

# EFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) DE *Escherichia coli* Y DEL AMONIO DISUELTO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN TEJIDOS DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus schmitti*.

Tsai García-Galano <sup>1</sup> \*, Tania Rodríguez-Ramos <sup>1</sup> y Olimpia Carrillo <sup>2</sup>

(1) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, Ciudad Habana, Cuba.

(2) Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle J e I, Plaza de la Revolución, Ciudad Habana, Cuba.

(\*) Autor correspondiente: E-mail: [tsai@uh.cu](mailto:tsai@uh.cu)

## RESUMEN

Se evaluó el efecto del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (2mg LPS/Kg de peso húmedo) y del amonio disuelto (5 mg/L), en las concentraciones de ácido ascórbico (AA) en el músculo y el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. A las 24 horas de la inyección de LPS, las concentraciones de AA en el hepatopáncreas y el músculo fueron significativamente más bajas que en el control. Las altas concentraciones de amonio provocaron a las 169 horas un decrecimiento en los valores de AA, tanto en el músculo como en el hepatopáncreas. Los resultados obtenidos evidencian que el estrés causado por LPS y por el amonio, incrementó la demanda de AA en los tejidos analizados. Esto podría resultar en un mayor requerimiento de AA para responder a estas necesidades.

Palabras claves: lipopolisacárido; amonio; ácido ascórbico; vitamina C; cultivo de camarones; *Litopenaeus schmitti*

## ABSTRACT

The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) (2 mg LPS/Kg wet weight) and dissolved ammonia concentration (5 mg/L) in muscle and hepatopancreas ascorbic acid (AA) concentrations, was evaluated in *Litopenaeus schmitti*. After 24 hours LPS injection, hepatopancreas and muscle AA concentration were significantly lower than control. A reduction in hepatopancreas and muscle AA content with high dissolved ammonia concentration was recorded at 169 hours. The results showed that LPS and ammonia stress increased the AA request in the analyzed tissues. This suggests a higher AA requirement to respond to these necessities.

Key words: lipopolysaccharide; ammonia; ascorbic acid; vitamin C; shrimp culture; *Litopenaeus schmitti*.

Los camarones sometidos a cultivo se encuentran expuestos a fluctuaciones de diversos factores tales como la temperatura, pH, oxígeno y amonio, entre otros, así como a agentes patógenos que pueden llevar a situaciones de estrés y causar variadas respuestas en el organismo. El amonio resultante de la excreción de los camarones cultivados así como de la mineralización de detritus orgánico como las heces y de los residuos del alimento, puede llegar a ser muy tóxico y se ha reportado que altas concentraciones en el medio afectan el crecimiento, la muda y la respuesta inmune (Chen y Kou, 1992, Le Moullac y Haffner, 2000). La entrada de una sustancia extraña al organismo, tal como una bacteria o un virus, puede ocasionar una disminución en el crecimiento, bajas supervivencias y en general un deterioro de la salud de los animales (Wedemeyer y Wood, 1974, Iwama y Nakanishu, 1996).

Numerosos estudios han señalado el papel del ácido ascórbico (AA) o vitamina C en la respuesta de los camarones ante diferentes patógenos así como ante el estrés ambiental. (Masumoto *et al.*, 1991, Merchie *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2006). El ácido ascórbico es requerido por todas las especies animales, en las que juega un importante papel en la nutrición. Actúa como un poderoso agente reductor en las células y tejidos del cuerpo, como cofactor en las reacciones de hidroxilación de prolina a hidroxiprolina y es un regulador en la síntesis de esteroides (Hunter *et al.*, 1979, Conklin, 1997, Groff y Cropper, 1999). En la mayoría de los animales acuáticos, incluyendo los crustáceos, el AA debe ser suministrado a través de la dieta al no poseer la enzima L-gulonolactona oxidasa, la cual se requiere para la biosíntesis del ascorbato a partir de la glucosa como precursor (Sato y Udenfriend, 1978).

En los camarones peneidos el ácido ascórbico es esencial, aunque aún existen discrepancias sobre los requerimientos para alcanzar crecimientos óptimos y mantener una salud adecuada. Independientemente de la forma química en que se suministre, las fluctuaciones en el estatus del AA, relacionadas con su metabolismo, consumo, interacciones dietéticas, así como factores físicos y ambientales, podrían resultar en variaciones en la resistencia a infecciones y en la respuesta al estrés (Waabo *et al.* 2001). En condiciones estresantes, se podrían requerir mayores concentraciones de AA que las necesarias para un adecuado crecimiento (Chen y Chang, 1994).

El ácido ascórbico es almacenado en diversos tejidos como el cerebro, bazo, riñón, hígado y músculo, para responder a demandas específicas del organismo ante diversas situaciones como el estrés ambiental o el ataque de patógenos (Thomas, 1990; Sanders, 1991, Gabaudan y Verlhac, 2001). Aunque todos los tejidos no responden con la misma variación ante una condición desfavorable, la concentración de AA ha sido utilizada en peces como un indicador subclínico de su deficiencia, tal como señalan Lim y Lovell (1978).

En el presente trabajo se evalúan los efectos de elevadas concentraciones de amonio disuelto y un reto a un lipopolisacárido (LPS) de la bacteria *Escherichia coli*, en las concentraciones de ácido ascórbico en el músculo y el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones experimentales.

Camarones procedentes de la Estación de Camaronicultura de Yaguanabo, Cienfuegos, con pesos entre 20-40 g, fueron situados en tanques de 100 L de capacidad con un sistema de recirculación de agua a través de filtros biológicos y mecánicos. Los ejemplares fueron mantenidos con aireación constante y durante el experimento la salinidad se mantuvo en  $36.1 \pm 0.09$  ups, la concentración de oxígeno en  $5.57 \pm 0.01$  mg.L<sup>-1</sup>, el pH en  $7.9 \pm 0.02$  y la concentración de amonio en  $0,07 \pm 0.009$  mg.L<sup>-1</sup>, excepto cuando se indique en el texto. El fotoperíodo fue de 12 horas luz-12 horas oscuridad. Los dos experimentos fueron realizados con camarones en periodo de intermuda después de 2 semanas de aclimatarse a las condiciones de laboratorio.

Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial (Zeigler Brothers Inc.) la cual tenía L-ascorbil-2-polifosfato (APP) como fuente de ácido ascórbico.

### Experimento con LPS

Los camarones se inyectaron en las coxas del tercer par de pereópodos con 2 mg LPS.Kg<sup>-1</sup> de peso húmedo (menor que la LD<sub>50</sub>) (datos no publicados). El LPS empleado, es un componente de la membrana externa de la pared celular de la bacteria *Escherichia coli* serotipo 05:B55 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, E.U.). Se inyectó un grupo control con una solución salina (450 mM NaCl). A las 24 horas de la inyección, 40 animales fueron sacrificados, se tomaron muestras de músculo y hepatopáncreas y se conservaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

### Experimento con altas concentraciones de amonio disuelto.

Se situaron 30 camarones en 3 tanques con agua de mar conteniendo 5 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Para mantener los valores deseados de amonio en el transcurso del experimento, los tanques se aislaron del sistema general de recirculación de agua y ésta se reemplazó diariamente en un 30% eliminándose las heces y los restos de alimento. Al agua se le adicionó cloruro de amonio para alcanzar y mantener la concentración de amonio en un rango entre 4-6 mg.L<sup>-1</sup>. En el grupo control el amonio se mantuvo en  $0.07 \pm 0.009$  mg.L<sup>-1</sup>. El amonio fue determinado con un analizador digital ORION acoplado a un electrodo. A las 24, 72 y 169 horas de iniciado el experimento se tomaron muestras de músculo y hepatopáncreas y se conservaron en nitrógeno líquido para posterior determinación del ácido ascórbico.

### Análisis bioquímico

Para la determinación del ácido ascórbico se empleó el método espectrofotométrico que utiliza 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), modificado por Dabrowski y Hinterleitner (1989). Se hicieron análisis duplicados de cada ejemplar y para cada tejido.

### Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas en las concentraciones de ácido ascórbico en el músculo y el hepatopáncreas en el experimento del amonio fueron determinadas mediante un análisis de

varianza de una vía seguido de una prueba Tukey para comparación de medias. Una prueba t-Student fue empleada en el experimento con LPS. Previamente se realizaron análisis para verificar la normalidad y homogeneidad de varianzas (Kolmogorov-Smirnov y Bartlett). Los resultados fueron considerados significativos a  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimento con LPS

Los camarones sometidos a un reto con LPS presentaron a las 24 horas de la inyección, concentraciones de AA en el hepatopáncreas que fueron significativamente más bajas que el grupo control. En el músculo no se observaron marcadas variaciones en los valores obtenidos (Tabla 1). Altas concentraciones de AA se encontraron en el hepatopáncreas, mientras que en el músculo fueron mucho más bajas, lo cual está en correspondencia con lo reportado por otros autores (Bai, 2001; Gabaudan y Verlhac, 2001). Diversos trabajos señalan que la concentración de AA en estos dos tejidos puede ser usada como un índice del estatus de AA (Murai *et al.*, 1978, Shelback *et al.*, 1990, Bai, 2001).

LPS es un componente estructural muy importante en la pared celular de las bacterias y ésta es usualmente la primera estructura del patógeno que se pone en contacto con el sistema inmune del camarón, ejerciendo un efecto muy potente en éste (Newman y Bullis, 2001). La entrada de LPS al organismo, desencadena una serie de eventos que conducen a la liberación de los gránulos contenidos en los hemocitos para dar muerte al patógeno antes de ser fagocitado y encapsulado. En la trucha arco iris, la entrada del patógeno induce la activación del estallido oxidativo, produciéndose altas cantidades de especies reactivas al oxígeno (ROS) en los leucocitos que atacarán la pared celular de la célula bacteriana. Estas ROS son liberadas intra y extracelularmente y son tóxicas para la misma célula. El ácido ascórbico presente, tanto intra como extra celular, protege a la célula de una auto oxidación (Gabaudan y Verlhac, 2001). En *Penaeus monodon*, Song y Hsieh (1994) demostraron *in vitro* que se producía un estallido respiratorio seguido a la estimulación con PMA, zymosan y beta-glucanos y las cantidades generadas de intermediarios reactivos al oxígeno (ROI) por los hemocitos del camarón fueron similares a las observadas en los macrófagos de los peces. En el presente estudio, el drástico descenso de la concentración de AA en el hepatopáncreas de los camarones sometidos al

reto, podría estar relacionado con su liberación a la hemolinfa y actuando como un antioxidante, protegería a las células del daño oxidativo.

### Experimento con altas concentraciones de amonio disuelto

Después de 72 horas de ser expuestos los camarones a concentraciones de amonio de 5 mg/L, decrecieron significativamente los valores de AA en el hepatopáncreas. En el músculo, las concentraciones fueron declinando hasta alcanzar los menores valores a las 169 horas (Tabla 2).

El amonio puede llegar a ser muy tóxico en los crustáceos, afectando el crecimiento y la muda (Chen y Kou, 1992), el consumo de oxígeno (Racotta y Hernández-Herrera, 2000) y la respuesta inmune (Le Moullac y Haffner, 2000; Rodríguez-Ramos, com. per.), por lo que diversos mecanismos están implicados en el organismo para responder al estrés a que está siendo sometido.

Ha sido señalado que un incremento en la concentración de amonio en el agua reduce la excreción amoniacal y se elevan los niveles en la sangre y en los tejidos, lo que produce marcados efectos en la fisiología del camarón (Dall *et al.*, 1990), reduciendo el consumo del alimento para así disminuir la producción de amonio (Colt y Armstrong, 1981). Aunque en el presente trabajo no se cuantificó el consumo del alimento, pudo haber ocurrido una disminución en la tasa de ingestión, afectándose las cantidades de AA consumidas. Las deficiencias dietéticas de AA han sido relacionadas con un decrecimiento de la actividad de la fosfatasa alcalina (Lim *et al.*, 2001) la cual es capaz de hidrolizar el grupo fosfato de las formas monofosfatadas del AA y liberar la forma nativa del AA para su posterior absorción (Kittakoop *et al.*, 1996, Maffia *et al.*, 2001)). Estudios *in vitro* han demostrado que el AA actúa como un estimulador de la síntesis de la fosfatasa alcalina (Pizauro *et al.*, 2002). Un menor consumo del AA pudo causar una disminución de la síntesis de la fosfatasa alcalina y/o una menor actividad, afectando la liberación del AA nativo y su incorporación a los tejidos.

El amonio y los nitritos son captados del medio y acumulados en la hemolinfa a través de un mecanismo asociado a las células encargadas del transporte activo de las sales, que se encuentran en las branquias, pudiendo una parte del amonio presente en la hemolinfa ser convertido a nitrito dentro del camarón y posteriormente ser liberado

Tabla 1. Concentraciones de ácido ascórbico ( $\mu\text{g AA.g de tejido}^{-1}$ ) en camarones sometidos a reto con LPS. Valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tejido	LPS (n=18)	Control (n=18)
	Media $\pm$ ES	Media $\pm$ ES
Músculo	12.19 <sup>a</sup> $\pm$ 1.19	18.04 <sup>a</sup> $\pm$ 1.33
Hepatopáncreas	156.00 <sup>a</sup> $\pm$ 11.10	332.76 <sup>b</sup> $\pm$ 35.91

Tabla 2. Concentraciones de ácido ascórbico ( $\mu\text{g AA.g de tejido}^{-1}$ ) en camarones sometidos a altas concentraciones de amonio. Valores con diferentes supraíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tejido	Control	24 h	72 h	169 h
	(n=14)	(n=10)	(n=9)	(n=11)
	Media $\pm$ ES	Media $\pm$ ES	Media $\pm$ ES	Media $\pm$ ES
Músculo	6.80 <sup>c</sup> $\pm$ 0.94	2.84 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.79	5.02 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.28	0.50 <sup>a</sup> $\pm$ 0.37
Hepatopáncreas	92.94 <sup>b</sup> $\pm$ 11.49	123.05 <sup>b</sup> $\pm$ 10.02	75.48 <sup>a</sup> $\pm$ 6.92	43.33 <sup>a</sup> $\pm$ 4.69

en situaciones de estrés por amonio (Chen y Lin, 1995). Se conoce que la intoxicación por nitrito puede causar daños estructurales y bioquímicos en los hepatocitos de *Oncorhynchus mykiss* a las 72 horas de exposición así como en el músculo de *Penaeus monodon* (Mensi *et al.*, 1982, Muir *et al.*, 1991). Es probable que las altas concentraciones de amonio a las que estuvo sometido *Litopenaeus schmitti*, provocaran daños en el músculo y afectaran la absorción y/o acumulación del AA en las células R del hepatopáncreas.

Wang *et al.* (2006) demostraron en *Litopenaeus vannamei*, que el amonio influye en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y en el sistema enzimático antioxidante. Los valores de ROI fueron más bajos en los camarones alimentados con *Artemia* enriquecida con L-ascorbil-2-polifosfato y la actividad de las enzimas antioxidantes fue más elevada. Teniendo en cuenta que el AA, en su papel como agente reductor y antioxidante, secuestra radicales libres perjudiciales al organismo, es posible que la exposición de *Litopenaeus schmitti* a altas concentraciones de

amonio, haya provocado un elevado requerimiento de AA para dar respuesta a esta alteración del metabolismo, conduciendo a un decrecimiento en las concentraciones en el músculo y el hepatopáncreas.

Otra causa de la disminución de las concentraciones de AA al incrementarse los niveles de amonio sería por una mayor demanda de éste para ser utilizado en la biosíntesis de la carnitina, la cual está involucrada en el metabolismo lipídico. Se ha reportado un aumento en la glucosa sanguínea y en la movilización de los lípidos en los camarones sometidos a un estrés de amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000), que podría estar mediado por la hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH), la cual está involucrada en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Santos *et al.*, 1997).

La participación del AA en diversas funciones biológicas, hace complejo poder dilucidar las causas del decrecimiento de su concentración en el hepatopáncreas y el músculo, no obstante se

demuestra por primera vez en *Litopenaeus schmitti* que las condiciones de estrés a que fueron expuestos los camarones provocaron incrementos en la demanda de AA en los dos tejidos analizados, lo que puede implicar un mayor requerimiento dietético.

## REFERENCIAS

- Bai, S.C. (2001). Requeriments of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rock fish *Sebastes schligeli* (Hilgendorf). *En: Ascorbic acid in aquatic organisms* (K. Dabrowski, ed.), CRC Press, pp:69-85.
- Colt, J.E. and D.A. Armstrong (1981): Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society* (FCS Publ. 1): 34-47.
- Conklin, D.E. (1997): Vitamins. *En: Crustacean Nutrition* (L.R. DAbrahamo, D.E. Conklin y D.E. Akiyama), World Aquaculture Society, 149 pp.
- Chen, H.Y. and C.F. Chang (1994) : Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimps (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L ascorbic acid. *J. Nutr.* 124:2033-2038.
- Chen, J.C. and Y.Z. Kou (1992): Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 104:249-260.
- Chen, J.C. and C.Y. Lin (1995): Responses of oxygen consumption, Ammonia-N excretion and Urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture* 136:243-255.
- Dabrowski, K. and S. Hinterleitner (1989): Applications of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulphate in biological materials. *Analyst. January*, 114:83-87.
- Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg and D.J. Sharples (1990): The Biology of the Penaeidae. *En: Advances in Marine Biology* (Blaxter y Soutward, ed.), 27, Academic Press, San Diego, 489 pp.
- Gabaudan, J. and V. Verlhac (2001): Critical review of the requirement of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonids, percids, plecoglossids and flat fish). *En: Ascorbic acid in aquatic organisms.* (K. Dabrowski, ed.), CRC Press, pp:33-48
- Groff, J.L. and S.S. Gropper (1999) : Advanced Nutrition and Human Metabolism. Ed.Wadsworth pp:245-260.
- Hunter, B., P.C. Magarelli, D.V. Lightner and L.B. Colvin (1979): Ascorbic acid dependent collagen formation in peneid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B:181-185.
- Iwama, G. and T. Nakanishu (1996): *Fish immune system:organism, pathogen and environment.* Acad. Press, USA, 380 pp.
- Kittakoop, P., S. Piyatiratitvirakul y P. Menasveta (1996): Detection of metabolic conversions of ascorbate-2-monophosphate and ascorbate-2-sulphate to ascorbic acid in tiger prawn *Penaeus monodon* using high-colorimetry. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B(4):737-743.
- Le Moullac, G. and P. Haffner (2000): Environmental factors affecting immunoresponse in Crustacea. *Aquaculture* 191:121-131.
- Lim, C. and R.T. Lovell (1978): Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 108:1137
- Lim, Ch., C.H. Shoemaker and P.H. Kleisies (2001): The effect of ascorbic acid on the immune response in fish. *En: Ascorbic acid in aquatic organisms* (K. Dabrowski, ed.). CRC Press, pp:140-166.
- Maffia, M., T. Verri and C. Storello (2001): In vitro methods and results of ascoric absorption in epithelial tissues of fish. *En: Ascorbic acid in aquatic organisms* (K. Dabrowski, ed.). CRC Press, pp:211-240.
- Masumoto, T., H. Hosakana and S. Shimeno (1991): Ascorbic acids role in aquaculture nutrition. *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*, (D.M. Akiyama y R.K.H. Tan, eds.) Thailandia e Indonesia, September 19-25 pp:42-48.
- Mensi, P., A. Arillo, C. Margiocco and G. Schenone (1982): Lysosomal damage under nitrite intoxication in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Comp Biochem Physiol* 73C:161-165
- Merchie, G., E.K. Kontara, P. Lavens, K. Kurmaly and P. Sorgeloos (1998): Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquac. Res.* 29:579-585.

- Muir, P.R., D.C. Sutton and L. Owens (1991): Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. *Mar. Biol.* 108:67-71.
- Murai, T., J.W. Andrews and J.C. Bauernfield (1978): Use of L-ascorbic acid, ethocel coated ascorbic acid and ascorbate 2-sulphate in diets for channelfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 108: 1761-1773.
- Newman, S. and R.A. Bullis (2001): Immune mechanisms of shrimp: form, function and practical application. *Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture* (C.L. Browdy and D.E. Jorry, eds.), Aquaculture 2001, Baton Rouge, USA, pp.226-237.
- Pizauro Jr, J.M., P. Ciancaglini and M. Macari (2002): Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 4(3), 12 pp..
- Racotta, I.S. and R. Hernández-Herrera (2000): Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei* to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A:437-443.
- Sanders, K. (1991): Vitamin C in fish nutrition. A review. *Fish. Dir. Skr. Ser. Ern.* 4., 13 pp
- Santos, E.A., L.E.M. Nery, R. Keller and A.A. Gonçalves (1997): Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol. Zool.* 70, 415-420.
- Sato, P. and S. Udenfriend (1978): Scurvy-prone animals including man, monkey and guinea pig do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 187:158-162.
- Shelback, T., N.G. Andersen, M. Winning and S. Westergaard (1990): Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. *Aquaculture*, 84:335-343.
- Song, Y.L. and Y.T. Hsieh (1994): Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Thomas, P. (1990). Molecular and biochemical response of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *American Fisheries Symposium* 8:9-28.
- Waagbo, R., K. Hamre and A. Maage (2001): The impact of micronutrients on the requirement of ascorbic acid in crustaceans and fish. En: *Ascorbic acid in aquatic organisms* (K. Dabrowski, ed.). CRC Press, pp:101-131.
- Wang, W.N., Y. Wang and A.L. Wang (2006). Effect of supplemental L-ascorbyl-2-polyphosphate (APP) in enriched live food on the immune response of *Penaeus vannamei* exposed to ammonia-N. *Aquaculture* (online).
- Wedemeyer, G.A. and J.W. Wood (1974): Stress as a predisposing factor in fish diseases. *US Fish Wildl. Serv. Fish Dis. Leaflet*, 38:1-8.

Aceptado: 12 de agosto de 2007