



304406
UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR ³
205

ELABORACION DE UNA TECNICA DE CULTIVO DE
TEJIDOS PARA CELULAS DE CAMARONES
DEL GENERO Penaeus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ADRIANA ELVIA MATA VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z. ANGEL RETANA REYES

ASESORES:

M. en C. LAURA BORREGO
DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNANDEZ

INCORPORACION A LA UNAM DE 1981 A 1991

MEXICO, D. F. 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

Resumen	iv
Introducción	1
El Cultivo Celular	1
La Camaronicultura en México	7
El Hepatopancreas de los Crustáceos Decápodos	10
Justificación	11
Hipotesis y Objetivo	12
Material y Métodos	13
Resultados	20
Discusión	26
Conclusiones	50
Recomendaciones	52
Apéndice A. Fórmulas de Reactivos Utilizados	53
Apéndice B. Resultados: Cuadros y figuras	59
Apéndice C. Formulación de los Medios Nutritivos Utilizados	74
Bibliografía	76

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En el presente trabajo se utilizaron camarones penidos de cuatro especies, como donadoras de tejidos para la implementación de una técnica de cultivo celular. Dos de las especies son representantes de la población de estos animales en el Pacífico, y las dos restantes representan las especies nativas del Golfo de México. El propósito de establecer la técnica para cultivar las células de origen penido *in vitro*, fué obtener una población celular homogénea.

Las células para elaborar los cultivos celulares se obtuvieron a partir de hepatopancreas de camarones del género *Penaeus*, en estadios postlarval y juvenil. Estas células *in vitro* presentan las siguientes características: son redondeadas, nucleadas, y vacuolizadas; que crecen en suspensión. Inicialmente, se observaron por lo menos cuatro tipos celulares. Sin embargo, al subcultivar, estos se redujeron a dos. Al cuarto y quinto pase se observaron células vacuolizadas con núcleos periféricos y rodeadas por una capa refringente que se identificó como una capa proteica (la cual no se observa en los primeros pases). La división celular es amitótica.

Se utilizaron cuatro diferentes medios de cultivo: MEM, L-15, RPMI 1640 y M199. De ellos, el M199, resultó ser el único que se acercó a los requerimientos de los hepatopancreacitos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

El Cultivo Celular.

El cultivo celular es una de las herramientas más utilizadas dentro de las ciencias que requieren del uso de organismos vivos, como sujetos de experimentación. Los cultivos celulares son considerados así, como reactivos biológicos, al igual que los animales de laboratorio y embriones de pollo. Se utilizan generalmente, para sustituir al hombre, o a animales de laboratorio cuando por razones éticas, económicas, prácticas o políticas las investigaciones no se pueden llevar a cabo en el animal a estudiar.

El cultivo celular tiene tres variantes: el cultivo primario, el secundario y las líneas celulares heteroploides (líneas establecidas) (5, 7, 18, 20, 22, 23, 39, 42, 43).

El cultivo primario consiste en células obtenidas por la disgregación de un tejido, que se siembran o cultivan por primera vez *in vitro*. Sus características son: conservan el número cromosómico de las células del tejido de origen, tienen una amplia susceptibilidad viral, no son malignas, retienen la cromatina sexual y normalmente no crecen en suspensión, ya que la mayoría tiene la capacidad de formar una monocapa, que se sujeta a la superficie del envase en el que se mantienen. Se utilizan para el aislamiento viral, investigación, producción de vacunas, constatación de las mismas, etc. (5, 7, 18, 20, 22, 23, 39, 42, 43).

Los cultivos secundarios son aquellos que se derivan

del cultivo primario, cuando se hacen subcultivos del mismo. Las características de las células, son esencialmente las mismas, aunque con el paso del tiempo existen ciertos cambios, tanto morfológicos como funcionales. Tanto los cultivos primarios como secundarios sufren degeneración entre los 30 y 50 subcultivos (pases), consecuencia de lo cual dejan de dividirse. Se utilizan en la investigación y producción de vacunas (5, 7, 18, 20, 22, 23, 39, 42, 43).

Las líneas celulares heteroploides consisten de células que pueden ser subcultivadas indefinidamente, aunque es difícil su obtención. La población celular corresponde a un sólo tipo de célula, obteniéndose así una población homogénea. Las células son poliploides o aneuploides, y pueden ser de origen maligno y sobreviven más de 20 subcultivos. Se utilizan en el diagnóstico virológico, producción de vacunas e investigación (5, 7, 18, 20, 22, 23, 39, 42, 43).

Las líneas celulares pueden ser adquiridas comercialmente de la American Type Culture Collection (7).

El cultivo celular se facilita con el desarrollo de los medios químicamente definidos, que contienen casi todos los nutrientes requeridos para el crecimiento celular. Uno de ellos, es el medio desarrollado por Eagle en 1959. Este es una solución isotónica de sales, glucosa, vitaminas, coenzimas y aminoácidos que se ajusta a un pH de 7.4; contiene además antibióticos para inhibir la proliferación de bacterias. Otros medios comúnmente utilizados son: el M199, para células linfoides y sanguíneas;

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RpMI 1640, que contiene una gran variedad de sales (7, 18, 20, 39).

Todos los medios se enriquecen con un cierto porcentaje de suero. Este puede ser suero fetal bovino, o de cualquier animal, previamente inactivado por calor y esterilizado por filtración. El porcentaje de suero en el medio variará de acuerdo a la finalidad del mismo. Así encontramos medios que favorecen la división celular, llamados de crecimiento y que contienen de 5 a 20 % de suero; generalmente se trabajan con un 10 % de suero. Los medios de mantenimiento, que sólo permiten a las células sobrevivir, contienen entre 2 y 5 % de suero, siendo utilizado el 2 %; generalmente todos contienen rojo de fenol como indicador de pH. Al metabolizar, las células liberan sustancias que acidifican el medio, haciéndolo cambiar de color rojo (pH 7.2 - 7.6), a un amarillo brillante (pH < 7.0). Esto también indica el momento de hacer un cambio de medio. Por otra parte, un color magenta indica que el medio está muy alcalino, lo cual puede deberse a la muerte de la población celular, o a que sólo una pequeña parte de ésta, se encuentra metabolizando. Un pH alcalino, también puede deberse a que las botellas o tubos de cultivo, no se hayan cerrado herméticamente (7, 18, 20, 39).

Hoy en día, los medios nutritivos se consiguen comercialmente, en diferentes concentraciones (1x, 5x ó 10x). Para su reconstitución se utiliza agua tridestilada y se esterilizan por medio de filtración, luz U.V. y radiación gamma; de manera que no se expongan al calor, ya que contienen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

substancias termolábiles (7, 18, 20, 39).

Ciertos aminoácidos y vitaminas son esenciales para el crecimiento y supervivencia de los cultivos celulares. Los requerimientos nutricionales varían de acuerdo al tipo de tejido que se trabaje. Es por ello, que es necesario conocer los requerimientos de las células en cuestión. Además, se necesitan ciertos nutrientes aun no bien definidos que suplementen los medios. Los que generalmente se adicionan como suero o extractos tisulares. El suero, contiene una gran variedad de promotores del crecimiento, y substancias nutritivas que ayudarán a que las células se establezcan (7, 18, 20, 24, 42).

Todos los medios que se utilizan en cultivo celular, se manejan con una dosificación de antibióticos; rara vez, se les añade antimicóticos, ya que estos tienden a ser muy tóxicos para las células. Los antibióticos que se utilizan con mayor frecuencia son: penicilina G sódica (en una concentración de 100 a 1000 UI/ml) y el sulfato de estreptomycin (en una concentración de 10 a 100 mg/ml); como antimicóticos o micostáticos se utilizan la anfotericina B y la nistatina (en concentraciones de 10 a 100 mg/ml) (5, 7, 18, 20, 22, 23, 39, 42, 43).

El primer paso en la preparación de los cultivos celulares, es la disociación de los tejidos o de una monocapa de cultivo celular. La dispersión es necesaria de manera que las células, como una unidad, se adieran a la superficie del recipiente que las contenga y empiecen a dividirse (18, 43).

TESIS CON
FALLA DE COPIA

Existen tres métodos para la dispersión celular, dependientes respectivamente de: la digestión con una enzima proteolítica, la tripsina; la quelación con verseno (EDTA); y la separación mecánica. Para la dispersión de líneas celulares, se usan mezclas de tripsina-verseno. La digestión con tripsina, es utilizada en la preparación de cultivos primarios (18, 43).

El uso de tripsina para la dispersión celular depende de su capacidad para digerir el material proteico intercelular, permitiendo así que las células adyacentes se separen la una de la otra, manteniendo su integridad estructural individual. Esta enzima es muy eficiente por lo que se ha extendido mucho su aplicación. La tripsina es utilizada en la preparación de cultivos celulares de peces, artrópodos, aves y mamíferos (18, 43).

Aunque la tripsina tiene una alta eficiencia en producir la dispersión celular, a su vez, puede causar daños a las células vivas. Por lo que las células se exponen a su acción, sólo el tiempo mínimo necesario en lograr la disociación celular. Para controlar su acción, se manejan ciertas condiciones de pH y temperatura. La tripsina es comúnmente utilizada al 0.25 %, disuelta en una solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 7.2 - 7.4). La digestión se lleva a cabo dentro del rango de temperaturas comprendido entre 4 y 37 °C (5, 7, 18).

El verseno es menos versátil y se utiliza a una concentración de 0.02 - 1.5 %, preparado en solución salina amortiguadora de fosfatos con un pH 7.2 - 7.4, libre de calcio y

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

magnesio, ya que su acción se basa en la captura de iones calcio, que juegan un papel importante en la adhesión intercelular. La mezcla tripsina-verseno, se utiliza generalmente para desprender monocapós celulares. Mientras que la separación mecánica, sólo se utiliza en aquellos casos donde los órganos o tejidos a dispersar tienen uniones intercelulares débiles. Así, se evita su exposición a reactivos potencialmente tóxicos (20).

Para el manejo de las células, además de los medios de cultivo se utilizan soluciones balanceadas de sales que ayudan a proveer a estas de tonicidad, pH y minerales (7, 18, 20, 22, 23, 24, 42, 43).

Debido a los diferentes requerimientos de salinidad para el cultivo de células de peces teleósteos marinos, Siegel en 1973 (43), sugirió que se modificara la salinidad de la solución amortiguadora que se utilizara, así como también la de la tripsina y la del medio. La modificación sugerida por este autor, consiste en elevar la concentración de sal en 0.06 M, obteniéndose así soluciones 0.26 M (la solución salina fisiológica tiene una molaridad de 0.2) (42, 46, 47).

Otro factor que es de suma importancia en el establecimiento de una población celular *in vitro*, es la temperatura a la que se mantienen los cultivos. Así, se dice que la temperatura óptima de crecimiento para las células de mamífero es de 37 °C, mientras que para las células de artrópodos es de 28 °C, siendo la de los peces de 25 °C (18, 39).

En realidad no existe literatura acerca del cultivo

celular en crustáceos. Se ha reportado que con medio Leibowitz-15 (L-15), las células cardíacas y hematopoyéticas de camarones peneidos crecen formando un monoestrato. Esto fué reportado por Chen en 1988 (14), donde menciona también, que las células que crecen con mayor eficiencia *in vitro*, son las hematopoyéticas.

Sin embargo, el Dr. Jean Robert Bonami*, asegura que se intentó el establecimiento de la técnica de cultivo celular para tejidos de origen peneido, durante la década de los 70's, pero que al no haber obtenido resultados satisfactorios, el grupo que lo trabajaba en la Universidad de Montpellier, Francia y otro en Estados Unidos, abandonaron los proyectos.

La Camaronicultura en México.

En los últimos años, se ha visto un aumento considerable del cultivo de camarones del género *Penaeus*, a nivel mundial (4, 41).

La producción mundial de camarones peneidos, es sostenida principalmente por tres especies, que en su conjunto representan el 71 % del total y que corresponden al camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), con el 33 %; el camarón blanco chino (*Penaeus chinensis*, también conocido como *Penaeus orientalis*), con el 28 %; y el camarón blanco de occidente (*Penaeus vannamei*), con el 10 % (4).

La expansión del cultivo de camarones peneidos, a nivel mundial y en nuestro país, implica el dominio de la tecnología utilizable en cada una de sus fases (4).

*Comunicación personal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En México, se está impulsando el cultivo de camarón, debido a que la producción a través de las pesquerías en lagunas costeras, bahías y mar abierto en los últimos ocho años se ha mantenido estable. Siendo las posibilidades de lograr aumentos en los volúmenes de captura cada día menores, debido en parte al deterioro de las embarcaciones por falta de mantenimiento, el alto costo del avituallamiento y a que se ha alcanzado el máximo rendimiento sostenible de la captura, lo que hace menos rentable la actividad. Como una alternativa para aumentar la producción, desde 1985 se inició un proceso de construcción de granjas, principalmente en los estados de Sinaloa, Nayarit y Sonora. Actualmente, este esfuerzo es significativo y poco a poco, se han empezado a aportar volúmenes de camarón cultivado a la producción. Siendo las especies más cultivadas en nuestro país *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* (4, 41).

El potencial de especies nativas con el que cuenta nuestro país es muy grande. De ellas, ocho especies de camarones peneidos de los subgéneros *Farfantepenaeus* y *Litopenaeus*, son las que tienen mejores posibilidades de manejo, entre éstas cabe destacar en las costas de la vertiente del Golfo de México a: *P. duorarum* (camarón rosado), *P. setiferus* (camarón blanco) y *P. aztecus* (camarón café); y en el Pacífico a *Penaeus vannamei* (camarón blanco), *P. stylirostris* (camarón azul) y *P. californiensis* (camarón café) (4, 41).

A partir de la instalación y puesta en marcha de las granjas, a nivel mundial, se ha observado el desarrollo de

diversas enfermedades que afectan a los camarones en cultivo y que merman la producción al final del ciclo (generalmente de 4 a 5 meses). Muchas de estas enfermedades, empiezan a tener efectos sobre los camarones cuando los mismos ya han alcanzado un cierto tamaño, lo cual implica pérdidas económicas proporcionales al tipo de cultivo empleado (4).

Los factores que han propiciado el desarrollo de las enfermedades en los estanques, han sido las condiciones del cultivo (densidad de los organismos, alimentación, procedencia de la semilla, etc.). Las enfermedades observadas son causadas por muy diversos agentes etiológicos, entre los que encontramos a: virus, bacterias, hongos, etc.; además de las que son producto de deficiencias nutricionales y estress (13, 21, 27, 28, 29, 32, 35).

Los virus que afectan los camarones peneidos, pertenecen a las siguientes familias: Reoviridae, Baculoviridae y Parvoviridae (13, 21, 27, 28, 35).

Las enfermedades virales que son de mayor importancia a nivel mundial, en el cultivo de peneidos se pueden agrupar en seis grandes grupos, que son: enfermedades provocadas por un virus tipo *Baculovirus penaei* (BP); enfermedades causadas por virus tipo *Honodon baculovirus* (MBV); necrosis baculoviral de la glándula del intestino medio (BMN); virosis tipo-Parvo que atacan al hepatopaneas (HPV); virosis del tipo-Reo (Reo-like); y la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHNN) (13, 21, 27, 32, 35, 51, 52).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El Hepatopancreas de los Crustáceos Decápodos

El hepatopancreas es un órgano vital para los crustáceos decápodos, ya que tiene funciones glandulares, de absorción, digestivas y de almacenamiento nutricional; así como, de excreción de material de desecho (1, 2, 3, 19). Estructuralmente es un complejo compacto de ductos y tubulos ciegos que ocupa gran parte del cefalotórax. Se ha demostrado, la presencia de una red nerviosa extensa que lo cubre. Además, de las funciones antes mencionadas, está implicado en el ciclo de muda, el almacenamiento de reservas inorgánicas y el metabolismo de lípidos y carbohidratos. No queda duda de que al menos una parte de sus funciones, están bajo el control neuroendócrino. Existe controversia sobre las funciones de cada uno de los tipos celulares que lo conforman; pero todos los autores están de acuerdo en que el epitelio hepatopancreático se encuentra formado por cuatro tipos celulares: las células-E o embrionarias, las células-R o de absorción, las células-F o fibrilares y las células-B o en forma de ampolla. Al-Mohanna y Colaboradores, describieron en 1985 un quinto tipo celular al que llamaron células-H o enanas (1, 2).

JUSTIFICACION

El estudio de las enfermedades virales que afectan al camarón peneido de nuestro país, hace indispensable el desarrollo de técnicas de cultivo de células *in vitro*, que ayuden al estudio y diagnóstico de estas infecciones.

HIPOTESIS

Las células de camarones del género *Penaeus*, pueden cultivarse y mantenerse *in vitro*, modificando el medio para ajustarlo a los requerimientos nutricionales de las mismas.

OBJETIVO

Desarrollar una técnica de cultivo celular, para el mantenimiento de células vivas de camarones peneidos.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con cuatro diferentes especies del género *Penaeus*. Dos de las cuales corresponden a especies nativas de las costas del Golfo de México (*P. setiferus* y *P. aztecus*)*: las otras dos representan especies del Pacífico (*P. californiensis* y *P. vannamei*)**.

Se llamará población A a aquella que representa las especies del Golfo de México, y población B a la que representa las especies del Pacífico de nuestro país.

Todos los ejemplares fueron puestos en observación durante un periodo de un mes, antes de ser utilizados, bajo condiciones de stress (alta densidad, manejo, concentraciones altas de amonio, nitritos y nitratos).

Para preparar el agua de mar de los acuarios se utilizaron sales Instant Ocean ***. Los parámetros químicos del agua se midieron con "kits" de la marca Aquarium Pharmaceuticals, Inc.

La población A se mantuvo en un acuario de cristal de 40 litros. La población total consistía en 29 individuos (16 *P. aztecus* y 13 *P. setiferus*). Así, la densidad del acuario era de 1.4 individuos /litro. Los parámetros fisicoquímicos del agua que se utilizaron para provocar stress en la población fueron: amonio (2 ppm), nitratos (60 ppm) y nitritos (4 ppm).

Los camarones de las especies del Pacífico (*P. vannamei* y *P. californiensis*) o población B, se mantuvieron en un acuario de 150 lts. La densidad en este acuario era de 2.5 camarones/lit.

Ya que se contaba con 31 individuos de *P. vannamei* y 28 de *P. californiensis*. Los parámetros del agua se mantuvieron en las mismas constantes, antes especificadas para las especies del Golfo de México. Estos animales tuvieron que pasar por un periodo de aclimatación de 48 hrs., debido a que las características del agua en los estanques de la granja en Puerto Peñasco, eran distintas a las manejadas en este experimento. Los animales estaban acostumbrados a una salinidad de 38 ppm y 29 °C.

Sólo aquellos ejemplares que no mostraron signos de enfermedad, se utilizaron dentro de las siguientes metodologías (los animales utilizados para el cultivo celular, eran pesados y medidos antes de comenzar a trabajarlos):

Método A

Se tomó al ejemplar y se le lavó externamente con solución salina fisiológica (SSF) estéril, desechando después de cada lavado la solución utilizada. Se procedió a separar el cefalotórax del abdomen, conservando sólo el cefalotórax en una caja de Petri estéril. Con la ayuda de pinzas y tijeras estériles, se quitó el exoesqueleto y se extrajo el hepatopancreas, el cual se colocó en otra caja de Petri estéril. Ahí, se lavó con un poco de SSF estéril. Se cortó en pedazos muy pequeños ($1-2 \text{ mm}^2$), en 2 ml de tripsina 0.25%. Se vacía el tejido ya cortado, junto con la tripsina a un tripsinizador, donde se le añaden 8 ml más de tripsina. La tripsinización se llevó a cabo en agitación media (con la ayuda de un agitador magnético y una bala magnética estéril colocada dentro del tripsinizador),

durante 15 minutos. El tripsinizado se vierte en dos tubos de ensayo con tapón de baquelita estériles, donde es centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos. Después de lo cual se desechó el sobrenadante, y se resuspendió cada uno de los paquetes celulares en 5 ml de medio esencial de Eagle (MEM), con un 15 % de suero fetal bovino (ver Apéndice A). La suspensión celular de uno de los tubos, se sembró en una botella Falcon de plástico. Mientras el contenido del otro tubo se sembró en una botella de vidrio plana. Los cultivos se incubaron en una estufa a 37 °C.

Método B

Se preparó una solución balanceada de sales de Hank's al 0.26 M, utilizando además para cada litro de esta solución 2 ml de quinolona. Con esta solución se llenan tres cajas de Petri estériles. El camarón se lavó externamente con SSF estéril (que contenía 500 UI de penicilina/ml y 50 mg de estreptomycin/ml), tres veces. Se separó el cefalotórax del abdomen y se procedió a quitar el exoesqueleto. Se extrajo el hepatopáncreas, el cual se depositó en una de las cajas de Petri con solución de Hank's, por un lapso de 3 minutos. A continuación, se cambia el órgano a otra caja de Petri con solución de Hank's, donde permaneció por otros 3 minutos. Después se pasó a la tercera caja de Petri conteniendo solución de Hank's, donde se lavó durante 5 minutos. A continuación se le colocó en una caja de Petri estéril, en donde se le añadieron 2 ml de tripsina 0.25 % (0.26 M de salinidad). El órgano se cortó en pequeños pedazos (1-2 mm²), los cuales luego se vertieron en

un tripsinizador. Agregándoseles, 8 ml más de tripsina, procediendo a tripsinizar durante 15 minutos en agitación media. La acción de la tripsina se neutralizó con 1 ml de suero fetal bovino, que se añadió al final de la tripsinización. El tripsinizado, se dividió en dos tubos de ensaye con tapa de baquelita y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos. Se tiró el sobrenadante, y el paquete celular se resuspendió en 5 ml de RPMI 1640 0.26 M o en MEM 0.26 M. Se sembró el contenido de uno de los tubos en una botella de vidrio o en 5 tubos Leighton (1 ml en cada uno), la suspensión celular del otro tubo se sembró en una botella Falcon de plástico. Los cultivos se incubaron a 37 °C.

Método C

Los camarones se anestesiaron, introduciéndoseles en el refrigerador (4 °C), durante 5 minutos; utilizando una caja de Petri estéril. Posteriormente se tomaron de la caja de Petri con pinzas estériles dándoles un baño de 10 seg. en una solución de yodo al 1 %. Inmediatamente, se colocaron en un frasco conteniendo solución salina estéril 0.47 M, donde permanecieron 5 minutos. Enseguida se le pasó, por un baño de 10 segundos en benzalconio al 20 %; sumergiéndoles inmediatamente después en otro frasco, con solución salina estéril 0.47 M, limpia, donde permanecieron otros 5 minutos. A continuación, se le sumergió en solución salina estéril 0.47 M limpia, conteniendo 1000 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin y 100 mg/ml de nistatina. En esta solución de antibióticos, permaneció durante 20 minutos.

El siguiente paso, consistió en un baño de 5 minutos en solución salina 0.47 M estéril.

Habiendo terminado de lavar al camarón externamente, se separó el cefalotórax con pinzas y tijeras estériles, colocándolo en una caja de Petri estéril. Se removió el exoesqueleto, y se extrajo el hepatopáncreas, el cual se pasó a otra caja de Petri estéril, más pequeña. Se le añadió solución salina balanceada de Hank's 0.26 M estéril, con antibióticos (1000 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina). Utilizando esta solución, se lavó tres veces el órgano completo. Luego, se decantó la solución y se cortó al órgano, en trozos lo más pequeños posibles. se le añadieron 10 ml de una solución de tripsina (1:250 de DIFCO) al 0.25 %, preparada con PBS (solución amortiguadora de fosfatos 0.26 M a un pH de 7.4); vertiéndose a continuación en un matraz Erlenmeyer de 25 ml con tapón estéril, que ya contenía una bala magnética. Se tripsinizó durante 20 minutos, en agitación a una velocidad media.

Al concluir los 20 minutos, el tripsinizado se filtró a través de dos capas de gasa estéril, recibiendo el filtrado en una probeta, donde previamente se colocó 1 ml de suero fetal bovino. El filtrado se vació a unos tubos de ensayo con tapón de rosca. Se procedió entonces a centrifugarlo 15 minutos a 1500 rpm.

El sobrenadante se decantó y el paquete celular obtenido, se resuspendió en 5 ml de medio M199 (Grand Island Biological Company), preparado con un 20 % de suero fetal bovino.

Se tomó 0.1 ml de la suspensión celular, colocándosele en un tubo estéril. El resto de la suspensión se sembró en una caja Falcon de plástico nueva. Añadiéndosole 5 ml más de medio M199 (se utilizaron además medios MEM, L-15 y RpMI, siguiendo esta misma técnica).

La caja se incubó a 34 °C, observando el desarrollo celular cada 3 a 5 días.

Se tomó 0.1 ml de suspensión celular, se le agregó 0.1 ml de Nigrosina 0.2 %. Se montó una cámara de Neubauer, donde se colocó la suspensión celular teñida con nigrosina, para conocer el número de células viables sembradas por ml (las células muertas sufren cambios en la permeabilidad de su membrana, tiñéndose de negro, mientras que las vivas no absorben el colorante permaneciendo incoloras). Siguiendo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{total de células vivas}}{\text{\# total de cuadros utilizados}} \times \text{Factor de dilución (2)} \times 10^4 = \frac{\text{\# células}}{\text{ml}}$$

Las células se subcultivaron cada 5 días. Esto se hizo tomando la mitad del contenido de la caja Falcon, es decir 5 ml, y pasándola a otra donde se le añadieron otros 5 ml de medio M199 nuevo.

Para los dos primeros pases se utilizaron cajas Falcon de plástico con capacidad total de 25 ml; en el tercer pase se sembró en tubos de Leighton de cristal (en cada uno se colocó 0.5 ml de suspensión celular y 0.5 ml de medio nuevo), o en botellas de cristal planas (5 ml de suspensión celular + 5 ml de

medio nuevo). El cuarto se sembró en botellas o tubos de Leighton de cristal; mientras que el quinto pase se sembró en microplacas de 96 pozos de fondo plano y plásticas, o en cajas Falcon de este material.

Antes de utilizar, cualquiera de los medios y soluciones se verificó su esterilidad, sembrando una alícuota de los mismos en medio líquido de tioglicolato, agar cerebro-corazón y Sabouraud, para detectar la presencia de bacterias y hongos.

Ya habiendo obtenido los cultivos celulares se tomarán fotografías de los mismos, en microscopía óptica.

* Donados por el Dr. Carlos Rosas, Jefe del Departamento de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias, UNAM; fueron proporcionados 10 *P. aztecus* y 6 *P. setiferus*. El resto de los ejemplares fueron capturados con atarraya en la Laguna de Mandinga, Veracruz.

** Donados por el M. en C. Heriberto Duarte Moreno, Representante de la Granja en Puerto Peñasco, Sonora, del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS).

*** Marca comercial de sales para la preparación de agua de mar artificial.

RESULTADOS

Los ejemplares a los que se hace referencia dentro del texto de material y métodos, consideran sólo a aquellos que sobrevivieron las condiciones de stress a las que fueron sometidos.

Originalmente se contó con 120 individuos dentro de la población A, y 100 en la población B. Durante el transporte de Veracruz a la Ciudad de México, la población A sufrió una mortalidad del 10 %. La población B consistía de 50 *P. californiensis* y 50 *P. vannamei*, esta presentó una mortalidad del 5 % en el transcurso de su transporte desde Puerto Peñasco, Sonora hasta la Ciudad de México, que requirió de 18 hrs. aproximadamente, lapso durante el cual la temperatura del agua bajó de 29 °C a 18 °C.

Las mortalidades alcanzadas dentro de los acuarios y producto de las condiciones estresantes fueron de: 75.8% para la población representante del Golfo de México y de 37.9 % para la población de camarones del Pacífico.

Método A:

Los ejemplares que se trabajaron utilizando el método A, fueron exclusivamente representantes del Golfo de México, con una talla promedio de 44.6 mm de longitud total y un peso húmedo promedio de 1.6 grs (ver cuadro 1). Dentro del método A sólo se trabajó con MEM.

Los cultivos obtenidos por este método, presentaron

todos contaminaciones bacterianas que no se lograron controlar aún con el uso de antibióticos (en las concentraciones más altas permisibles: 1000 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin). Se hizo una tinción de Gram, observándose bacilos gram negativos polares en gran cantidad.

Así en ninguno de los cultivos hechos siguiendo el método A, se logró observar a las células de hepatopaneas, salvo, justo después de sembrar. Estas son células grandes y redondas, que presentan un núcleo y algunas vacuolas.

Método B:

En los métodos A y B, se tuvieron problemas debido a que el manejo de los camarones durante el lavado es bastante difícil. Estos son animales muy resistentes, a menudo saltaban saliéndose de las cajas de Petri, o mediante contracción brusca y fuerte del abdomen se soltaban al estarlos sujetando con las pinzas.

En este método se utilizaron también, exclusivamente, *P. aztecus* y *P. setiferus* (especies nativas del Golfo de México). La talla promedio de estos individuos fué de 67.5 mm de longitud total, y su peso húmedo promedio era de 3.2 grs. Para este método, se usaron los medios MEM y RpMI (ver cuadro 2).

Los resultados obtenidos con el método B, fueron cultivos contaminados con bacterias, y levaduras.

Para controlar el crecimiento de las levaduras, se añadió al medio nistatina a una concentración de 100 mg/ml. Junto con la nistatina se añadieron también los antibióticos

(penicilina-estreptomocina), en la misma concentración antes mencionada. Aun con la aplicación del antimicótico, el crecimiento de las levaduras no se modificó.

Sólo en una ocasión se observaron células de camarón que sobrevivían, aún en la presencia de contaminación tanto bacteriana como por levaduras. Esto sucedió en un tubo de Leighton, donde la población celular de hepatopancreacitos era muy pequeña. Se intentó rescatar, observándose, que al realizar varios lavados de las células con solución de Hank's con antibióticos y nistatina, la población de bacterias y levaduras disminuyó, observándose una lenta recuperación de los hepatopancreacitos.

Método C:

La población B, representante del Pacífico fué utilizada enteramente para realizar este método. La talla promedio para *P. californiensis* fué de 70 mm de longitud total y peso húmedo promedio de 3.5 grs (ver cuadro 3). Para *P. vannamei*, la talla promedio era de 72 mm y el peso húmedo promedio de 4.0 grs (ver cuadro 4). Los medios utilizados dentro de esta metodología fueron: MEM, RpmI, L-15 y M199.

En este último método se manejó al animal anestesiado por frío, además de un conteo de células al hacer el cultivo, de manera que se conociera el número total de células viables por mililitro sembradas. El promedio obtenido de estas para *P. californiensis* como para *P. vannamei*, fué de 1.9×10^6 células/ml (ver cuadros 3 y 4).

Los resultados observados en el cuadro 5 (número de células viables sembradas/ml), se relacionaron con los medios utilizados, observándose que se obtiene un mayor número de células viables por ml utilizando medio M199, que con cualquiera de los otros medios empleados durante la investigación (Cuadros 3 y 4; figuras 1 y 2). En los cuadros 5 y 6 se muestra la relación entre el peso húmedo en gramos de los camarones vivos y el número de células viables sembradas/ml de acuerdo al medio utilizado; las gráficas correspondientes se muestran en las figuras 3 y 4. En estas últimas se puede observar que no sólo hay una relación en cuanto a la variación del número de células viables/ml / el medio utilizado, sino que también hay una relación entre el peso húmedo de los camarones vivos y el número de células obtenidas. Siendo esta última, el que hay una variación en el número de células, aumentando conforme aumenta el peso húmedo de los individuos.

Se empezaron a ver resultados satisfactorios cuando las poblaciones de bacterias y de levaduras disminuyeron significativamente. Así, se observan células grandes redondeadas, con un núcleo y algunas vacuolas. Se observan a menudo células que se encuentran unidas, pero siempre el núcleo de las dos células se encuentra bien definido. Existe evidencia de que existe una constricción celular, lo cual sugiere una división amitótica. El crecimiento de la población es lento y se necesita de un buen número de estas células para que esto sea perceptible.

Las células que crecen en suspensión, en uno de los

ensayos, se comportaron de manera diferente. Al hacer un subcultivo a partir de un tubo Leighton, a una microplaca plástica de 96 pozos de fondo plano, las células que correspondían a un quinto pase, se fijaron al sustrato pero no se observó que la población aumentara.

Las células obtenidas por este método son grandes, vacuolizadas y con grandes núcleos. Al ser sembradas se observaron redondeadas al microscopio óptico, mientras que a aumentos mayores se ven cilíndricas con núcleos ligeramente desplazados hacia la periferia. Su citoplasma es heterogéneo, vacuolizado y algunas presentan gotas lipídicas sujetas a las células como si estuvieran siendo secretadas.

En los primeros pases (primera a tercero), podemos observar a una población celular más o menos homogénea, las células son redondas, algunas con núcleos periféricos. Muchas se observan secretando la mitad de su contenido celular. En estos también se observaron a células juntas, con un cierto grado de constricción, es decir, dividiéndose amitóticamente. Algunas de estas células presentan una capa refrigente.

La mayoría de las células en los últimos pases (cuarto a quinto), presentan núcleos periféricos. Observadas a 1000 x son redondeadas, vacuolizadas y con un citoplasma heterogéneo. Se tomaron fotografías en las cuales se observa el final de la división celular. Así también, una de las fotografías presenta una célula con núcleo periférico, vacuolizada; una de las vacuolas se encuentra abierta hacia el medio. Todas las

células observadas se encuentran rodeadas por una capa refringente. Las fotografías tomadas en microscopio óptico son de células vivas sin teñir (ver figuras 7 a 12).

DISCUSION

Existe una gran variedad de enfermedades que atacan a los camarones pensidos (13, 24, 31, 32, 33, 36, 38, 39, 55, 56, 57). Estas pueden ser causadas por múltiples agentes etiológicos como son virus, bacterias y hongos; además de enfermedades llamadas ambientales sin relación con agentes microbiológicos específicos y que se manifiestan cuando existen cambios en los parámetros fisicoquímicos del agua. Otras enfermedades importantes son las relacionadas con los aspectos nutricionales (deficiencias o intoxicaciones).

Estos factores deben de considerarse en los diferentes procesos de investigación y contar con animales sanos. Una alternativa es el empleo de camarones SPF (specific pathogen free- libres de patógenos específicos), pero estos son de difícil adquisición. Sin embargo, fué imprescindible demostrar el estado de salud de los donadores de tejidos con los que se contaba, que eran animales convencionales. La presencia de enfermedades subclínicas se manifestaría cuando los camarones se sometieran a estados de tensión como: una elevada concentración de nitritos, nitratos y amonio; concentraciones inadecuadas de sales; temperaturas subóptimas o supraóptimas; baja o alta concentración de oxígeno, pH, etc (Lightner, Bell y colaboradores). La metodología utilizada para controlar estas variables consistió en someter a la población a estados de tensión que fueron: sobrepoblación y concentraciones altas de compuestos nitrogenados, durante un período de cuarentena y la observación

clínica de los camarones. Se esperaba la manifestación de signos clínicos y lesiones como serían anorexia, cambios en el comportamiento, ablandamiento de la cutícula, cambios de coloración, presencia de zonas necróticas y mortalidad.

El equipo disponible permitió controlar algunos de los parámetros antes mencionados que fueron: temperatura, salinidad, fotoperiodo y pH. El mantener concentraciones altas, pero no letales de compuestos nitrogenados se facilitó debido a la sobrepoblación de los acuarios. Esto también causó algunos problemas, los niveles de estos compuestos se incrementaron hasta concentraciones tóxicas en varias ocasiones, controlándose mediante recambios de agua hasta del 80 % del volumen total del acuario. Periódicamente, cada tercer día, se hacían recambios del 20 %, para mantener las concentraciones de compuestos nitrogenados. Moe y Spotte (44, 53), recomiendan que cuando existen concentraciones tóxicas o letales de estos compuestos, se controlen mediante recambios de por lo menos el 50 % del volumen total del acuario.

No se trabajó con salinidad y temperatura, porque estos dos parámetros están íntimamente relacionados con las enfermedades ambientales. Cuando existe un cambio paulatino y no brusco de estos dos parámetros, no se presentan problemas. Sin embargo, el cambio brusco de cualquiera de ellos, o de ambos, puede detonar alguna de las enfermedades ambientales, como la necrosis muscular espontánea (28).

Otra razón para no utilizar a la salinidad como factor

estresante, es que los niveles subóptimos o supraóptimos causan problemas en la osmorregulación de los organismos marinos; debilitando en extremo a los animales, además de no ser el único factor estresante que se iba a manejar, ya que se ha comprobado que es una combinación de varios factores los que provocan la aparición de enfermedades. La temperatura interactúa con la salinidad, modificando la capacidad osmorreguladora de los crustáceos decápodos hiperosmóticos moderados (los cuales admiten diluciones del medio externo hasta de 1/3 de la salinidad normal), como son los camarones del género *Penaeus* (17).

La mortalidad resultado de las condiciones de tensión en las poblaciones con las que se trabajó fueron altas. Aunque, debió determinarse la causa de la muerte de los individuos, no se realizó, ya que el fin de este tratamiento fué seleccionar sólo aquellos animales que se encontraran sanos, fueran resistentes y no presentaran signos de enfermedad, debilidad o conductas anormales.

El aspecto nutricional de los camarones se cuidó, dándoles como alimento a las poblaciones de *P. setecus* y *P. setiferus*, camarón congelado, almeja, ostión y pescado frescos. Se les alimentaba dos veces al día (mañana y noche), permitiéndoles comer durante dos horas antes de retirar los restos de alimento. La eliminación de restos de comida se hizo, para no provocar un aumento en la concentración de compuestos nitrogenados. En estas poblaciones, no se detectaron deficiencias nutricionales (ablandamiento de la cutícula, cambio de

coloración. canibalismo), siendo un indicio de que se cumplió con los requerimientos nutricionales de los camarones.

Las poblaciones de *P. californiensis* y *P. vannamei*, se alimentaron también dos veces diarias (mañana y noche), pero utilizando alimento balanceado comercial comprimido. A esta población se le dió una ración correspondiente al 5 % del peso promedio de la población multiplicado por el número de individuos. Al igual que para las especies del Golfo de México, se les permitió comer durante dos horas antes de retirar los restos de alimento. Para estas dos poblaciones tampoco se observaron deficiencias nutricionales, hasta el término del experimento, ya que algunos camarones blancos, demostraban una coloración azul-verdosa, lo cual se atribuyó a la falta de carotenoides y xantofilas dentro de la dieta.

Para realizar el trabajo se utilizaron postlarvas tardías y juveniles de cuatro especies de penéidos. Los estadios postlarval y juvenil fueron escogidos debido a que es en ellos, que la mayoría de las enfermedades virales causan las mortalidades más altas (9, 13, 24, 31, 33, 36, 38, 39, 49, 55, 56, 57). La ventaja de utilizar individuos jóvenes es que son más resistentes al transporte, permitiendo que se contara con un buen número de ejemplares para trabajar. Además, sus tejidos tienen una mayor capacidad de división, es por esto último que en cultivo celular se prefiere utilizar individuos jóvenes o embriones como fuentes donadoras de células. Sin embargo, cualquier individuo sano puede ser donador. A lo anterior hay que

añadir, que los camarones entre más jóvenes o más pequeños (en tamaño y peso), son más susceptibles al ataque de cualquier de las enfermedades virales (9); siendo sus células la mejor opción para la replicación de este tipo de virus.

El órgano que se seleccionó para trabajar en este proyecto fué el hepatopancreas. Aunque tiene funciones glandulares, las células de que se compone son epiteliales, y se ha observado que este tipo de células crecen adecuadamente *in vitro*, aunque pueden ser exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. El hepatopancreas, es un órgano fácil de identificar por su tamaño, especialmente en postlarvas tardías y juveniles. Es un órgano vital para el camarón, además de ser el órgano blanco primario de cinco de los seis grupos de virus de los camarones peneidos y secundario del sexto (8, 11, 12, 13, 17, 24, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 42, 43, 49, 54, 55, 56, 57). Este órgano, y los cambios morfológicos que sufren sus células, se utilizan para monitorear el valor nutricional de dietas o alimentos para camarones peneidos (58).

Entre las desventajas del hepatopancreas como fuente de células para el cultivo *in vitro*, están: el hecho de que las células glandulares presentes en el tejido (células-B) (2, 22), no son fáciles de mantener *in vitro*: es un órgano en el que encontramos bacterias y hongos (levaduras principalmente), en su lumen que acompañan al alimento desde el estómago; dos de los cinco tipos celulares presentes en el hepatopancreas al final de la digestión (que dura aproximadamente 24 hrs), degeneran y

mueren siendo desechados en las heces junto con el material no procesado. Otro factor muy importante es que existen varias teorías, apoyadas por distintos autores (Al-Mohanna y Colaboradores; Gibson y Barker), de la existencia de la transformación de un tipo celular a otro con distintas funciones. Dentro de estas, el único punto que tienen en común la mayoría de ellas es que las células-E son el inicio de esta serie de transformaciones.

Para realizar cultivos celulares, es importante el conocer los requerimientos nutricionales de las células a cultivar. Si no existe información al respecto, como en este caso, el conocer al menos los requerimientos nutricionales de los animales donadores (como grupo), puede ser un buen principio. Aún mejor resulta el conocer los requerimientos por especie. En general, las dietas de los camarones peneidos se han elaborado tomando como patron las dietas utilizadas en el cultivo de peces. Aunque existen algunos trabajos sobre los requerimientos de ciertas especies como *P. vannamei*, en él se basa la formulación de alimentos comerciales que se utilizan hoy en día, para *P. monodon*, *P. schmitti*, etc. Al igual que todas las otras especies animales, estos requerimientos varían dependiendo de la edad (en este caso estadio), del o de los animales (4, 18). Como todo organismo vivo sus requerimientos son de: proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas.

Las dietas para postlarvas tardías y juveniles contienen aproximadamente el 20 % de proteína animal, estas se

proporcionan principalmente en forma de harina de pescado, de camarón o de calamar, o combinaciones. Además, se usan proteínas vegetales que se adicionan generalmente en forma de soya. Se ha comprobado en varios estudios, que los requerimientos de aminoácidos comprenden todas las sustancias de este tipo, y que dependiendo de la especie es la cantidad requerida de cada uno de ellos (50). Una parte importante de las dietas, que constituye entre el 4 y 9 %, son los ácidos grasos poliinsaturados, los fosfolípidos y el colesterol. En cuanto a los carbohidratos se ha demostrado que la glucosa obtenida de la digestión de polisacáridos es mejor asimilada que la glucosa pura; se les agrega también glucosamina en una proporción del 0.53 %, ya que es necesaria para la síntesis de quitina. Aunque existen pocos estudios en cuanto a los requerimientos vitamínicos, se ha determinado que los crustáceos requieren de la mayoría de las vitaminas del grupo B, así como de las vitaminas C y E, ya que la vitamina A puede ser sintetizada por el camarón a partir de precursores como los carotenoides. Los estudios que se relacionan con las necesidades de minerales, también son escasos. Se sabe que los requerimientos de fósforo son altos (alrededor del 1.5 % de la dieta). También, se conocen como minerales esenciales al magnesio y al potasio (18).

La literatura que existe en la actualidad con respecto al cultivo de células de origen peneido, se limita al reporte hecho por Chen en 1986 (14). En este no se menciona a que pH se manejó el medio, ni tampoco la temperatura a la que se incubaron

los cultivos. Metselaar en 1982 (43), menciona que la temperatura óptima para la incubación de cultivos celulares de artrópodos es de 28 °C; mientras que Siegel (51), dice que la temperatura óptima en el caso de los cultivos de tejidos de peces es de 25 °C. La salinidad del medio depende de la especie que se vaya a trabajar. Las soluciones y medios utilizados en el cultivo celular tienen una concentración de sales de 0.2 M, que es isotónica para las células. Siegel (51, 52), recomienda añadir suficiente cloruro de sodio a los medios y soluciones utilizadas, para el cultivo de células de peces teleosteos marinos, para elevar su concentración de sales en 0.06 M, obteniéndose así una solución al 0.26 M. En el caso de elasmobranquios hay que aumentar más la salinidad. Aunque el pH del agua de mar es alto (alcalino, 8.2-8.6), no se hace mención, dentro de las metodologías utilizadas para peces marinos y artrópodos, del pH utilizado. Las sustancias utilizadas en el cultivo celular de tejidos de origen mamífero tienen un pH que oscila entre 7.2 y 7.4.

En el método A se siguió el mismo esquema de la metodología utilizada en el cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo (5, 7, 23, 25, 26, 28, 43, 47, 48). Aunque fué obvio el que las células de hepatopancreas tendrían requerimientos nutricionales distintos al de los fibroblastos, se decidió trabajar con medio esencial de Eagle (MEM), ya que este se utiliza no sólo para mantener fibroblastos sino muchos otros tipos celulares. Generalmente, se usa con un 10 % de suero fetal

bovino enriqueciendo los medios utilizados en cultivos primarios, como el que se iba a intentar, en este caso se decidió adicionar un 15 % de suero fetal bovino, proporcionando así un medio más rico a las células. La salinidad de ninguna de las soluciones utilizadas en este método, se modificó, de manera que se pudiera observar como se comportaban las células frente a una solución salina fisiológica.

Al ser los camarones organismos acuáticos, se sabía que el riesgo de contaminación era mucho mayor que al trabajar con organismos terrestres. Debido a que el agua que los circunda es un ambiente en donde encontramos gran variedad de microorganismos. Por esto se consideró necesario lavar primero a los camarones externamente, y luego al órgano aislado. A manera preventiva se utilizaron antibióticos, pero sólo en el medio nutritivo. Cabe mencionar que todos los camarones de cada una de las poblaciones utilizadas, estuvieron compartiendo el mismo estanque, así se parte de que su microflora y microfauna sea la misma. Y por lo tanto, los contaminantes encontrados en los cultivos celulares también sean los mismos.

El resultado, en los primeros intentos hechos siguiendo el método A, fue el mismo: muerte de las células por contaminación bacteriana. Sólo en un caso, se observaron formaciones semejantes a colonias celulares, pero al hacer una tinción de Giemsa se identificaron como colonias bacterianas. Se corrió entonces una tinción de Gram, lo cual permitió clasificar a las bacterias como bacilos gram negativos polares. Con el fin

de encontrar un antibiótico que pudiera erradicarlos se hizo un antibiograma utilizando antibióticos de amplio espectro como cloramfenicol, gentamicina, penicilina y estreptomina. Ninguno de ellos inhibió totalmente el crecimiento bacteriano.

De esta experiencia se concluyó lo siguiente: 1) Que era necesario el hacer más lavados, o igual número de lavados pero más prolongados, de manera que se eliminara el mayor número de microorganismos contaminantes. 2) Aún habiendo lavado repetidamente al camarón externamente, el lavado del órgano antes de someterlo a la acción de la tripsina era necesario. 3) Las soluciones con las cuales se lavaría al camarón externamente, así como la utilizada para lavar al órgano, deberían contener antibióticos y antimicóticos (estos últimos para evitar las contaminaciones por levaduras y hongos, que aún no habían sido detectadas). 4) A las soluciones utilizadas se les debía modificar la salinidad, según la propuesta de Siegel (51), en 0.06 M, obteniéndose así soluciones 0.26 M (la molaridad de una solución fisiológica es 0.2).

Así, en el método B se siguieron los mismos pasos que en el método anterior; excepto que los lavados fueron más prolongados, utilizándose para ello una solución al 0.26 M con quinolona (ácido 1-ciclopropil-7-[4-etil-1-piperacina]-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinoleína-carboxílico). El espectro de acción de este producto incluye a gérmenes gram negativos, gram positivos y micoplasmas, actuando tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Como este producto es muy tóxico para las

células, se utilizó a una concentración de 1:20,000. Otra diferencia con respecto al método A, fue el uso de otro medio nutritivo el RpmI 1640, además del MEM.

Siguiendo este método tampoco se pudo observar crecimiento de la población de hepatopancreacitos *in vitro*. La contaminación observada en este caso no fué sólo provocada por bacterias sino también por levaduras. El desarrollo de la población de levaduras pudo verse favorecida por la salinidad del medio (0.26 M), y la disminución de la población bacteriana que se logró mediante la aplicación de antibióticos. Para eliminar a las levaduras se utilizan en el cultivo celular nistatina y anfotericina B, ambos compuestos son muy tóxicos para las células, por lo tanto su empleo es delicado. Dentro de la metodología se utilizó la nistatina en la concentración de 100 mg/ml. La nistatina sólo se añadió al medio nutritivo.

Hubo sólo un caso en el que se vió que la población de hepatopancreacitos sobrevivió aun en la presencia de contaminación, tanto bacteriana como por levaduras. Esta no se pudo rescatar, ya que al añadir el antimicótico, se produjo un efecto citotóxico (aglutinación de las células), que causó su muerte. Al final, todos los cultivos hechos mediante este método se desecharon.

A partir de esta segunda experiencia surgieron nuevos problemas: Aunque la contaminación bacteriana ya podía ser controlada, el nuevo reto era eliminar la contaminación por levaduras. Esto no fue nada fácil, debido a que los antimicóticos son muy tóxicos para las células, por lo que no se podía

adicionar al medio y a las demás soluciones en concentraciones altas. La alternativa fué el uso de desinfectantes como el yodo y el benzalconio, pero sólo para la eliminación de los microorganismos que se encontraran sobre el exoesqueleto. Si el hepatopaneas se expusiera directamente a su acción se provocaría una destrucción del tejido. Sin embargo, el hepatopaneas también contiene microorganismos ya que pertenece al sistema digestivo. La interrogante entonces fué como eliminar en su mayor parte a los contaminantes contenidos dentro del órgano. Esto podía ser comprobado por la aparición de contaminación, de cualquier tipo, unos días después de realizado el cultivo. A este respecto se observó que la contaminación bacteriana aparecía de 2 a 3 días después de hecho el cultivo, la de levaduras entre 3 y 5 días, y la aparición de mohos en 8 días aproximadamente.

Para descartar que las fuentes de contaminación fueran las soluciones, todas se sometieron a pruebas de esterilidad. Sembrando una alícuota de ellas en medios nutritivos para promover el crecimiento de microorganismos presentes. Se utilizó caldo tioglicolato y agar cerebro-corazón para detectar bacterias tanto anaerobias como aerobias; para detectar la presencia de levaduras y hongos se utilizó medio Sabouraud. De esta manera se desechó la posibilidad de que los medios estuvieran contaminados. Los resultados indicaron que durante el procesamiento de la muestra no se eliminaron los contaminantes.

En el método C. se corrigieron las deficiencias de los

dos métodos anteriores. Para facilitar el manejo de los camarones durante su procesamiento, estos se anestesiaron después de ser medidos y pesados. Esto se consiguió introduciéndolos dentro de una caja de petri al refrigerador (4 °C), durante 5 minutos. El tiempo máximo promedio en que los camarones lograban sobrevivir en refrigeración es de 8 minutos, después de este tiempo morían, o quedaban demasiado débiles.

Era importante que los camarones no estuvieran muertos debido a que el hepatopáncreas es el primer órgano en descomponerse a la muerte del animal, producto de la acción de la variedad de enzimas que se producen en él (21, 22). El animal debía estar anestesiado para facilitar su manejo, pero no debía morir, ya que el proceso entero de lavado toma poco más de 35 minutos. Tiempo en el cual las enzimas que produce el hepatopáncreas tendrían condiciones adecuadas y tiempo para actuar y lastimar el tejido. Además, entre las enzimas que produce este órgano, encontramos a la tripsina. Como se mencionó antes, esta enzima puede dañar e inclusive causar la muerte celular, si los tejidos son expuestos mucho tiempo a su acción. En caso de que el animal estuviera muerto, y considerando el tiempo que se utiliza en la disgregación del órgano, el tejido estaría expuesto a la acción enzimática durante más de 50 minutos. A consecuencia de esto, el tejido se vería dañado, y la cantidad de células viables que se sembraran sería mucho menor al obtenido. Esto se pudo comprobar cuando hubo muerte de los camarones en el proceso de lavado, el número de células viables

sembradas fué mucho menor como se puede ser en el cuadro 5 (indicadas por un <).

El número de células que se presenta en los resultados corresponde al número de células viables totales que se sembraron. No se calculó la viabilidad de cada uno de los cultivos. Se conoce que son células viables porque al hacer el conteo en el hemocitómetro, habiendo teñido previamente con nigrosina, sólo se contaron aquellas que no se colorearon (es decir, las células vivas). Como se puede observar el número de células viables sembradas es de 1.9×10^6 células/ml; en este caso no se estandarizó el número de células viables en cada uno de los cultivos, como se hace en el caso de células de origen mamífero (por lo general, se siembran en estos casos de 3.0 a 4.0×10^5 células/ml).

Durante los lavados lo que se hace es primero exponer a los camarones a una solución de yodo al 1%, este al igual que el benzalconio, tiene poder bactericida y fungicida; además es viricida, detergente y removedor de grasas. El manejar al camarón anestesiado ayuda a que este no salte o se mueva durante los baños de yodo y benzalconio, facilitando en gran medida su lavado. Después de cada uno de los baños mencionados en la metodología, se lavó al camarón durante 5 minutos en una solución salina al 0.47 M, que permite la eliminación del desinfectante antes de someter al animal al siguiente paso. Generalmente, los camarones al ser introducidos en el segundo baño de solución salina 0.47 M se recuperaban casi totalmente. Sin embargo, en dos

casos el ejemplar murió durante el lavado con yodo. El número de células obtenidas en estos casos fue menor al del resto y las células sobrevivieron sólo al primer pase (ver cuadros 3 y 4).

Al lavar a los camarones en una solución salina con antibióticos y nistatina durante 20 minutos, se pretendió eliminar a los contaminantes que se encontraron en el lumen del hepatopáncreas (muchos de ellos pertenecientes a la fauna natural de los camarones), dándoles tiempo suficiente a los medicamentos para que pudieran ejercer su acción. Se lava nuevamente con solución salina sin antibióticos, para que los microorganismos debilitados o muertos se desprendan y queden en esa solución.

La solución salina para lavar externamente al camarón se utilizó a una concentración del 0.47 M debido a que ésta es equivalente a la salinidad en la cual se mantuvieron en el acuario.

Cuando ya se hubo extraído el hepatopáncreas, éste se colocó en una caja de petri más pequeña estéril, de manera que los contaminantes que se encontraron se diluyeron al hacer los lavados con solución de Hank's 0.26 M con antibióticos. En este caso, ya no se le añadió nistatina a la solución para evitar un efecto citotóxico. La salinidad de la solución de Hank's que se utilizó fue de 0.26 M, es decir, casi la mitad de la de la solución con que se lava el camarón externamente.

La tripsina utilizada, al igual que el medio nutritivo, contienen sales que les dan una salinidad de 0.2 M, no existiendo modificaciones en estas soluciones en la metodología. Se puede

utilizar también tripsina con una salinidad de 0.26 M, sin observarse cambios en los resultados obtenidos.

De los medios utilizados, con el que se obtuvieron mejores resultados fué con el M199. Este se utiliza generalmente para crecer células sanguíneas, aunque se puede utilizar para cualquier tipo de células, el crecimiento de las cuales variará si no se cumple completamente con sus requerimientos nutricionales. El factor que hizo de este medio el más adecuado, fué la presencia de Tween 80 y colesterol dentro de su fórmula. El Tween 80 es un aceite que se utiliza entre otras cosas para la fabricación de emulsiones. El Tween 80 actúa como una fuente de lípidos, y sustituye algunos ácidos grasos necesarios para la células. Además ayuda a la incorporación de algunos compuestos no solubles en agua, debido a que es un potente tensoactivo sintético formado por ésteres oleicos parciales de anhídrido de sorbato. El colesterol es una lipoproteína que pertenece al grupo de los esteroides. Se encuentra en mayores concentraciones en las membranas plasmáticas de muchas células animales. Aunque también es un componente menor de las membranas de algunos organelos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Se ha demostrado la importancia de este último compuesto dentro de las dietas siendo esencial, y agregándolo en forma de harina de cabeza de camarón, harina de calamar o en el caso de alimento para larvas en forma de algas (enriquecidas con él artificialmente), para el adecuado crecimiento de los camarones cultivados en granjas (15, 16, 18, 21, 45).

El contenido de lípidos en el hepatopáncreas es alto, siendo los fosfolípidos los de más alta concentración (21). Esto implica que la presencia de fuentes de ácidos grasos o los componentes mismos de las células estén disponibles en el medio, de manera que las células no sólo se mantengan, sino que también cuenten con los elementos necesarios para la división celular.

El resto de la composición química de los medios es adecuada para las células, ya que contienen iones y minerales, que pueden ser utilizados por las mismas. Todos los medios contuvieron un 20% de suero fetal bovino. Además, se suplementaron con vitaminas y aminoácidos esenciales, de manera que éstos no fueran un factor limitante.

Al observar que el número de células viables por ml obtenidas en los diferentes ensayos hechos eran variables, se intentó relacionar estos resultados con el medio utilizado en cada caso. Al hacer la relación que se muestra en las figuras 1 y 2 (con los datos de los cuadros 3 y 4), se observó que el número de células obtenidas con medio M199 es mucho mayor que aquel que se obtuvo con los otros tres medios utilizados (MEM, L-15 y RpMI 1640).

En la comparación anterior no se tomó en cuenta el peso húmedo de los camarones vivos, que está íntimamente relacionado con el número de células obtenidas. Es así, como se agrupó a los camarones en clases de acuerdo a su peso húmedo, y en relación a esto se sacaron los promedios del número de células viables/ml obtenidas, separándolos a su vez en relación al medio utilizado

en cada caso. Esto permitió la observación más clara de la diferencia entre el número de células viables/ml obtenidas con respecto al medio, ya que al clasificarlos de acuerdo a su peso húmedo se homogeneizó a la parte de la población que se estaba analizando. Se obtuvieron así, las gráficas que se muestran como figuras 3 y 4. En ellas, también se puede ver que el número de células obtenidas con los medios MEM, L-15 Y RpMI 1640, se mantiene más o menos constante; aunque si hay un aumento del número de células con respecto al peso húmedo de los individuos analizados, que se debe a que a mayor tamaño mayor número de células. La diferencia existente (mostrada en las figuras 3 y 4), debe analizarse estadísticamente para comprobar que realmente se debe al tipo de medio utilizado y no al azar. Lo anterior no se realizó debido a que no estaba comprendido dentro de los objetivos de este trabajo.

El éxito del cultivo celular se debió a que el medio M199 es más rico que los otros tres medios empleados (ver apéndice C), y cumple más eficientemente con los requerimientos de las células hepatopancreáticas. Como lo sugiere el hecho de que todos los cultivos celulares exitosos, fueron realizados utilizando M199. Las células se dividieron hasta el quinto pase, degenerando paulatinamente en pasos subsecuentes. Se observó un aumento de la población celular de aproximadamente el 100%, es por esto que se realizaron los subcultivos. Para el quinto pase la población ya no se divide de esta manera (figuras 5 y 6). Sin embargo, pueden permanecer viables por tres meses, siempre y

cuando se les suministre con nuevo medio. Lo anterior se comprobó observando el comportamiento de las células: las células vivas que crecen en suspensión sedimentan rápidamente, mientras que las muertas tienden a flotar y a aglutinarse.

El número de células viables obtenidas con los medios MEM, L-15 y RpMI 1640 fué menor. lo que indicó que las necesidades inmediatas de las células no se cumplieron por lo que murieron en pocos minutos.

El número de pases o subcultivos realizados y la frecuencia de los mismos en todo cultivo celular depende de el desarrollo de las células y los fines para que se vayan a utilizar. En este caso, los subcultivos se hicieron cada cinco días debido a que en ese tiempo hubo un aumento de la población a casi el doble de la misma. Si se hubieran dejado más tiempo es probable que llegara un momento en que se produjera un efecto citotóxico y las células empezaran a morir por falta de nutrientes. El monitoreo mediante microscopia óptica y el no observar un aumento de la población, estableció que el número de pases a realizar eran cinco; el seguir subcultivando a las células no era necesario ya que la población no aumentaba considerablemente.

Es importante recalcar que durante este experimento no se estimuló el crecimiento y división celular con hormonas. Aunque no se pudieron localizar escritos sobre las investigaciones hechas en Estados Unidos y Francia, el trabajo de Chen (14), demuestra que él utilizó extractos de ovarios y músculo. En el ovario podemos encontrar concentraciones de

hormonas que varían de acuerdo al estado de maduración de los individuos utilizados para realizar el extracto. Algunas investigaciones en las que se utilizan cultivos celulares no parecen ser afectadas por la presencia de hormonas en el medio. Sin embargo, existen otras en las cuales el medio debe de estar libre de estas sustancias, por lo cual los cultivos que se estimulan con hormonas no serían de utilidad.

El cultivo celular de hepatopancreacitos muestra células grandes. Al inicio dentro de los primeros pases (1 a 3), se pueden distinguir por lo menos cuatro tipos celulares distintos. Las células en general son redondeadas, algunas con grandes vacuolas que parecen ser lipídicas (figura 8), otras no muestran núcleo, algunas presentan muchas vacuolas pero pequeñas, y aquellas que muestran núcleos ligeramente desplazados hacia la periferia (figura 8). Al hacer preparaciones frescas del segundo pase, se pueden observar a algunas células que se encuentran liberando al medio secreciones de forma merócrina (figura 9), estas células pueden ser consideradas como células-F. Sin embargo, conforme se les subcultiva los tipos celulares observados se reducen a dos, a partir del tercer pase se observan células nucleadas periféricamente (figuras 10, 11 y 12), y otras un poco más pequeñas y vacuolizadas. En el quinto pase se observa a una población dominada por células redondeadas, con citoplasma heterogeneo, vacuolizadas, con un núcleo periférico y rodeadas por una capa refringente (figuras 10, 11 y 12). A lo largo de la vida *in vitro* de las células, no se observa división mitótica de

las células. Estas parecen dividirse amitóticamente, como se muestra en la figura 10. La figura 7 muestra un corte de hepatopáncreas incluido en parafina y teñido con H&E (Hematoxilina- Eosina), que se utilizó como control, para poder comparar a las células y asegurar que se trata del mismo tejido.

Existen numerosas descripciones de las células que conforman al hepatopáncreas. Estas están compuestas principalmente por descripciones detalladas de la morfología citológica de cada uno de los tipos celulares para diversas especies de decápodos. En el caso de los peneidos, también podemos encontrar en la literatura la descripción del cambio morfológico de cada uno de los tipos celulares a lo largo de la digestión, así como en relación al estado de muda en el que se encuentre el animal (1, 2, 3, 58). La recopilación hecha por Gibson y Barker en 1979 (19), junto con trabajos de Al-mohanna y colaboradores (1, 2), mencionan que las células-B presentan una capa entérica que recubre su superficie apical, y que en un punto de la digestión el núcleo se encuentra en la periferia comprimido en esta posición por la aparición de una gran vacuola. Sin embargo, en lo observado al microscopio óptico y como lo muestran las figuras 10, 11 y 12, las células fotografiadas no presentaron esa vacuola, pero en todas el núcleo se encontraba localizado periféricamente. Una estructura que era desconcertante en un principio era la observación de una capa refringente que rodea completamente a las células. Esta capa refringente corresponde a la capa entérica de las células-B. Hasta el momento

de tomar e interpretar fotografías tomadas en microscopía electrónica, de las células que se obtienen en los últimos pases, sólo se puede suponer que las células presentes son células-B, ya que son las únicas que en la literatura se describen como poseedoras, en una etapa de su vida, de un núcleo periférico. Así, la célula que se presenta en la figura 12, en la cual se observa un par de vacuolas abiertas al exterior, pudiendo ser vacuolas pinocíticas que la identificarían como una célula-B; o quizá se encontrándose en un proceso de exocitosis, en cuyo caso se podría decir que la célula es una célula-F, ya que estas son las que supuestamente secretan por exocitosis enzimas al lumen del hepatopaneas.

En la literatura (1, 2, 22), se habla de que las células B y F se encuentran recubiertas por una capa entérica, pero sólo en su superficie apical; en lo observado en el microscopio óptico de las células recién sembradas, se puede constatar que no sólo estos tipos celulares poseen esta capa entérica, sino que también todos los otros tipos celulares la poseen, y que en algunas la misma recubre a toda la célula.

Anteriormente se mencionó que el cultivo celular es una herramienta muy utilizada dentro de las ciencias biológicas. La ventaja de ésta reside en el hecho de que se proporciona un medio muy homogéneo, requieren de una inversión económica relativamente baja, y ocupan poco espacio.

Su aplicación no sólo se limita a su utilización en la producción de diferentes sustancias útiles en las ciencias

biomédicas (como en la producción de vacunas, interferon, anticuerpos, etc.); sino que también es un valioso instrumento en la investigación. Se utiliza, asimismo, para el diagnóstico de enfermedades, la replicación y multiplicación de microorganismos, el estudio de los mismos y su relación con las células, como reactivo biológico en la experimentación con fármacos, en investigaciones de ciencia básica (por ejemplo en: fisiología celular, biología celular y molecular, genética); en la producción de reactivos con fines diagnósticos y de investigación, entre otras aplicaciones.

En el caso expuesto en esta tesis, el cultivo celular de hepatopancreaticos, puede dilucidar la polémica existente en torno a la función de cada una de las células; si se encuentra bajo influencia de neurosecreciones, cuales son estas y su efecto; se podrán comprobar las teorías existentes sobre la transformación de un tipo celular a otro; que es lo que promueve la diferenciación celular; porqué diferenciándose a partir de un sólo tipo celular (células-E), existen diferencias en cuanto al número de cada uno de los tipos celulares del hepatopancreas, etc. Al-mohanna y colaboradores (3), mencionan que las células-R pueden dividirse amitóticamente, esto puede comprobarse cultivandolas *in vitro*, también se podría ver si esto sucede para otros tipos celulares.

Por otra parte el cultivo de hepatopancreaticos será una herramienta muy útil en la investigación de los diferentes tipos de enfermedades virales, permitiendo también tener un medio

de replicación que lleve a contar con un lote de virus de alta calidad para estudios posteriores. El observar la evolución de la enfermedad *in vitro* puede revelar detalles clave que ayuden en la prevención y control de dichas enfermedades. Se podrá conocer si el agente causal de una enfermedad es uno sólo o varios, y cual es el papel de cada uno de ellos.

Este estudio aporta nuevas experiencias que serán útiles para diseñar una técnica de cultivo de tejidos de los camarones peneidos, que en un momento pueda extrapolarse hacia un conocimiento mayor de los crustáceos decápodos que son importantes económicamente, así como de otros invertebrados marinos.

CONCLUSIONES

- 1) Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el cultivo de células hepatopancreáticas es posible; obteniéndose hasta cinco pases en los cuales se observó un aumento marcado de la población celular (aproximadamente 100 %).
- 2) El número de células viables obtenidas (1.9×10^6 células/ml), es el suficiente como para estandarizar esta técnica con cualquiera de los métodos utilizados en el cultivo celular de células de origen mamífero.
- 3) La división de las células es amitótica.
- 4) Las células pueden sobrevivir *in vitro* durante tres meses, como un cultivo en suspensión.
- 5) Al ser un cultivo primario este consta de varios tipos celulares. En los primeros dos pases se observan cuando menos cuatro tipos celulares. A partir del tercer pase, uno de ellos empieza a dominar, mientras que los otros empiezan a degenerar. En el cuarto y quinto pase se observan dos tipos celulares, aunque con una marcada dominancia de uno de ellos.
- 6) Las células dominantes, observadas a partir del tercer pase, son: grandes, redondeadas, con núcleos periféricos, muy vacuolizadas y rodeadas por una cubierta que podría ser proteica (tal vez equivalente a aquella descrita en la literatura, que protege a las células hepatopancreáticas en su superficie apical).
- 7) Con fundamento en lo anterior, y al descubrir vacuolas abiertas al medio, probablemente las células dominantes

observadas pertenezcan al tipo B o al F.

8) El medio M199, fue el más adecuado para el cultivo de hepatopancreacitos. Lo cual se debe a que contiene fuentes lipídicas, colesterol y Tween 80, lo cual parece determinar el éxito de la supervivencia de las células *in vitro*.

9) Una innovación de la técnica, durante este trabajo, es el lavado externo sucesivo del camarón con desinfectantes como parte esencial de la misma. Las técnicas descritas para otros cultivos celulares, pueden recomendar una desinfección profunda de la zona donde se haría la incisión para obtener el tejido a cultivar; pero nunca en forma de lavados sucesivos.

RECOMENDACIONES

- A) Se hace necesario continuar con este tipo de investigaciones y obtener una línea celular, tanto como estudios de microscopía electrónica.
- B) Adicionar colágeno a los tubos o botellas de cultivo, para favorecer que las células se adhieran a la superficie de los mismos.
- C) Preparar medios de cultivo que contengan diversos ácidos grasos, de manera que se cubran los requerimientos nutricionales de las células más eficientemente, favoreciendo el crecimiento celular.
- D) Realizar pruebas de control de calidad de las células en cultivo, como por ejemplo: cariotipos, pruebas de susceptibilidad a agentes virales, detección de microorganismos contaminantes (micoplasmas, clamidias y virus aberrantes o latentes unidos al ácido nucleico), hibridación del ácido nucleico para la detección de mutaciones, entre otras.

APENDICE A

FORMULAS DE REACTIVOS UTILIZADOS

1) Solución Salina Fisiológica (SSF)

NaCl	8.5 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

2) Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

a) Solución Stock A

NaH ₂ PO ₄	2.8 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

b) Solución Stock B

Na ₂ HPO ₄	14.2 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	500 ml

c) Solución Stock C

NaCl	8.5 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	1000 ml

Primero se prepara la solución salina a la molaridad deseada. La preparación de las soluciones stock es la siguiente:

Solución Stock A	95 ml
Solución Stock B	405 ml

Se hace la mezcla y se ajusta el pH a 7.4. Luego se afora a un litro con la solución salina.

Se esteriliza en autoclave a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

3) Solución de Tripsina

Tripsina	25 grs
FBS pH 7.4 c.b.p.	1000 ml

Se distribuye en cantidades de 100 ml. Se mantiene a -20 °C. Para su uso se diluyen 100 ml de esta solución stock en 900 ml de PBS sin calcio ni magnesio. Antes de usarse se filtra para esterilizarla.

4) Bicarbonato de Sodio 7%

NaHCO ₃	7 ml
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

Esta solución se esteriliza en autoclave a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

5) Medio Esencial de Eagle (MEM)

MEM 10x (In Vitro)	10 ml
Suero Fetal Bovino (In Vitro)	15 ml
Vitaminas en sales de Eagle 100x	1 ml
Aminoácidos en sales de Eagle 50x	2 ml
Fenicilina G Sódica	1000 UI/ml

Sulfato de Estreptomicina	100 mg/ml
NaHCO ₃ 7 % c.b.p.	pH 7.4
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

Se esteriliza por filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um.

6) Solución Balanceada de Sales de Hank's 0.2 M

Solución A

NaCl	8.0 grs
KCl	0.4 grs
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 grs
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.06 grs
KH ₂ PO ₄	0.06 grs
Glucosa	1.0 grs
Rojo de fenol	0.04 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	800 ml

Solución B

CaCl ₂	0.14 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

Solución C

NaHCO ₃	0.35 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

Cada una de las soluciones se esteriliza por separado en autoclave a 15 lbs de presión durante 15 minutos. Antes de usarse se mezclan en medio estéril.

7) Solución Salina al 26 %

NaCl	26 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

8) Solución Balanceada de Sales de Hank's 0.26 M con quinolona

Solución Balanceada de Sales de Hank's 0.2 M	100 ml
NaCl al 26 %	1.35 ml
Quinolona al 5%	2 ml

9) Solución Salina Fisiológica 0.26 M con antibióticos

Solución Salina Fisiológica	100 ml
NaCl 26 %	1.35 ml
Penicilina G Sódica	500 UI/ml
Sulfato de Estreptomicina	50 mg/ml

10) Tripsina 0.25 % 0.26 M

Tripsina 0.25 % preparada en PBS	100 ml
NaCl 26 %	1.35 ml

11) Medio Esencial de Eagle 0.26%

MEN 10x (In Vitro)	10 ml
Suero Fetal Bovino (In Vitro)	15 ml

Vitaminas en sales de Eagle 100x	1 ml
Aminoácidos en sales de Eagle 50x	2 ml
Penicilina G Sódica	1000 UI/ml
Sulfato de Estreptomina	100 mg/ml
NaHCO ₃ 7 % c.b.p.	pH 7.4
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml
NaCl 26 %	1.35 ml

Se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um

12) RpMI 1640 0.26 M

RpMI 1640 10x (MicroLab)	10 ml
Suero Fetal Bovino (In Vitro)	15 ml
Vitaminas en sales de Eagle 100x	1 ml
Aminoácidos en sales de Eagle 50x	2 ml
Penicilina G Sódica	1000 UI/ml
Sulfato de Estreptomina	100 mg/ml
NaHCO ₃ 7 % c.b.p.	pH 7.4
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml
NaCl 26 %	1.35 ml

Se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um.

13) Solución Salina 0.47 M

NaCl	13.7 gra
H ₂ O tridest. c.b.p.	500 ml

Se esteriliza en autoclave a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

14) Solución de Yodo al 1 %

Yodo	1 gr
Solución Salina 0.47 M estéril c.b.p.	100 ml

15) Solución de Benzalconio

Benzalconio	20 ml
Solución Salina 0.47 M estéril c.b.p.	100 ml

16) Solución Salina 0.47 M más Antibióticos

Penicilina G Sódica	1000 UI/ml
Sulfato de Estreptomina	100 mg/ml
Nistatina	100 mg/ml
Solución Salina 0.47 M estéril c.b.p.	100 ml

17) Solución de Hank's 0.26 M con Antibióticos

Penicilina G Sódica	1000 UI/ml
Sulfato de Estreptomina	100 mg/ml
Solución de Hank's 0.26 M c.b.p.	100 ml

18) Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 0.26 M

Solución Stock A	
NaH ₂ PO ₄	6.49 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml
Solución Stock B	
Na ₂ HPO ₄	33.37 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	500 ml
Solución Stock C	
NaCl	27.40 grs
H ₂ O tridest. c.b.p.	1000 ml

Primero se prepara la solución salina a la molaridad deseada. La proporción de las soluciones stock es la siguiente:

Solución Stock A	95 ml
Solución Stock B	405 ml

Se hace la mezcla y se ajusta el pH a 7.4. Luego se afora a un litro con la solución salina.

Se esteriliza en autoclave a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

19) Medio M199

Medio M199 10x	10 ml
(Grand Island Biological Company)	
Suero Fetal Bovino (In Vitro)	20 ml
Vitaminas en sales de Eagle 100x	1 ml
Aminoácidos en sales de Eagle 50x	2 ml
Penicilina G Sódica	1000 UI/ml
Sulfato de Estreptomicina	100 mg/ml
NaHCO ₃ 7 % c.b.p.	pH 7.4
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

Se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um.

20) Medio Esencial de Eagle (MEM) con 20 % de Suero Fetal Bovino

MEM 10x (In Vitro)	10 ml
Suero Fetal Bovino (In Vitro)	20 ml
Vitaminas en sales de Eagle 100x	1 ml
Aminoácidos en sales de Eagle 50x	2 ml
Penicilina G Sódica	1000 UI/ml
Sulfato de Estreptomicina	100 mg/ml
NaHCO ₃ 7 % c.b.p.	pH 7.4
H ₂ O tridest. c.b.p.	100 ml

Se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um.

- 21) Medio Leibowitz-15 con 20 % de Suero Fetal Bovino
- | | |
|-----------------------------------|------------|
| L-15 10x (Microlab) | 10 ml |
| Suero Fetal Bovino (In Vitro) | 20 ml |
| Vitaminas en sales de Eagle 100x | 1 ml |
| Aminoácidos en sales de Eagle 50x | 2 ml |
| Penicilina G Sódica | 1000 UI/ml |
| Sulfato de Estreptomicina | 100 mg/ml |
| NaHCO ₃ 7 % c.b.p. | pH 7.4 |
| H ₂ O tridest. c.b.p. | 100 ml |

Se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um.

- 22) Medio RpMI 1640 con 20 % de Suero Fetal Bovino
- | | |
|-----------------------------------|------------|
| RpMI 10x (Microlab) | 10 ml |
| Suero Fetal Bovino (In Vitro) | 15 ml |
| Vitaminas en sales de Eagle 100x | 1 ml |
| Aminoácidos en sales de Eagle 50x | 2 ml |
| Penicilina G Sódica | 1000 UI/ml |
| Sulfato de Estreptomicina | 100 mg/ml |
| NaHCO ₃ 7 % c.b.p. | pH 7.4 |
| H ₂ O tridest. c.b.p. | 100 ml |

Se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana estéril de 0.22 um.

- 23) Solución de Nigrosina 0.2 %
- | | |
|-------------------------|---------|
| Nigrosina | 0.2 grs |
| PBS pH 7.4 0.2 M c.b.p. | 100 ml |

Se esteriliza por filtración, utilizando una membrana millipore de 0.22 um.

- 24) Medio Líquido de Tioglicolato
- | | |
|--|----------|
| Medio líquido de tioglicolato (Bioxon) | 29.5 grs |
| Agua destilada (c.b.p.) | 1000 ml |

Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme y calentar agitando frecuentemente. Hervir durante 1 o 2 minutos o hasta su disolución. Distribuir en tubos de ensaye de 15 x 2 cms, llenándolos hasta la mitad (15 ml en cada tubo). Esterilizar durante 15 a 18 minutos a 121 °C (15 lbs e presión). Enfriar antes de usarlo y conservar en la obscuridad en un lugar fresco y seco (no refrigerar).

- 25) Agar Infusión de Cerebro-Corazón
- | | |
|---|----------|
| Agar Infusion de Cerebro-Corazón (Bioxon) | 52.0 grs |
| Agua destilada (c.b.p.) | 1000 ml |

Mezclar bien, calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión), durante 15 minutos. Antes de usar

el medio, agitar suavemente para que se distribuya el precipitado a través del medio.

26) Agar de Dextrosa Sabouraud

Agar de dextrosa Sabouraud (Bioxon)	65.0 grs
Agua destilada (c.b.p.)	1000 ml

Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 118-121 °C (no más de 15 lbs de presión), durante 15 minutos. Se debe evitar la exposición indebida al calor, que facilita la hidrólisis de los componentes quedando así blando el medio.

27) Lavado del Material de Cristalería y Plástico para su Uso en Cultivo Celular

1. Lavar el material con cepillo o fibra utilizando una solución detergente (7x) al 3 %.
2. Enjuagar con agua corriente, 7 veces por lo menos.
3. Dejar enjuagando en agua destilada durante una noche.
4. Enjuagar por lo menos 7 veces con agua destilada.
5. Enjuagar 7 veces con agua bidestilada.
6. Secar en un horno a 80 °C (sólo el material de cristal).
7. Preparar el material para meter a esterilizar.
8. Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión de vapor, durante 15 minutos.

28) La esterilización de material plástico se realiza mediante radiación ionizante (luz U.V., rayos gamma) y no ionizante (microondas).

APENDICE B

RESULTADOS: CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1

Datos de los Ejemplares Utilizados en el Método A.

ESPECIE	PESO HUMEDO (grs)	LONG. TOTAL (mm)	MEDIO UTILIZADO	
<i>Penaeus aztecus</i>	2.3	62	MEM	
	2.3	64	MEM	
	2.6	64	MEM	
	1.8	59	MEM	
	2.9	66	MEM	
	1.3	35	MEM	
	1.2	30	MEM	
	1.3	36	MEM	
	1.3	37	MEM	
	1.2	34	MEM	
	<i>P. setiferus</i>	1.7	41	MEM
		1.4	39	MEM
1.2		35	MEM	
1.3		37	MEM	
1.3		37	MEM	
1.2		36	MEM	
PROMEDIOS		1.6	44.6	MEM

CUADRO 2

Datos de los Ejemplares Utilizados en el Método B

ESPECIE	PESO HUMEDO (grs)	LONG. TOTAL (mm)	MEDIO UTILIZADO
<i>P. aztecus</i>	2.5	61	RpMI
	3.2	68	RpMI
	2.9	67	MEM
	5.0	79	MEM
	1.6	41	RpMI
	2.8	68	MEM
<i>P. setiferus</i>	3.4	73	MEM
	4.3	75	MEM
	6.7	92	RpMI
	2.2	64	RpMI
	2.2	63	MEM
	3.1	67	MEM
	1.9	59	RpMI
PROMEDIOS	3.2	67.5	MEM Y RpMI

CUADRO 3

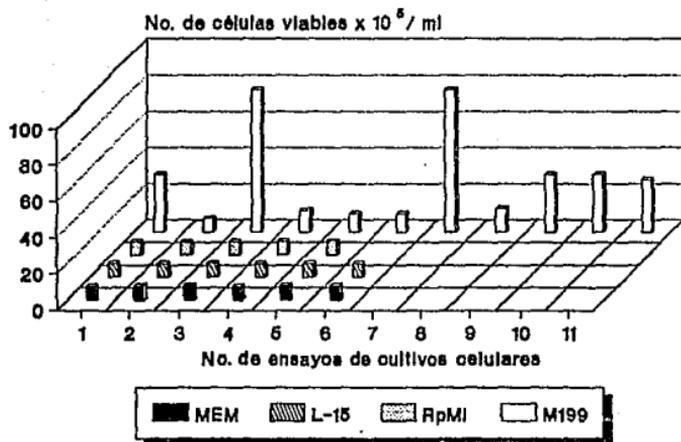
Datos de los Individuos de la Especie *P. californiensis*
Utilizados en el Método C

MEDIO UTILIZADO	LONG. TOTAL (mm)	PESO HUMEDO (grs)	No. DE CELULAS VIABLES/ML
MEM (6)	41	1.5	7.7 x 10 ⁵
	59	1.8	7.9 x 10 ⁵
	62	2.0	8.2 x 10 ⁵
	64	2.1	7.6 x 10 ⁵
	79	5.1	7.8 x 10 ⁵
	80	5.5	7.9 x 10 ⁵
L-15 (6)	61	2.6	7.7 x 10 ⁵
	66	3.0	7.7 x 10 ⁵
	70	3.2	8.1 x 10 ⁵
	69	3.5	7.6 x 10 ⁵
	75	4.3	7.7 x 10 ⁵
	81	5.2	7.7 x 10 ⁵
RpMI 1640 (5)	71	3.5	7.4 x 10 ⁵
	73	3.9	7.1 x 10 ⁵
	74	4.4	7.6 x 10 ⁵
	79	4.9	7.6 x 10 ⁵
	82	5.3	7.7 x 10 ⁵
	M199 (11)	64	2.5
68		2.7	7.6 x 10 ⁵
67		2.8	7.9 x 10 ⁵
68		2.9	1.2 x 10 ⁶
67		3.0	1.0 x 10 ⁶
73		3.3	1.0 x 10 ⁶
72		3.3	7.9 x 10 ⁵
73		3.4	1.3 x 10 ⁶
76		3.5	3.2 x 10 ⁶
75		3.8	3.2 x 10 ⁶
75		4.0	2.9 x 10 ⁶
PROMEDIOS	70	3.5	1.9 x 10 ⁶

< Ejemplar que murió durante los lavados con desinfectantes.

FIGURA 1

RELACION ENTRE MEDIOS UTILIZADOS Y No. DE CELULAS VIABLES SEMBRADAS



RESULTADOS PARA *P. cellfortiensis*

CUADRO 4

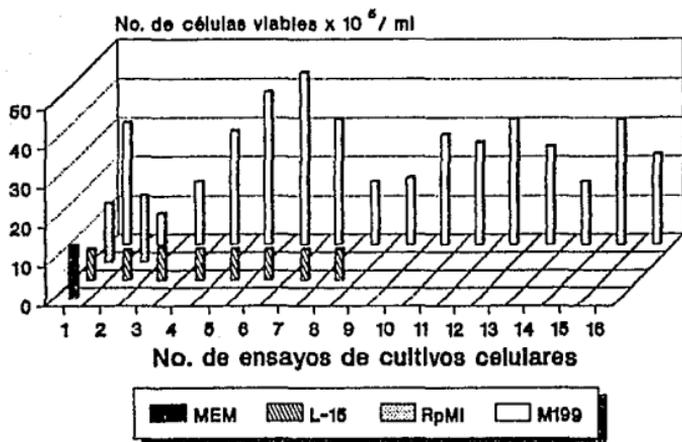
Datos de los Individuos Pertenecientes a la Especie *P. vannamei* Utilizados en el Método C

MEDIO UTILIZADO	LONG. TOTAL (mm)	PESO HUMEDO (grs)	No. DE CELULAS VIABLES/ML
MEM (1)	76 78	4.4 5.0	1.3 x 10 ⁶
L-15 (8)	59 61 67 71 74 79 80 92	1.7 2.3 2.7 3.6 4.8 5.1 5.3 6.7	7.7 x 10 ⁶ 7.5 x 10 ⁶ 8.1 x 10 ⁶ 7.8 x 10 ⁶ 7.7 x 10 ⁶ 7.5 x 10 ⁶ 7.6 x 10 ⁶ 7.7 x 10 ⁶
RpM1 1640 (2)	69 73 75 75	3.4 3.8 4.2 4.3	1.5 x 10 ⁶ 1.7 x 10 ⁶ 1.7 x 10 ⁶ 1.7 x 10 ⁶
M199 (16)	42 59 59 64 61 70 72 71 73 75 74 77 78 78 80 82 93	1.4 1.8 1.8 2.5 2.9 3.2 3.2 3.3 3.9 4.5 4.6 4.7 4.9 5.1 5.2 5.8 7.1	3.1 x 10 ⁶ 7.8 x 10 ⁶ 1.6 x 10 ⁶ 2.9 x 10 ⁶ 3.9 x 10 ⁶ 4.4 x 10 ⁶ 3.2 x 10 ⁶ 1.6 x 10 ⁶ 1.7 x 10 ⁶ 2.8 x 10 ⁶ 2.6 x 10 ⁶ 4.7 3.2 x 10 ⁶ 2.5 x 10 ⁶ 1.6 x 10 ⁶ 3.2 x 10 ⁶ 2.3 x 10 ⁶
PROMEDIOS	72	4.0	1.9 x 10 ⁶

- * Representa las células viables obtenidas de un cultivo hecho con dos ejemplares.
- ^^ Representa las células viables obtenidas de un cultivo hecho con dos ejemplares.
- ++ Representa las células viables obtenidas de un cultivo hecho con dos ejemplares.
- == Representa las células viables obtenidas de un cultivo hecho con dos ejemplares.
- < Ejemplar que murió durante los lavados con desinfectantes.

FIGURA 2

RELACION ENTRE MEDIOS UTILIZADOS Y No DE CELULAS VIABLES SEMBRADAS



RESULTADOS PARA *P. vannamei*

CUADRO 5

RELACION ENTRE EL PESO HUMEDO DE LOS CAMARONES VIVOS Y EL NUMERO DE CELULAS VIABLES POR MILILITRO SEMBRADAS DE ACUERDO AL MEDIO UTILIZADO.

A) DATOS PARA *P. californiensis*

- 1) Rango = Dato mayor - Dato menor
= 5.5 - 1.5
= 4
- 2) Número de clases (k) = $1 + 3.322 \log n$
= $1 + 3.322 \log 28$
= 5.8 aprox 6
- 3) Amplitud = $K/R = 6/4 = 0.7$

Frecuencias relativas en relación al medio utilizado

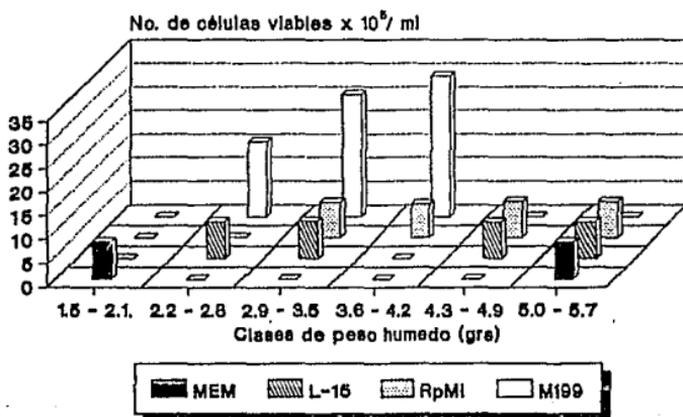
CLASES	FREC. MEM	FREC. L-15	FREC. RpMI	FREC. M199
1.5 - 2.1	4	0	0	0
2.2 - 2.8	0	1	0	3
2.9 - 3.5	0	3	1	6
3.6 - 4.2	0	0	1	2
4.3 - 4.9	0	1	2	0
5.0 - 5.7	2	1	1	0

Promedios de peso humedo (grs) de acuerdo al medio utilizado

CLASES	X MEM	X L-15	X RpMI	X M199
1.5 - 2.1	7.8×10^5	0	0	0
2.2 - 2.8	0	7.7×10^{10}	0	1.6×10^6
2.9 - 3.5	0	7.8×10^{10}	7.4×10^{10}	2.6×10^6
3.6 - 4.2	0	0	7.1×10^{10}	3.0×10^6
4.3 - 4.9	0	7.7×10^{10}	7.6×10^{10}	0
5.0 - 5.7	7.8×10^5	7.7×10^{10}	7.7×10^{10}	0

FIGURA 3

RELACION ENTRE EL PESO HUMEDO DE LOS CAMARONES VIVOS Y EL No DE CELULAS VIABLES POR ML DE ACUERDO AL MEDIO UTILIZADO



DATOS PARA *P. californiensis*

CUADRO 6

RELACION ENTRE EL PESO HUMEDO DE LOS CAMARONES VIVOS Y EL NUMERO DE CELULAS VIABLES POR MILILITRO SEMBRADAS DE ACUERDO AL MEDIO UTILIZADO

B) DATOS PARA *P. vannamei*

- 1) Rango = 7.1 - 1.4
= 5.7
- 2) $K = 1 + 3.322 \log 27$
= 5.7 aprox. 6
- 3) $A = 5.7/8 = 0.95$

Frecuencias relativas en relación al medio utilizado

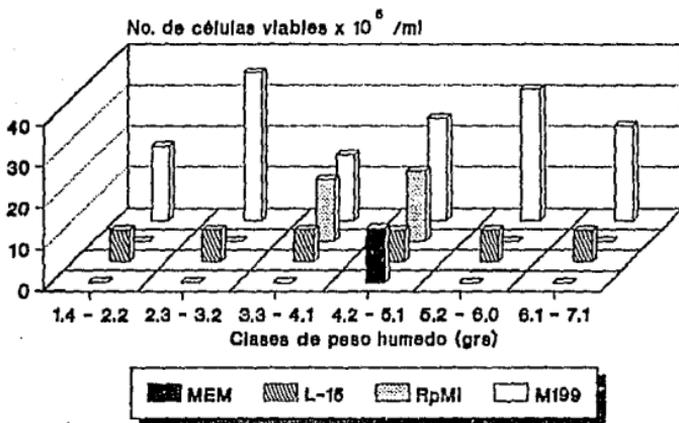
CLASES	FREC. MEM	FREC. L-15	FREC. RpMI	FREC. M199
1.4 - 2.2	0	1	0	3
2.3 - 3.2	0	2	0	4
3.3 - 4.1	0	1	1	2
4.2 - 5.1	1	2	1	5
5.2 - 6.0	0	1	0	1
6.1 - 7.1	0	1	0	1

Promedios de peso humedo en relación al medio utilizado

CLASES	X MEM	X L-15	X RpMI	X M199
1.4 - 2.2	0	7.7×10^6	0	1.8×10^6
2.3 - 3.2	0	7.8×10^6	0	3.6×10^6
3.3 - 4.1	0	7.8×10^6	1.5×10^6	1.6×10^6
4.2 - 5.1	1.3×10^6	7.6×10^6	1.7×10^6	2.5×10^6
5.2 - 6.0	0	7.6×10^6	0	3.2×10^6
6.1 - 7.1	0	7.7×10^6	0	2.3×10^6

FIGURA 4

RELACION ENTRE EL PESO HUMEDO DE LOS CAMARONES VIVOS Y EL No DE CELULAS VIABLES POR ML DE ACUERDO AL MEDIO UTILIZADO



DATOS PARA *P. vannamei*

CUADRO 7

RELACION DE NUMERO DE CELULAS VIABLES SEMBRADAS/ML Y EL NUMERO DE CELULAS VIABLES/ML OBSERVADAS DESPUES DE 5 DIAS AL REALIZAR EL PRIMER PASE

A) Datos para *P. californiensis*:

No. de Celulas Viabiles/ml sembradas	No. de Celulas Viabiles/ml Observadas a los 5 dias	Crecimiento de la poblacion en %
3.2 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	100.0
7.6 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁶	99.2
7.9 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁷	98.8
1.2 x 10 ⁶	2.3 x 10 ⁶	99.0
1.0 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶	97.5
1.0 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶	101.7
7.9 x 10 ⁶	1.6 x 10 ⁷	100.9
1.3 x 10 ⁶	2.6 x 10 ⁶	99.8
3.2 x 10 ⁶	6.3 x 10 ⁶	97.6
3.2 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	99.1
2.9 x 10 ⁶	5.8 x 10 ⁶	98.9

x 3.7 x 10⁶ 6.0 x 10⁶ 99.3

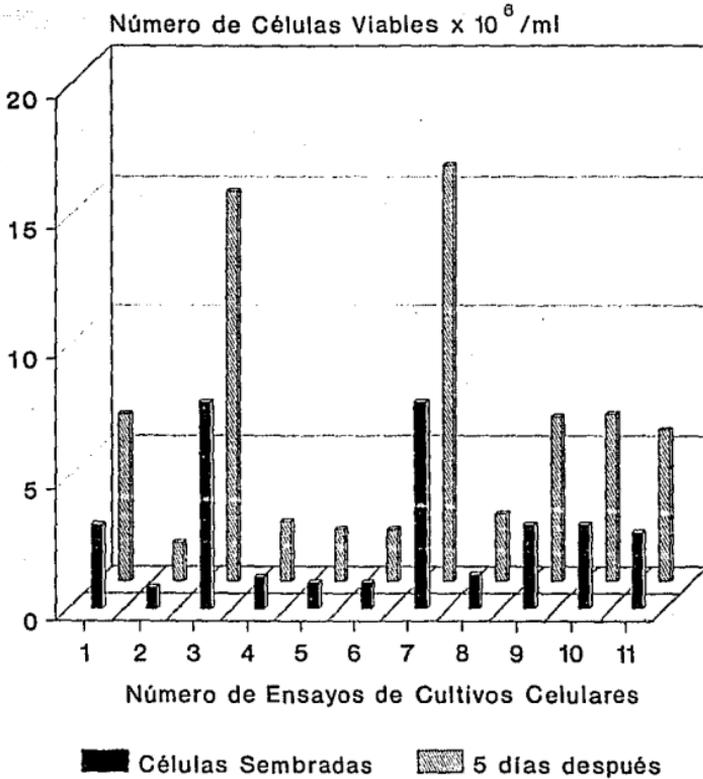
B) Datos para *P. vannamei*:

3.1 x 10 ⁶	6.1 x 10 ⁶	98.7
7.3 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁶	100.2
1.6 x 10 ⁶	3.2 x 10 ⁶	101.5
2.9 x 10 ⁶	5.8 x 10 ⁶	99.6
3.9 x 10 ⁶	7.8 x 10 ⁶	99.9
4.4 x 10 ⁶	8.7 x 10 ⁶	98.9
3.2 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	100.1
1.6 x 10 ⁶	3.2 x 10 ⁶	101.3
1.7 x 10 ⁶	3.4 x 10 ⁶	97.7
2.8 x 10 ⁶	5.5 x 10 ⁶	98.4
2.6 x 10 ⁶	5.1 x 10 ⁶	97.9
3.2 x 10 ⁶	6.3 x 10 ⁶	98.2
2.5 x 10 ⁶	5.0 x 10 ⁶	99.3
1.6 x 10 ⁶	3.2 x 10 ⁶	100.0
3.2 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	98.9
2.3 x 10 ⁶	4.6 x 10 ⁶	99.5

x 3.0 x 10⁶ 6.1 x 10⁶ 99.4

FIGURA 5

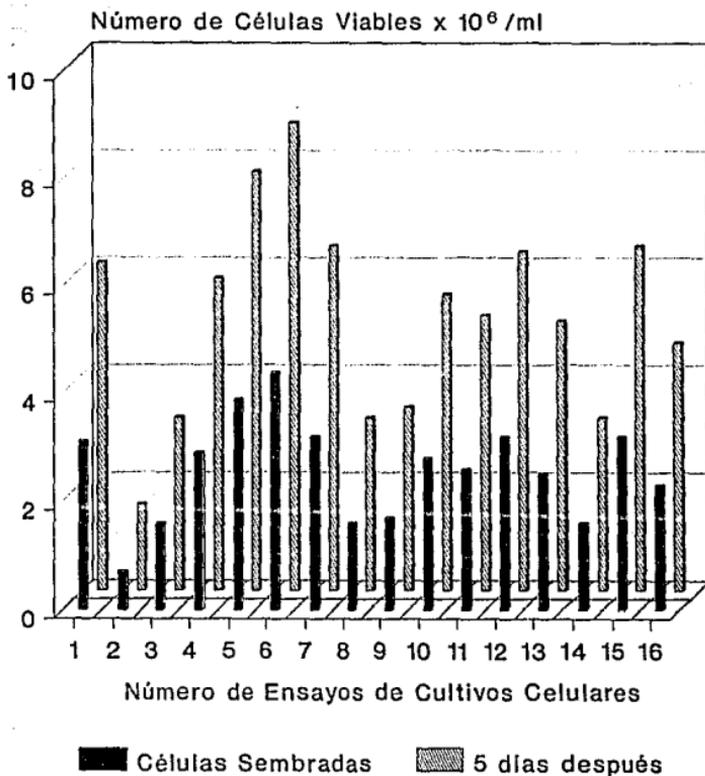
RELACION DE NUMERO DE CELULAS VIABLES
SEMBRADAS/ML Y EL NUMERO DE CELULAS
VIABLES/ML OBSERVADAS DESPUES DE 5 DIAS



DATOS PARA *P. californiensis*

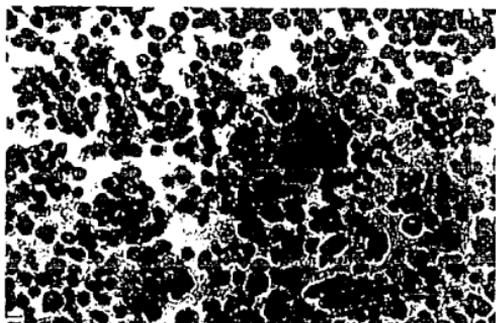
FIGURA 4

RELACION DE NUMERO DE CELULAS VIABLES SEMBRADAS/ML Y EL NUMERO DE CELULAS VIABLES/ML OBSERVADAS DESPUES DE 5 DIAS



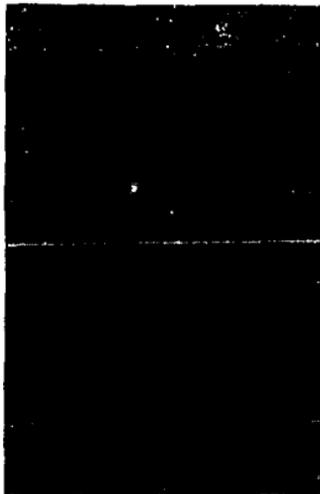
DATOS PARA *P. vannamei*

FIGURA 7



Corte incluido en parafina del hígado, incluído teñido con H & E (400x).

FIGURA 8



Célula recién sembrada: el núcleo está ligeramente desplazado hacia la periferia, altamente vacuolizada y no presenta una recubierta proteica. También presenta una gran vacuola lipídica).

FIGURA 9



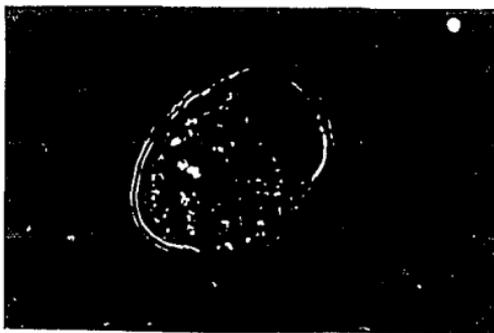
Células secretando de manera merócrina (primero y segundo pases), 400x.

FIGURA 10



Células hepatopancreáticas al final de la división amitótica en el tercer pase (400x).

FIGURA 11



Célula del cuarto pase: núcleo desplazado a la periferia, vacuolizada, y con una cubierta refringente que la rodea (400x).

FIGURA 12



Célula del quinto pase: núcleo desplazado hacia la periferia, altamente vacuolizada, algunas de ellas abiertas hacia el medio (400x).

APENDICE C

FORMULACION DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS UTILIZADOS

FORMULACION DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS UTILIZADOS (GIBCO)
TODAS LAS CANTIDADES SON EN MILIGRAMOS/LITRO

COMPONENTES	MEM	RpMI 1640	L-15	M199
<u>Sales inorgánicas:</u>				
CaCl ₂ (anhidro)	2000	-	140	2000
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	-	-	-	7.20
KCl	4000	4000	400	4000
KH ₂ PO ₄	-	-	60	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	1000	-	976.7
NaCl	68000	60000	8000	68000
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1400	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	-	-	190.12	1400
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	-	15120	359	-
MgSO ₄ (anhidro)	976.7	-	97.67	-
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	1000	-	-
MgCl ₂ (anhidro)	-	-	93.68	-
<u>Otros componentes:</u>				
Sulfato de adenina	-	-	-	100
Adenosintrifosfato 2Na	-	-	-	10
Acido adenilico	-	-	-	2
Colesterol	-	-	-	2
Desoxirribosa	-	-	-	5
D-glucosa	10000	20000	-	10000
Glutaciona (reducida)	-	10	-	0.5
Guanina HCl	-	-	-	3
Hipoxantina Na	-	-	-	0.35
Rojo de Fenol	100	50	10	200
Ribosa	-	-	-	5
Acetato de sodio	-	-	-	500
Timina	-	-	-	3
Tween 80	-	-	-	200
Uracilo	-	-	-	3
Xantina Na	-	-	-	3.4
D(+) galactosa	-	-	900	-
Piruvato de Na	-	-	550	-
<u>Aminoácidos:</u>				
DL-Acido aspártico	-	-	-	600
L- Acido aspártico	-	200	-	-
L- Acido glutámico	-	200	-	-
DL-Acido glutámico	-	-	-	1500
DL-Alanina	-	-	-	500
DL-alfa-Alanina	-	-	450	-
L-Arginina HCl	1260	-	-	700
L-Arginina	-	2000	500	-
L-Asparagina	-	500	250	-
L-Cisteína	240	500	120	500
L-Cisteína Na	286.1	-	-	-
L-Cisteína HCl H ₂ O	-	-	-	1.1

COMPONENTES	MEM	RpMI 1640	L-15	M199
L-Cisteína 2HCl	-	-	-	260
Glicina	-	200	100	-
L-Glutamina	-	3000	300	1000
L-Histidina HCl H ₂ O	420	-	-	500
L-Hidroxi prolina	-	200	-	218.8
L-Histidina	-	150	250	-
L-Isoleucina	520	500	-	-
DL-Isoleucina	-	-	250	100
L-Leucina	520	500	125	-
DL-Leucina	-	-	-	400
L-Lisina	-	-	75	-
L-Lisina HCl	725	400	-	1200
L-Metionina	150	150	-	-
DL-Metionina	-	-	150	700
L-Fenilalanina	-	150	320	-
DL-Fenilalanina	-	-	250	300
L-Prolina	-	200	-	500
L-Serina	-	300	200	-
DL-Serina	-	-	-	400
L-Treonina	480	200	-	-
DL-Treonina	-	-	600	500
L-Triptófano	100	50	20	-
DL-Triptófano	-	-	-	600
L-Tirosina	-	200	300	-
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	519	-	-	200
L-Valina	460	200	-	-
DL-Valina	-	-	200	580
<u>Vitaminas:</u>				
Acido ascórbico	-	-	-	0.5
Acido fólico	10	10	1	0.1
Acido para-aminobenzoico	-	10	-	0.5
Biotina	-	2	-	0.1
Calciferol	-	-	-	1.0
Cloruro de colina	10	30	1	5.0
D-Pantotenato de Ca	10	2.5	-	0.1
DL-Pantotenato de Ca	-	-	1	-
i-Inositol	20	350	2	0.5
Menadiona	-	-	-	0.1
Monofosfato de tiamina	-	-	1	-
Niacina	-	-	-	0.25
Nicnamida	10	10	1	0.25
Piridoxal HCl	10	-	-	0.25
Piridoxina HCl	-	10	1	0.25
Riboflavina	1	2	-	0.1
Riboflavina-5'-Fosfato de Na	-	-	0.1	-
Tiamina HCl	10	10	-	0.1
Vitamina A (acetato)	-	-	-	1.4
Vitamina B ₁₂	-	0.05	-	-

BIBLIOGRAFIA

- 1) Al-Mohanna S.Y., J.A. Nott and D.J.W. Lane (1985) Mitotic E- and Secretary F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. U.K. 65:901-910.
- 2) Al-Mohanna S.Y. and J.A. Nott (1986) E-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 66:403-414.
- 3) Al-Mohanna S.Y. and J.A. Nott (1987) R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). Marine Biol. 95:129-137.
- 4) Arredondo J.L. (1990) Analisis del cultivo de camarón en México al término de 1989. En: Lanza-Espino de la G., Arredondo J.L. LA ACUICULTURA EN MEXICO: DE LOS CONCEPTOS A LA PRODUCCION. Instituto de Biología, UNAM. México pp. 77-104.
- 5) Ballow H.C., Forrester F.T., et al (1981). BASIC LABORATORY METHODS IN VIROLOGY. U.S. Department of Health and Human Services. U.S.A., 35 pp.
- 6) Bárcena A. et al (1989) Bases técnicas para el ordenamiento del cultivo de camarón. Acuavisión 17:13-16.
- 7) Behbehani A.M. (1972) LABORATORY DIAGNOSIS OF VIRAL, BACTERIAL AND RICKETTSIAL DISEASES. Charles C. Thomas Publishers. U.S.A. 229 pp.
- 8) Bell T.A., Lightner D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus setiferus* and *Farfantepenaeus aztecus*. Aquaculture 38:185-194
- 9) Bell T.A., Lightner D.V. (1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. J. of Fish Diseases 10:165-170.
- 10) Bell T.A. and D.V. Lightner (1988). A HANDBOOK OF NORMAL PENAEID SHRIMP HISTOLOGY. World Aquaculture Society. U.S.A. 114 pp.
- 11) Bell T.A., Lightner D.V., Brock J.A. (1990). A biopsy procedure for the nondestructive determination of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J. of Aquatic Animal Health 2:151-153.
- 12) Bonami J.R. et al (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J. of Gen. Virol. 71:2657-2664.
- 13) Bonami J.R.; Bonami J.M. (1992) MEMORIAS DEL PRIMER CURSO INTERNACIONAL SOBRE ENFERMEDADES DE CRUSTACEOS Y TECNICAS ACTUALES PARA SU DIAGNOSTICO; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.
- 14) Chen, Shiu-Nan (1988) ESTABLISHMENT, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF CELL CULTURES FROM MARINE FISH, CRUSTACEANS AND MOLLUSCS. First International Symposium on Marine Molecular Biology Baltimore, MD. (USA)
- 15) Chiu-Liao, Hwei-Meei Su, and Jaw-Hwa Lin (1986). Larval Foods for Penaeid Prawns. In: McVey J.F. (Ed). CRC Handbook of Mariculture. Vol. 1. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Inc. U.S.A. 437p.
- 16) Conkin D.E., L.R. D'Albramo and Norman Boudreau (1986). Lobster Nutrition. In: McVey J.F. (Ed). CRC Handbook of

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

- Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Inc. U.S.A. 413-423
- 17) Conroy G.; Conroy D.A., Dixon P.F.; Fukushima and L. Shimokawa (1989) First report of *Baculovirus penaei* (BP) and of some common epibionts from cultured pacific white shrimp (*Penaeus setiferus*) in northern Peru. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 9(5): 119 - 121.
- 18) Cruz L.A. (1988) Nutrición y alimentación del camarón. Acuavisión 14:32-34
- 19) Díaz Iglesias E. (1988). ASPECTOS DE LA FISIOLÓGIA DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS. Editorial Pueblo y Educación. Cuba, 119 pp.
- 20) Fenner F. et al (1974) THE BIOLOGY OF ANIMAL VIRUSES. 2nd Edition. Academic Press. U.S.A., 834 pp.
- 21) Guay J.C., M. Kayama y Y. Murakami (1974). Lipid class distribution and fatty acid composition of prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Bull. J. Soc. Sci. Fish. 40 (10):1027-1032.
- 22) Gibson R. and Barker P.L. (1979) The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17:285-346
- 23) Hoskins J.M. (1967) VIROLOGICAL PROCEDURES. Butterworth & Co. (Publisher) Ltd. Great Britain, 358 pp.
- 24) Johnson P.T. (1983) Disease caused by viruses, rickettsiae, bacteria and fungi. In: Provenzano A.J. (ed). THE BIOLOGY OF CRUSTACEA: PATHOBIOLOGY. Vol. 6. Academic Press, U.S.A., pp 5-8.
- 25) Kalter S.A. (1963) PROCEDURES FOR ROUTINE LABORATORY DIAGNOSIS OF VIRUS AND RICKETTSIAL DISEASES. Burgess Publishing Co. U.S.A.
- 26) Kruse P.F., Patterson M.K. Jr. (1973). TISSUE CULTURE: METHODS AND APPLICATIONS. Academic Press. U.S.A., 868 pp.
- 27) Kucera L.S., Myrvik Q.N. Jr. (1973) TISSUE CULTURE: METHODS AND APPLICATIONS. Academic Press. U.S.A., 404 pp.
- 28) Lakshmi G.J., Venkatarameiah A and H.D. Howse (1978) Effect of salinity and temperature changes on spontaneous muscle necrosis in *Penaeus setiferus* Ives. Aquaculture 13:35-43
- 29) Leblanc B.D. and R.M. Overstreet (1990) Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus setiferus*) relative to age. Aquaculture 87:237-242.
- 30) Lehninger A.L. (1985). BIOQUÍMICA: LAS BASES MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR. Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A. España, 1117 pp.
- 31) Lightner D.V. (1977). Virus diseases in shrimps. In: Sinderman C.J. (ed). DISEASE DIAGNOSIS AND CONTROL IN NORTH AMERICAN MARINE ACUACULTURE: DEVELOPMENTS IN AQUACULTURE AND FISHERIES SCIENCE. Vol. 6. Elsevier Scientific Publishing Co. U.S.A., pp. 14-18.
- 32) Lightner D.V., Redman R.M., D.A. Donald, R.R. Williams and L.A. Perez (1980) Major diseases encountered in controlled environment culture of penaeid shrimp at Puerto Peñasco, Sonora, Mexico. In: Sinderman C.J. (ed) Proceedings of the Ninth and Tenth U.S. Japan Meetings on Aquaculture. pp 25-33 NOAA
- 33) Lightner D.V. (1983) Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey (ed). MARICULTURE. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 289-320.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 34) Lightner D.V., Redman T.A., Bell T.A., Brock J.A. (1983). Detection of IHNN in *Farfantepenaeus aztecus* and *Penaeus setiferus* imported into Hawaii. J. World Maricult. Soc. 14:212-233.
- 35) Lightner D.V., Redman R.M. and T.A. Bell (1983) Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J. of Invert. Path. 42:62-70
- 36) Lightner D.V. et al (1985). Recent advances in penaeid virus disease investigations. J. World Maricult. Soc. 16:267-274.
- 37) Lightner D.V., Bell T.A. and R.M. Redman: A COLLECTION OF CASE HISTORIES DOCUMENTING THE INTRODUCTION AND SPREAD OF THE VIRUS DISEASE IHNN IN PENAID SHRIMP CULTURE FACILITIES IN NORTHWESTERN MEXICO. (DRAFT)
- 38) Lightner D.V., and R.M. Redman (1985) A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. J. of Invert. Pathol. 45:47-53.
- 39) Lightner D.V. (1985) A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Proc. of the First International Conference of the Culture of Penaeid Prawns Shrimps.
- 40) Lightner D.V. and J.A. Brock (1987) A lymphoma-like neoplasm arising from hematopoietic tissue in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus* (Boone) (Crustacea: Decapoda). J. of Invert. Path. 49:188-193.
- 41) Lightner D.V., Mohny L.L., Williams R.R. and Redman R.M. (1987) Glycerol tolerance of IHNN virus of penaeid shrimp. J. of the World Aquaculture Soc. 18(3):194-197.
- 42) Luiz de Siquiera Bueno S., R.M. Nascimento and I. Nascimento (1990) Baculovirus penaeid infection in *Farfantepenaeus subtilis*: A new host and a new geographical range of the disease. J. of World Aquaculture Soc. 21(3):235-237.
- 43) Metselaar D., Simpson D.I.H. (1982) PRACTICAL VIROLOGY FOR MEDICAL STUDENTS AND PRACTITIONERS IN TROPICAL COUNTRIES. Oxford. G.B., 496 pp.
- 44) Moe M.A. Jr. (1992). THE MARINE AQUARIUM REFERENCE: SYSTEMS AND INVERTEBRATES. Fourth Edition. Green Turtle Publications. U.S.A., 512 pp.
- 45) New, M.B. (1976) A review of dietary studies with shrimp and prawns. Aquaculture 7:101 - 144.
- 46) Pares Sevilla A. (1988). Panorama actual de la camaronicultura en Sinaloa. Aquavisión 13:4-6.
- 47) Paul J. (1965). CELL AND TISSUE CULTURE. 3rd. Edition. E&S Livingstones Ltd., G.B.
- 48) Rovozzo G.C., Burke C.N. (1973) A MANUAL OF BASIC VIROLOGICAL TECHNIQUES. Prentice Hall, Inc. U.S.A., 287 pp.
- 49) Sano T., Nishimura T., Fukuda H., Hayashida F. (1985) Baculoviral Infectivity Trials on Kuruma Shrimp Larvae, *Penaeus japonicus*, of Different Ages. In: Ellis A.E. (ed) FISH AND SHELLFISH PATHOLOGY, First Edition, Academic Press, Inc. U.S.A., 412 pp.
- 50) Shewbart K.L., W.L. Mies and P.D. Ludwig (1972) Identification and quantitative analysis of the amino acids present in protein of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. Marine Biol. 16:64-67

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 51) Siegel M.M., and A. R. Beasley (1973) Marine Teleost Fish tissues. In: Kruse P.F. Jr. TISSUE CULTURE: METHODS AND APPLICATIONS. Academic press. U.S.A.
- 52) Siegel M.M. and A.R. Beasley (1973) Trypsin: Marine Teleost fish tissues. In: Kruse P.F. (ed). TISSUE CULTURE: METHODS AND APPLICATIONS. Academic Press. U.S.A.
- 53) Spotte S. (1979). SEAWATER AQUARIUMS: THE CAPTIVE ENVIRONMENT. John Wiley & Sons. U.S.A., 145 pp.
- 54) Thurman R.B., Bell T.A., Lightner D.V. and S. Hazanow (1990). Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculoviruses and their use in diagnosis of infections. J. of Aquatic Animal Health 2:128-131.
- 55) Tsing A. and Bonami J.R. (1987) A new viral disease of the tiger shrimp Penaeus japonicus Bate. J. Fish Dis. 10:137-141.
- 56) Vega Villazante F. (1990) Enfermedades virales en la camaronicultura mexicana. 1a. Parte. Aquavisión 17:24-26
- 57) Vega Villazante F. (1990) Enfermedades virales en la camaronicultura mexicana. 2a. Parte. Aquavisión 18:29-31.
- 58) Vogt G., Storch V., Quintio E.T. and F.F. Pascual (1985) Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in Libinia schlosseri (Decapoda). Aquaculture 48:1-12

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA