EFECTOS COMBINADOS DE LAS VITAMINAS C Y E DIETÉTICAS EN LA INMUNORESPUESTA DEL JUVENIL *LITOPENAEUS VANNAMEI* ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON GLUCANOS

César Molina[1], Jenny Rodríguez[1], José Ignacio Arango[2], Fabrizio Echeverría[1] y Mariuxi Sotomayor[1].
[1] Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM
[2]Roche Ecuador S.A.

Introducción

Muchos mecanismos de defensa celular en los crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis (Muñoz *et al.* 2000; Rodríguez y Le Moullac 2000). No obstante, la producción sin control puede ocasionar que estos radicales libres, tales como el anión superóxido (O_2^-), fuguen desde rutas metabólicas específicas, conduciendo a la iniciación de la peroxidación de lípidos con implicaciones patológicas que van desde la distrofia muscular, incremento a la susceptibilidad a enfermedades e incluso la muerte del animal (NRC 1993; Chew 1995). Por esta razón el uso de antioxidantes naturales como las vitaminas C y E, juegan un papel importante en la inmunoestimulación, ya que actúan removiendo, disminuyendo o previniendo la iniciación y/o propagación de los radicales libres nocivos producidos a través de la actividad celular normal y de factores medio ambientales adversos (Chew 1995).

De estas 2 vitaminas, la vitamina E es especialmente importante en la prevención de la oxidación de lípidos por que se incorpora directamente a la membrana de la célula donde ésta puede proteger a los ácidos grasos poliinsaturados, presentes en los fosfolípidos, del ataque de radicales libres (Lall y Olivier 1991). Adicionalmente, se han reportado estudios que demuestran que la vitamina E puede modular la respuesta inmune en peces (Montero *et al*. 1998) y el sistema de defensa antioxidante en camarones (Dandapat *et al*. 2000). Por otro parte, varios reportes han demostrado un mejoramiento de la respuesta inmune en peces (Waagbo *et al*. 1993) y camarones (Merchie *et al*. 1998) en relación a la suplementación dietética de vitamina C.

El interés en el uso de inmunoestimulantes ha aumentado con el aparecimiento de enfermedades en camarones frecuentemente expuestos a condiciones estresantes. Investigaciones en el área de los glucanos reportaron una mayor resistencia a enfermedades en *P. monodon* (Chang *et al*. 1999) y mayor respuesta inmunitaria en *L. vannamei* (Otero 2001). Así también se pudo observar en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) un efecto positivo sobre la actividad de los macrófagos se observó como consecuencia de la combinación de vitamina C y ß-glucanos (Verlhac *et al*. 1996).

En base a lo descrito y considerando que no existe suficiente información sobre el efecto combinado de vitaminas y glucanos, el presente trabajo investigó el efecto de las combinaciones de las vitaminas C y E sobre salud del camarón *L. vannamei,* inmunoestimulado con ß-glucanos y desafiados contra el Virus de la Mancha Blanca (WSSV).

Materiales y Métodos

Ensayo de alimentación

Camarones juveniles *L. vannamei* entre 2,7 y 2,9 g, fueron sembrados a una densidad de 50/m^2 en acuarios de 50 l. El sistema de cultivo tuvo un recambio de agua continuo cercano al 1000% diario. La temperatura, salinidad y oxígeno del agua fueron medidos 3 veces por semana reportando los siguientes valores 28,6±0,4˚C, 34±1 ups, 5,76±0,19 mg/l, respectivamente. El fotoperíodo fue mantenido en 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Las 15 dietas fueron preparadas para contener las concentraciones de vitaminas C (VC) y E (VE) indicadas en la Tabla 1 y mantenidas hasta su uso en un ambiente nitrogenado a –10˚C en fundas selladas.

Estas dietas fueron distribuidas al azar y suministradas por 21 días a los animales, y por 12 días más con la incorporación de 75 ppm ß-glucanos a cada una de las 15 dietas. Es importante mencionar que las concentraciones de las vitaminas fueron calculados como principio activo y no de la forma esterificada que normalmente se encuentra en el mercado.

Los camarones fueron alimentados a razón del 8% de la biomasa dos veces por día (09h00 y 17h00). Todos los días antes de la primera alimentación el alimento no consumido, heces y mudas fueron removidos de los 60 acuarios.

De cada una de las 4 réplicas (acuarios) por tratamiento dietético se sacrificaron 3-5 camarones en intermuda (C) o premuda temprana (D_0) para la extracción de hemolinfa a los 21 días de cultivo y al finalizar el mismo (día 34).

Luego de la extracción, las hemolinfas de los camarones de un mismo acuario fueron agrupadas en una sola muestra y diluida 1:1 con anticoagulante (Citrato de sodio 10% estéril, pH 7,2) en microtubos. Las muestras mantenida a 4ºC y tratadas asépticamente fueron divididas en 3 alícuotas para la cuantificación de los siguientes parámetros inmunitarios: anión superóxido (ROIs, Muñoz *et al.* 2000), actividad fenoloxidasa (PO, Echeverría 1998), actividad antibacteriana (AA, Tapia 1997) y proteínas totales del plasma (PP) siguiendo el método de Lowry modificado por Cedeño (1998). El número total de hemocitos (NTH) y fórmula hemocitaria (semigranular, SG; granular, G y hialino, H), se realizó de acuerdo a lo descrito por Muñoz (1996).

Ensayo de desafío

Camarones de 1-2g fueron sembrados en 60 acuarios de 50 l, a una densidad de 55/m^2. Cada mañana el agua de mar fue recambiado en un 80%, en un sistema estático. La temperatura, salinidad y oxígeno del agua medidos cada dos días fueron de 23,2±1,1ºC; 34±1 ups y 6,42±0,10 mg/l, respectivamente.

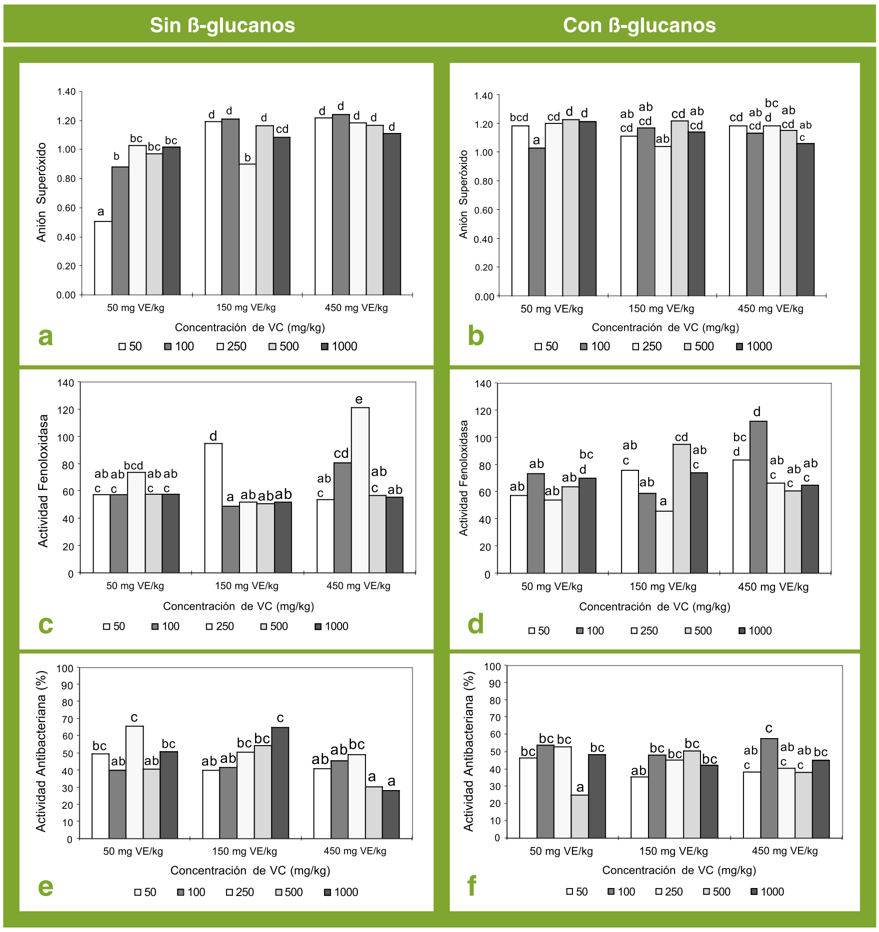

Figura 1. Anión superóxido, fenoloxidasa y actividad antibacteriana medidos después de alimentar sin y con ß-glucanos, respectivamente. Barras con igual letra no tienen diferencia significativa.

Las mejores combinaciones de VC y VE en base a la respuesta inmunitaria fueron ensayadas con cinco réplicas por tratamiento y suministradas a los animales por 21 días como un periodo de acondicionamiento. Seguidamente las dietas que llevaban ß-glucanos fueron suministradas por 12 días más junto con las que se venían dando sin glucanos. Para este ensayo se preparó una papilla conformada por camarón juvenil inyectado con WSSV, diagnosticado grado severo (por PCR), fue mantenida en -80ºC. En el día 34, 12 horas antes de la infección se dejó en ayuno a los animales, para posteriormente suministrar la papilla al 8% de la biomasa, dividida en 3 raciones durante el día. Como control negativo para cada uno de los tratamientos dietéticos, fue utilizada la papilla autoclavada por 15 minutos a 121ºC y 15 psi, para inactivar el virus.

Al final del día la papilla no consumida fue sifoneada y el agua recambiada para continuar suministrando las mismas dietas que se venían dando. Se revisó los acuarios cada 2 horas, para remover animales muertos y contar los sobrevivientes, hasta que uno de los tratamientos control alcanzara el 50% determinando esto el final del experimento.

Animales de cada dieta (tratamiento infectado y no infectado) fueron analizados para el diagnóstico de WSSV mediante la técnica de reacción de polimerización en cadena (PCR) siguiendo el protocolo descrito por Lo (1998).

Procesamiento de datos

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba *post hoc* de Duncan fue aplicada con un nivel de confianza del 95%. Los datos fueron transformados a un *índice inmunitario global* (GII), que corresponde a la sumatoria de los 5 parámetros inmunitarios, donde cada parámetro puede tener un valor entre 1 y 20%. Diferencias en la tasa de mortalidad fueron determinadas mediante un análisis de regresión múltiple.

Resultados y Discusión

Ensayo de alimentación

Efecto de las vitaminas antioxidantes C y E sin inmunoestimulación

Componente celular (Hemocitos) y humoral (Proteínas plasmáticas) de la hemolinfa

A 150 mg de VE/kg, tanto el NTH como las PP se incrementaron en relación directa a la concentración de VC (Tabla 1). Cuando la dosis de VE se incrementó a 450 mg/kg se obtuvo mejores resultados, con una concentración de VC de 50 a 250 mg/kg. En tanto que a la dosis más baja de VE (50 mg/kg) los mejores resultados en NTH se presentaron con dosis altas de VC (500 y 1000 mg/kg). La fórmula hemocitaria estuvo en los niveles normales en las 15 dietas, 13-35 % de hemocitos hialinos, 45-74 % de hemocitos semigranulosos.

Análisis inmunofuncionales: Anión superóxido, Actividad fenoloxidasa, Actividad antibacteriana

En términos generales, las dietas con 150 y 450 mg VE/kg presentaron una mayor y significativa ($p<0,05$) producción de ROIs que las dietas conteniendo 50 mg VE/kg (Fig. 1a). La más baja producción de ROIs fue observada en la dieta control (1). A este nivel de VE fue necesario incrementar la concentración de VC sobre los 250 mg, para alcanzar los resultados obtenidos a 150 y 450 mg VE/kg. Estos resultados coinciden con la literatura, la cual señala que la VE incrementa la fagocitosis, en humanos y animales, y que la VC ayuda a la regeneración de la VE cuando ésta se reduce (Niki *et al*. 1982). Esto explicaría por que a bajos niveles de VE es necesario incrementar la dosis de VC.

La actividad PO se incrementó en las dieta de 450 mg VE con las dos menores concentraciones de VC (50 mg/kg: dieta 11 y 100 mg/kg: dieta 12). Los animales alimentados con la dieta 13 tuvieron la más alta ($p<0,05$) actividad de PO seguidos por la dieta 6 (Fig. 1c), también se observó una alta actividad PO.

La AA del plasma (Fig. 1e) siguió el mismo patrón de comportamiento que el de las proteínas plasmáticas. Es decir que se incrementó en función de la concentración de VC, cuando la VE se mantuvo en 150 mg/kg. A 450 mg de VE, es mejor mantenerse a concentraciones bajas de VC (50, 100 y 250 mg/kg).

Tabla 1. Número Total de Hemocitos (NTH) y hemocitos Granulosos (G) en *L. vannamei* alimentados con las diferentes relaciones de vitaminas C y E presentes en las dietas sin y con ß-glucanos[1].

Dietas	Vitamina E (mg/kg)	Vitamina C (mg/kg)	NTH (por ml) Sin β-Glucanos	NTH (por ml) Con β-Glucanos	G (%) Sin β-Glucanos	G (%) Con β-Glucanos
1	50	50	21E+06 ab	21E+06 de	20,1 bcde	16 bcde
2	50	100	20E+06 ab	18E+06 bcde	22,7 de	14 abcd
3	50	250	18E+06 ab	19E+06 cde	12,8 ab	10 abc
4	50	500	24E+06 ab	20E+06 cde	25,8 e	9 ab
5	50	1000	26E+06 b	23E+06 e	12,3 a	9 a
6	150	50	15E+06 a	10E+06 a	17,4 abcde	23 e
7	150	100	22E+06 ab	19E+06 bcde	13,8 abc	21 de
8	150	250	21E+06 ab	21E+06 de	21,5 cde	9 a
9	150	500	25E+06 b	13E+06 ab	23,7 de	8 a
10	150	1000	27E+06 b	18E+06 bcde	22,1 de	13 abcd
11	450	50	25E+06 ab	17E+06 bcd	17,4 abcde	15 abcde
12	450	100	23E+06 ab	22E+06 de	17,7 abcde	18 cde
13	450	250	23E+06 ab	18E+06 bcde	20,5 bcde	10 abc
14	450	500	16E+06 ab	14E+06 abc	16,5 abcd	15 abcde
15	450	1000	24E+06 ab	22E+06 de	16,7 abcd	8 a

[1]Valores con letras comunes en la misma columna no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Indice inmunitario global

Al integrar toda la información obtenida en el GII (Fig. 2), se confirmaron los resultados parciales, es decir que las respuestas más altas se obtuvieron combinando 150 mg de VE con dosis altas de VC (500 mg/kg: dieta 9 y 1000 mg/kg: dieta 10). Si la dosis de VE se incrementa a 450 mg/kg, la concentración de vitamina C, no debe superar los 250 mg/kg (dietas, 11, 12, 13). Prácticamente todos los parámetros inmunitarios disminuyeron a partir de los 250 mg de VC en la dosis de 450 mg de VE, indicando un efecto contraproducente de dosis excesivas de vitaminas E y C. Si la dosis de VE es la mínima (50 mg/kg) es necesario incrementar la concentración de VC a 1000 mg/kg. Resumiendo, los más altos GII fueron observados en las dietas del 9 al 13.

Efecto combinado de las vitaminas antioxidantes C y E con inmunoestimulación

Componente celular (Hemocitos) y humoral (Proteínas plasmáticas) de la hemolinfa

La incorporación de ß-glucanos en las dietas hizo descender el NTH, especialmente en las dietas con 150 y 450 de VE (Tabla 1). La fórmula hemocitaria también se modificó observándose un incremento de los H (32-77%) y un descenso de los SG (8-44%).

Uno de los objetivos de la inmunoestimulación es promover la proliferación de hemocitos (incremento del NTH). Sin embargo, este parámetro puede ser difícil de evaluar, debido a que el estimulante provoca también que los hemocitos abandonen la circulación e infiltren los tejidos, observándose inicialmente una caída de la población de hemocitos circulantes (Ryan y Karp 1993). La proliferación es evidente, cuando el estimulante o el microbio ha sido eliminado y la producción de nuevos hemocitos supera a la infiltración. La infiltración acompañada de los procesos de limpieza del estimulante (fagocitosis o nodulación), podrían explicar la caída en aproximadamente 4 millones de hemocitos/ml destacando particularmente de hemocitos granulares cuando se estimuló a los animales (Tabla 1). La bibliografía reporta que los SG junto a los G están implicados en los procesos de encapsulación y nodulación (Martin *et al.* 1998). El incremento de H observado en el presente estudio también ha sido reportado en otros trabajos de inmunoestimulación o desafío microbiano ya sea con ß-glucanos (Otero, comunicación personal), probióticos (Gullian y Rodríguez 2001) o incluso WSSV. Se observó además, la presencia de hemocitos morfológicamente modificados y denominados atípicos (At), encontrándose los mayores porcentajes en las dietas con 150 mg VE/kg. La naturaleza de estos hemocitos atípicos debe ser investigada en futuros trabajos.

Con respecto a la concentración de PP, se observó un ligero descenso comparado con lo reportado cuando se suministró las mismas dietas pero sin ß-glucanos. Por otra parte no se observó ningún efecto de la concentración de VC a 150 mg de VE/kg.

Análisis inmunofuncionales: Anión superóxido, Actividad fenoloxidasa, Actividad antibacteriana.

Al incluir b-glucanos en las dietas la generación de superóxido se incrementó en la dosis de 50 mg VE/kg, obteniéndose resultados similares a los observados a mayores concentraciones de VE (Fig. 1b). En cuanto a la actividad PO, la mayor respuesta, se encontró en los animales alimentados con la dieta 9, 11 y particularmente la 12 (Fig. 1d), manteniéndose en cierta medida lo anteriormente observado, es decir una mayor actividad PO con alta dosis de VE combinada con baja concentración de VC. Con respecto a la AA, se encontró un descenso (Fig. 1f), comparado con lo reportado cuando se suministró las mismas dietas sin ß-glucanos. Con inmunoestimulación no se observó ningún efecto de la concentración de VC a 150 mg de VE/kg, tal como se reportó sin inmunoestimulación.

Indice inmunitario global

Al incluirse el inmunoestimulante el GII (Fig. 2) descendió en las dietas 9, 10, 11, 12 y 13 (las que tuvieron el mayor índice sin inmunoestimulación), en tanto que se incrementó en las dietas 1 y 3 (estas dietas tuvieron dosis bajas de VE). Estos resultados sugieren que en presencia de 75 ppm de ß-glucanos como inmunoestimulante sería recomendable mantenerse a niveles bajos de VE (50 mg/kg).

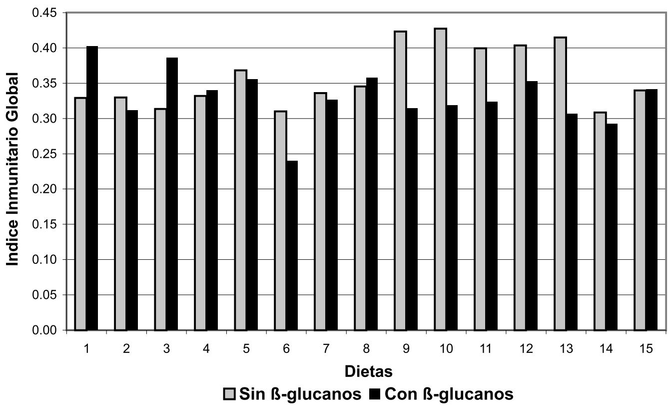

Figura 2. Indice inmunitario global obtenido después de suministrar las 15 dietas sin y con ß-glucanos.

Ensayo de desafío

Paras las pruebas de desafío con WSSV se alimentaron animales con las dietas que produjeron las mejores respuestas inmunitarias. Las dietas seleccionadas fueron: Dietas 9 con o sin ß-glucanos, dietas 1 y 12 con ß-glucanos y dieta 13 sin ß-glucanos. La dieta 1 sin ß-glucanos fue usada como control.

Mediante análisis de regresión múltiple se determinó que las dietas 1 (50/50) con ß-glucanos y la 9 (150/500) sin ß-glucanos presentaron la menor velocidad de mortalidad al término de los 7 días del ensayo. La dieta 9 sin ß-glucanos fue la que mejor incrementó la respuesta inmune del camarón. La adición de ß-glucanos en esta dieta causó el descenso en el NTH lo que pudo haber ocasionado la mayor tasa de mortalidad. Los ß-glucanos dieron resultados más prometedores de supervivencia a dosis bajas de VE. La dieta 13 se seleccionó en base a la fuerte actividad PO que produjo, pero esto no significó mayor supervivencia al WSSV, obteniéndose con ella la más alta tasa de mortalidad (10% diario). Sin embargo, es de anotar que esta dieta estuvo en el límite superior de estimulación, dosis más altas de VC (a 450 mg VE/kg) hicieron caer la respuesta inmune (con o sin inmunoestimulación). Es probable que un suministro continuo de esta dieta en condiciones de infección, implique una dosificación excesiva de VE, la misma que pudiera comprometer los mecanismos de producción de radicales de oxígeno generados por el huésped para destruir al patógeno (Cao y Cutler 1993).

Estos resultados confirmarían las observaciones de Montesdeoca *et al*. (2001) de que el NTH y la actividad oxidativa son 2 parámetros inmunitarios importantes a considerarse cuando se trata de resistencia al WSSV, tal como se observó con la dieta 9 sin ß-glucanos y la dieta 1 con ß-glucanos. Sería recomendable sin embargo repetir el ensayo de desafío con mayor número de réplicas y/o ensayar infecciones menos agresivas. Adicionalmente, cabe destacar que la papilla infectada es demasiado letal y posiblemente enmascare resultados que en condiciones naturales podrían ser más evidentes.

Conclusiones

Al final de este estudio, los camarones que presentaron la menor tasa de mortalidad por el Virus de la Mancha Blanca, mejor respuesta inmune y la mejor relación costo-beneficio en acuarios sin productividad natural fueron los que recibieron las dietas conteniendo:

- (1) 150 mg Vitamina E / 500 mg VitaminaC por kg de balanceado
- (2) 50 mg Vitamina E / 50mg VitaminaC con 75 mg ß-glucanos por kg de balanceado

Glosario

Actividad Antibacteriana: Capacidad de algunos componentes del plasma (la parte líquida de la hemolinfa del camarón) para inhibir el crecimiento de bacterias. Valores entre 40 y 60% de inhibición son considerados como normales.

Fenoloxidasa: Es la enzima que interviene en la formación de quinonas y ellos polimerizan en melanina (manchas negras en los animales) observada en los procesos inflamatorios de los artrópodos. Las quinonas y la melanina son compuestos con actividad microbicida.

Anión superóxido: Es un radical de oxígeno tóxico (O_2^-) que se produce durante la fagocitosis como un mecanismo de destrucción.

Proteínas plasmáticas: La concentración de proteínas presentes en el plasma es un indicador importante del estado fisiológico del animal. Camarones saludables en intermuda son aquellos con más de 100 mg/ml.

Hemograma: Número total de hemocitos circulantes y la fórmula hemocitaria consiste en la determinación del número y la proporción en que están presentes en la hemolinfa del camarón las 3 clases de hemocitos.

Hemocitos granulosos y semigranulosos: Almacenan y liberan el sistema profenoloxidasa e intervienen además en la encapsulación y nodulación.

Hemocitos hialinos: Actúan en la coagulación y al igual que los semigranulosos en la fagocitosis. Un juvenil saludable tiene alrededor de 20 millones de hemocitos por ml.

Bibliografía

Cao, G. y Cutler, R. 1993. High concetrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. Archives of Gerontology and Geriatrics 17: 189-201.

Cedeño V. R. 1998. Evaluación clínica de ensayos inmunitarios en el camarón *Penaeus vannamei.* Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil, Ecuador.

Chang, C., Su, M., Chen, H., Chu-Fang Lo, C., Kou, G. y Chiu Liao, L. 1999. Effect of dietary b-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organism. 36: 163-168.

Chew, B. P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. J Nutr. 125:1804S-1808S

Dandapat, J.; Chainy, G. B. N. y Rao, K. J. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative Biochemistry and Physiology. 127C: 101–115

Echeverría, F. 1998. Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón *Penaeus vannamei*. Redacción Técnica. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.17 pp.

Gullian, M. y Rodríguez, J. 2001. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 24-27 Octubre, Guayaquil, Ecuador.

Lall, S. P. y Olivier, G. 1991.Role of micronutrients in immune response and disease resístanse in fish. Fish nutrition in Practice (France) in Kaushik, S.J. and Luquet, P. (Eds). pp. 101-118. June 24-27, 1991. INRA Paris, France.

Lo, C-F., Chang, Y-S., Cheng, C-T. y Kou, G-H. 1998. PCR monitoring of cultured shrimp for white spot síndrome virus (WSSV) infection in growout ponds. In Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. p281-286. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 11-14 November, 1998. Bangkok, Thailand.

Martin, G.G., Kay, J., Poole, D., y Poole, C. 1998. *In vitro* nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the american lobster, *Homarus americanus*. Invert. Zool. 117: 155-168.

Merchie, G.; Kontara, E. K.; Lavens, P.; Robles, R.; Kurmaly, K. y Sorgeloos,P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture Research 29: 579-585.

Montero, D.; Tort, L.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L. y Vergara, J. M. 1998. Depletion of serum alternative complemented pathway activity in gilthead seabream (Sparus auratus) caused by _-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. Aquaculture 161: 475.

Muñoz, M. 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *P. vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil, Ecuador.

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Wil P.W. van der Knaap, Mialhe, E. y Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 191: 89-107.

National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requirements of domestic animals, Nutrient Requirements of fish. National . National Academic Press, Washington DC., 114pp.

Niki, E.; Tsuchiya, J.; Tanimura, R. y Kamiya, Y. 1982. Regeneration of vitamin-E from _-chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. Chem. Lett. 789-792.

Otero, V. 2001. Evaluación de los _-glucanos como inmunoestimulantes del sistema de defensa del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis de Biólogo Pesquero. Universidad Laica “Eloy Alfaro”. Manta, Ecuador.103pp.

Rodríguez, J. y Le Moullac, G. 2000. State of art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191: 109-119.

Ryan, N. A., y Karp, R. D. 1993. Stimulation of hemocyte proliferation in the american cockroach (*Periplaneta americana*) by injection of *Enterobacter cloacae*. Journal of Insect Physiology. 39(7): 601-608.

Tapia, F. 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *P. vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., y Hole, R. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on nonspecific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 143: 123-133.

Waagbo, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E., y Sandnes, K. 1993. Dietary vitamin C, inmunity and disease resistance in Atlantic salmon. Fish physiology and Biochemistry 12: 61-73.