



ALLIANCE™

[.https://www.globalseafood.org](https://www.globalseafood.org)Health &  
Welfare

# Los fitoquímicos de la bromelina pueden mejorar el crecimiento y brindar protección a largo plazo a los camarones contra la AHPND

25 November 2024

By Wing-Keong Ng, PhD, FASc and Mei-Ling Mong, MSc

**Este estudio es el primer informe sobre la eficacia de la bromelina dietética para mitigar la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) y probablemente otras enfermedades relacionadas con *Vibrio* en el camarón**



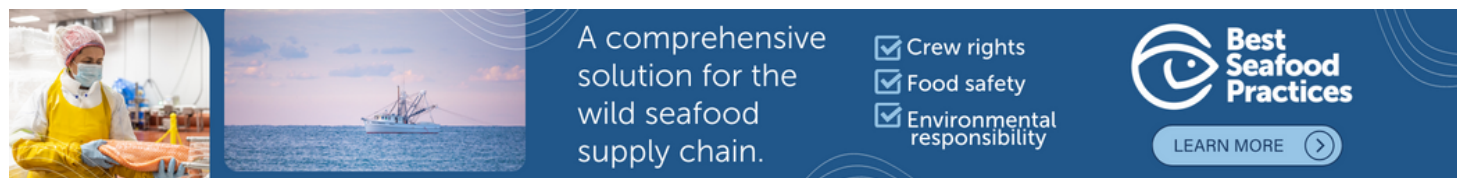
Fitoquímicos de bromelina extraídos de piñas como una solución fitotecnológica para mitigar la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en el cultivo de camarón.

El uso generalizado de poblaciones libres de patógenos específicos (SPF) de camarón blanco del Pacífico domesticado (*Penaeus vannamei*) ha reducido en gran medida los portadores de muchas enfermedades virales. Sin embargo, las enfermedades bacterianas siguen siendo un problema y limitan la productividad de muchas granjas camaroneras. En los últimos años, la aparición de una enfermedad bacteriana llamada necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) ha causado importantes pérdidas económicas a los criadores de camarón en la etapa de engorde. Se detectó por primera vez en China (2009) y se propagó secuencialmente en los tres años siguientes a Vietnam, Malasia y Tailandia, luego a México (2013) y Filipinas (2014) antes de ser reportada en América del Sur y Corea del Sur en 2016, Bangladesh y EE. UU. en 2017 y Costa Rica en 2020. La AHPND, una enfermedad infecciosa que se está propagando por países y continentes, es una pandemia bacteriana en el mundo de los camarones cultivados.

La aparición de la AHPND ha llevado a un mayor uso de antibióticos en Asia y, como consecuencia, se ha informado que las bacterias que causan la AHPND muestran resistencia a los antibióticos a una amplia gama de antibióticos, incluida la resistencia a la tetraciclina mediada por plásmidos en *V. parahaemolyticus*. Debido a las preocupaciones ambientales y de salud humana asociadas con el uso excesivo de antibióticos, los aditivos alimentarios de origen vegetal, conocidos colectivamente como fitogénicos o fitobióticos, se consideran cada vez más como alternativas potenciales a los antibióticos.

La eficacia de varios extractos de plantas para mitigar la AHPND en el camarón se debe a la acción de sus diversos compuestos bioactivos. Recientemente investigamos el potencial de los extractos de piña (*Ananas comosus*); el compuesto bioactivo predominante presente en el extracto de piña es la bromelina. Los estudios han informado que la bromelina exhibe varias actividades enzimáticas, antiinflamatorias, antiedematosas, antitrombóticas y antiinflamatorias, entre otros beneficios que promueven la salud humana.

De particular interés en la nutrición animal son las propiedades antibacterianas de la bromelina, que inhibe el crecimiento de patógenos intestinales como *Vibrio cholera* y *Escherichia coli*; la bromelina inhibe la producción de toxinas bacterianas, previniendo así la diarrea causada por *E. coli* y *V. cholera* en animales. Aunque no se conoce el modo de acción exacto, se ha especulado que este efecto de la bromelina se logra al interactuar con las vías de señalización secretoras intestinales o debido a efectos antiadherentes, posiblemente al alterar proteolíticamente los sitios receptores que evitan que las bacterias patógenas se adhieran a los receptores ubicados en la mucosa intestinal.



(<https://bspcertification.org/>).

Teniendo en cuenta el hecho de que la bromelina es eficaz contra las toxinas proteínicas de *E. coli* y *V. cholera* que atacan el tracto digestivo de los animales, y que la toxina del cólera es un miembro de la familia de toxinas AB, decidimos investigar si la bromelina también podría ser eficaz contra la AHPND, que es causada por la toxina proteínica PirAB que ataca el sistema digestivo (hepatopáncreas) del camarón. Este es el primer informe sobre la eficacia de la bromelina en el control de enfermedades causadas por *Vibrio*, incluida la AHPND, en camarones *P. vannamei*.

## Ensayo de alimentación y desafío de enfermedades

Se elaboraron cuatro dietas prácticas utilizando un alimento comercial para postlarvas de camarón (Post Larva II crumbles #902, Gold Coin Specialities Ltd., Malasia) como formulación base. El uso de un alimento comercial para camarones como base nos permitió evaluar la eficacia potencial real de la bromelina, en caso de que se agregue a los alimentos comerciales. El alimento comercial para camarones se molió hasta convertirlo en polvo fino antes de volver a granularlo. Las dietas de control positivo (posCON) y negativo (negCON) consistieron en el alimento comercial para camarones regranulado con la adición de un aglutinante de gránulos (Pegabind®, Bentoli AgriNutrition Co., Ltd., Tailandia). Solo el camarón alimentado con la dieta posCON fue posteriormente desafiado con *V. parahaemolyticus* (VP<sub>AHPND</sub>). También se peletizaron otras dos dietas con la inclusión de 1 por ciento (1% BM) o 2 por ciento (2% BM) de polvo a base de bromelina extraído de piñas (Anatara Lifesciences Ltd., Brisbane, Australia) a expensas de la alfa-celulosa. Las dietas de control no tenían BM añadido.

Se alimentaron manualmente grupos cuadruplicados de camarones con su dieta respectiva tres veces al día hasta la aparente saciedad durante 28 días. Una vez finalizado el ensayo de crecimiento, se retiraron de cada acuario los camarones de cada tratamiento dietético, se agruparon y luego se volvieron a colocar en cada acuario para el ensayo de desafío de la enfermedad.

El primer ensayo de desafío AHPND utilizó 23 camarones por réplica (cuatro réplicas para cada dieta) durante diez días. Después del primer desafío de la enfermedad, los camarones sobrevivientes se agruparon por tratamiento dietético y se reorganizaron a 15 camarones por réplica con tres réplicas. Todos los camarones se cambiaron a la dieta de control (0% BM) durante 14 días antes de volver a desafiarlos con AHPND. Este se consideró el período de lavado y se utilizó como una forma indirecta de observar si la suplementación dietética previa con bromelina tuvo un efecto a largo plazo en la salud del camarón. A partir de entonces, se realizó el segundo desafío AHPND durante otros 10 días. El cronograma de la prueba de alimentación, el período de lavado y las pruebas de desafío AHPND se ilustran secuencialmente en la Fig. 1.

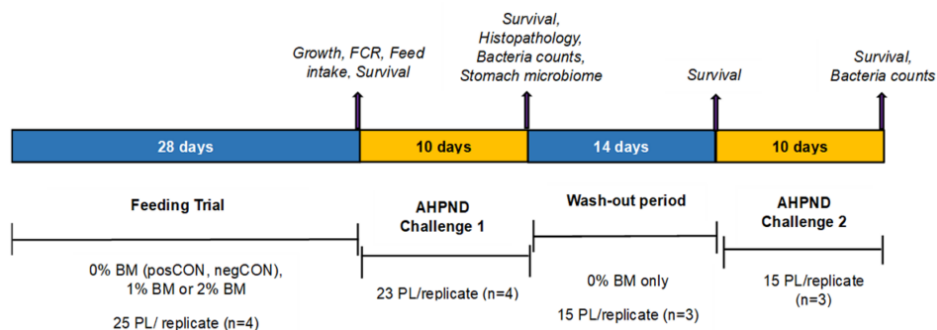


Fig. 1: Diagrama esquemático de la prueba de alimentación, el período de lavado, las pruebas de desafío AHPND y el cronograma de muestreo. BM = bromelina; posCON = control positivo; negCON = control negativo; PL = postlarvas. Diagrama no dibujado a escala.

El desafío de la enfermedad se llevó a cabo utilizando el método de inmersión. Los camarones de cada acuario en los grupos posCON, 1%BM o 2%BM se colocaron durante 15 minutos (con aireación) en un matraz Erlenmeyer de 1 litro que contenía 150 mL de cultivo  $VP_{AHPND}$  (108 UFC/mL). Luego, la suspensión bacteriana que incluía los camarones se vertió directamente en su respectivo acuario que contenía agua de mar artificial limpia. Se incluyó el tratamiento de control negativo (negCON) para que sirviera como control ambiental y los camarones no fueron desafiados con  $VP_{AHPND}$ , sino sumergidos en caldo de soya tripsínica estéril más NaCl al 1,5 por ciento. Todos los camarones fueron observados cada tres horas para monitorear los signos clínicos generales y la mortalidad.

Se pueden encontrar detalles completos sobre las metodologías utilizadas y los resultados en la publicación original [Ng, W-K y M-L Mong. 2024. Dietary bromelain from pineapple extracts improved growth performance and moduled digestive microbiota which provided longer-term protection to *Penaeus vannamei* against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Research* 2024, **Article ID 6492170** (<https://doi.org/10.1155/2024/6492170>), 14 pp.

## Eficacia de los fitoquímicos de la bromelina

El rendimiento de crecimiento de los camarones alimentados con dietas con bromelina añadida mejoró con respecto a los grupos de control. En particular, los camarones alimentados con 2% BM tuvieron en su mayoría un peso final, un porcentaje de ganancia de peso, una ganancia de peso diaria, una tasa de crecimiento específica y un consumo de alimento significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) que los camarones alimentados con las dietas de control. Sin embargo, el rendimiento de crecimiento no fue significativamente mayor ( $P > 0,05$ ) en comparación con los camarones alimentados con 1% BM. La tasa de conversión alimenticia (FCR) fue excelente con valores cercanos a 1,0 en todas las dietas, y las tasas de supervivencia de los camarones fueron altas (95-100 por ciento).

El negCON (no desafiado con AHPND) mostró una supervivencia de los camarones del 95-98 por ciento en los dos ensayos de desafío de la enfermedad, lo que confirmó que los procedimientos y sistemas experimentales utilizados en el presente estudio no estresaron notablemente a los camarones ni los hicieron susceptibles a una mortalidad no deseada. En el primer desafío de AHPND, los camarones alimentados con la dieta de 1% BM mostraron la supervivencia más alta ( $84,8 \pm 3,8$  por ciento), seguidos por los de 2% BM ( $78,3 \pm 2,5$  por ciento), que fueron significativamente más altos en

comparación con el grupo posCON ( $69,5 \pm 1,8$  por ciento) (Figura 2). Después del período de lavado y de volver a desafiar a los camarones con AHPND (segundo desafío de AHPND), los camarones alimentados previamente con 1% o 2% de BM mostraron una supervivencia significativamente mayor con  $71,1 \pm 9,7$  por ciento y  $73,3 \pm 3,8$  por ciento, respectivamente, en comparación con el grupo posCON que tuvo la supervivencia más baja con  $51,1 \pm 2,2$  por ciento (Fig. 2).

Fig. 2: Supervivencia acumulada de *P. vannamei* durante 10 días en el primer y segundo desafío de la enfermedad AHPND. En el primer desafío AHPND, los camarones fueron alimentados con la dieta de control con 0 (control positivo o negativo), 1 o 2 por ciento de dietas suplementadas con bromelina durante 28 días antes de la prueba de desafío. En el segundo desafío AHPND, los camarones restantes fueron alimentados con la dieta de control durante otros 14 días (período de lavado) antes de la prueba de desafío. Los camarones en el grupo de control negativo no fueron desafiados. Diferentes letras dentro del mismo grupo de desafío AHPND indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Los resultados mostraron que la adición de 2% BM redujo significativamente la diferencia porcentual promedio de supervivencia (3,5 por ciento) entre el primer y el segundo desafío AHPND en comparación con el grupo posCON (18,5 por ciento), mientras que los camarones alimentados con 1% BM fue del 14,4 por ciento. Teniendo en cuenta que la diferencia en la supervivencia de los camarones entre el primer y el segundo desafío de AHPND para el grupo negCON fue de alrededor del 3,0 por ciento, el pequeño aumento en la mortalidad de los camarones observado en el grupo 2% BM durante el segundo desafío de la enfermedad podría no deberse a AHPND per se. La mortalidad de los camarones fue causada por hepatopáncreas dañado (Figura 3).

Fig. 3: Secciones transversales representativas del hepatopáncreas de *P. vannamei* después del desafío con AHPND. (A) El hepatopáncreas del grupo de control positivo mostró un desprendimiento masivo de células epiteliales del túbulo hepatopancreático y ninguna célula B y R. (B) Se observó que el hepatopáncreas del camarón alimentado con la dieta de 2 por ciento de bromelina tenía menos daño y mostró una estructura casi normal. Barras de escala = 50  $\mu$ m.

## Microbiota del estómago

Se sabe que la microbiota intestinal está involucrada en la regulación de la salud y la enfermedad del camarón. La comunidad bacteriana del estómago de los camarones infectados con VP<sub>AHPND</sub> alimentados con dietas suplementadas con BM mostró la mayor diversidad alfa según el índice de Simpson. Un índice de Simpson alto indica una gran cantidad de ASV (variante de secuencia de amplicón) y proporciones más similares de ASV. La diversidad bacteriana en el grupo posCON fue la más baja de todos los grupos y fue deprimida en comparación con los camarones no desafiados en el grupo negCON.

A nivel de filo, la estructura de la comunidad bacteriana consistió principalmente en Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes en abundancia relativa en todos los grupos de tratamiento (Figura 4). El grupo posCON tuvo una abundancia relativa aumentada de Tenericutes y Bacteroidetes con una abundancia relativa disminuida de Actinobacteria en comparación con el grupo negCON sin desafío. En comparación con el grupo posCON, la comunidad bacteriana en el estómago de los camarones alimentados con una dieta de 1% BM mostró una abundancia relativa aumentada de Verrucomicrobia y Planctomycetes con una disminución correspondiente en la abundancia relativa de Tenericutes. Para el grupo 2% BM, se observó un enriquecimiento significativo de Proteobacteria en el estómago con una disminución en la abundancia de Tenericutes.



Fig. 4: Abundancia relativa media del filo bacteriano en diferentes grupos de tratamiento [control negativo (negCON), control positivo (posCON), 1 por ciento de bromelina (1% BM) y 2 por ciento de bromelina (2% BM)]. Cada filo bacteriano se representa con un color diferente en el gráfico de barras. La proporción combinada totaliza 1 para cada grupo.

La abundancia aumentada del género bacteriano *Luteolibacter* se identificó como una de las características estadísticamente significativas y biológicamente informativas que diferencian el grupo con 1% BM y 2% BM de los grupos de control (Figura 5). La abundancia aliviada de *Luteolibacter* en el estómago de los camarones alimentados con dietas suplementadas con BM podría servir como un biomarcador potencial. La abundancia relativa del género bacteriano *Vibrio* entre los cuatro grupos de tratamiento se representa en la Figura 6. Las bacterias *Vibrio* fueron más abundantes en el grupo posCON. La adición de bromelina en la dieta, independientemente del nivel dietético, tendió a reducir los recuentos de *Vibrio* en el estómago del camarón. La abundancia más baja de bacterias *Vibrio* se observó en el estómago del grupo negCON.

Fig. 5: Abundancia del género bacteriano *Luteolibacter* identificado como una de las características estadística y biológicamente informativas que diferencian el grupo de tratamiento con bromelina de los grupos de tratamiento sin bromelina [control negativo (negCON), control positivo (posCON)] en el estómago del camarón.

Fig. 6: Abundancia del género bacteriano *Vibrio* entre los grupos con bromelina añadida (1% y 2% BM) y los grupos de control (negCON y posCON) en los estómagos del camarón.

## El potencial de los fitoquímicos de la bromelina

La bromelina es un complejo enzimático que consiste en una mezcla de diferentes endopeptidasas de tiol con otros componentes menores como fosfatasas, celulasas, glucosidasas, peroxidasas, glicoproteínas, carbohidratos, etc. La bromelina es la enzima proteolítica sulfhidrilo predominante presente en la piña. La bromelina comercial se extrae principalmente del tallo y del fruto de la piña, pero también se puede aislar en pequeñas cantidades de desechos de la piña, como hojas, cáscaras y coronas. Se sabe que la bromelina del tallo (EC 3.4.22.32) presenta propiedades bioquímicas, actividad biológica y composición diferentes a las de la bromelina del fruto (EC 3.4.22.33). Por lo tanto, las comparaciones de los estudios de investigación realizados con bromelina deben considerar qué parte



de la piña se utilizó para la extracción, la actividad enzimática resultante, la composición y la pureza del producto de bromelina. Además, los estudios realizados utilizando extractos crudos de varias partes de la piña en lugar de bromelina purificada también contendrán otros compuestos bioactivos menores, como saponinas, flavonoides, alcaloides y taninos, que pueden contribuir a los hallazgos de la investigación.

Actualmente, se dispone de muy poca información sobre el impacto de la BM dietética en el rendimiento de crecimiento de los animales acuáticos. El presente ensayo de crecimiento mostró que la suplementación con bromelina en los alimentos de camarones blancos generalmente mejoró el rendimiento de crecimiento, especialmente en el nivel dietético de 2% BM. La adición de bromelina hasta el 2 por ciento de la dieta no causó ningún problema de palatabilidad o toxicidad del alimento, como lo demuestra la alta supervivencia de los camarones con un excelente consumo de alimento y FCR observados. El mejor rendimiento de crecimiento de los camarones alimentados con dietas con BM agregado podría deberse en parte al mejor estado de salud de los camarones. Otros factores que contribuyen a la mejora del crecimiento observada en el presente estudio pueden incluir la mejora de la digestibilidad de los nutrientes y/o cambios beneficiosos en la morfología intestinal que permitirían una mejor absorción de nutrientes.

El presente estudio es el primer informe sobre la eficacia de la bromelina dietética para mitigar AHPND y probablemente otras enfermedades relacionadas con *Vibrio* en camarones. Los recuentos presuntivos de *Vibrio* y los recuentos totales de bacterias cultivables en el hepatopáncreas de camarones alimentados previamente con dietas suplementadas con BM fueron significativamente más bajos que en el control positivo después de ambas pruebas de desafío AHPND. La prevalencia de bacterias *Vibrio* en el estómago de camarones alimentados con dietas con BM añadida también fue notablemente menor en comparación con posCON (Fig. 6).

Actualmente no se conoce el modo de acción antibacteriano exacto de la bromelina. Los resultados del presente estudio contribuyeron a una mejor comprensión del modo de acción de la bromelina. Al introducir un período de lavado de 14 días en el que todos los camarones se cambiaron a la dieta de control (sin bromelina) antes del segundo desafío AHPND, pudimos demostrar que la resistencia a las enfermedades en los camarones no dependía totalmente de la presencia real directa de bromelina en el cuerpo del camarón. Se demostró que la suplementación dietética con bromelina tiene la capacidad de impartir un efecto beneficioso duradero en la salud de los camarones. En el grupo 2% BM, la supervivencia de los camarones en el primer y segundo desafío AHPND fue casi la misma después de tener en cuenta la mortalidad encontrada en el grupo de control negativo sin desafío (Figura 2). En el grupo posCON, el segundo desafío AHPND resultó en una caída adicional del 18,5 por ciento en la supervivencia de los camarones, lo que resultó en una supervivencia acumulada de solo el 51,1 por ciento.

## ¿Puede el extracto de uva mejorar el crecimiento de postlarvas de camarón blanco del Pacífico?



Para lograr el mejor crecimiento y el mayor nivel de actividad antioxidante in vivo, el nivel óptimo del extracto de uva Nor-grape 80 es de 250 a 500 ppm.



Global Seafood Alliance

La mayor mortalidad observada en el segundo desafío AHPND en comparación con el primer desafío de la enfermedad en el grupo posCON no es inesperada ya que los camarones no tienen inmunidad adaptativa que crea memoria inmunológica para una respuesta mejorada a la exposición secundaria con el mismo patógeno. Los camarones en el grupo posCON probablemente se debilitaron por el primer desafío de la enfermedad que resultó en una mayor mortalidad cuando se los desafió una segunda vez.

Con base en los resultados del presente estudio, planteamos la hipótesis de que el modo de acción antibacteriano de la bromelina podría no depender completamente de las acciones inhibitoras directas de la bromelina sobre los patógenos invasores. En estudios humanos, se informó que la vida media plasmática de la bromelina fue de 6 a 9 horas. Debido a su corta vida media, no se espera que la bromelina se bioacumule en los tejidos. Dado que la infección por AHPND se produce a través de la colonización de la bacteria patógena *Vibrio* en el estómago del camarón, los cambios positivos en la microbiota intestinal modulados por la bromelina dietética podrían haber proporcionado un efecto más duradero en el mantenimiento de la salud y una mejor respuesta inmunitaria del camarón cuando se lo expuso a AHPND.

## Perspectivas

El presente estudio proporcionó la primera evidencia del papel y la importancia de una microbiota estomacal diversificada para mantener la salud de los camarones y su capacidad para resistir la infección por AHPND incluso sin la presencia directa de fitoquímicos dietéticos como la bromelina. Las propiedades protectoras de la bromelina dietética se mantuvieron en los camarones incluso después de cambiar a la dieta de control sin bromelina añadida durante dos semanas (período de lavado) antes del segundo desafío con AHPND.

La mayor diversidad alfa se observó en los camarones infectados con VP<sub>AHPND</sub> alimentados con las dietas con bromelina añadida. Los cambios relativos en la comunidad bacteriana del estómago fueron evidentes entre los grupos de tratamiento. Las bacterias de los géneros *Luteolibacter*, *Paracoccus*, *Planctomyces* y *Demequina* contribuyeron significativamente a las diferencias de diversidad entre los grupos de tratamiento y se enriquecieron especialmente en los grupos alimentados con BM. Los roles reales desempeñados por estos cambios en la comunidad bacteriana aún deben investigarse.

En conclusión, el presente estudio demostró que la manipulación de la microbiota intestinal mediante el uso de fitoquímicos como la bromelina puede ser una alternativa a los antibióticos de amplio espectro nocivos en el manejo de la enfermedad de AHPND y posiblemente otras enfermedades causadas por *Vibrio* en camarones de cultivo. Con base en estos resultados de laboratorio, recomendamos un nivel de bromelina en la dieta del 2 por ciento para mejorar el crecimiento y la resistencia a la enfermedad de AHPND.

## Authors

---



**WING-KEONG NG, PHD, FASC**

Corresponding author

Asian Aquafeeds Services, Penang, Malaysia; retired professor, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

[wkng.usm@gmail.com](mailto:wkng.usm@gmail.com) (<mailto:wkng.usm@gmail.com>).



**MEI-LING MONG, MSC**

School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

Copyright © 2024 Global Seafood Alliance

All rights reserved.