 a 8 °C, aproximadamente). Luego, la hemolinfa fue diluida con más solución anticoagulante y mantenida sobre hielo, hasta su posterior análisis. Se registró de los volúmenes de solución anticoagulante y hemolinfa de cada muestra.

Estas muestras fueron enviadas al laboratorio antes mencionado para el análisis respectivo; el cual realizó: conteo de hemocitos utilizando el método de recuento en cámara de Neubauer descrito por Morales y Cuellar-Anjel (2014); proteínas plasmáticas totales por método colorimétrico de Biuret mediante kits de análisis QCA, según Gomall et al. (1949) citados por Morales y Cuellar-Anjel (2014); cuantificación de fenoloxidasa total por método de oxidación de L-DOPA según Hernández-López et al. (1996) citados por López et al. (1996) y cuantificación de anión superóxido por el método de reducción de NBT descrito por Song and Hsieh (1994).

Estos parámetros inmunológicos fueron tomados al inicio y al final del cultivo experimental. Luego con estos datos, fueron calculadas sus variaciones.

3.9. Parámetros de calidad de agua y patológicos.

Se midió temperatura, oxígeno disuelto, pH, alcalinidad, salinidad y amonio tóxico (NH₃) del agua de cultivo, en los horarios y con los instrumentos o métodos indicados en la tabla 1; basados en las recomendaciones de Rojas et al. (2005).

Tabla 1

Horarios, frecuencia, instrumento o método de la toma de parámetros de calidad de agua de los tanques de cultivo experimental.

Parámetro	Horario y frecuencia	Instrumento o Método
Temperatura	6:00 h y 18:00 h, diariamente	Termómetro YSI Pro20
Alcalinidad	6:00 h, semanalmente	Espectrofotometría/YSI9100
Salinidad	12:00 h, semanalmente	Refractómetro Manual Salinómetro 0-100ppt Stx-3 Vee Gee
Oxígeno disuelto	6:00 h y 18:00 h, diariamente	Oxímetro YSI Pro20
Potencial de hidrógeno	12:00 h, semanalmente	Potenciómetro Portátil DPH- 2 / Medidor de pH
Amonio tóxico (amoníaco)	12:00 h, semanalmente	Espectrofotometría/YSI9100

El nivel de lípidos en el hepatopáncreas, el grado de infestación por ectoparásitos en las branquias y por gregarinas en el intestino del langostino, fueron determinados siguiendo los métodos descritos por Morales y Cuellar-Anjel (2014). Las muestras preparadas en fresco fueron observadas directamente en el microscopio, iniciando con el objetivo de menor aumento 4x y finalizando con el de mayor aumento 10x. Debido a la rápida descomposición de las muestras, primero se analizó el hepatopáncreas, después se las branquias y finalmente el intestino.

3.10. Procesamiento y análisis de datos.

Los datos colectados de los parámetros de crecimiento, sobrevivencia e inmunológicos del langostino fueron ordenados y procesados a través del programa computacional Excel de Microsoft Office. Asimismo, se utilizó el programa SPSS para determinar si hay diferencias significativas en el crecimiento, sobrevivencia, conteo de hemocitos, concentración de proteínas plasmáticas, concentración de fenoloxidasas y concentración del anión

superóxido, a través del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan a un nivel de seguridad de 95 %.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza.

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, indica que los datos siguen una distribución normal ($p > 0,05$, anexo 3) y la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, indica que las varianzas son homogéneas ($p > 0,05$, anexo 4). Por tanto, la prueba de Duncan es válida porque se cumple con los dos requisitos anteriores y se considera correcta la interpretación del orden jerárquico de los promedios obtenidos de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino.

4.2. Crecimiento y sobrevivencia del langostino.

Durante todo el periodo experimental de cultivo, el crecimiento promedio del langostino tratado con 2 250 ppm de ácidos biliares en la dieta, estuvo ligeramente por encima de los otros tratamientos como se muestra en la figura 4. Sin embargo, al final del cultivo, en el peso promedio y en el incremento de peso promedio, los tratamientos y el control no tuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos (tabla 2, anexos 1 y 5).

Los resultados muestran que, en ninguna de las dosis de ácidos biliares en el alimento balanceado, hay un efecto a su favor en el crecimiento corporal del langostino. Estos resultados discrepan con los obtenidos por Su et al. (2021), quienes lograron mejorar el crecimiento del langostino alimentados con dietas altas en harina de pescado, similares a los alimentos balanceados comerciales, con dosis de 200 y 300 ppm de ácidos biliares. Esta discrepancia puede ser debidas a las dosis probadas en esta investigación que fueron muy altas (750 ppm a 3750 ppm); como la dosis ensayada por Granda (2022) (1 000 ppm) quien obtuvo crecimiento del langostino similar al control. Esto muestra que dosis elevadas no tienen efecto favorable en el crecimiento. Así

también, Su et al. (2021), en dietas altas en harina de pescado, afirman que en dosis iguales o mayores a 500 ppm de ácidos biliares, podrían causar daño oxidativo al langostino.

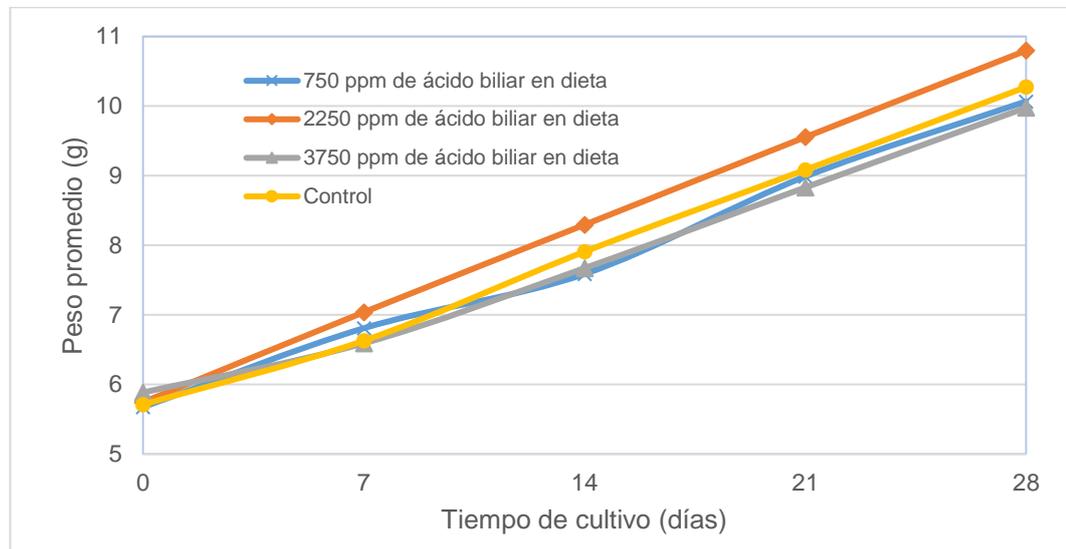


Figura 4

Crecimiento de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

La sobrevivencia de *P. vannamei* sometido a dieta con dosis de 2 250 ppm de ácidos biliares, fue muy superior que las otras dosis; y que las dosis de 750 y 3 750 ppm estuvieron ligeramente por encima del control durante el periodo de cultivo (figura 5). El análisis estadístico determinó que la sobrevivencia promedio final en la dosis de 2 250 ppm fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en las otras dosis de ácidos biliares y el control (tabla 2, anexos 1, 5 y 6).

En la figura 5 se puede observar que la sobrevivencia de *P. vannamei* alimentado con dosis de 750 y 2 250 ppm de ácido biliar en la dieta fue superior a la del control; por lo tanto, la sobrevivencia mejora con el uso de ácidos biliares; aunque estos resultados no fueron similares a los obtenidos por Su et al. (2021), quienes no encontraron diferencias significativas en este parámetro. Sin embargo, las diferencias significativas de sobrevivencias obtenidas a favor de las dosis de ácidos biliares antes mencionadas, se deben

a la estimulación que estos ácidos están generando en el sistema inmunológico del langostino, demostrados por Li et al. (2023a), Su et al. (2021) y Kumar et al. (2019), que influyen favorablemente en la sobrevivencia.

Tabla 2

Peso promedio final, incremento de peso y sobrevivencia de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Peso promedio final (g)	Incremento de peso promedio (g)	Sobrevivencia final (%)
750	10,07 ^a ± 0,40	4,39 ^a ± 0,62	93,9 ^b ± 1,4
2 250	10,80 ^a ± 0,72	5,05 ^a ± 0,84	96,9 ^c ± 0,5
3 750	9,98 ^a ± 0,72	4,09 ^a ± 0,65	91,0 ^a ± 0,6
Control	10,27 ^a ± 0,21	4,56 ^a ± 0,23	89,8 ^a ± 1,5

Promedios con letra diferente como superíndice, indican diferencia significativa.

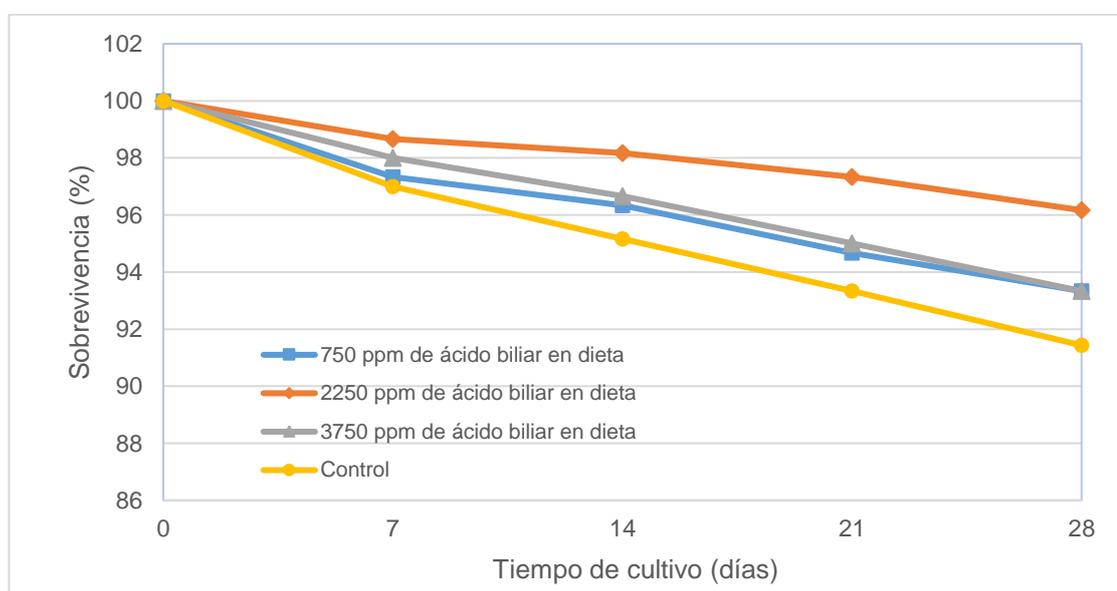


Figura 5

Sobrevivencia de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

4.3. Parámetros inmunológicos del langostino.

Tanto en el conteo final de hemocitos como en la variación de hemocitos de la hemolinfa del langostino, no se evidenció efecto a favor de alguna de las dosis de ácidos biliares en la dieta; pues el análisis de varianza determinó diferencia no significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos (tabla 2, anexos 2 y 5). Puede observarse en la tabla 3 que los valores finales de la concentración de hemocitos son iguales a las variaciones, respectivamente; esto es debido a que el conteo inicial (empezando el cultivo) de hemocitos estuvieron por debajo de 10^6 cél./ml.

Los niveles de hemocitos obtenidos fueron superiores a los encontrados por Su et al. (2021), quienes probaron ácidos biliares en dietas altas en harina de pescado. Sin embargo, los valores obtenidos en niveles alrededor de 10^8 cél./ml, como se muestra en la tabla 3, fueron superiores a los reportados por los autores antes mencionados, quienes obtuvieron valores en niveles de 10^6 cél./ml. Esta diferencia y las variaciones de hemocitos (tabla 3) muestran que este parámetro inmunológico está muy estimulado; no por los ácidos biliares; pero sí por los niveles de temperatura que estuvieron en un rango de 26,2 a 27,8 °C; valores muy cercanos al indicado por Martín Rios et al. (2022); quienes luego de un análisis de investigaciones al respecto, mencionaron que: “La temperatura que propició el mayor valor de los parámetros inmunológicos fue 28 °C para el cultivo de *P. vannamei*”.

Tabla 3

Conteo final de hemocitos y variación de hemocitos de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Conteo de hemocitos (cél./ml)	Variación de hemocitos (cél./ml)
750	$3,4E+08^a \pm 5,3E+07$	$3,4E+08^a \pm 5,3E+07$
2 250	$3,8E+08^a \pm 1,5E+08$	$3,8E+08^a \pm 1,5E+08$
3 750	$2,7E+08^a \pm 7,1E+07$	$2,7E+08^a \pm 7,1E+07$
Control	$3,0E+08^a \pm 3,6E+07$	$3,0E+08^a \pm 3,6E+07$

Promedios con letra diferente como superíndice, indican diferencia significativa.

La concentración de proteínas plasmáticas del langostino encontrada al final del periodo de cultivo, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) donde se aplicó 2 250 ppm de ácido biliar en la dieta, que en los otros tratamientos; sin embargo, la variación de la concentración de proteínas plasmáticas no fue significativamente mayor donde se aplicó ácidos biliares que el control (tabla 4, anexos 2, 5 y 6).

La concentración final de proteína plasmática evidencia que sí hay un efecto de estos ácidos. Por lo tanto, esto demuestra que los ácidos biliares agregados al alimento balanceado comercial en nivel de 2 250 ppm, aumentan la concentración de proteínas plasmáticas; lo que significa que estos ácidos estimulan el sistema inmune del langostino. Asimismo, todas las concentraciones obtenidas están por encima del mínimo establecido por Molina et al. (2001), quienes recomienda niveles mayores o iguales a 100 mg/ml de proteínas plasmáticas totales; así como también, están dentro del rango indicado por Gullian (2001), quien considera normal el rango de 100 a 130 mg/ml.

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 del langostino; pero que los ácidos biliares agregados en niveles de 2 250 ppm en el alimento balanceado, aumentan la concentración de estas proteínas.

Tabla 4

Concentración de proteínas plasmáticas y variación de la concentración de proteínas plasmáticas de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Concentración de proteínas plasmáticas (mg/ml)	Variación de la concentración de proteínas plasmáticas (mg/ml)
750	124,22 ^b ± 1,28	5,53 ^{a,b} ± 2,17
2 250	126,86 ^c ± 1,00	8,78 ^b ± 2,53
3 750	120,88 ^a ± 0,98	4,25 ^a ± 2,31
Control	119,57 ^a ± 1,35	5,13 ^{a,b} ± 1,82

Promedios con letra diferente como superíndice, indican diferencia significativa.

La concentración de fenoloxidasa de la hemolinfa del langostino al final del cultivo, no mostró diferencia significativa a favor del uso de ácidos biliares en la dieta; pues, tanto el control como las menores dosis tuvieron similares efectos, y mayores que la dosis más alta. Sin embargo, los valores de las variaciones de la concentración de fenoloxidasa mostraron efectos significativamente mayores ($p < 0,05$) en la dosis de 2 250 ppm (tabla 5, anexos 2, 5 y 6).

Si bien se ha logrado un efecto de la adición de ácidos biliares en el alimento balanceado sobre la variación de la concentración de fenoloxidasa, ésta representa alrededor del 2%; lo que implica valores muy bajos. Sin embargo, la concentración de fenoloxidasa al final de cultivo, que representan el estado inmune final del langostino, no muestra una clara diferencia. No obstante, los valores obtenidos de este parámetro se encuentran por encima del mínimo (250 mD.O.) establecido por Molina et al. (2021); y en los rangos normal (200 a 350 mD.O.) y alto (350 a 500 mD.O.), según los indicados por Gullian (2001).

Los valores relativamente altos obtenidos en la concentración de fenoloxidasa tanto en los tratamientos experimentales como en el control, pueden ser debido principalmente a 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, como sostiene Martín Rios et al. (2022).

Tabla 5

Concentración final de fenoloxidasa y variación de la concentración de fenoloxidasa de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Concentración final de fenoloxidasa (mD.O.)	Variación de la concentración de fenoloxidasa (mD.O.)
750	349 ^{a,b} ± 18	7 ^{b,c} ± 1,1
2 250	378 ^b ± 18	8 ^c ± 1,5
3 750	335 ^a ± 14	6 ^{a,b} ± 1,1
Control	370 ^b ± 10	5 ^a ± 1,1

Promedios con letra diferente como superíndice, indican diferencia significativa.

La concentración de anión superóxido en la hemolinfa del langostino al final del cultivo, no tuvo diferencia significativa entre los tratamientos con ácidos biliares en la dieta; así como también, el uso de ácidos biliares en la dieta no mostró efectos significativamente mayores ($p > 0,05$) respecto al control (tabla 6, anexos 2, 5 y 6).

Al igual que en la fenoloxidasa, en el anión superóxido, los valores de las variaciones de la concentración de anión superóxido muestran un efecto favorable a la adición de ácidos biliares en el alimento que la concentración final del anión superóxido, por lo que no se puede atribuir una clara diferencia. No obstante, los valores finales logrados con la adición de los ácidos biliares se encuentran en niveles por encima del mínimo ($\geq 1,5$ D.O.) según Molina et al. (2021); no así para el control. Así también, los valores de este parámetro se encuentran en el rango de bueno (de 1,5 a 2,0 D.O) indicado por Guillan (2001). Los niveles adecuados de este parámetro se

explican por los niveles apropiados de oxígeno disuelto; pues en condiciones de hipoxia la concentración del anión superóxido disminuye, como lo menciona Martín Rios et al. (2022).

Aunque los autores mencionados anteriormente han establecido un valor mínimo en condiciones fisiológicas normales, es importante establecer un valor máximo; pues las especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido en elevadas concentraciones 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 sangre que puede causar daño oxidativo en el hepatopáncreas (Su et al., 2021).

Tabla 6

Concentración final de anión superóxido y variación de la concentración de anión superóxido en la hemolinfa de P. vannamei alimentado con dietas suplementadas con tres dosis de ácidos biliares.

Dosis de ácido biliar en la dieta (ppm)	Concentración final de anión superóxido (D.O.)	Variación de la concentración de anión superóxido (D.O.)
750	1,64 ^a ± 0,02	0,39 ^{a,b} ± 0,05
2 250	1,65 ^a ± 0,09	0,53 ^b ± 0,14
3 750	1,63 ^a ± 0,03	0,37 ^a ± 0,04
Control	1,45 ^a ± 0,13	0,26 ^a ± 0,04

Promedios con letra diferente como superíndice, indican diferencia significativa.

4.4. Parámetros de calidad de agua y patológicos.

Los parámetros físicos y químicos de calidad de agua permanecieron constantes durante el cultivo, excepto el amoníaco que fue incrementando su concentración durante el cultivo, y fueron muy similares entre uno y otro tratamiento.

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 de 7,4 a 7,8, la alcalinidad de 140 a 205 mg/L, la salinidad de 21 a 22 ‰ y el amonio tóxico (NH₃) de 0,05 mg/L al inicio del cultivo, hasta 0,39 mg/L al final del cultivo (Anexo 7).

Estos niveles de los parámetros de calidad de agua estuvieron dentro de los límites permisibles (Instituto Nacional de Pesca, 2018) a excepción del amonio tóxico que pasó el nivel óptimo de 0,1 mg/l; aunque esto no ha significado mortalidad del langostino como muestran los resultados de sobrevivencia.

Respecto a los parámetros patológicos tomados al inicio y final del cultivo, el grado y nivel de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos del langostino empezó con G1 (0 a 85% de lípidos) en todos los tratamientos y terminó con G3 (90 a 96% de lípidos) en todos los tratamientos excepto en la dosis de 2 250 ppm de ácidos biliares en la dieta que alcanzó el G4 (96 a 100% de lípidos) (Anexo 8). Con esta dosis de ácidos biliares en la dieta también se ha logrado obtener mejores resultados en la sobrevivencia y en la concentración de proteínas plasmáticas en esta investigación. Con esta dosis de ácidos biliares se alcanza los requerimientos óptimos necesarios en el organismo del langostino, para que alcance el más alto nivel de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos. Para esto, no solamente las dietas deben cubrir los requerimientos de sustancias grasas, sino que también se absorban en el intestino; siendo obligatorio que estas grasas previamente se emulsifiquen; proceso que es realizado por los ácidos biliares (Tacon, 1989; Mukhopadhyay and Maitra, 2004 y Romano et al., 2019).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Con ácidos biliares adicionados extra *pellet* en el alimento balanceado en dosis de 750 a 3 750 ppm, se obtiene crecimiento corporal del langostino similar al del control, cultivado experimentalmente en tanque.
2. Con la dosis de 2 250 ppm de ácidos biliares se logra mejorar significativamente la sobrevivencia del langostino, frente a las otras dosis y el control.
3. Las dosis de 0, 750, 2 250 y 3 750 ppm de ácidos biliares adicionados al alimento balanceado, no tuvieron efectos diferenciales sobre el conteo de hemocitos totales del langostino; encontrándose todos ellos en niveles aceptables.
4. Con la dosis de 2 250 ppm de ácidos biliares se logra significativamente la mayor concentración de proteínas plasmáticas respecto a las otras dosis y el control; encontrándose en todas las dosis, la concentración de proteínas en valores aceptables.
5. Las dosis de ácidos biliares probadas no tuvieron efecto diferencial a su favor al control entre los tratamientos en la concentración final de la enzima fenoloxidasa y del anión superóxido; hallándose estos parámetros en los niveles aceptables.
6. El nivel de lípidos de los túbulos hepatopancreáticos del langostino en las dosis de ácidos biliares y control, alcanzaron niveles del 90% a 96%; siendo la dosis de 2 250 ppm de ácidos biliares en la dieta; donde llegaron al rango del 96% a 100% de lípidos.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos con la adición de ácidos biliares en dietas alimenticias de bajo nivel proteico, o con menores niveles nutricionales en comparación a dietas premium usadas en el cultivo del langostino.
2. Aunque no se ha demostrado en esta investigación la lixiviación de los ácidos biliares durante la alimentación de *P. vannamei*, se sugiere probar estas dosis de ácidos biliares, y dosis inferiores, adicionadas a alimentos balanceados desde su fabricación.
3. A raíz de las evidencias encontradas en los parámetros patológicos: nivel de lípidos en los túbulos hepatopancreáticos y grado de infestación por *Zoothamnium* sp., se sugiere probar experimentalmente con repeticiones en cada dosis, los ácidos biliares en la dieta.
4. Así mismo considerar análisis microbiológicos/bacteriológicos para determinar cargar bacterianas iniciales y finales en próximas investigaciones con la aplicación de ácidos biliares en la dieta.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Cárcamo-Aréchiga, N., Grijalva-Chon, J., Hernández-López, j., Varela-Romero, A., López-Torres, M. y Medina-Juárez, L. (2015). Mecanismos de defensa de los camarones penaeidos durante un proceso infeccioso: una revisión. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XVIII (1): 32-42 (2016).
<https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/242>
- Chandra, P. (6 de diciembre de 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/feed-machinery/articles/importance-feed-additive-bile-t43043.htm>
- Fierro-Coronado, J., Luna-González, A., Cáceres-Martínez, C., Álvarez-Ruiz, P., Escamilla-Montes, R., González-Ocampo, H. y Peraza-Gómez, V. (2018). Efecto de los inmunoestimulantes microbianos en el porcentaje de infección por WSSV y la expresión de inmune-relacionados genes en camarones blancos *Litopenaeus vannamei*. *Revista Colomb Cienc Pecu* 32 (3): 221-231. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n3a07>
- Fonseca, E., González, R. y Rico, R. (2013). Sistema inmune de los camarones. *Revista AquaTIC*, nº 38.
<http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/viewFile/99/88>

- 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.
- Hagey, L, Moller, P., Hofmann, A. & Krasowski, M.D. (2010). Diversity of bile salts in fish and amphibians: evolution of a complex biochemical pathway. *Physiological and Biochemical Zoology* 83: 308–321.
- Hofmann, A., Hagey, L. & Krasowski, M. (2010). Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *Journal of Lipid Research* 51: 226–246.
- 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://www.researchgate.net/profile/Noriaki-lijima/publication/225947868_Purification_and_characterization_of_bile_salt-activated_lipase_from_the_hepatopancreas_of_red_sea_bream_Pagrus_major/links/546e8e600cf29806ec2eb717/Purification-and-characterization-of-bile-salt-activated-lipase-from-the-hepatopancreas-of-red-sea-bream-Pagrus-major.pdf
- Instituto Nacional de Pesca. (2018). *Acuicultura camarón blanco del Pacífico*. Gobierno de México.
<https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- 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>

- Kumar, V., Sinha, A., Romano, N., Allen, K., Bowman, B. & Thompson, K. (2018). Metabolism and nutritive role of cholesterol in the growth, gonadal development and reproduction of crustaceans. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 26: 254–273.
- 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 (2023) Abril 101491. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101491>
- Li, X., Li, H., Qu, K., Liu Y., Chi, S., Yang, Q., Tan, B., Zhang, S. & Xie, S. (2023b). Dietary bile acids promote sterol metabolism, bile acids enterohepatic circulation, and apoptosis in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animal Feed Science and Technology Volume* 303, 2023, setiembre,115710. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115710>
- López, S. (2020). *Efecto del aceite vegetal (canola) y animal (sardina y salmón) en el alimento sobre la expresión transcripcional del camarón blanco Penaeus vannamei* [Tesis para grado de Maestro en Ciencias Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Acuicultura)]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México.
- López, J., Gollas, T. and Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 113. 61-66. DOI: [10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0)
- 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.cu/index.php/rpa/article/view/e4037>

- Medina, D. (2018). *Evaluación de alimento enriquecido con Dunaliella sp. para incrementar la resistencia del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) a infecciones experimentales por Vibrio parahaemolyticus* [Tesis para grado de Doctora en Ciencias Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación Acuicultura)]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México.
- 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.
<http://repository.ias.ac.in/21310/1/384.pdf>
- Olsen, R., Kiessling, A., Milley, J., Ross, N. & Lall, S. (2005). Effect of lipid source and bile salts in diet of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., on astaxanthin blood levels. *Aquaculture* 250: 804-812.
- 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. United States 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>
- Rueda, D. (2018). *Evaluación de la respuesta inmune en camarón blanco del pacífico "Penaeus vannamei" a base de dietas con niveles altos de*

vitaminas, nucleótidos y β-glucanos [Trabajo para título de Médico Veterinario Zootecnista, Universidad Central del Ecuador].

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14488/1/TUCE-0014-056-2018.pdf>

Sallam, A., Mansour, A., Srour, 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.

Scheaffer, R., Mendenhall, W. y Ott, L. (1987). *Elementos de muestreo*. 3ra Edición. México: Grupo Editorial Interamericana S.A. de C.V. Disponible en: https://issuu.com/hectorm.delossantos-posadas/docs/elementos_de_muestreo_-_schaffer_et

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.

Su, Ch., Li, J., Lu, Y., Wang, Y., Ding, Y., Pan, L. & Zhang, M. (2022). Interactive effects of dietary cholesterol and bile acids on the growth, lipid metabolism, immune response and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*: Sparing effect of bile acids on cholesterol in shrimp diets. *Aquaculture* 547 (2022) 737412.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737412>

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*. 2021;00: 1–13.

DOI: 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#l>

- 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 (2023) 101452. DOI: 10.1111/anu.13338
- Wang, Z., Zhou, J., Li, J., Zou, J. & Fan, L. (2020). The immune defense response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to temperature fluctuation. *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 103, Pages 103-110.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.053>
- Weel, P. (1973). "Hepatopancreas"? *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 47A, pp. 1 to 9.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(74\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(74)90044-9)
- Weiss, M., Rebelein, A. & Slater, M. (2019). Lupin kernel meal as fishmeal replacement in formulated feeds for the Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 26: 752–762.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/anu.13034>
- 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 (2021) 100773.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100773>
- Yang, H., Mu, X., Luo, D., Hu, Y., Song, H. & Liu, C. (2012). Sodium taurocholate, a novel effective feed-additive for promoting absorption and pigmentation of astaxanthin in blood parrot (*Cichlasoma synspilum* ♀ x *Cichlasoma citrinellum* ♂). *Aquaculture* 350–353: 42–45.
- Yasmine El-Barbary, Alkhateib G., Abdelgayed Y. y Ahmed El-Ashram. (2021). La influencia de continuos e intermitentes *Bacillus subtilis*: aplicación en el camarón de pata blanca, *Litopenaeus vannamei*, genes relacionados con el sistema inmunológico. *Revista Egipcia de Biología Acuática y Departamento de Zoología Pesquera*, Facultad de Ciencias, Universidad Ain Shams, El Cairo, Egipto. ISSN 1110 – 6131 Vol. 25 (3): 241 - 261.

ANEXOS

Anexo 1. Peso promedio, biomasa y sobrevivencia de *P. vannamei* alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.

Tratamiento (Dosis de ácido biliar en la dieta)	Tiempo de cultivo (días)	Peso promedio (g)				Biomasa (g)				Sobrevivencia (%)			
		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
750 ppm	0	5,52	5,93	5,57	5,67	193	208	195	199	100,0	100,0	100,0	100,0
	7	6,86	6,55	7,01	6,81	235	227	233	232	98,0	99,0	95,0	97,3
	14	7,28	7,33	8,15	7,59	248	253	268	256	97,5	98,5	94,0	96,7
	21	8,55	8,65	9,76	8,99	287	294	318	300	96,0	97,0	93,0	95,3
	28	10,37	9,61	10,22	10,07	342	320	331	331	94,3	95,1	92,4	93,9
2 250 ppm	0	5,62	5,88	5,73	5,74	197	206	201	201	100,0	100,0	100,0	100,0
	7	6,98	6,91	7,22	7,04	239	239	250	243	98,0	99,0	99,0	98,7
	14	8,78	7,88	8,22	8,29	300	272	283	285	97,5	98,5	98,5	98,2
	21	9,89	9,11	9,66	9,55	336	312	331	327	97,0	98,0	98,0	97,7
	28	11,39	10,00	11,00	10,80	384	340	374	366	96,3	97,1	97,1	96,9
3 750 ppm	0	5,69	6,22	5,74	5,88	199	218	201	206	100,0	100,0	100,0	100,0
	7	6,54	7,01	6,22	6,59	224	240	213	226	98,0	98,0	98,0	98,0
	14	7,81	8,02	7,18	7,67	267	267	245	259	97,5	95,0	97,5	96,7
	21	9,22	9,23	8,04	8,83	300	300	270	290	93,0	93,0	96,0	94,0
	28	10,38	10,41	9,14	9,98	328	333	292	318	90,3	91,4	91,3	91,0
Control	0	5,78	5,61	5,74	5,71	202	196	201	200	100,0	100,0	100,0	100,0
	7	6,85	6,95	6,08	6,63	228	238	202	223	95,0	98,0	95,0	96,0
	14	8,02	8,11	7,59	7,91	262	270	247	260	93,5	95,0	93,0	93,8
	21	9,15	9,22	8,88	9,08	288	300	283	290	90,0	93,0	91,0	91,3
	28	10,46	10,32	10,04	10,27	327	330	311	323	89,3	91,4	88,6	89,8

Anexo 2. Parámetros inmunológicos de *P. vannamei* alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.

Tratamiento (Dosis de ácido biliar en la dieta)	Repetición	Conteo de hemocitos (cél./ml)			Concentración de proteínas plasmáticas (mg/ml)			Concentración de fenoxidasa (mD.O.)			Concentración de anión superóxido (D.O.)		
		Inicial	Final	Variación	Inicial	Final	Variación	Inicial	Final	Variación	Inicial	Final	Variación
750 ppm	1	4,0E+05	2,9E+08	2,9E+08	118,28	122,75	4,47	355	361	6	1,28	1,66	0,38
	2	3,8E+05	4,0E+08	4,0E+08	116,84	124,88	8,04	350	358	8	1,29	1,63	0,34
	3	4,8E+05	3,4E+08	3,4E+08	120,96	125,05	4,09	320	328	8	1,21	1,65	0,44
	Promedio	4,2E+05	3,4E+08	3,4E+08	118,69	124,23	5,53	342	349	7	1,26	1,64	0,38
2 250 ppm	1	3,9E+05	2,6E+08	2,5E+08	116,28	126,08	9,80	350	360	10	1,05	1,73	0,68
	2	4,1E+05	5,5E+08	5,4E+08	115,84	126,50	10,66	389	397	8	1,15	1,55	0,40
	3	4,5E+05	3,4E+08	3,4E+08	122,10	128,00	5,90	370	377	7	1,18	1,68	0,50
	Promedio	4,2E+05	3,8E+08	3,8E+08	118,07	126,86	8,79	370	378	8	1,13	1,65	0,53
3 750 ppm	1	4,0E+05	1,9E+08	1,9E+08	114,11	120,18	6,07	345	352	7	1,18	1,59	0,41
	2	3,8E+05	3,0E+08	3,0E+08	118,84	120,48	1,64	325	330	5	1,29	1,65	0,36
	3	4,5E+05	3,2E+08	3,2E+08	116,96	122,00	5,04	320	325	5	1,31	1,64	0,33
	Promedio	4,1E+05	2,7E+08	2,7E+08	116,64	120,89	4,25	330	336	6	1,26	1,62	0,36
Control	1	4,1E+05	3,0E+08	3,0E+08	112,15	118,05	5,90	365	371	6	1,10	1,35	0,25
	2	4,3E+05	2,6E+08	2,6E+08	114,20	120,65	6,45	375	379	4	1,29	1,51	0,22
	3	4,6E+05	3,4E+08	3,4E+08	116,96	120,01	3,05	355	359	4	1,28	1,59	0,31
	Promedio	4,3E+05	3,0E+08	3,0E+08	114,44	119,57	5,13	365	370	5	1,22	1,48	0,26

Anexo 3. Prueba de normalidad de datos de Shapiro-Wilk en los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino sometido a cuatro dosis de ácidos biliares en la dieta (incluido el control), según SPSS, versión 24.

Parámetro	Estadístico	gl	Sig.
Peso inicial del langostino (g)	0,896	12	0,143
Peso final del langostino (g)	0,950	12	0,640
Incremento de peso del langostino (g)	0,970	12	0,915
Supervivencia (%)	0,921	12	0,295
Conteo inicial de hemocitos (cél./mL)	0,923	12	0,315
Conteo final de hemocitos (cél./mL)	0,879	12	0,085
Variación de conteo de hemocitos (cél./mL)	0,879	12	0,084
Concentración inicial de proteínas plasmáticas (mg/mL)	0,973	12	0,936
Concentración final de proteínas plasmáticas (mg/mL)	0,944	12	0,555
Variación de concentración de proteínas plasmáticas (mg/mL)	0,966	12	0,869
Concentración inicial de fenoloxidasa total (D.O)	0,946	12	0,579
Concentración final de fenoloxidasa total (D.O)	0,941	12	0,513
Variación de concentración de fenoloxidasa total (D.O)	0,947	12	0,587
Concentración inicial de anión superóxido (D.O)	0,877	12	0,080
Concentración final de anión superóxido (D.O)	0,869	12	0,063
Variación de concentración de anión superóxido (D.O)	0,918	12	0,269

Anexo 4. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene en datos de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino sometido a cuatro dosis de ácidos biliares en la dieta (incluido el control), según SPSS, versión 24.

Parámetro	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Peso inicial del langostino (g)	2,883	3	8	0,103
Peso final del langostino (g)	2,426	3	8	0,141
Incremento de peso del langostino (g)	1,415	3	8	0,308
Supervivencia (%)	2,207	3	8	0,165
Conteo inicial de hemocitos (cél./mL)	1,123	3	8	0,396
Conteo final de hemocitos (cél./mL)	2,946	3	8	0,099
Variación de conteo de hemocitos (cél./mL)	2,949	3	8	0,098
Concentración inicial de proteínas plasmáticas (mg/mL)	0,644	3	8	0,608
Concentración final de proteínas plasmáticas (mg/mL)	0,325	3	8	0,807
Variación de concentración de proteínas plasmáticas (mg/mL)	0,219	3	8	0,881
Concentración inicial de fenoloxidasa total (mD.O)	0,638	3	8	0,611
Concentración final de fenoloxidasa total (mD.O)	0,549	3	8	0,663
Variación de concentración de fenoloxidasa total (mD.O)	0,160	3	8	0,920
Concentración inicial de anión superóxido (D.O)	1,710	3	8	0,242
Concentración final de anión superóxido (D.O)	3,366	3	8	0,075
Variación de concentración de anión superóxido (D.O)	2,476	3	8	0,136

Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino sometido a cuatro dosis de ácidos biliares en la dieta (incluido el control), según SPSS, versión 24.

Parámetro		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig,
Peso inicial del langostino (g)	Entre grupos	0,076	3	0,025	0,630	0,616
	Dentro de grupos	0,321	8	0,040		
	Total	0,397	11			
Peso final del langostino (g)	Entre grupos	1,214	3	0,405	1,297	0,340
	Dentro de grupos	2,494	8	0,312		
	Total	3,708	11			
Incremento de peso del langostino (g)	Entre grupos	1,453	3	0,484	1,224	0,362
	Dentro de grupos	3,165	8	0,396		
	Total	4,618	11			
Sobrevivencia (%)	Entre grupos	89,897	3	29,966	25,888	0,000
	Dentro de grupos	9,260	8	1,158		
	Total	99,157	11			
Conteo inicial de hemocitos (cél./mL)	Entre grupos	8,67E+08	3	2,89E+08	0,204	0,891
	Dentro de grupos	1,13E+10	8	1,42E+09		
	Total	1,22E+10	11			
Conteo final de hemocitos (cél./mL)	Entre grupos	2,12E+16	3	7,08E+15	0,899	0,483
	Dentro de grupos	6,30E+16	8	7,88E+15		
	Total	8,43E+16	11			
Variación de conteo de hemocitos (cél./mL)	Entre grupos	2,12E+16	3	7,08E+15	0,899	0,483
	Dentro de grupos	6,30E+16	8	7,88E+15		
	Total	8,43E+16	11			
Concentración inicial de proteínas plasmáticas (mg/mL)	Entre grupos	32,147	3	10,716	1,527	0,281
	Dentro de grupos	56,157	8	7,020		
	Total	88,304	11			
Concentración final de proteínas plasmáticas (mg/mL)	Entre grupos	97,750	3	32,583	23,920	0,000
	Dentro de grupos	10,898	8	1,362		
	Total	108,647	11			
Variación de concentración de proteínas plasmáticas (mg/mL)	Entre grupos	35,325	3	11,775	2,368	0,147
	Dentro de grupos	39,777	8	4,972		
	Total	75,101	11			

(Continuación del Anexo 5)

Concentración inicial de fenoloxidasa (mD.O)	Entre grupos	3 213,583	3	1 071,194	4,227	0,046
	Dentro de grupos	2 027,333	8	253,417		
	Total	5 240,917	11			
Concentración final de fenoloxidasa (mD.O)	Entre grupos	3 347,583	3	1 115,861	4,538	0,039
	Dentro de grupos	1 967,333	8	245,917		
	Total	5 314,917	11			
Variación de concentración de fenoloxidasa (mD.O)	Entre grupos	24,333	3	8,111	5,123	0,029
	Dentro de grupos	12,667	8	1,583		
	Total	37,000	11			
Concentración inicial de anión superóxido (D.O)	Entre grupos	0,036	3	0,012	2,081	0,181
	Dentro de grupos	0,046	8	0,006		
	Total	0,081	11			
Concentración final de anión superóxido (D.O)	Entre grupos	0,058	3	0,019	3,112	0,088
	Dentro de grupos	0,050	8	0,006		
	Total	0,108	11			
Variación de concentración de anión superóxido (D.O)	Entre grupos	0,108	3	0,036	5,460	0,024
	Dentro de grupos	0,053	8	0,007		
	Total	0,161	11			

Anexo 6. Subgrupos según la prueba post hoc Duncan ($\alpha=0,05$) de los parámetros biométricos e inmunológicos del langostino que arrojaron diferencia significativa ($p<0,05$) entre los tratamientos según ANOVA, utilizando el programa computacional SPSS, versión 24.

Subconjuntos (para alfa = 0,05) en la sobrevivencia					
Dosis	N	Sobrevivencia promedio final (%)			Sig.
		1	2	3	
Duncan ^a Control	3	89,77			
3 750ppm	3	91,00			
750ppm	3		93,93		
2 250ppm	3			96,83	
		,198	1,000	1,000	

Subconjuntos (para alfa = 0,05) en la concentración de proteínas plasmáticas					
Dosis	N	Promedio concentración final (mg/mL)			Sig.
		1	2	3	
Duncan ^a Control	3	119,57			
3 750ppm	3	120,89			
750ppm	3		124,23		
2 250ppm	3			126,86	
		,204	1,000	1,000	

Subconjuntos (para alfa = 0,05) en la concentración de fenoloxidasa (mD.O)						
Dosis	N	Promedio concentración final (mD.O)		Variación de la concentración (mD.O)		
		1	2	1	2	3
Duncan ^a 3 750ppm	3	336		5		
750ppm	3	349	349	6	6	
Control	3		370		7	7
2 250ppm	3		378			8
		,328	,062	,359	,143	,359

Subconjuntos (para alfa = 0,05) en la concentración de anión superóxido (D.O)				
Dosis	N	Variación de la concentración (D.O)		Sig.
		1	2	
Duncan ^a Control	3	0,26		
3 750ppm	3	0,37		
750ppm	3	0,39	0,39	
2 250ppm	3		0,53	
		,104	,068	

Anexo 7. Parámetros físicos y químicos de calidad de agua durante el cultivo experimental de *P. vannamei* alimentado en tres dosis de ácidos biliares en la dieta.

Tratamiento (Dosis de ácido biliar en la dieta)	Día de Cultivo	Oxígeno disuelto am (mg/l)	Oxígeno disuelto pm (mg/l)	Temperatura am (°C)	Temperatura pm (°C)	pH	Alcalinidad (mg/l)	Salinidad (‰)	Amonio Tóxico (mg/l NH ₃)
750 ppm	0	4,1	5,1	27,5	28,1	7,4	140	22	0,05
	7	3,9	4,9	27,8	28,2	7,6	155	21	0,15
	14	4,0	4,5	27,3	28,5	7,5	158	21	0,18
	21	4,2	4,7	26,6	27,7	7,8	160	21	0,22
	28	4,1	4,7	26,5	27,1	7,5	165	21	0,25
2 250 ppm	0	4,1	5,1	27,5	28,1	7,4	140	22	0,05
	7	4,0	4,7	27,3	28,3	7,5	145	21	0,21
	14	4,1	4,8	27,0	28,6	7,6	150	21	0,25
	21	4,1	4,5	26,8	27,6	7,6	165	21	0,26
	28	4,0	4,6	26,2	27,1	7,8	178	21	0,35
3 750 ppm	0	4,1	5,1	27,5	28,1	7,4	140	22	0,05
	7	4,2	4,9	27,0	28,0	7,5	150	21	0,16
	14	4,1	4,8	27,2	27,5	7,5	155	22	0,23
	21	4,3	4,8	27,1	27,9	7,6	160	21	0,31
	28	4,0	4,5	26,4	26,9	7,7	190	21	0,39
Control	0	4,1	5,1	27,5	28,1	7,4	140	22	0,05
	7	4,3	4,8	27,3	28,2	7,5	160	22	0,11
	14	4,4	5,0	27,5	28,0	7,7	180	21	0,23
	21	4,1	4,8	27,0	27,9	7,8	190	21	0,25
	28	4,2	4,6	26,3	27,1	7,8	205	21	0,28

Anexo 8. Parámetros patológicos de *P. vannamei* alimentado con tres dosis de ácidos biliares en la dieta.

Parámetro patológico	Tratamiento (dosis de ácidos biliares en la dieta)	Día 0		Día 28	
		Nivel de lípidos	Grado	Nivel de lípidos	Grado
Nivel y grado de lípidos en hepatopáncreas	750 ppm	0-85 % Lípidos	G1	90 – 96% Lípidos	G3
	2250 ppm	0-85 % Lípidos	G1	96 -100% Lípidos	G4
	3750 ppm	0-85 % Lípidos	G1	90 – 96% Lípidos	G3
	Control	0-85 % Lípidos	G1	90 – 96% Lípidos	G3
		Ectoparásito	Grado	Ectoparásito	Grado
Grado de severidad a la infestación por epicomensales en lamelas branquiales	750 ppm	<i>Zoothamnium</i> sp.	G1	<i>Zoothamnium</i> sp.	G1
	2250 ppm	<i>Zoothamnium</i> sp.	G1	Ninguno	G0
	3750 ppm	<i>Zoothamnium</i> sp.	G1	Ninguno	G0
	Control	<i>Zoothamnium</i> sp.	G1	<i>Zoothamnium</i> sp.	G1
		Parásitos	Grado	Parásitos	Grado
Grado de severidad a la infestación por gregarinas	750 ppm	<i>Gregarina/trofozoito</i>	G1	<i>Ninguno</i>	G0
	2250 ppm	<i>Gregarina/trofozoito</i>	G1	Ninguno	G0
	3750 ppm	<i>Gregarina/trofozoito</i>	G1	Ninguno	G0
	Control	<i>Gregarina/trofozoito</i>	G1	<i>Ninguno</i>	G0

Nota:

Nivel lipídico en porcentaje:

G1: 0-85%, G2: 85-90%, G3: 90-96% y G4: 96-100%.

Epicomensales en lamelas branquiales/organismo:

G0: No presenta, G1:1-5, G2:6-10, G3: 10-15, G4: mayor a 15.

Gregarinas en el intestino/organismo:

G0: No presenta, G1:1-15, G2:16-50, G3: 51-100, G4: mayor a 100.