

## Saponina en dieta de camarón blanco *Penaeus vannamei* posible causa de enteritis hemocítica y efectos negativos sobre el crecimiento y supervivencia

## Saponin in white shrimp *Penaeus vannamei* diet possible cause of hemocytic enteritis, a negative effect in growth performance and survival

Lozano-Olvera, R.<sup>id</sup>, Palacios-González, D.A.<sup>id</sup>, Tirado-Flores E.A.<sup>id</sup>, Puello-Cruz, A.C.<sup>id</sup>

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.: Unidad en Acuicultura y Manejo Ambiental. Av. Sábalo Cerritos s/n, 82112, Mazatlán, Sinaloa, México.



**Please cite this article as/Como citar este artículo:** Lozano-Olvera, R., Palacios-González, D.A., Tirado-Flores E.A., Puello-Cruz, A.C.(2024). Saponin in white shrimp *Penaeus vannamei* diet possible cause of hemocytic enteritis, a negative effect in growth performance and survival. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1640. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1640>

### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 01<sup>th</sup> 2024.

Accepted/Aceptado: May 29<sup>th</sup> 2024.

Available on line/Publicado: June 12<sup>th</sup> 2024.

### RESUMEN

La optimización de técnicas de producción e intensificación en la camaronicultura han diversificado las estrategias en nutrición y salud. La inclusión de aditivos para mejorar resultados es cada vez más común y es de gran importancia evaluarlos adecuadamente. Este estudio realizó un análisis integral sobre el efecto de saponina en juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei*. Se incluyeron 4 concentraciones de saponina (0 %, 2 %, 4 % y 6 %) en una dieta comercial y se alimentaron durante 28 días bajo condiciones controladas de cultivo. El alimento sin saponina (0 %) mostró los mejores resultados, el crecimiento fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) respecto a las demás concentraciones. La sobrevivencia mostró reducción conforme la inclusión de saponina se incrementó, al igual que el daño en tracto digestivo (0 % > 2 % > 4 % > 6 %). Las concentraciones evaluadas en este estudio no produjeron mejoras en los camarones, por el contrario, provocaron problemas en su tracto digestivo y en el alimento con mayor proliferación de hongos a mayor inclusión de saponina.

**PALABRAS CLAVE:** Nutrición, *Penaeus vannamei*, saponinas, histopatología, enteritis hemocítica.

### \*Corresponding Author:

**Ana C. Puello-Cruz.** Unidad en Acuicultura y Manejo Ambiental. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Av. Sábalo Cerritos, s/n, Cerritos. 82112, Mazatlán, Sinaloa, México. Teléfono 52(669) 9898700 ext. 227. E-mail: [puello@ciad.mx](mailto:puello@ciad.mx)

---

## ABSTRACT

---

The optimization of production techniques and intensification of shrimp culture has led to diversified nutrition and health strategies. While the inclusion of additives to improve results is common, they must be properly evaluated. This study aims to perform a comprehensive evaluation of saponin on juvenile white shrimp (*Penaeus vannamei*). Four saponin concentrations (0 %, 2 %, 4 %, and 6 %) were included in a commercial diet and fed to shrimp for 28 days under controlled culture conditions. The diet without saponin (0 %) showed the most significant difference results ( $p < 0.05$ ) when compared to the other concentrations. Survival rates decreased as saponin inclusion increased, along with the observed digestive tract damage (0 % > 2 % > 4 % > 6 %). Contrary to expectations, the evaluated concentrations in this study did not produce improvements in shrimp; instead, they resulted in problems in the digestive tract. Furthermore, greater fungi proliferation was observed in the diet with higher saponin inclusion.

---

**KEY WORDS :** Nutrition, *Penaeus vannamei*, saponins, histopathology, hemocytic enteritis.

---

## Introducción

Durante la última década, el cultivo de camarón se ha visto afectado por enfermedades que han producido pérdidas significativas en todo el mundo (Abdel-Latif et al., 2023; Flegel, 2019). Como estrategias se aplican mejoras en bioseguridad, manejo saludable y selección genética que han logrado reducir notoriamente los posibles riesgos de brotes infecciosos (Alday-Sanz et al., 2018); sin embargo, todas estas estrategias son insuficientes para controlar y evitar la dispersión de ciertas enfermedades. Tal es el caso de la enfermedad del síndrome de mancha blanca WSSD (por sus siglas en inglés: White Spot Syndrome Virus) y enfermedad de necrosis aguda en hepatopáncreas AHPND (por sus siglas en inglés: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) los cuales continúan causando grandes pérdidas por no contar con tratamientos eficientes para erradicarlos siendo el gran reto a resolver (Han et al., 2019; WOA, 2021). En este contexto, la nanotecnología y sustancias bioactivas provenientes de extractos naturales son empleadas como aditivos en alimentos especializados para promover tolerancia al estrés frente a la intensificación de los cultivos y enfermedades con resultados prometedores (Abdel-Latif et al., 2023; Sharawy et al., 2022; Tacon, 2017).

Las mejoras en la salud animal bajo condiciones óptimas de nutrición promueven un desempeño favorable frente a condiciones adversas de cultivo y manejo en los organismos en general (Servin et al., 2021). Ante la tendencia del uso de proteína de origen vegetal en acuicultura (El-Naby et al., 2023), particularmente en las dietas de camarón, es de vital importancia evaluar

efectos subletales que pudieran afectar la homeostasis del intestino y deterioro en su salud ya que harinas como la de soya o girasol contienen cantidades considerables de saponinas en su composición (Jannathulla *et al.*, 2018) que contrario a lo deseado pudieran llegar a representar un riesgo para la salud de los organismos si no se consideran durante la elaboración de las dietas donde serán incluidas. De igual manera algunos productos fitogénicos con aceites y aminoácidos esenciales, ácidos orgánicos, esteroides y/o triterpenos han sido evaluado como suplementos alimenticios para fines similares (Abdel-Latif *et al.*, 2023; Francis *et al.*, 2002; Kesselring *et al.*, 2021).

El caso particular de las saponinas, las cuales están presentes en plantas; han demostrado que su actividad biológica produce beneficios en el humano al ser consumida con moderación, mientras que en otros animales se han demostrado efectos benéficos, adversos e incluso nocivos (Bureau *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2002; Francis *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2022). Bureau *et al.* (1998) observaron que al agregar 1.5 y 3.0 g de *Quillaja saponins* por kg de alimento para salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) el crecimiento disminuía y les causaba daño en tracto intestinal. A diferencia con camarón blanco *P. vannamei* donde a las saponinas se les atribuyeron beneficios en crecimiento, mejoras en sus procesos digestivos, microbiota intestinal, estimulación en sistema inmune y/o incremento en sobrevivencia, sin embargo, en la salud del tracto digestivo el beneficio fue limitado (Akbar *et al.*, 2023; Servin *et al.*, 2021). Huang *et al.* (2022) evaluaron el efecto de los compuestos bioactivos en el agua de cultivo con los camarones, concluyendo que al agregarlos una vez por semana en un periodo de 70 días mejoró la tasa de crecimiento específico y crecimiento promedio diario, sin diferencias en sobrevivencia respecto al control. Krogdahl *et al.* (2015) y Gopan *et al.* (2020) reportaron que en dietas con bajas concentraciones de saponinas se estimuló el sistema inmune, pero a concentraciones altas afectaban el crecimiento y causaban daño en la integridad de la mucosa intestinal por su interacción con las membranas celulares. Recientemente, las saponinas han sido señaladas como agente causal de enteritis en el intestino distal en salmones (Krogdahl *et al.*, 2015). La información existente en camarones es escasa por tanto el objetivo de este estudio fue evaluar de una manera integral el efecto de diferentes concentraciones de extractos de saponina en juveniles de camarón blanco *P. vannamei*.

## Material y Métodos

### Inclusión de diferentes concentraciones de saponina en alimento comercial

El alimento comercial (35 % proteína y 9 % lípidos; Purina®) y saponina fueron pulverizados (Nixtamatic®). Posteriormente se mezclaron con ayuda de una batidora casera (Blazer home®) a cuatro diferentes inclusiones de saponina, a una no se le agregó saponina y a las otras tres se les agregaron 20, 40 y 60 g·kg<sup>-1</sup> de saponina al alimento (0 %, 2 %, 4 % y 6 % respectivamente), luego a cada mezcla se le agregaron 250 mL de agua para formar una masa homogénea. Finalmente, se reconstituyó el pellet en un molino de carne (Torrey®), y almacenó en bolsas ziploc bajo refrigeración (4 °C) de acuerdo con el proceso seguido por Loya-Rodríguez *et al.* (2023).

## Aclimatación de los organismos

Juveniles de camarón blanco (*P. vannamei*) de un laboratorio de larvas local (El Rosario 22°54'028.3" N, 106°05'043.5" W) fueron aclimatados en tanques de fibra de vidrio de color gris claro de 300 L con agua marina filtrada (salinidad  $33.79 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ ; temperatura  $29.90 \pm 1.14 \text{ °C}$ ) y aeración constante. Los camarones fueron alimentados a saciedad tres veces al día. Se realizaron análisis de qPCR (IQ real Sistema Cuantitativo) a una muestra representativa del lote para descartar presencia de WSSV, TSV (según siglas en inglés Taura Syndrome Virus) y AHPND siguiendo la metodología de Dangtip *et al.* (2015).

## Diseño experimental y sistema

Después de obtener análisis negativos a las enfermedades mencionadas anteriormente y concluir el periodo de aclimatación, un total de 640 camarones juveniles de  $0.23 \pm 0.1 \text{ g}$  y  $35.44 \pm 0.23 \text{ mm}$  peso y talla promedio respectivamente, fueron distribuidos aleatoriamente en 16 unidades experimentales ( $40 \text{ organismos UE}^{-1}$ ), las cuales consisten en tanques redondos de fibra de vidrio con capacidad útil de 50 L, paredes negras y fondo blanco. Cada concentración (0 %, 2 %, 4 %, y 6 %) contó con cuatro replicas. Los camarones fueron alimentados 3 veces al día (08:00, 12:00 y 16:00 h) por 28 días. Las condiciones de cultivo fueron: agua filtrada ( $10 \mu\text{m}$ ), aireación constante con piedras difusoras y fotoperiodo 12 h luz/12 h oscuridad. Antes de la primera alimentación diaria, cada UE era sifoneada para eliminar heces, alimento no consumido o cualquier otro desecho. La temperatura ( $29.90 \pm 1.14 \text{ °C}$ ), salinidad ( $33.79 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ ), oxígeno disuelto ( $3.18 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ ) fueron registrados diariamente (YSI 85 Multimeter), y los otros parámetros fisicoquímicos (nitritos, nitratos, amonio, y pH) fueron medidos con kits comerciales (API Saltwater Master Test Kit). Al momento de alimentar a los camarones, se tomó el tiempo de reacción al mismo, con la ayuda del cronómetro del celular, se registró el momento en el que atrapaban el pellet y comenzaban a consumirlo (reacción de consumo).

Al concluir el periodo experimental (28 días) se realizaron biometrías individuales a todos los camarones, de todas las concentraciones y replicas. Posteriormente se calcularon los siguientes parámetros:

Crecimiento (Pan *et al.*, 2007)

$$\text{Ecuación 1: } \text{Peso ganado (g)} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{(\text{Duración días})}$$

$$\text{Ecuación 2: } \text{Incremento en talla (mm)} = \frac{(\text{Talla final} - \text{Talla inicial})}{(\text{Duración días})}$$

Tasa de Crecimiento Específico (Stadtlander *et al.*, 2013)

$$\text{Ecuación 3: } \text{TCE (\% día}^{-1}\text{)} = \left[ \frac{(\text{Ln peso final}) - (\text{Ln peso inicial})}{\text{Días}} \right] \times 100$$

Sobrevivencia (Li *et al.*, 2007)

$$\text{Ecuación 4: } S (\%) = \frac{\text{Número final de organismos}}{\text{Número inicial de organismos}} \times 100$$

### **Análisis histopatológico**

El control inicial consistió en muestrear aleatoriamente 17 camarones para evaluar su salud antes de comenzar a alimentarlos con las diferentes concentraciones de saponina. Al día 22 de alimentación, un episodio de alta mortalidad fue registrado por lo cual se colectaron aleatoriamente ocho camarones por cada concentración (dos camarones por replica) los cuales fueron fijados para análisis histopatológicos. Igualmente, al día 28 de alimentación, ocho camarones de cada concentración se fijaron en solución Davidson y procesaron histológicamente para su evaluación. Cada camarón se cortó longitudinalmente, cada sección se deshidrató en etanoles al 70 %, 80 %, 96 % y 100 % antes de ser embebidos en parafina de acuerdo a Bell & Lightner (1988). Secciones de 5 µm de cada camarón fueron cortadas con un micrótopo manual (Leica RM 2125RT) y teñidas con hematoxilina-eosina-floxina y montadas en portaobjetos (Lightner, 1996). Cada una de las muestras se observó bajo un microscopio Olympus (CX31) para detectar alteraciones en los tejidos. Se consideró la condición histopatológica presente en los controles (antes y después de los tiempos de alimentación) para detectar la alteración del tejido y los efectos en la salud de los camarones. Por lo tanto, cualquier alteración presente en los camarones después de la alimentación con las diferentes concentraciones de saponina se tomó como indicativa del efecto de la saponina en la concentración experimental (Frías-Espericueta *et al.*, 2008<sup>a</sup>).

### **Análisis estadísticos**

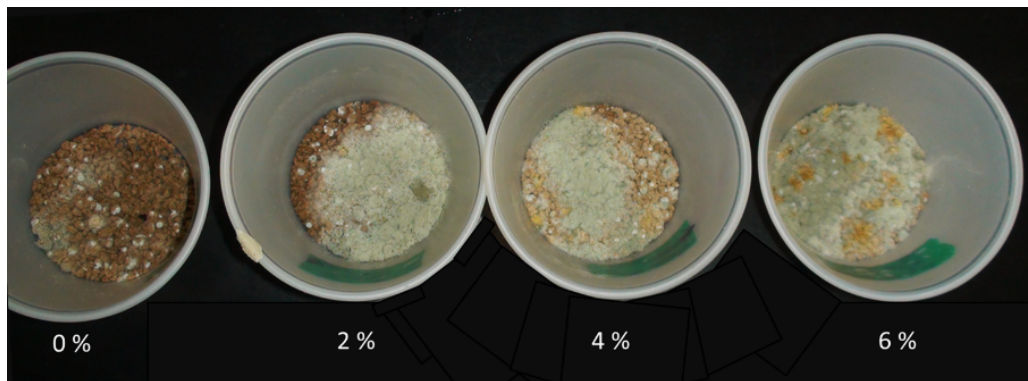
Los datos obtenidos de peso y longitud inicial, peso y longitud final se sometieron a un análisis estadístico de Kruskal Wallis y una prueba post hoc de Dunn. Los datos de peso ganado, incremento en talla y tasa de crecimiento específico se analizaron con un ANOVA de 1 vía con una prueba post hoc de Tukey y los datos de sobrevivencia se analizaron con una prueba de Kaplan Meier con una prueba post hoc de Holm-Sidak. Todos los análisis se realizaron con una significancia de 0.05 en el software Sigma Plot.

### **Resultados y Discusión**

Los crustáceos detectan el alimento gracias a quimiorreceptores (astetascos), por lo que las dietas deben de ser atractantes para su rápida identificación y consumo (Junnathulla *et al.*, 2021). En el presente estudio, el alimento con las diferentes inclusiones fue aceptado por los camarones; sin embargo, varió entre las diferentes concentraciones. La reacción de consumo fue inmediata para el alimento sin saponina (0 %). Los camarones de la concentración al 2 % tuvieron una reacción de consumo < 2 segundos, el de 4 % > 4 segundos y el de 6 % > 15 segundos, este último en algunos casos no fue consumido. Al respecto, Jumah *et al.* (2020) demostraron en *P. monodon* que al incluir *Quillaja saponin*, a una concentración de 0.6 g por kg en la dieta, tiene efecto sobre la atractabilidad en comparación con alimentos con menor

inclusión. Así mismo Junnathulla *et al.* (2021) reportaron que, al incluir harinas de soya en dietas de camarón, la presencia de taninos y saponinas reducía la atractabilidad del alimento, reduciendo el consumo y tiempo de respuesta. Existe información que las saponinas pueden ser tóxicas para ciertos organismos y es dependiente de la concentración (Francis *et al.*, 2002). *Oncorhynchus tshawytscha* y *Oncorhynchus mykiss* alimentados con dietas suplementadas con 1.5 y 3.0 g·kg<sup>-1</sup> de *Quillaja saponina* en dieta, mostraron menor consumo, supresión del crecimiento y daño en tracto digestivo (Bureau *et al.*, 1998).

En esta investigación se observó que el alimento con 6 % de saponina presentó mayor crecimiento de hongos al no mantenerse bajo refrigeración adecuada, la saponina de alta pureza que se empleó para este estudio resultó ser altamente higroscópica (Figura 1).



**Figura 1. Crecimiento de hongos en alimentos especializado para camarón con diferentes concentraciones de saponinas incluidas (0 %, 2 %, 4 % and 6 %).**

De acuerdo con nuestros resultados, la inclusión de saponina en la dieta de camarón no influyó en los parámetros fisicoquímicos del agua bajo las condiciones de flujo abierto, ya que no se observaron variaciones significativas en los parámetros fisicoquímicos evaluados y los valores fueron adecuados para camarón (Instituto Nacional de Pesca 2018; <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuaculturacamaron-blanco-del-pacifico>. Marzo 2023). Estos resultados estaban previstos debido al flujo de agua constante que permitía un recambio total cada 7.5 h.

Los datos de peso y talla al inicio (IW y IS respectivamente) y al final (FW y FS respectivamente) de la evaluación, fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0.05$ ), que demostró que los datos iniciales no presentaban diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones al inicio de la evaluación, y si se presentaron al final ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1). Los datos de ganancia en peso (WG), incremento en talla (SI) y tasa de crecimiento específico (SGR % d<sup>-1</sup>) fueron analizados con un ANOVA de una vía y un análisis post hoc de Tukey. El



análisis de dichos resultados (Tabla 1), muestra que los camarones alimentados sin saponina (0 %) presentaron mayor crecimiento tanto en peso como longitud (WG = 0.82 g y SI = 20.98 mm) en comparación con las inclusiones de saponina al 2 %, 4 % y 6 %. Lo anterior quedó demostrado con los trabajos de Jannathulla *et al.* (2018) con *P. vannamei* y Chen *et al.* (2011) con lenguado japones, quienes observaron efecto negativo en los parámetros de crecimiento de los organismos conforme el nivel de inclusión de saponina aumentaba, aun tratándose de concentraciones de saponina menores a las utilizadas en el presente estudio (0.8 a 6.5 g·kg<sup>-1</sup>). Estos resultados evidencian la tolerancia y resiliencia de los organismos a concentraciones de saponina de hasta 20 g·kg<sup>-1</sup>, sin presentar efectos en sobrevivencia significativamente diferentes al control. En contraste, Huang *et al.* (2022) reportan que juveniles *P. vannamei* tratados semanalmente con diferentes concentraciones (0 a 5 ml m<sup>-3</sup>) de compuestos bioactivos a base de saponinas en el agua de cultivo, mostraron mejor crecimiento que los camarones no tratados.

**Tabla 1. Resultados de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentados con cuatro concentraciones de saponina (Conc.) durante 28 días.**

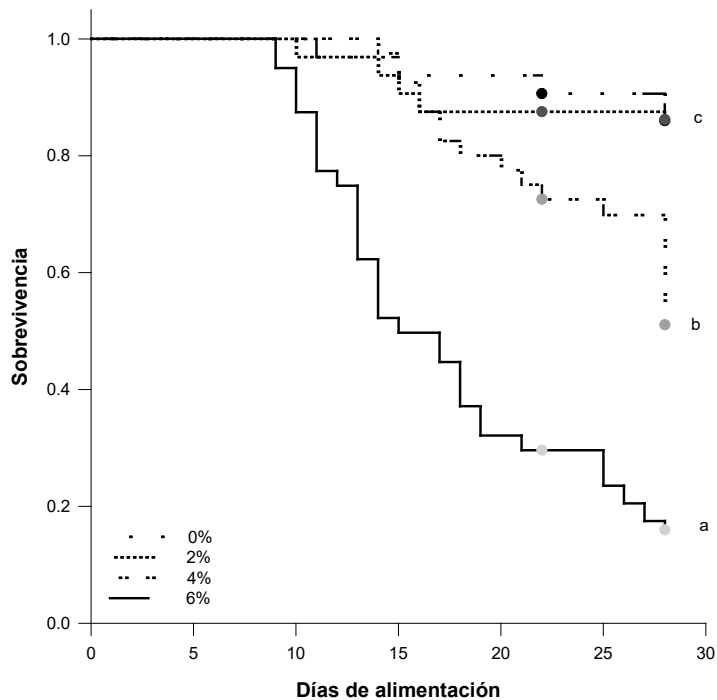
Conc.	IW (g)	FW (g)	WG (g/d)	IS (mm)	FS (mm)	SI (mm/d)	SGR (%/d)	S (%)
0 %	0.23±0.01	1.05±0.43 <sup>c</sup>	0.82±0.10 <sup>c</sup>	35.06±4.79	56.04±8.19 <sup>c</sup>	20.98±1.21 <sup>c</sup>	5.44±0.31 <sup>c</sup>	86.25±4.79 <sup>c</sup>
2 %	0.24±0.01	0.78±0.38 <sup>b</sup>	0.54±0.06 <sup>b</sup>	35.54±5.01	50.96±7.83 <sup>b</sup>	15.42±1.48 <sup>b</sup>	4.19±0.33 <sup>b</sup>	86.25±2.50 <sup>c</sup>
4 %	0.24±0.01	0.61±0.36 <sup>a</sup>	0.37±0.05 <sup>a</sup>	35.55±4.35	46.96±8.15 <sup>a</sup>	11.41±1.08 <sup>a</sup>	3.36±0.28 <sup>a</sup>	52.50±6.12 <sup>b</sup>
6 %	0.24±0.01	0.71±0.33 <sup>ab</sup>	0.47±0.10 <sup>ab</sup>	35.48±5.58	50.73±7.38 <sup>ab</sup>	15.25±1.56 <sup>b</sup>	3.82±0.48 <sup>ab</sup>	18.13±1.25 <sup>a</sup>

IW=peso inicial; WG=peso ganado; SI=incremento en talla; FS=talla final; SGR=tasa de crecimiento específico; S=sobrevivencia.

0 % = sin inclusión de saponina; 2 % = con 2 % inclusión de saponina; 4 % = con 4 % inclusión de saponina y 6 % = con 6 % inclusión de saponina. Las letras indican las concentraciones homogéneas obtenidas en los análisis post hoc correspondientes (Dunn/Tukey/Holm Sidak) donde las que no presentan diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ) comparten letras iguales.

En el presente estudio, se observó un efecto en la capacidad de sobrevivencia de los camarones dependiente de la concentración de saponina (Tabla 1) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los camarones alimentados con 0 % y 2 % del resto de las concentraciones. Nuestros resultados indican que la sobrevivencia se redujo a medida que la inclusión de saponina se incrementó (0 % > 2 % > 4 % > 6 %), siendo la concentración de 6 % en la que ocurrió la más alta mortalidad entre el día 8 y 14 de alimentación alcanzando un 25 % de mortalidad al día 11, estos resultados fueron similares para la concentración 4 % para el día 22. Se observó que estas dos concentraciones tuvieron efectos notoriamente negativos al ser comparados con las concentradas 0 % y 2 %. Al día 28 de alimentación, la sobrevivencia para la concentración del

6 % fue de 18.13 %, de 52.50 % para la concentración del 4 %, mientras que para el 2 % y 0 %, fue de 86.25 % (Figura 2).



**Figura 2. Curva de sobrevivencia Kaplan-Meier en juveniles de *Penaeus vannamei* alimentados con diferentes concentraciones de saponina. (0 %; 2 %; 4 % y 6 %).**

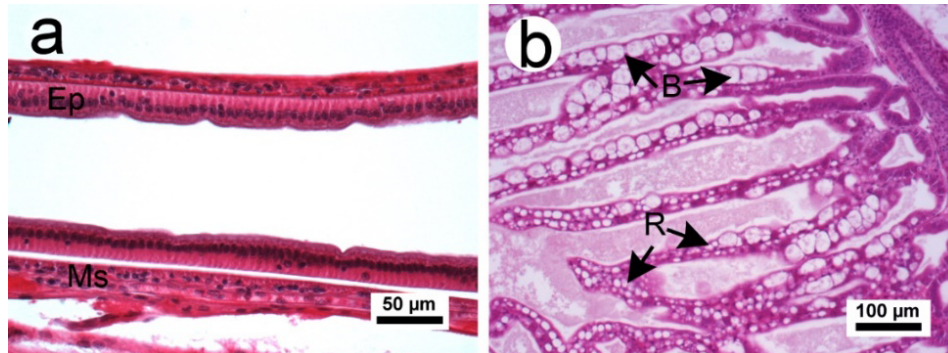
Las letras indican las concentraciones homogéneas obtenidos en el análisis post hoc (Holm Sidak) donde las que no presentan diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ) comparten letras iguales.

### Evaluación histopatológica

Antes de comenzar la alimentación con saponinas los camarones se observaron sanos con una apariencia y comportamiento normales y sin signos de enfermedad, condición que fue confirmada por análisis iniciales de PCR y la evidencia histológica (Figura 3). No se observaron cambios histopatológicos en los tejidos ni en órganos. Todos los camarones analizados mostraron tractos digestivos sin daños en el estómago, intestino ni hepatopáncreas (Figura 3a y b). El hepatopáncreas era normal sin daño en el epitelio tubular; con evidente abundancia de vacuolas secretoras en células B y vacuolas



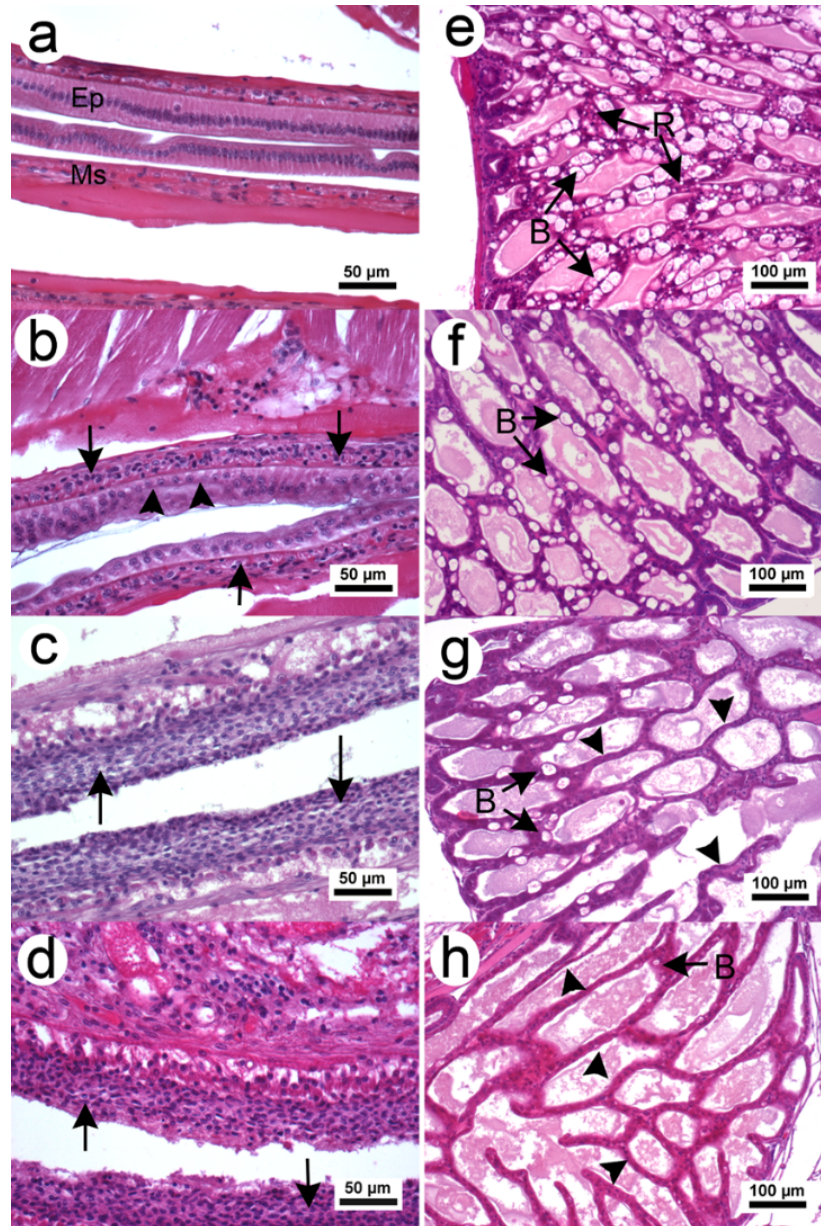
lipídicas en células R (Figura 3b). Las branquias de todos los camarones mostraron epitelio normal, con excepción de 3 de los 17 camarones evaluados que mostraron necrosis focal en filamentos secundarios.



**Figura 3. Microfotografías de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei* antes de alimentarse con diferentes concentraciones de saponina incluidas en alimento.**

Intestino medio con epitelio (Ep) y capas musculares (Ms) sin cambios patológicos aparentes (a) y túbulos hepatopancreáticos con micro-anatomía normal. Tinción hematoxilina-eosina-floxina.

Los efectos de las saponinas sobre la salud de los animales dependen de la especie, origen de los compuestos y ruta de exposición (Couto *et al.*, 2015). Mientras que, el efecto de las saponinas sobre el tracto intestinal de los animales se ha atribuido al incremento de la permeabilidad en las membranas de las células intestinales (Francis *et al.*, 2005). En el presente estudio, los camarones alimentados con 4 % y 6 % de saponina desarrollaron severa enteritis en intestino medio, a la vez que se vio afectado el tejido hepatopancreático (Figura 4) y los parámetros zootécnicos, incluida la sobrevivencia al finalizar el experimento. Estos resultados son consistentes con Krogdahl *et al.* (2015), quienes reportaron que dietas con concentraciones entre 2 - 10 g kg<sup>-1</sup> de saponinas de soya, causaron enteritis en salmónidos, alterando las funciones digestivas e inmunológicas, condición que se relaciona con lo observado en el presente estudio, sin embargo, los camarones parecen presentar mayor tolerancia a la inclusión de saponina en la dieta comparado con peces (Couto *et al.*, 2015; Krogdahl *et al.*, 2015; Yasir *et al.*, 2021). Desde el día 22, los camarones alimentados con saponinas (2 %, 4 % y 6 %) mostraron daños en intestino y hepatopáncreas, que incluye desarrollo severo de enteritis hemocítica en intestino medio y atrofia del epitelio tubular (Figura 4).



**Figura 4. Microfotografía del intestino (a – d) y hepatopáncreas (e – h) de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentados 22 días con inclusiones del 0 % (a, e), 2 % (b, f), 4 % (c, g) y 6 % (d, h).**

**a.** Intestino medio sin cambios patológicos en epitelio (Ep) y capas musculares (Ms); **b.** Intestino con leve infiltración hemocítica (flecha) y epitelio con reducción del tamaño de células (cabeza de flecha); **c – d.** Intestino con daño severo de enteritis hemocítica (flecha); **e.** Túbulos hepatopancreáticos con epitelio tubular normal y abundantes vacuolas secretoras y lípidos en células B y R (Flechas); **f.** Túbulos con disminución de lípidos y vacuolas secretoras en células R y B (flecha); **g – h.** Hepatopáncreas con epitelio tubular atrofiado (cabeza de flecha) y pocas o nulas vacuolas secretoras y lipídicas. Tinción hematoxilina-eosina-floxina.

Los camarones que se alimentaron sin saponinas (0 %) se observaron sin cambios patológicos aparentes en tracto digestivo (Figura 4a), y solo 1 de los 8 analizados mostraron infiltración hemocítica leve. Los daños intestinales no eran graves con la inclusión de saponina al 2 % comparados con los alimentados con 4 % y 6 % de saponina, pero el 3 de los 8 analizados mostraron signos incipientes de enteritis como infiltración hemocítica en la capa muscular con modificación leve en la altura del epitelio intestinal (Figura 4b). Se observó enteritis hemocítica en 5 de los 8 y 7 de los 8 camarones analizados en las concentraciones 4 % y 6 % respectivamente (Figura 4c, d). Estos resultados difieren de los reportado por Huang *et al.* (2022), quienes observaron que la adición de extractos a base de saponina en el agua no influyo significativamente en las estructuras del tracto digestivo de los camarones; pero si el grosor de las capas musculares y altura de las vellosidades intestinales, las cuales tendieron a ser mayores comparadas con el control, posiblemente debido a la vía de administración empleada.

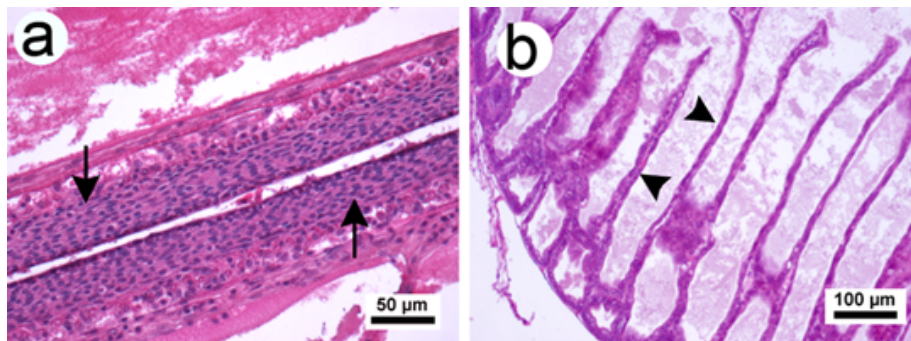
Aunque, la exposición a saponinas ya ha sido asociada a procesos inflamatorios en el tracto digestivo de los peces (Bureau *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2002; Krogdahl *et al.*, 2015), a la fecha no existen informes sobre el desarrollo de enteritis en camarones *P. vannamei* alimentados con saponinas incluidas en dietas. Chen *et al.* (2011) observaron efectos negativos en el tracto intestinal de lenguado japonés alimentados con concentraciones de 3.2 y 6.4 g·kg<sup>-1</sup> de saponina, encontrando disminución de las células caliciformes del intestino, así como hiperplasia de las vellosidades intestinales y disminución de la lámina propia en la mucosa intestinal conforme las concentraciones de saponina aumentaban. Los efectos negativos de las saponinas se atribuyen a sus propiedades astringentes e irritante, que incrementa la permeabilidad de las células intestinales facilitando la entrada de antígenos y toxinas (Böttger & Melzing, 2013; Francis *et al.*, 2002; Knudsen *et al.*, 2008). Alteraciones en la mucosa intestinal como aumento en los linfocitos intraepiteliales y vacuolas supranucleares fueron asociados a efectos subletales por la inclusión de 1 y 2 g·kg<sup>-1</sup> de saponina en dieta para juveniles besugo *Sparus aurata*, pudiendo comprometer la función y/o predisponer la entrada de patógenos oportunistas (Couto *et al.*, 2014). Recientemente, Huang *et al.* (2022) observaron en camarones cultivados en aguas tratadas con productos de saponina modificaciones en la arquitectura tisular del intestino como presencia de vacuolas supranuclear e incremento en las ondulaciones del epitelio intestinal, hallazgos que difieren de un tracto intestinal sano (Bell & Lightner, 1988). Resultados similares se obtuvieron en este estudio que incluyó signos incipientes de inflamación en la submucosa y secciones de epitelio con modificaciones en la forma como reducción de la altura de la célula epitelial en los camarones alimentados con 2 %, sugiriendo que estas modificaciones podrían estar asociadas a efectos subletales como mecanismos para mantener la homeostasis intestinal.

En el presente estudio se pudo apreciar que el epitelio hepatopancreático de los camarones mostró afectación en su micro anatomía presentando túbulos atrofiados con células picnóticas, reducción de lípidos y vacuolas secretoras en células epiteliales. El daño en hepatopáncreas y número de camarones afectados aumentó en relación directa con el incremento en la concentración de saponina incluida (Figura 4e – h). Los alimentados sin saponina (0 %) mostraron un epitelio tubular normal (Figura 4e) con abundantes vacuolas secretoras en células B y vacuolas lipídicas en células R representados en 6 de los 8 camarones analizados. Solo 2 de los 8 camarones presentaron reducciones mínimas en vacuolas de la células R. En 8 de los



8 camarones alimentados con el 2 % de saponina presentaron un epitelio tubular con reducción en el número de vacuolas secretoras en las células B, y vacuolas lipídicas en células R (Figura 4f). En comparación, camarones alimentados con 4 % y 6 % de saponina desarrollaron atrofia severa del epitelio tubular y las vacuolas en células R y B estuvieron ausentes en 2 y 5 de los 8 camarones analizados respectivamente (Figura 4g, h). La disminución de lípidos relacionada con la presencia de saponinas ya se ha documentado en estudios como el de Jannathulla *et al.* (2018), quienes observaron una disminución de colesterol y triglicéridos en hemolinfa relacionada con el aumento en el porcentaje de saponina, estos daños en las células y la disminución de lípidos son asociados a la gran capacidad de las saponinas para alterar las membranas celulares, interactuando con el colesterol presente en ellas y en algunos casos provocar alteraciones en los organelos celulares (Schulz, 1990; Stewart *et al.*, 2016).

Al final del experimento (28 días), los camarones del 4 % y 6 % presentaron alteraciones histopatológicas similares a las encontradas al día 22 de alimentación, que incluye el daño a nivel intestinal manifestado como enteritis hemocítica y atrofia del epitelio tubular en hepatopáncreas (Figura 5a, b). Los camarones alimentados con 2 % y 0 % de saponinas presentaron el intestino medio sin daño epitelial en 8 de los 8 camarones analizados, sin embargo, en 2 de los 8 camarones del 2 % y 1 de los 8 camarones del 0 % mostraron leve reducción de vacuolas lipídicas a nivel hepatopáncreas y necrosis tubular focal.



**Figura 5. Microfotografías de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei* después del periodo de alimentación (28 días).**

Intestino con severa enteritis hemocítica (a) de camarones alimentados con el 6% y hepatopáncreas (b) con epitelio tubular atrofiado con vacuolas secretoras y lipídicas ausentes al día 28. Tinción hematoxilina-eosina-floxina.

Aunado a lo anterior, es importante considerar que los camarones que fueron expuestos a compuesto a base y extractos puros de saponina adicionados al agua de cultivo, también presentaron modificaciones en la microanatomía del hepatopáncreas que incluye menor cantidad de vacuolas de reserva (vacuolas lipídicas en células R) y vacuolas secretoras en células B (Huang *et al.*, 2022), así como desprendimiento de la lámina basal, degradación de los túbulos del

hepatopáncreas y disminución en la dureza del exoesqueleto (Nagesh *et al.*, 1999). Esto evidencia la importancia de realizar más investigación para evaluar los efectos subletales de la saponina en la microanatomía de tracto digestivo. Exposición a patógenos o agentes tóxicos, incluidos exposición a metales pesados han sido implicados como causantes de enteritis hemocítica en camarones (Lightner, 1996; Frías-Espericueta *et al.*, 2008<sup>b</sup>), sin embargo, su patogenia aún sigue sin estar clara.

## Conclusiones

En el presente estudio los camarones alimentados con saponina desarrollaron enteritis hemocítica severa y daños en el hepatopáncreas directamente relacionado con la concentración incluida. Los resultados enfatizan la necesidad de realizar más investigación enfocada en evaluar los mecanismos relacionados con su patogenia. Es importante tomar en cuenta que la inclusión de ingredientes en los alimentos se debe de evaluar de una manera integral, considerando aspectos como el efecto del producto en el organismo, agua y el efecto que puede tener en las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la dieta.

## Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, PCAC; desarrollo de la metodología, LOR, TFEA; manejo de software, PCAC, LOR; validación experimental, ACPC, TFEA, LOR, PGDA; análisis de resultados, ACPC, TFEA, LOR, PGDA; Manejo de datos, ACPC, TFEA, LOR, PGDA; escritura y preparación del manuscrito ACPC, TFEA, LOR, PGDA; redacción, revisión y edición, ACPC, LOR, PGDA; administrador de proyectos y adquisición de fondos, PCAC.

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

## Financiamiento

Por recursos propios generados por el Laboratorio Nutrición, Alimentación y Alimento vivo alternativo CIAD-Mazatlán.

## Declaraciones éticas

Los autores confirman que todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la correspondiente ley mexicana de bienestar animal (NOM-062-ZOO-1999); aunque estas directrices no incluyen camarones, aplicamos los mismos principios en cuanto a bienestar y cuidado animal de otras especies”.

## Declaración de consentimiento informado

No aplica

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al CONAHCYT Y CIAD por financiar parcialmente este estudio.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

- Abdel-Latif, H.M.R., Yilmaz, S., & Kucharczyk, D. (2023). Editorial: Functionality and applications of phytochemicals in aquaculture nutrition. *Frontier in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1218542>
- Akbary, P., Ajdari, A., & Ajang, B. (2023). Growth, survival, nutritional value and phytochemical, and antioxidant state of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed with premix extract of brown *Sargassum ilicifolium*, *Nizimuddinina zanardini*, *Cystoseira indica*, and *Padina australis* macroalgae. *Aquaculture International*, 31, 681–701. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00994-5>
- Alday-Sanz, V., Brock, J., Flegel, T.W., Mcintosh, R., Bondad-Reantaso, M.G., Salazar, M., & Subasinghe, R. (2018). Facts, truths and myths about SPF shrimp in Aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 76-84. <https://doi.org/10.1111/raq.12305>
- Bell, T., & Lightner, D.V. (1988). *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. Baton Rouge, La.:World Aquaculture Society.
- Böttger, S., & Melzig, M.F. (2013). The influence of saponins on cell membrane cholesterol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22), 7118-7124. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.008>
- Bureau, D.P., Harris, A.M., & Cho, C.Y. (1998). The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, 161(1-4),27-43. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00254-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00254-8)
- Chen, W., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, W., & Cai, Y. (2011). Effects of dietary soybean saponins on feed intake, growth performance, digestibility and intestinal structure in juvenile



- Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 318(1–2), 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.050>
- Couto, A., Kortner, T.M., Penn, M., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., & Oliva-Teles, A. (2014). Effects of dietary phytosterols and soy saponins on growth, feed utilization efficiency and intestinal integrity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 432, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.009>
- Couto, A., Kortner, T.M., Penn, M., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., & Oliva-Teles, A. (2015). Dietary saponins and phytosterols do not affect growth, intestinal morphology and immune response of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 970-982. <https://doi.org/10.1111/anu.12220>
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., & Flegel, T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>
- El-Naby, A.S.A., Eid, A.E., Gaafar, A.Y., Sharawy, Z., Khattaby, A.A., El-sharawy M.S., & El Asely, A.M. (2023). Overall evaluation of the replacement of fermented soybean to fish meal in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei* diet: growth, health status, and hepatopancreas histomorphology. *Aquaculture International*. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01234-0>
- Flegel, T.W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(2), 249-266. <https://doi.org/10.1111/jwas.12589>
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587-605. <https://doi.org/10.1079/BJN2002725>
- Francis, G., Makkar, H.P.S., & Becker, K. (2005). *Quillaja saponins*-a natural growth promoter for fish. *Animal feed science and technology*, 121(1-2), 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.015>
- Frías-Espéricueta, M. G., Castro-Longoria, R., Barrón-Gallardo, G.J., Osuna-López, J.I., Abad-Rosales, S.M., Páez-Osuna, F., & Voltolina, D. (2008<sup>a</sup>). Histological changes and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with different copper concentrations. *Aquaculture*, 278(1-4), 97-100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.008>
- Frías-Espéricueta, M.G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A.C., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F., Lozano-Olvera, R., & Voltolina, D. (2008<sup>b</sup>). Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic toxicology*, 89(3), 152-157. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.010>
- Gopan, A., Lalappan, S., Varghese, T., Maiti, M.K., & Peter, R.M. (2020). Anti-Nutritional Factors in Plant-Based Aquafeed Ingredients: Effects on Fish and Amelioration Strategies Bioscience. *Biotechnology Research Communications*, 13(12), 01-09.
- Han, J.E., Kim, J.E., Jo, H., Eun, J.S., Lee, C., Kim, J.H., Lee K.J., & Kim, J.W. (2019). Increased susceptibility of white spot syndrome virus-exposed *Penaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture*, 512, 734333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734333>
- Huang K.C., Lee J.W., Shiu Y.L., Ballantyne R., & Liu C.H. (2022). Micro-Aid Liquid 10 Promotes Growth Performance and Health Status of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(1), 49. <https://doi.org/10.3390/jmse10010049>

- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Vasanthakumar, D., Ambasankar, K., & Muralidhar, M. (2018). Effect of fungal fermentation on apparent digestibility coefficient for dry matter, crude protein and amino acids of various plant protein sources in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1318-1329. <https://doi.org/10.1111/anu.12669>
- Jannathulla, R., Sravanthi, O., Khan, H.I., Moomeen, H.S., Gomathi, A., & Dayal, J.S. (2021). Chemoattractants: Their essentiality and efficacy in shrimp aquaculture. *Indian Journal of Fisheries*, 68(1), 151-159. <https://doi.org/10.21077/ijf.2021.68.1.95994-20>
- Kesselring, J., Gruber, C., Standen, S., & Wein, S. (2021). Effect of a phytogetic feed additive on the growth performance and immunity of Pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed a low fishmeal diet. *Journal of the World Aquaculture*, 52(2), 303-315. <https://doi.org/10.1111/jwas.12739>
- Jumah, Y.U., Tumbokon, B.L., & Serrano, A.E. (2020). Dietary *Quillaja saponin* improves growth and resistance against acute hyposalinity shock in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* post larvae. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 72, 1-13. <https://doi.org/10.46989/IJA.72.2020.1227608>
- Knudsen, D., Jutfelt, F., Sundh, H., Sundell, K., Koppe, W., & Frøkiaer, H. (2008). Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soya bean induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 100(1), 120–129. <https://doi.org/10.1017/S0007114507886338>
- Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T.M., Penn, M., Gu, M., Berge, G.M., & Bakke, A.M. (2015). Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3887-3902. <https://doi.org/10.1021/jf506242t>
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Chen, X., Yu, N., Lai, Q., & Qin, J.G. (2007). Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*, 265(1-4), 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.018>
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Loya-Rodríguez, M., Palacios-González, D.A., Lozano-Olvera, R., Martínez-Rodríguez, I.E., & Puello-Cruz, A.C. (2023). Benzoic Acid Inclusion Effects on Health Status and Growth Performance of Juvenile Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*, 85(2), 188-199. <https://doi.org/10.1002/naaq.10286>
- Nagesh, T.S., Jayabalan, N., Mohan, C.V., Annappaswamy, T.S., & Anil, T.M. (1999). Survival and histological alterations in juvenile tiger shrimps exposed to saponin. *Aquaculture International*, 7, 159-167. <https://doi.org/10.1023/A:1009239319468>
- Pan, L.Q., Zhang, L.J., & Liu, H.Y. (2007). Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 273(4), 711–720. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.218>
- Servin Arce K., de Souza Valente C., do Vale Pereira G., Shapira B., & Davies S.J. (2021). Modulation of the gut microbiota of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) by dietary inclusion of a functional yeast cell wall-based additive. *Aquaculture Nutrition*, 27, 1114–1127. <https://doi.org/10.1111/anu.13252>
- Sharawy, Z.Z., Ashour, M., Labena, A., Alsaqufi, A.S., Mansour, A.T., & Abbas, E.M. (2022). Effects of dietary *Arthrospira platensis* nanoparticles on growth performance, feed utilization, and

- growth-related gene expression of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 551, 737905. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737905>
- Schulz, I. (1990). Permeabilizing cells: Some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods in Enzymology*, Academic Press. 192, 280-300. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)92077-Q](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)92077-Q)
- Stadtlander, T., Khalil, W.K.B., Focken, U., & Becker, K. (2013). Effects of low and medium levels of red alga nori (*Porphyra yezoensis* Ueda) in the diets on growth, feed utilization and metabolism in intensively fed Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Nutrition*, 19, 64–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00940.x>
- Stewart, M.P., Sharei, A., Ding, X., Sahay G., Langer R., & Jensen K.F. (2016). *In vitro* and *ex vivo* strategies for intracellular delivery. *Nature* 538, 183–192. <https://doi.org/10.1038/nature19764>
- Tacon, A. G. (2017). Biosecure shrimp feeds and feeding practices: guidelines for future development. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(3), 381-392. <https://doi.org/10.1111/jwas.12406>
- Wang, Y., Jia, X., Guo, Z., Li, L., Liu, T., Zhang, P., & Liu, H. (2022). Effect of dietary soybean saponin Bb on the growth performance, intestinal nutrient absorption, morphology, microbiota, and immune response in juvenile Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Frontiers in Immunology*, 13,1093567. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1093567>
- WOAH – World Organization for Animal Health. (2021). Acute hepatopancreatic necrosis disease in: Manual of Diagnostic Tests for Aquatics Animals 2021. World Organization for Animal Health, Paris, France Available at: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/2.2.01\\_AHPND.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.2.01_AHPND.pdf)
- Yasir, I., Tresnati, J., Aprianto, R., Yanti, A., Bestari, A.D., & Tuwo, A. (2021). Effect of different doses of saponins and salinity on giant tiger prawn *Penaeus monodon* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 763, No. 1, p. 012021). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/763/1/012021>