CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES BÁSICAS PARA EL CULTIVO PRIMARIO *IN VITRO* DE CÉLULAS DE MANTO DE LA MADREPERLA *Pinctada mazatlanica* (HANLEY 1856)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales
(Orientación en Acuacultura)

P r e s e n t a

Alejandro Olivera Bonilla

La Paz, Baja California Sur, Julio del 2006

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S.,siendo las 9 horas del día 21 del Mes de Junio del 2006 se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES BÁSICAS PARA EL CULTIVO PRIMARIO *IN VITRO* DE CÉLULAS DE MANTO DE LA MADREPERLA *Pinctada mazatlanica* (HANLEY, 1856)"

Presentada por el alumno:

Alejandro Olivera Bonilla

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuacultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DR. PEDRO ENRIQUE SAUCEDO LASTRA
DIRECTOR DE TESIS

DR. HECTOR NOLASCO SORIA
CO-TUTOR

DR. JOSE LUIS DÍAZ DE LEÓN ALVAREZ
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité Tutorial

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra	CIBNOR
Dr. Hector Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. José Luís Díaz de León Álvarez	UABCS

Comité Revisor de Tesis

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra	CIBNOR
Dr. Hector Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. José Luís Díaz de León Álvarez	UABCS

Jurado del Examen de Grado

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra	CIBNOR
Dr. Hector Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. José Luís Díaz de León Álvarez	UABCS
Suplente: Dr. Ángel Isidro Campa Córdova	CIBNOR

Resumen

El género *Pinctada* es utilizado en el perlicultivo comercial a nivel mundial. En este proceso, un fragmento de manto de la zona paleal de una ostra perlera (donador) es implantado en la gónada de otras ostras (receptores). Sin embargo el método para el cultivo de perlas esféricas es ineficiente. En el presente trabajo se realizó la búsqueda de métodos alternativos al perlicultivo: el cultivo *in vitro* del manto de *P. mazatlanica*. Por ello se realizó investigación preliminar dirigida a sentar las bases para el establecimiento de un cultivo primario *in vitro* de tejido y células del manto de la especie. La presente tesis tiene como objetivo determinar las condiciones básicas para llevar a cabo el cultivo *in vitro* de células aisladas y explantes del manto, evaluando cinco diferentes formas de disgregación enzimática celular, tres medios de cultivo para permitir la supervivencia de explantes, dos sustratos (con y sin poli-D-lisina) para las células y el manto, cuatro osmolaridades del medio de cultivo para el manto, además de la absorción de calcio del manto *in vitro*. Se obtuvo que la colagenasa (tipo I con una actividad específica de 414 U/mg) permitió los mejores rendimientos medidos como número de células viables disgregadas a 37°C por 60 minutos. La siembra de células disgregadas se dio mejor en el medio RPMI 1640, mantenido a 37°C con sustrato poli-D-lisina. El cultivo de explantes resultó ser mejor en el medio RPMI 1640 a 60 mM de NaCl, y en estas mismas condiciones se evidenció la absorción de calcio por medio de espectrofotometría de absorción atómica. Se puede concluir que los resultados preliminares generados en la presente investigación proporcionan un panorama claro del rumbo que deben seguir los futuros estudios dentro de este campo tan novedoso de la investigación científica y tecnológica. Se recomienda evaluar otras temperaturas, y utilizar el análisis digital de imágenes como método de cuantificación de procesos importantes como la absorción de calcio, así como realizar este tipo de estudios con la otra especie de ostra perlera mexicana *Pteria sterna*.

Palabras clave: *Pinctada mazatlanica*, cultivo *in vitro*, manto.

ESTABLISHMENT OF BASIC CONDITIONS FOR *IN VITRO* CULTIVATION OF CELLS OF MANTLE TISSUE OF MOTHER-OF-PEARL OYSTER *Pinctada mazatlanica* (HANLEY 1856)

Abstract

The genus *Pinctada* is used in commercial pearl farming worldwide. In this activity, a piece of mantle tissue from a donor's paleal zone is implanted within the gonad of other receiver pearl oysters. However, this method has proved to be inefficient in commercial pearling activities. In the present thesis, the *in vitro* cultivation of mantle tissue from *P. mazatlanica* was evaluated as alternative method. Preliminary research was aimed for establishing the basis of a primary *in vitro* culture of cells and tissue of the species. The final goal was to culture cells and explants of the species, testing five methods of enzymatic dissociation, three different culture media, two cell substrates (with and without poly-D-lysine), four different osmolarities of the cell culture medium, as well as calcium intake by mantle tissue *in vitro*. Our results indicated that collagenase (type I with specific activity of 414 U/mg) yielded the best measured as number of disaggregated viable cells at 37°C for 60 minutes. Disaggregated cells grew better in RPMI 1640 cell medium, maintained at 37°C with poly-D-lysine substrate. Culture of explants resulted better using RPMI 1640 medium at 60mM NaCl, and in this conditions calcium absorption was evaluated by atomic absorption espectrophotometric. Our preliminary results provide a clear overview of the pathway that future studies must follow in this innovative scientific and technologic research field. We recommend trying other temperatures in cell enzymatic dissociation, using a digital image analysis for evaluating calcium absorption, and it would be valuable to conduct this kind of experiments with the other pearl oyster species in Mexico, *Pteria sterna*.

Keywords: *Pinctada mazatlanica*, in vitro culture, mantle tissue.

A Dios,

a mis padres,

y a mis hermanos.

Agradecimientos

Al personal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por darme todas las facilidades y prestaciones para el buen desarrollo de este trabajo. Al apoyo económico de CONACyT. Gracias a la Dra. Thelma Castellanos y al personal del Programa de Posgrado por todo el apoyo recibido.

Agradezco muy sinceramente a mi director de tesis, el Dr. Pedro Saucedo Lastra, quien fue fundamental, ya que en ningún momento dudó de este trabajo y nunca dejó de alentarme y apoyarme para sacar adelante la tesis, mostrando siempre un interés adecuado, compresión y flexibilidad de su parte. Además agradezco las largas charlas entabladas en torno al cultivo de perlas, así como sus sugerencias para mejorar el trabajo.

A mis cotutores, los doctores Héctor Nolasco Soria y José Luís Díaz de León Álvarez, quienes aportaron ideas sustanciales y que gracias a sus revisiones enriquecieron este documento.

A Delia Rojas y Arturo Sierra por darme todas las facilidades en los laboratorios de Genética Molecular y Cultivo de Células Animales, y hacer del área de trabajo un ambiente muy agradable. A Delia por apoyarme en el uso de instrumentos y reactivos. Un agradecimiento muy especial a Arturo Sierra, quien fue una persona esencial para la exitosa culminación de este trabajo, no solo por su gran experiencia e interés en el tema, sino también por la guía y sugerencias aportadas en toda ocasión.

A todos mis compañeros de generación, que hicieron de muchas horas y días libres un antiestrés. A Mariel quien me dio ese último empujón que necesitaba.

A todos, ¡Gracias!

CONTENIDO

1.0. INTRODUCCIÓN 1

2.0. ANTECEDENTES 5

2.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL MANTO 5
2.2. HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA DEL MANTO 6
2.3. BIOMINERALIZACIÓN 8
2.4. IMPORTANCIA BIOMÉDICA DEL NACAR 11
2.5. CULTIVOS CELULARES EN INVERTEBRADOS MARINOS 12
2.6. CULTIVOS CELULARES DE MANTO DE BIVALVOS 13

3.0. JUSTIFICACIÓN 15

4.0. OBJETIVOS 17

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

5.0. HIPÓTESIS 18

6.0. METODOLOGÍA 19

6.1. RECOLECTA Y DEPURACIÓN 19
6.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO CELULAR 20
6.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CELULAR 21
6.4. AISLAMIENTO Y DISECCIÓN MECÁNICA DEL MANTO 22
6.4.1. DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA CELULAR 23
6.4.2. SIEMBRA DE CÉLULAS DISGREGADAS 25
6.5. OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE EXPLANTES 26
6.6. OSMOLARIDAD 28
6.7. ABSORCIÓN DE CALCIO 29
6.8. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA 29
6.9. ESTRUCTURA CELULAR 30
6.10. MONITOREO Y MANTENIMIENTO 30

7.0. RESULTADOS 32

7.1. COLECTA Y DEPURACIÓN 32
7.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO CELULAR 32
7.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CELULAR 33
7.4. AISLAMIENTO Y DISECCIÓN MECÁNICA DEL MANTO 33
7.4.1. DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA CELULAR 34

7.4.2. Siembra de células disgregadas 41
7.5. Corte y siembra de explantes **43**
7.6. Osmolaridad **44**
7.7. Absorción de calcio **45**
7.8. Espectrofotometría de absorción atómica **46**
7.9. Estructura celular **47**

8.0. DISCUSIÓN 48

9.0. CONCLUSIONES 70

10.0 RECOMENDACIONES 73

11.0. LITERATURA CITADA 74

ANEXO 1. HISTOQUÍMICA DE ROJO DE ALIZARINA 82

ANEXO 2. LISTA DE REACTIVOS 83

ANEXO 3. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO 84

GLOSARIO 88

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA INTERNA DE *PINCTADA MAZATLANICA* (MODIFICADO DE SOUTHGATE Y SAUCEDO, 2006). 6
FIGURA 2. FOTOMICROGRAFÍA DE LA ZONA MARGINAL DEL MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MARGARITIFERA* CONSTITUIDA POR FIBRAS MUSCULARES (FM), BORDE MEDIO (BM), BORDE EXTERNO (BE), BORDE INTERNO (BI) Y BRANQUIAS (BR). LAS LÍNEAS PUNTEADAS DIVIDEN LA ZONA MARGINAL (ZM) DE LA ZONA PEALEAL (ZD). CÔTÉ COQUILLE: LADO DE LA CONCHA, CÔTÉ VISCÉRAL: LADO VISCERAL. TOMADA DE FOUGEROUSE-TSING Y HERBAUT, 1994. 7
FIGURA 3. CRISTALES DE NÁCAR CRECIENDO ENTRE LAS PLANTILLAS PREVIAMENTE DEPOSITADAS. LAS CAPAS SE COMPONEN DE UNA CENTRAL DE FIBRAS (NEGRO) CUBIERTAS DE OTRAS CAPAS DE PROTEÍNAS (ROJO) CON PEQUEÑOS POROS QUE PERMITEN EL PASO DE MATERIALES QUE DAN FORMA A LOS CRISTALES DE ARAGONITA (AZUL) (TOMADO DE ADDADI Y WEINER, 1997). 10
FIGURA 4. PORCIONES VENTRALES DEL MANTO OBTENIDAS A PARTIR DE UN JUVENIL DE *PINCTADA MAZATLANICA*. FOTO: ALEJANDRO OLIVERA 22
FIGURA 5. DISECCIÓN MECÁNICA DEL MANTO DE *PINCTADA MAZATLANICA*. A) ZONA MARGINAL Y PALEAL, B) ZONA PALEAL EN SOLUCIÓN HANKS, C) FRAGMENTOS DE LA ZONA PALEAL DEL MANTO Y D) DISGREGACIÓN DEL MANTO CON PIPETA PASTEUR. FOTOGRAFÍAS: ALEJANDRO OLIVERA 23
FIGURA 6. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE SIEMBRA EN UNA PLACA MULTIWELL (4 X 6) PARA CULTIVOS CELULARES. M199: MEDIO 199, RPMI 1640: MEDIO MEGACELL® RPMI-1640, MEM: MEGACELL® MINIMUN ESSENTIAL MEDIUM EAGLE Y DMEM: MEGACELL® DULBECCO´S MODIFIED EAGLE'S. CONTROL: SOLUCIÓN HANKS. 26
FIGURA 7. INSTRUMENTO COMERCIAL PARA CORTAR EL MANTO UTILIZADO EN EL PERLICULTIVO. FOTO. ALEJANDRO OLIVERA. 27
FIGURA 8. CORTE DE LA ZONA PALEAL DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA*. FOTO. ALEJANDRO OLIVERA. 27
FIGURA 9. SIEMBRA DE LOS EXPLANTES DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA* EN PLACAS MULTIPOZO (4X6). FOTO: ALEJANDRO OLIVERA 28
FIGURA 10. DIAGRAMA DE FLUJO DE LO MÉTODOS REALIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO. 31
FIGURA 11. RENDIMIENTO CELULAR (CEL/ML) DE MANTO DE MADREPERLA (*PINCTADA MAZATLANICA*) INCUBADO A 15°C BAJO EL TRATAMIENTO DE VARIAS ENZIMAS. 35
FIGURA 12. RENDIMIENTO (CEL/ML) Y VIABILIDAD (%) DE CÉLULAS DISGREGADAS DEL MANTO DE MADREPERLA (*PINCTADA MAZATLANICA*) INCUBADO A 15°C BAJO EL TRATAMIENTO DE VARIAS ENZIMAS. 36
FIGURA 13. RENDIMIENTO CELULAR (CEL/ML) DE MANTO DE MADREPERLA (*PINCTADA MAZATLANICA*) INCUBADO A 37°C BAJO EL TRATAMIENTO DE VARIAS ENZIMAS. 37
FIGURA 14. RENDIMIENTO (CEL/ML) Y VIABILIDAD CELULAR (%) DE MANTO DE MADREPERLA (*PINCTADA MAZATLANICA*) INCUBADO A 37°C BAJO EL TRATAMIENTO DE VARIAS ENZIMAS. 38
FIGURA 15. RENDIMIENTO CELULAR (CEL/ML) DE MANTO DE MADREPERLA (*PINCTADA MAZATLANICA*) INCUBADO A 46°C BAJO EL TRATAMIENTO DE VARIAS ENZIMAS. 39
FIGURA 16. RENDIMIENTO (CEL/ML) Y VIABILIDAD CELULAR (%) DE MANTO DE MADREPERLA (*PINCTADA MAZATLANICA*) INCUBADO A 46°C BAJO EL TRATAMIENTO DE VARIAS ENZIMAS. 40
FIGURA 17. CÉLULAS DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA* CULTIVADAS EN MEDIO RPMI 1640 EN UN SUSTRATO DE POLI-D-LISINA (40X). LAS FLECHAS NEGRAS INDICAN CÉLULAS CON FORMA DE FIBROBLASTOS Y LAS FLECHAS BLANCAS CÉLULAS REDONDAS SIN ADHESIÓN AL SUSTRATO. 42

FIGURA 18. EXPLANTE DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA* CULTIVADO EN MEDIO RPMI 1640. EL EXPLANTE CRECIÓ HASTA ALCANZAR LAS PAREDES DEL POZO. 43
FIGURA 19. EXPLANTE DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA* CULTIVADO EN MEDIO RPMI 1640, SIN SUSTRATO A 60 mM. LAS FLECHAS BLANCAS SEÑALEN EL EXPLANTE Y LAS FLECHAS NEGRAS LAS CÉLULAS MIGRANDO FUERA DE ESTE. 45
FIGURA 20. CORTE TRANSVERSAL DE UN EXPLANTE DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA* INCUBADO A 60 mM Y TEÑIDO CON ROJO DE ALIZARINA S. 46
FIGURA 21. CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640 A DIFERENTES OSMOLARIDADES 15, 30, 45 Y 60 mM CON EXPLANTES DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA*. 47
FIGURA 22. CORTE TRANSVERSAL DE UN EXPLANTE DE MANTO DE MADREPERLA *PINCTADA MAZATLANICA* CULTIVADO EN MEDIO RPMI 1640 DURANTE 6 DÍAS Y TEÑIDO CON HEMATOXILINA-EOSINA (10X). 48

1.0. Introducción

La madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), al igual que concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851) son las dos especies de ostras productoras de perlas presentes en el Golfo de California. Las ostras perleras representan un recurso importante que se aprovecha integralmente en todo el mundo. La concha, por ejemplo, se utiliza en la fabricación de botones y objetos ornamentales. El nácar se aprovecha en trabajos de fina incrustación en maderas y metales preciosos que son verdaderas obras de arte, y se le emplea también en la industria de cosméticos para la fabricación de productos de belleza. Además, el músculo aductor (callo) de estos animales es un producto de alta calidad para consumo humano, y en países orientales como Japón es considerado un verdadero manjar en diferentes presentaciones, crudo, sazonado o enlatado (Monteforte, 1990, 1991).

El aprovechamiento más importante de las ostras perleras se relaciona, sin duda, con su capacidad de formar perlas. Por sí sola, una perla es una de las gemas más finas que existen en la naturaleza y es producida de manera natural por ciertos moluscos bivalvos, entre los cuales los géneros *Pteria* y *Pinctada* son los más importantes productores a nivel mundial (Gervis y Sims, 1992; Saucedo, 1995; Monteforte, 1996). La perla representa un producto de alto valor comercial en mercados nacionales e internacionales (Fassler, 1991, Saucedo, 2001). El cultivo de perlas (perlicultura) representa una de las industrias más importantes en el mundo, con un mercado lucrativo y bien establecido que tiene un valor entre 3 mil y 5 mil mdd al año (Fassler, 1995).

Se sabe que en el perlicultivo comercial, un fragmento de manto de la zona paleal de una ostra perlera (donador) es implantado en la gónada de otras ostras (receptores). Por sus características citoquímicas, -posee células secretoras de mucopolisacáridos ácidos que pueden participar en el transporte de calcio, así como células secretoras con abundante ARN y alta actividad enzimática de anhidrasa carbónica en las células epiteliales- la zona paleal del manto se utiliza como tejido de injerto. Posteriormente, un núcleo esférico inorgánico, fabricado con concha de un mejillón de agua dulce (Unionidae), es introducido por la misma vía teniendo cuidado que el epitelio externo del manto este en contacto con el núcleo (Cahn, 1949; García-Gasca, 1992). Después de la operación, las células epiteliales externas del manto se vuelven escamosas y emigran para encapsular al núcleo, y así, eventualmente forman un folículo llamado "saco perlero" alrededor del núcleo (Awaji y Suzuki, 1995). Sin embargo, este método para el cultivo de perlas esféricas es ineficiente, pues de cada 100 ostras perleras operadas, aproximadamente un tercio morirá, un tercio rechazará el núcleo implantado y el tercio restante producirá perlas de mediana calidad (Norton et al., 1996). A pesar de que estos valores son reales, no dejan de ser estadísticas obtenidas de granjas perleras comerciales de diferentes partes del mundo, las cuales pueden variar de especie a especie, de granja a granja, por la habilidad del implantador, y en función de una compleja interacción de las condiciones ambientales que imperan en una granja en un momento dado, tales como temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, oleaje y mareas, fotoperiodo, etc.

Hoy en día la técnica del cultivo de perlas prácticamente no ha variado desde hace un siglo, ya que en la actualidad se sigue utilizando la técnica Mise-Nishikawa, la cual hace honor a dos japoneses que la desarrollaron en 1904. Y aunque los resultados en el éxito de implante dependen de una gran variedad de factores ya mencionados, la técnica no es 100% exitosa. Es por esto que la búsqueda de nuevos métodos biotecnológicos, empleando herramientas del siglo XXI, hacen factible la posibilidad de definir técnicas alternativas a los métodos tradicionales del cultivo de perlas.

En el presente trabajo, se pretende realizar esta búsqueda de métodos alternativos utilizando una biotecnología con mucho potencial, que surgió como una rama de la medicina y que ahora constituye el cultivo *in vitro* de células animales. El objetivo de los cultivos celulares en condiciones *in vitro* es mantener viable una célula (cultivo celular) o una unidad funcional de células (cultivo de tejidos) fuera de su organismo multicelular. Los pioneros en estas técnicas, quienes removieron las células y órganos de pequeños vertebrados, los mantuvieron viables, y fueron capaces de hacer que se multiplicaran y crecieran, hicieron un impacto revolucionario en este campo (Martin, 1994).

Hoy en día, la incorporación de técnicas de cultivos celulares no se limita a la investigación en laboratorios. El cultivo de tejidos es también parte del campo de la economía, incumbiendo a las industrias farmacéuticas, alimenticia y biotecnológica. Tomando en cuenta la gran variedad de investigaciones y de aplicaciones industriales, es importante mencionar que las razones para utilizar las técnicas de cultivos de tejidos son tan variadas como las metas e imaginación de los investigadores (Martin, 1994).

El cultivo de células y tejidos animales vertebrados se ha desarrollado con mayor fuerza en el campo de la medicina desde hace más de cuatro décadas; desde el estudio de células cancerígenas (Attardi y Moro, 1953; Nowell, 1976), cultivos de piel (Zitcer y Kirk, 1954), cultivos de hígado (Posalaky et al., 1953), médula ósea (Fieschi, 1950), entre otros. Sin embargo en otros organismos, como los invertebrados marinos, su aplicación es más reciente y data de aproximadamente dos décadas (Rinkevich, 1999).

Los invertebrados, por su abundancia, pueden ser vistos como una gran fuente para todas las aplicaciones de las técnicas de cultivo *in vitro*, ya que representan más del 95% de las especies de metazoarios, y entre ellos, los invertebrados marinos corresponden al 30% de todas las especies. Por otro lado, las células de los invertebrados poseen desde la perspectiva morfogenética, multipotencialidad, totipotencialidad, neoplasia, etc. Esto conlleva a una alta plasticidad *in vivo* de formas, estructuras y procesos de proliferación celular (Rinkevich, 1999).

Por todo lo anterior, la presente tesis está dirigida a realizar investigación preliminar que permita sentar las bases para el establecimiento de un cultivo primario *in vitro* de tejido y células del manto de *P. mazatlanica*. Ello se hará con el apoyo de técnicas y herramientas biotecnológicas modernas.

2.0. Antecedentes

2.1. Anatomía y Fisiología del manto

En los bivalvos marinos y dulceacuícolas, el manto es responsable de un gran número de funciones especializadas, como capacidad sensorial, almacenamiento de nutrientes, dirección de corrientes alimenticias, y síntesis de una compleja matriz de proteínas (conquiolina) y cristales de carbonato de calcio que participan en la mineralización de la concha (Acosta-Salmón y Southgate, 2005).

En las ostras perleras, regiones especializadas del margen externo del manto son las encargadas de secretar una matriz orgánica y cristales de carbonato de calcio (calcita y/o aragonita) para la formación de la concha y el nácar (Doumenge et al., 1991).

Al abrir las valvas de *P. mazatlanica* se observa en primera instancia el manto (figura 1), que es una delgada capa de tejido de color crema que cubre los órganos. Este tejido está compuesto por tres zonas bien definidas: la marginal (formada por 3 lóbulos: interno, medio y externo); la paleal y la central (Zuñiga, 1998; Pérez, 2000). Partiendo de la región dorsal (cerca de la charnela), el manto forma dos capas en la región ventral; aquí el manto tiene una coloración café oscuro y el tejido es más grueso, debido a la presencia de los tres lóbulos que conforman la zona marginal. El manto sigue la curvatura de la concha y se expande y contrae al abrir y cerrar las valvas. Bajo éste, en pares y de forma de media luna, se encuentran dos pares de branquias de tipo filibranquias, compuestas por delgados

filamentos unidos entre si por mechones filiares. Estos filamentos son de color café y están adheridos al músculo abductor por medio de delgadas membranas. Las branquias se localizan en la región ventral del organismo (Zuñiga, 1998).

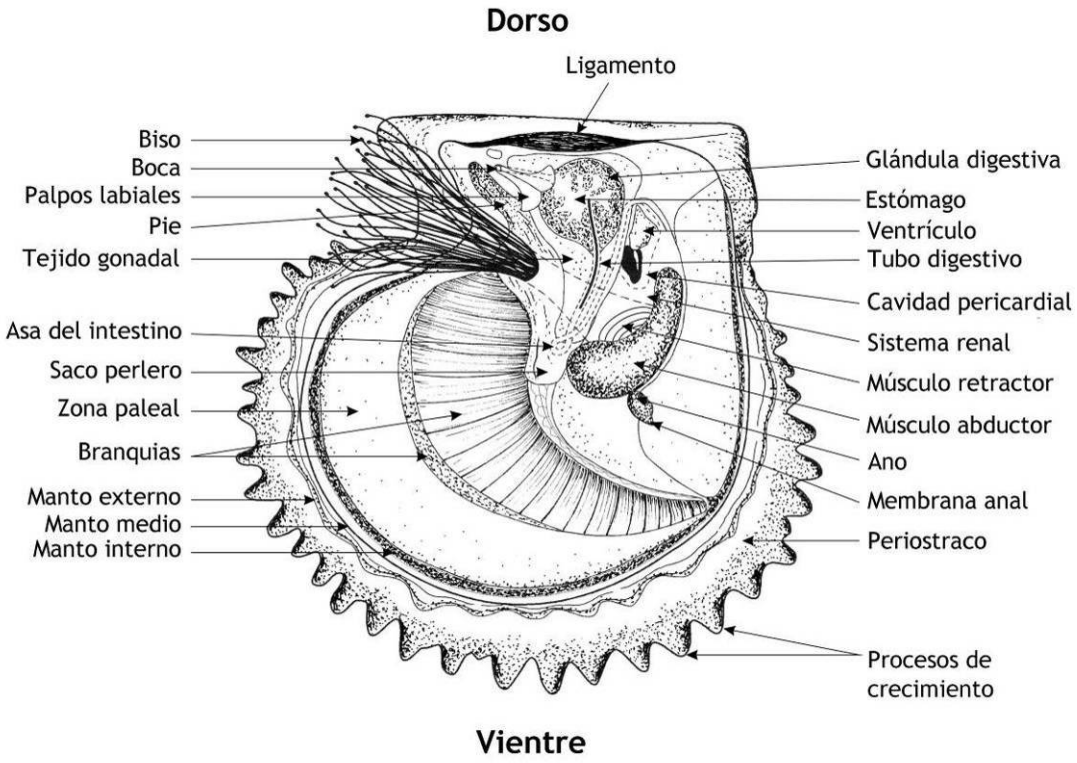

Figura 1. Anatomía interna de *Pinctada mazatlanica* (modificado de Southgate y Saucedo, 2006).

2.2. Histología e Histoquímica del Manto

El manto presenta un epitelio de recubrimiento interno y externo, los cuales están separados por una capa de tejido conectivo compuesto principalmente por fibras de colágeno en el cual se encuentran nervios, fibras musculares y vasos sanguíneos (figura 2).

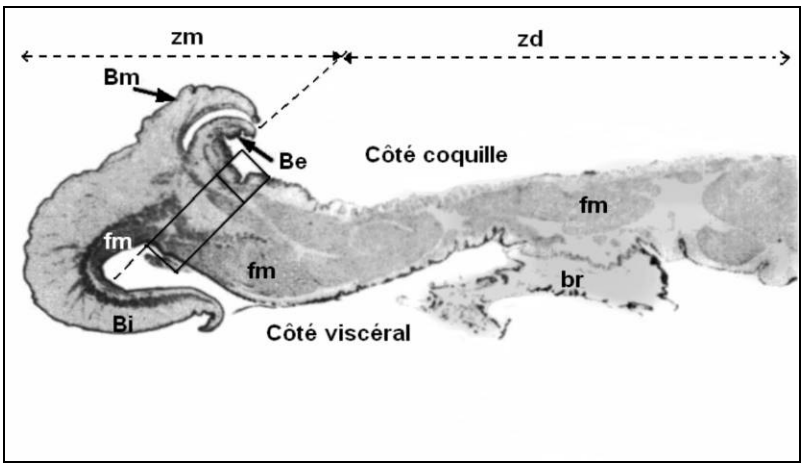

Figura 2. Fotomicrografía de la zona marginal del manto de madreperla *Pinctada margaritifera* constituida por fibras musculares (fm), borde medio (Bm), borde externo (Be), borde interno (Bi) y branquias (Br). Las líneas punteadas dividen la zona marginal (zm) de la zona pealeal (zd). Côté coquille: lado de la concha, Côté viscéral: lado visceral. Tomada de Fougerouse-Tsing y Herbaut, 1994**.**

Dix (1973) describe el manto paleal como un tejido que presenta capas de células epiteliales columnares externas e internas que rodean tejido muscular y conectivo. Las células tienen el mismo tamaño (10 a 15 µm x 4 a 6 µm), sin embargo existen pequeñas diferencias entre el epitelio externo e interno. Este último se caracteriza por la presencia de cilios densos, pigmentos de melanina en el citoplasma y un núcleo basal ovoide. La pigmentación de los cilios está ausente en el epitelio exterior.

Igualmente, existe la presencia de moco basofílico y células granulares gruesas acidofílicas en ambos lados del manto paleal, pero están un poco restringidos al epitelio de la superficie interna. Las células secretoras grandes de la superficie externa se encuentran en el subepitelio y en el epitelio interno (Dix, 1973).

2.3. Biomineralización

Además de la formación de la concha, en los bivalvos el manto juega un papel muy importante en el mecanismo de defensa interno del organismo llamado “nacarización” (Malek y Cheng, 1974; Checa, 2000). De hecho, este proceso natural ha sido utilizado por el hombre para desarrollar el perlicultivo. Dicho proceso se compara con la formación de la concha, ya que la perla tiene la misma composición química que la capa interna de la concha. En este sentido, todos los moluscos con concha son capaces de producir perlas (García-Gasca et al., 1994).

En condiciones naturales, el manto secreta tres capas paralelas durante la formación de la concha: el periostraco (capa externa), la capa prismática también conocida como capa calcárea externa (intermedia) y la capa nacarada interna (García-Gasca et al., 1994). Las capas calcáreas están construidas con carbonato de calcio (calcita y/o aragonita) y una matriz de macromoléculas orgánicas, de entre las cuales la calcita y aragonita son las formas polimórficas más comunes (Levi et al., 1998). Estos compuestos se depositan en complejas formas arquitectónicas, resultando un material ligero y resistente. Las conchas de los moluscos poseen al menos siete formas diferentes de arreglo arquitectónico, dentro de los cuales el nácar es el más estudiado. Este arreglo se asemeja a un modelo de ladrillos y cemento: los cristales poligonales de aragonita se asemejan a los ladrillos, y los polisacáridos y fibras de proteínas depositadas ortogonalmente y alineadas con los ejes de los cristales de aragonita se asemejan al cemento (Addadi y Weiner, 1997). La principal

diferencia entre la calcita y la aragonita es que los grupos de carbonato en la calcita se encuentran en un solo plano, mientras que en la aragonita se encuentran ligeramente rotados (Levi et al., 1998).

García-Gasca et al. (1994) describe este proceso de formación de la concha en tres etapas: (1) absorción de materiales calcáreos dentro del organismo, (2) secreción del material de la concha desde la epidermis del manto y, (3) transformación del material secretado en cristales de carbonato de calcio con una matriz orgánica que cementa el cristal. Las células responsables de la formación de la concha primero construyen una matriz orgánica, y después, a distancia, inducen la formación de cristales en los espacios disponibles. En las capas de la matriz orgánica se presentan muchos poros con la finalidad de permitir el paso de iones y proteínas (figura 3). Así los cristales pueden crecer lejos de las células del manto, el cual provee la materia prima para el crecimiento (Addadi y Weiner, 1997).

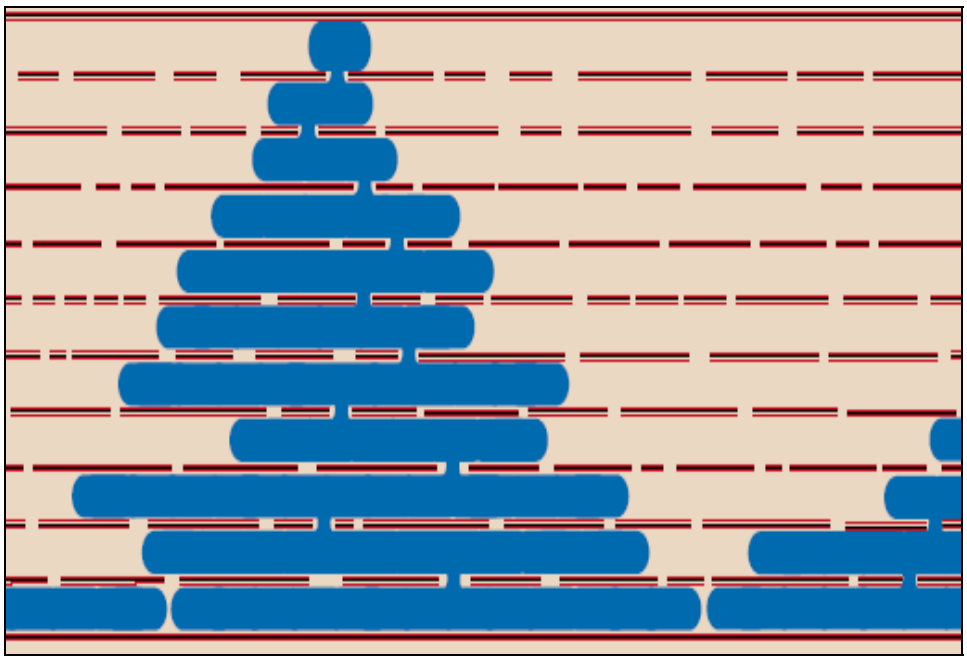

Figura 3. Cristales de nácar creciendo entre las plantillas previamente depositadas. Las capas se componen de una central de fibras (negro) cubiertas de otras capas de proteínas (rojo) con pequeños poros que permiten el paso de materiales que dan forma a los cristales de aragonita (azul) (tomado de Addadi y Weiner, 1997).

La matriz orgánica está involucrada en la morfología, tamaño, densidad y orientación de sus constituyentes. Se divide en dos fracciones, insoluble y soluble en agua. Las proteínas de la matriz que son solubles en agua controlan la morfología y aglomerado o nucleación (depositación) de los cristales. Las proteínas insolubles de la matriz controlan el tamaño del cristal. Las macromoléculas que conforman la matriz orgánica son secretadas por el epitelio externo hacia el líquido extrapaleal, en donde se reorganizan y sufren una serie de cambios para formar una plantilla en la cual los minerales son depositados (Sud et al., 2001).

2.4. Importancia Biomédica del nácar

Es importante destacar que el nácar tiene un gran potencial en la industria biomédica. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la biocompatibilidad y alta capacidad osteogénica del nácar (Atlan et al., 1999; Lamghari et al., 1999; Mouriès et al., 2002), que ya comienzan a ser de gran ayuda para acelerar la soldadura de huesos rotos, la reconstrucción de defectos maxilares variados y la regeneración de la médula espinal a partir de polvo de nácar (Atlan et al., 1997). Ello debido a que la matriz formada por el nácar libera señales químicas que pueden ser capaces de activar a los osteoblastos en un medio fisiológico. Por ello, estas moléculas representan candidatos ideales para actuar como compuestos homólogos entre el tejido óseo y el nácar (Mouriès et al., 2002). Asimismo, se sabe que el nácar posee la misma densidad del hueso, pero una microdureza mayor a la del titanio (Atlan et al., 1999).

Además, existe evidencia que un aloimplante de manto injertado cerca de la gónada de la ostra perlera *P. mazatlanica* puede alterar algunas de las rutas metabólicas involucradas en el ciclo gametogénico de la especie, estimulando la redirección del flujo de energía preferentemente hacia la reproducción (Saucedo et al., 2001). En comparación con organismos silvestres, los organismos injertados poseen una mayor cantidad de gametos maduros, una concentración más elevada de proteínas, lípidos y triglicéridos en la gónada, así como un menor nivel de proteínas en el músculo abductor. Lo que queda por elucidar aún sobre este proceso de maduración diferencial de la gónada entre organismos injertados

y no injertados son los mecanismos neuro-endócrinos que promueven el re-direccionamiento de la energía hacia la gónada en las ostras operadas.

2.5. Cultivos celulares en invertebrados marinos

Los cultivos celulares de invertebrados marinos han sido estudiados y desarrollados desde la década de los 60´s. Sin embargo, a pesar de los varios intentos que se han realizado, no se han reportado a la fecha avances importantes en cuanto a la definición de líneas celulares. A pesar de ello, los cultivos celulares de invertebrados marinos han sido usados exitosamente para investigar procesos específicos (Sud et al., 2001), particularmente como herramientas alternas a la experimentación con animales, como aplicaciones biotecnológicas y patológicas (Rinkevich, 1999).

Durante la década de los 90´s se han concentrado los esfuerzos por obtener líneas celulares principalmente de seis fila de invertebrados: Porifera, Cnidaria, Crustacea, Mollusca, Echinodermata, y Urochordata. Desafortunadamente, dentro de cada filum, son muy pocos los organismos marinos que se han tomado en cuenta. Por ejemplo *Porites lutea* y *Favia favus* (Anthozoa, Madeporaria), *Palemon* y *Penaeus* (Crustacea), neuronas de nudibranquios, parásitos de moluscos como *Perkinsus*, urocordados como *Botrylloides*, entre otros (Rinkevich, 1999).

En particular, los cultivos *in vitro* de tejidos de moluscos se han enfocado en diversos campos, tales como la neurobiología; la evaluación de efectos xenobióticos para monitorear contaminación a nivel celular (Aufret y Oubella, 1997); al estudio del sistema inmune, especialmente en moluscos que son hospederos intermedios de parásitos de humanos (Laurusen, et al., 1997); a estudios de patogénesis (Brewster y Nicholson, 1979); de parásitos protistas de ostiones (Gauthier y Vasta, 2002); a la biomineralización de la concha en abulón (Poncet et al., 1999), al metabolismo de caracoles terrestres (Pedler et al., 2000); a los factores de crecimiento en glándulas digestivas de bivalvos (Giard et al., 1998), estudios de los procesos bioquímicos en la calcificación de la concha en las ostras perleras (Machii, 1974; Youbin et al., 1994; Anjin y Shuna, 1995; Levi et al., 1998; Sud et al., 2001), entre otros.

2.6. Cultivos celulares de manto de bivalvos

Los estudios acerca del cultivo de manto de ostras perleras son muy escasos. Aunque se tienen registros que datan desde hace 30 años, es importante señalar que a la fecha no se ha llegado a concretar un estudio completo sobre líneas celulares. De los diversos estudios realizados se pueden resaltar los siguientes:

Suzuki y colaboradores (1991) evaluaron *in vitro* la habilidad de los amebocitos del manto de la ostra japonesa *P. fucata* para producir la matriz extracelular durante el proceso de regeneración del tejido donde se realiza la incisión para inserción del manto y el núcleo.

Los autores encontraron que los amebocitos agranulares aparentemente tienen la habilidad de producir una matriz extracelular compuesta de colágeno y posiblemente proteoglicanos.

Anjing y Shuna (1995) observaron bajo un microscopio de contraste de fases la formación y los cambios de la secreción de nácar por parte del manto de un mejillón de agua dulce (*Cristaria plicata*) cultivado *in vitro*, encontrando que, bajo estas condiciones, el manto puede secretar las mismas sustancias que existen *in vivo* y que gradualmente se pueden formar cristales calcio durante el periodo de cultivo.

Koyama y Aizawa (2000) lograron cultivar el manto de una almeja de profundidad (*Calyptogena soyoae*) durante 13 días a 4, 8, 15, 20 y 37°C, en un medio de cultivo DMEM (Dulbeco´s Modified Eagle Medium) y un sustrato de poli-D-lisina. El tejido solo se adhirió al sustrato a 4°C, sin embargo se registró proliferación de las células y síntesis de ADN durante 13 días hasta que un aumento en la temperatura las eliminó.

En un experimento relacionado con la producción de perlas *in vitro* con la ostra perlera *P. radiata*, Dharmaraj y Suja (2002) observan la secreción de material orgánico como células epiteliales y el depósito de cristales (no especificados) alrededor de un núcleo utilizando M199 y 10% de suero fetal de bovino a 28°C y ph 7.4. Los autores reportan la formación de una perla *in vitro*, no obstante no detallan mucho sobre el diseño del experimento ni de los resultados obtenidos.

Barik y colaboradores (2004) cultivaron el manto de un mejillón de agua dulce productor de perlas, *Lamellidens marginalis*. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO_2 a 28-30°C en medio Dulbeco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) adicionado con 10% de suero fetal de bovino y antibióticos. Después de 12 horas registraron la migración de células epiteliales para formar una capa alrededor de toda la placa de cultivo entre los 7 y 10 días de cultivo, para después observar la producción de cristales de aragonita entre los días 38 y 40.

Cabe resaltar que en ninguno de los estudios anteriores se analizaron variables experimentales diversas, con excepción del trabajo de Poncet y colaboradores (2000), ni tampoco se explica si se obtuvo algún resultado exitoso en cuanto a la definición de una línea celular. Es por esto que el presente estudio se pretende evaluar una gama de variables experimentales con la finalidad de tener un panorama más completo de la respuesta de las células y tejidos del manto a dichas variables.

3.0. Justificación

Las células del manto son las responsables directas de la formación de perlas por el depósito de cristales de carbonato de calcio y la secreción de una matriz orgánica proteica (conquiolina) para sujetar dichos cristales alrededor del núcleo implantado en la ostra. Sin embargo, los eventos celulares que desembocan en la secreción de nácar todavía no es del todo comprendido, aun a pesar de la importancia que reviste la perlicultura hoy en día. Es

por eso que el cultivo primario de células epiteliales y de explantes del manto constituye el punto de partida para poder estudiar y dominar más adelante el proceso de formación de perlas *in vitro*. De hecho, debe recordarse que la intención con el cultivo *in vitro* de manto es recrear lo que sucede en el saco perlero *in vivo*, en donde el patrón de proliferación de las células es quizá el aspecto que mayor importancia reviste y el que mejor se debe estudiar y comprender.

En México, la tecnología para el perlicultivo comercial se ha logrado dominar en años recientes. A pesar de ello, para poder permanecer en un mercado global tan competido, una tecnología adecuada debe desarrollarse de tal forma que garantice la obtención de perlas de buena calidad en un tiempo relativamente razonable. Esto pudiera optimizarse con la aplicación de herramientas modernas como el cultivo celular y tisular. Si bien los resultados de este estudio pudieran ayudar a sentar las bases de dicho cultivo, pudiera ser prematuro predecir el éxito del desarrollo de esta tecnología en nuestro país sin realizar experimentación básica. De hecho la idea de una perla cultivada *in vitro* ya había sido conceptualizada desde décadas atrás (Anon, 1985) bajo el principio de inyectar una suspensión de células de manto funcional junto con el núcleo, en vez de implantar un pedazo de manto. Esto parece irreal e impráctico en primera instancia, a menos que una línea celular y funcional del manto se logre establecer. Si lo anterior pudiera llevarse a cabo con éxito, habría otros aspectos asociados que se deben de tomar en cuenta, como: (1) la calidad de las perlas, la cual pudiera ser modificada al gusto del cliente utilizando líneas celulares de diferentes especies de ostras perleras, asegurando una excelente función secretora, ya que la calidad de las perlas está en función directa de la naturaleza de la

secreción celular; (2) que la cubierta de nácar depositada sobre el núcleo pudiera ser uniforme, a diferencia del método convencional de introducción del manto y núcleo al cuerpo de la ostra viva, ya que una suspensión celular se pudiera sujetar uniformemente alrededor del núcleo; y (3) se minimizaría el sacrificio de ostras para la preparación de manto injertado, contribuyendo indirectamente a la conservación de la especie.

Con base en lo anterior, resulta evidente la necesidad que existe por implementar nuevas herramientas biotecnológicas en el campo del perlicultivo comercial, en donde la poca ó nula información de que se dispone sobre cultivos tisulares y celulares, aunado al poco progreso logrado en este sentido desde décadas atrás, justifican plenamente la presente investigación.

4.0. Objetivos

La presente tesis tiene como objetivo determinar las condiciones básicas adecuadas para llevar a cabo el cultivo *in vitro* de células aisladas y explantes del manto de la madreperla *P. mazatlanica*.

4.1. Objetivos específicos

- Evaluar cinco diferentes formas de disgregación enzimática celular del manto de *Pinctada mazatlanica.*
- Evaluar tres medios de cultivo para permitir la supervivencia de explantes del manto de *Pinctada mazatlanica.*
- Evaluar dos sustratos para las células y el manto de *Pinctada mazatlanica.*
- Evaluar cuatro osmolaridades del medio de cultivo para el manto de *Pinctada mazatlanica.*
- Evaluar la producción de calcio *in vitro* por parte de las células del manto de *Pinctada mazatlanica.*

5.0. Hipótesis

Dado que el manto es un tejido orgánico como cualquier otro, si dentro de un entorno controlado *in vitro* se le proporcionan las condiciones elementales que existen *in vivo*, se logrará el desarrollo y crecimiento de células aisladas y explantes de manto como unidad funcional.

De manera particular se espera que la colagenasa sea la enzima con mayor actividad a una temperatura de 37°C, ya que pudiera encontrar más afinidad por el sustrato dadas las

características del manto al contener muchas fibras colágenas y los antecedentes existentes con buenos resultados a esa temperatura. Asimismo, se espera que el sustrato celular ayude a las células y los explantes, ya que la mayoría de las células requieren de una adhesión para su crecimiento y proliferación. El utilizar osmolaridades parecidas al ambiente donde se desarrolla el organismo podría proporcionar mejores condiciones osmóticas, por lo que se espera que el medio de cultivo preparado con agua de mar (60 mM) proporcione los mejores resultados y permita a su vez una absorción y/o síntesis de calcio.

6.0. Metodología

6.1. Recolecta y depuración

Un total de 15 individuos de *P. mazatlanica*, en la etapa de juveniles y con 60 (± 7.8) mm de longitud dorsoventral de la concha, fueron recolectados de las instalaciones submarinas del cultivo de bivalvos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR; 24°16' N, 110°19' O). Los organismos se limpiaron externamente de epibiontes, se cepillaron con alcohol etílico al 70% y se transportaron al Laboratorio de Larvicultura de Organismos Acuáticos del mismo Centro. Posteriormente, previo a su utilización, los organismos se mantuvieron en un sistema de flujo cerrado con agua filtrada (1 μm) e irradiada con luz UV durante 48 horas con recambios diarios de agua. Lo anterior con la finalidad de depurar (limpiar internamente) los tejidos. Se utilizaron pequeños fragmentos

de aproximadamente 40 mm de longitud obtenidos de la parte paleal ventral del manto de *P. mazatlanica* (ver apartado 6.4).

6.2. Preparación del sustrato celular

Se preparó primeramente una solución de Poli-D-lisina (SIGMA 81358) para utilizarla como sustrato para el cultivo de células de manto. El reactivo se diluyó con una solución amortiguadora estéril de boratos 0.15 M a pH 8.3 para dar una concentración final de 0.1 mg/mL esterilizada en autoclave. Se agregó 1 mL de la solución en cada pozo de una placa multipozos y se incubo a 37°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con solución amortiguadora de fosfatos estéril. Las placas no utilizadas en el momento se mantuvieron en refrigeración a 4°C, selladas de la tapa previamente con papel *parafilm* en la campana de flujo laminar.

La solución de reserva de Poli-D-lisina se conservó sin problema en refrigeración a 4°C. La cantidad de solución de reserva preparada fue suficiente para utilizarla en 120 pozos de placas multipozo de 6 x 4, como las empleadas en el presente experimento.

6.3. Preparación de los medios de cultivo celular

La preparación de los medios de cultivo celular se realizó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar, dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Animales del CIBNOR. Se probaron tres medios de cultivo, los cuales se prepararon según las instrucciones del fabricante: (1) Medio MegaCell® RPMI-1640 (SIGMA M-3817), (2) una combinación de 50% de MegaCell® Minimun Essential Medium Eagle (SIGMA M-4067) y 50% de MegaCell® Dulbecco´s Modified Eagle's (SIGMA M-3942), conteniendo 3% se suero fetal de bovino (SFB) marca Hyclone (filtrado a 40 µm), a excepción del Medio 199 (SIGMA M-2154) con 10% y (3) un control que contenía solución Hanks (SIGMA H-8264) en vez de medio de cultivo. Los medios de cultivo celular contuvieron adicionalmente L-Glutamina (4 mM) (como lo indica el fabricante) y 0.1% de Penicilina-Estreptomicina. Una vez preparados, los medios se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su utilización (ver anexo 1 y 3).

Se prepararon 50 mL de cada uno de los tres medios de cultivo evaluados. Cabe mencionar que para poder utilizarlos frescos al momento de la preparación, es necesario disolver la L-Glutamina en agua destilada a un pH de 4, para posteriormente pasarla por un filtro de membrana de 0.45 µm. En todos los casos los medios se mantuvieron en buen estado sin contaminación aparente durante todo el experimento, almacenándolos a 4°C y extremando las precauciones en cuanto a la esterilidad utilizando consumibles desechables en todo momento.

6.4. Aislamiento y disección mecánica del manto

Una vez depuradas, las ostras se sacrificaron cortando el músculo abductor. Posteriormente, con la ayuda de un bisturí y pinzas quirúrgicas estériles se extrajeron ambas porciones ventrales del manto (zona marginal). El tejido se colocó inmediatamente en una caja de petri conteniendo solución Hanks (ver anexo 3) adicionada con Rojo Fenol (para detectar cambios en el pH) y Penicilina-Estreptomicina con antibióticos (0.01%) (figura 4). Para evitar la contaminación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Animales, las disecciones se realizaron en el Laboratorio de Larvicultura. Las cajas se trasladaron inmediatamente de un laboratorio a otro.

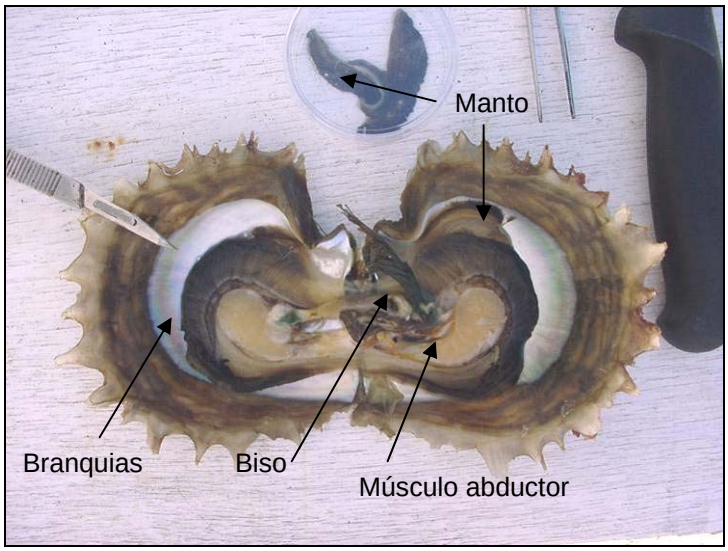

Figura 4. Porciones ventrales del manto obtenidas a partir de un juvenil de *Pinctada mazatlanica*. Foto: Alejandro Olivera

En condiciones de esterilidad, ya dentro de la campana de flujo laminar, la parte media del manto se aisló de tejido no deseado. Para esto se cambió dos veces de caja de

Petri con la misma solución utilizando un nuevo bisturí estéril en cada paso. Los fragmentos resultantes (≈40 mm de longitud x 4 mm de ancho) fueron divididos en fragmentos más pequeños (≈1 mm^2) (figuras 5 a,b y c).

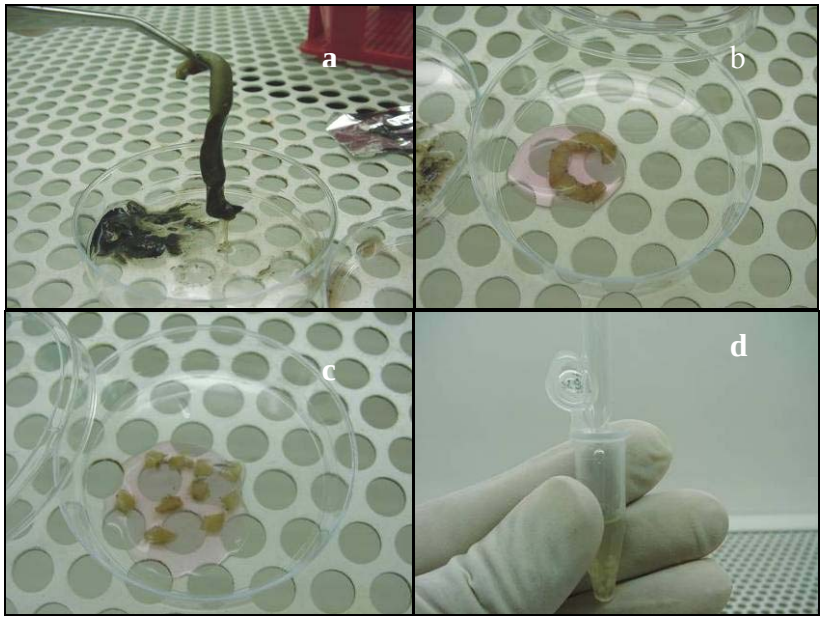

Figura 5. Disección mecánica del manto de *Pinctada mazatlanica*. a) zona marginal y paleal, b) zona paleal en solución Hanks, c) fragmentos de la zona paleal del manto y d) disgregación del manto con pipeta Pasteur. Fotografías: Alejandro Olivera

6.4.1. Disgregación enzimática celular

Para llevar a cabo la disgregación enzimática, se colocó el tejido obtenido en un tubo para centrífuga de 1.6 mL (figura 5d) conteniendo la enzima en cuestión (ver párrafo inferior) disuelta en solución Hanks en relación 1:2 tejido:volumen con rojo fenol (0.011%) y Penicilina-Estreptomicina (0.1%). Posteriormente, en la campana de flujo laminar, se manipuló succionando y expulsando repetidamente con una pipeta Pasteur estéril la mezcla

de tejido y solución enzimática para seguir fragmentando el tejido, durante 1 minuto aproximadamente (figura 5d).

Se utilizaron cinco diferentes enzimas para lograr la disgregación celular: (1) Solución de Tripsina-EDTA (E.C. 3.4.21.4) 1 X, (2) Colagenasa I 0.5% (E.C. 3.4.24.3), (3) Proteasa Tipo XIV 0.1% (3.4.24.31), (4) Proteinasa K 2.5% (E.C. 3.4.21.64) y (5) enzima de proteolítica de *Trichoderma harzianum* 1% (p/v). Todas se disolvieron en solución Hanks (pH 7.4).

En todos los casos, la disgregación se evaluó incubando a tres temperaturas experimentales: 15, 37 y 46°C, durante un periodo de 90 minutos. En pruebas preliminares se determinó que el rendimiento de una preparación de colagenasa tipo I (5U/mg) a 37°C no permite obtener resultados satisfactorios. Para todas las enzimas y temperaturas se evaluó el rendimiento y la viabilidad de las células disgregadas a intervalos de 20 minutos por inclusión/exclusión de Azul de Tripano (0.4%) (SIGMA T-8154), el cual se utilizó en proporción 1:1 (v/v). Lo anterior se calculó contando en un hematocitómetro las células no viables (teñidas de azul) y las viables refringentes. El cálculo de la viabilidad celular para cada lote experimental se hizo con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad(\%) = \frac{Total - Teñidas}{Total} x100 \qquad \text{Ec. 1}$$

6.4.2. Siembra de células disgregadas

Una vez realizada la disociación enzimática celular, se hicieron dos lavados del producto con solución Hanks. Para esto se centrifugó la mezcla de cada enzima y tejido a 180 g durante 15 minutos a 4°C, de acuerdo al protocolo de Martin (1994): Permitiendo que las células se asienten y separando la enzima mediante su centrifugación de 150 a 200 g durante 10 a 15 minutos. Inmediatamente después de los lavados se procedió a realizar la siembra celular. Para esto se succiona la mezcla de enzima y tejido con una pipeta Pasteur y se hace pasar por una columna de fibra de vidrio, conformada por otra pipeta que contiene la fibra en su interior, en la parte donde hace embudo. Esto con la finalidad de que queden retenidas la gran mayoría de las membranas, materia orgánica particulada, ácidos nucleicos y tejidos rotos, que pudieran ser un sustrato para bacterias indeseables, dejando pasar únicamente las células viables. Hecho esto, la suspensión de células se distribuyó uniformemente en los pozos.

Las células disgregadas y limpiadas de escombros celulares se sembraron en placas multipozo de 24 pozos (4 x 6), de fondo plano especiales para cultivos celulares (Corning 3526). Se probó un sustrato celular (Poli-D-lisina) y medios de cultivo simultáneamente, con tres réplicas por tratamiento (figura 6). Los cultivos se mantuvieron durante cinco días en una incubadora con un flujo de 3% de CO_2, a 23°C (Fisher Scientific).

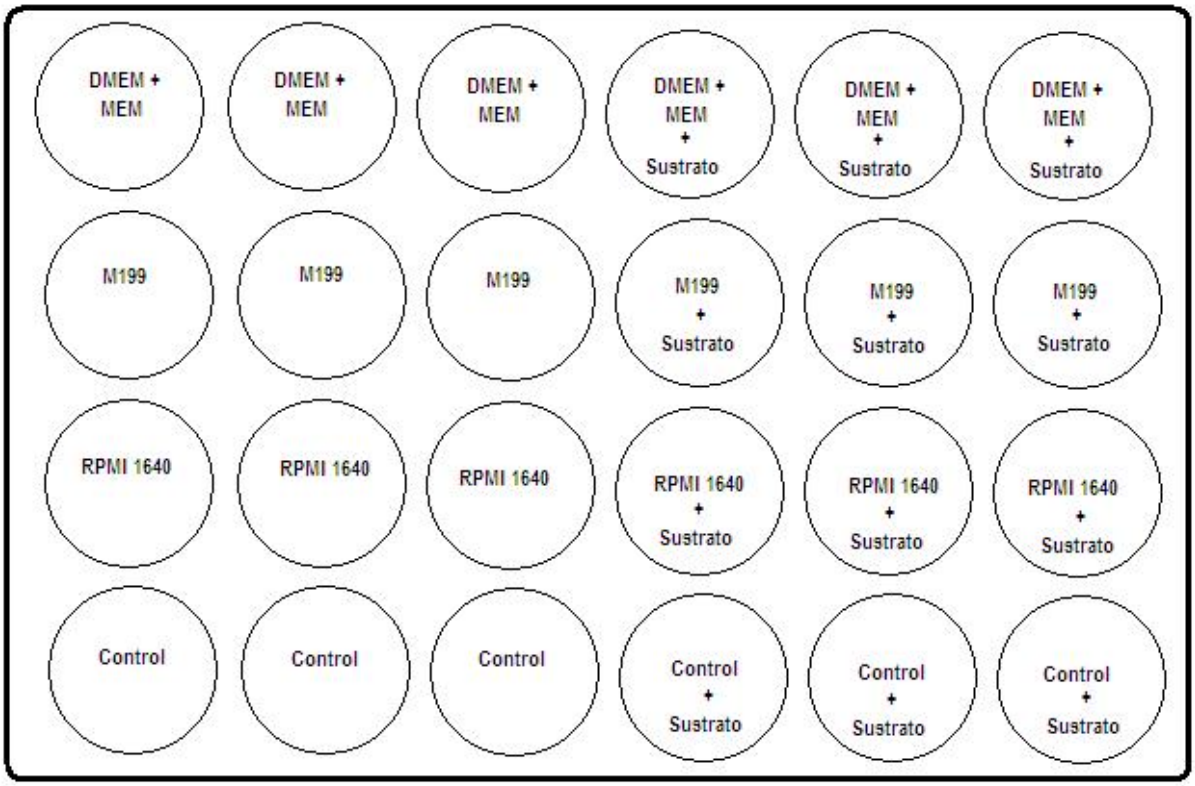

Figura 6. Esquema del diseño experimental de siembra en una placa multiwell (4 x 6) para cultivos celulares. M199: Medio 199, RPMI 1640: Medio MegaCell® RPMI-1640, MEM: MegaCell® Minimun Essential Medium Eagle y DMEM: MegaCell® Dulbecco´s Modified Eagle's. Control: Solución Hanks.

6.5. Obtención y siembra de explantes

Adicionalmente, utilizando el mismo diseño del bioensayo anterior, se sembró en cada pozo de otra placa un explante de manto de forma circular de 3 mm de diámetro, cortados con un instrumento comercial para el perlicultivo (figuras 7 y 8). De esta manera, se trabajó en ambos modelos (células aisladas y explantes) con un diseño experimental de tres réplicas por cada uno de los tres medios de cultivo y el control, con sustrato y sin

sustrato (figuras 6 y 9). Este procedimiento se realizó en tres ocasiones, manteniendo el cultivo hasta que se presentó algún problema con la supervivencia de los mismos, usualmente 10-14 días. Los cultivos se observaban a diario y a su vez eran agitados.

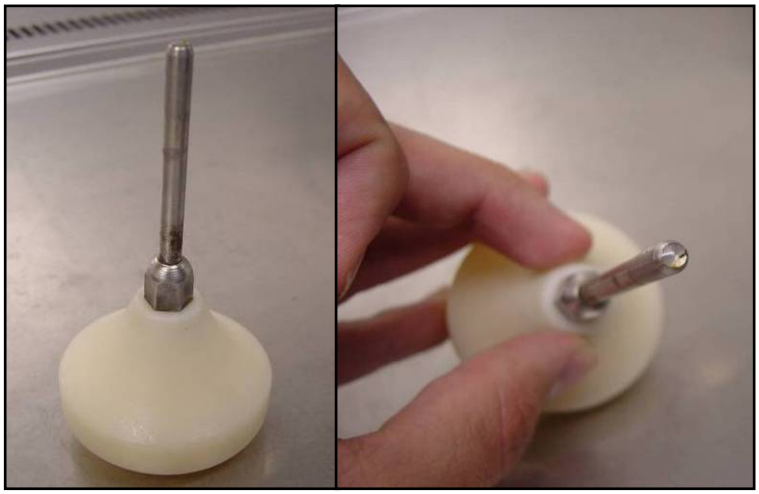

Figura 7. Instrumento comercial para cortar el manto utilizado en el perlicultivo. Foto. Alejandro Olivera.

Figura 8. Corte de la zona paleal de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica*. Foto. Alejandro Olivera.

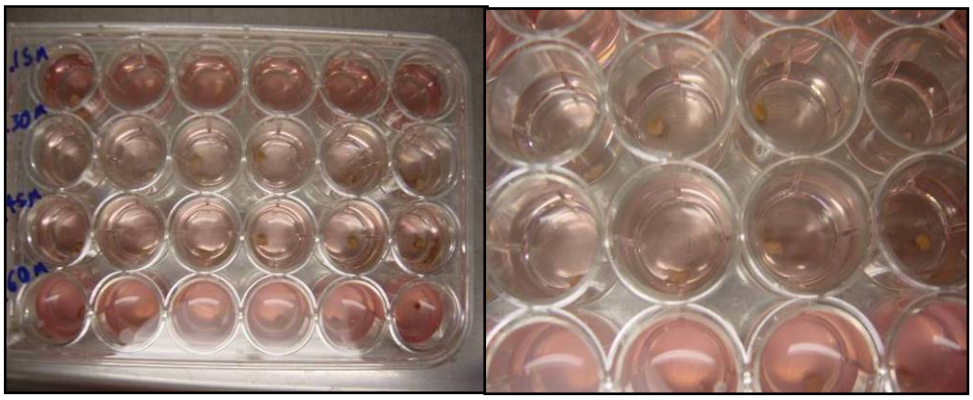

Figura 9. Siembra de los explantes de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* en placas multipozo (4x6). Foto: Alejandro Olivera

6.6. Osmolaridad

Para probar el comportamiento del tejido a diferentes osmolaridades se siguieron los mismos procedimientos metodológicos descritos anteriormente en la sección 6.5 y utilizando el medio Megacell® RPMI-1640 a 0.15, 0.30, 0.45 y 0.60 mM de NaCl adicionado con 3% de Suero Fetal de Bovino; 279-303 mOsm/kg. La solución de 0.6 mM de NaCl se preparó con agua de mar esterilizada en autoclave. Todos los tratamientos fueron adicionados con 0.1% (p/v) de Penicilina-Estreptomicina y L-Glutamina (4 mM). Estos se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Los cultivos fueron observados en su capacidad de manifestar una actividad metabólica representada como un cambio en la coloración del medio por acidificación (presencia de CO_2 de la respiración celular).

6.7. Absorción de calcio

Se siguió el mismo procedimiento anterior para sembrar los explantes (dos por pozo) utilizando placas de 24 pozos (4x6) sin recubrimiento con poli-D-lisina. Cada día se retiraron y se fijaron en formol al 10% dos explantes por tratamiento para evaluar la acumulación de calcio mediante la técnica histoquímica de rojo de Alizarina S (anexo 1), un colorante del grupo de las antraquinonas que forma un precipitado rojo anaranjado con el calcio (Spannhof, 1966). Para cada día y tratamiento se hicieron cortes transversales y longitudinales de los explantes. Posteriormente se sembró otra placa para repetir el mismo procedimiento.

6.8. Espectrofotometría de absorción atómica

El medio de cultivo resultante del bioensayo anterior se sometió a un procedimiento de análisis por medio de espectrofotometría de absorción atómica, de acuerdo a la norma NMX-AA-051-SCFI-2001, con la finalidad de determinar si el tejido absorbió el calcio disponible del medio de cultivo. De la misma forma, este procedimiento se realizó en dos ocasiones.

6.9. Estructura celular

Para identificar el crecimiento de las células del manto, se realizaron tinciones histológicas con la técnica convencional de contraste hematoxilina-eosina utilizando los explantes que fueron cultivados durante 5 días en las condiciones descritas en párrafos anteriores.

6.10. Monitoreo y mantenimiento

Durante el transcurso de los experimentos, los cultivos se revisaron diariamente en un microscopio invertido de contrates de fases (40X) con la finalidad de buscar células adheridas, confluentes y/o en mitosis, así como indicios de contaminación. Se hicieron recambios del 50% del medio de cultivo cada 48 horas. Durante todos los bioensayos se mantuvo un registro escrito y fotográfico detallado de los sucesos más relevantes.

Una representación de diagrama de flujo de la metodología del presente estudio se esquematiza en la figura 10.

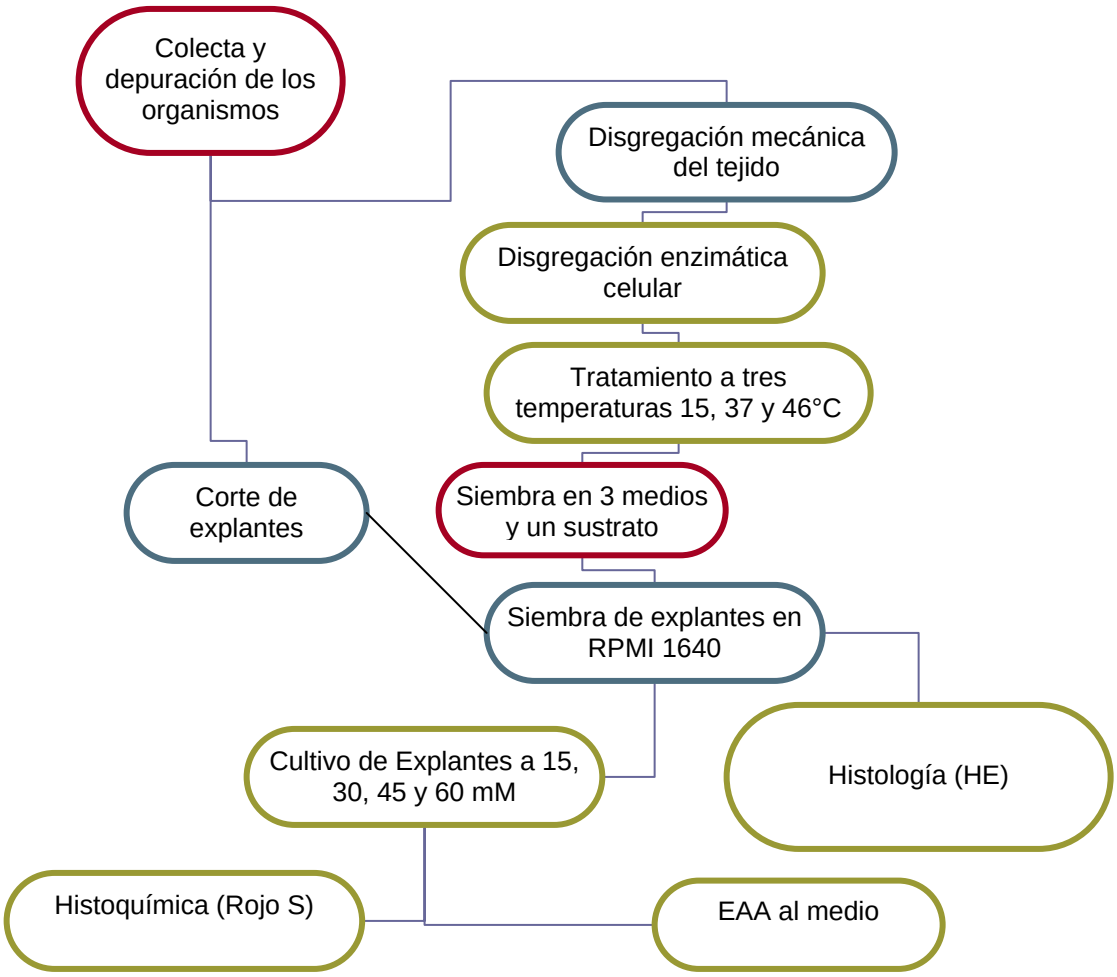

Figura 10. Diagrama de flujo de lo métodos realizados en el presente estudio.

7.0. Resultados

7.1. Colecta y depuración

La depuración y aislamiento del tejido aparentemente no representó problema alguno al aplicar los métodos establecidos, ya que ningún organismo de los recolectados murió y el tejido se obtuvo siempre de forma intacta. Sin embargo, cabe mencionar que el manto, al ser un tejido elástico, se contrae desde el momento que es extraído del organismo, ya que el tejido es bastante elástico por sus características intrínsecas, reduciéndose aproximadamente en un 50% de su tamaño. Por ello, se procedió con cuidado para tener la certeza de extraer la parte requerida. Por otro lado, el tejido se encuentra cubierto por un fluido extrapaleal que presenta mucha viscosidad, lo que dificulta su manipulación, siendo necesario limpiarlo completamente antes de proceder a la fragmentación en pequeñas porciones. En promedio se consumieron 10 minutos en aislar los pequeños fragmentos adecuados para la disociación enzimática o para la obtención de explantes.

7.2. Preparación del sustrato celular

No se presentó problema alguno en la preparación del sustrato celular.

7.3. Preparación de los medios de cultivo celular

No se presentó problema alguno en la preparación de los medios de cultivo celular. En todos los casos los medios se mantuvieron en buen estado sin contaminación aparente durante todo el experimento, almacenándolos a 4°C y extremando las precauciones en cuanto a la esterilidad utilizando consumibles estériles desechables en todo momento.

7.4. Aislamiento y disección mecánica del manto

Al momento de introducir el cuchillo por un costado de la ostra en busca del músculo abductor, se produce una hemorragia, por lo que en ese momento las ostras se mantuvieron con la parte dorsal hacia abajo con la finalidad de impedir que la hemolinfa y/o el fluido escurriera sobre el manto para evitar posibles contaminaciones.

Considerando que una parte del manto está inervado por el ganglio cerebral y otra por el ganglio visceral, ambas partes mantienen cierta independencia a estímulos recibidos. Por ello, al cortar el músculo abductor para disectar la ostra, en ocasiones el manto de una de las valvas se contrae y el otro se mantiene intacto. Cuando esto ocurría se conservaba para su uso en los experimentos la parte del tejido que permanece intacto, desechando el resto.

Al momento de la disección en cada ostra que fue utilizada para el experimento se encontró un par de crustáceos de la especie *Pontonia margarita* (Crustacea: Pontonidae);

siempre un macho y una hembra. Estos organismos son simbiontes obligados de las ostras que proporcionan servicio de limpieza a cambio de hogar y protección.

7.4.1. Disgregación enzimática celular

En pruebas preliminares se determinó que el rendimiento de una preparación de colagenasa tipo I (5U/mg) a 37°C no permite obtener resultados satisfactorios. Durante estas observaciones no se hizo evidente la liberación de células bajo el microscopio a intervalos de 15 minutos. Asimismo, en observaciones macroscópicas del recipiente, se identificó que la solución presentaba un color transparente y el tejido permanecía compacto. Este experimento se repitió tres veces en intervalos de 2 horas a 37°C y después se dejó durante 24 horas a la misma temperatura realizando monitoreos periódicos sin obtener resultados satisfactorios en ninguna ocasión. Lo mismo sucedió para las temperaturas de 15 y 46 °C. Resultados similares se obtuvieron con la enzima de *T. harzianum*, por lo que se procedió a eliminar ambas enzimas del diseño experimental.

Considerando los nulos rendimientos obtenidos de este bioensayo, se opto por cambiar la colagenasa tipo I por una de mayor actividad catalítica, en este caso de 414 U/mg. El rendimiento obtenido con las diferentes enzimas se muestra en las figuras 11 a 16. El rendimiento de la colagenasa I a 414 U/mg mejoró sustancialmente al liberar >200,000 cel/mL.

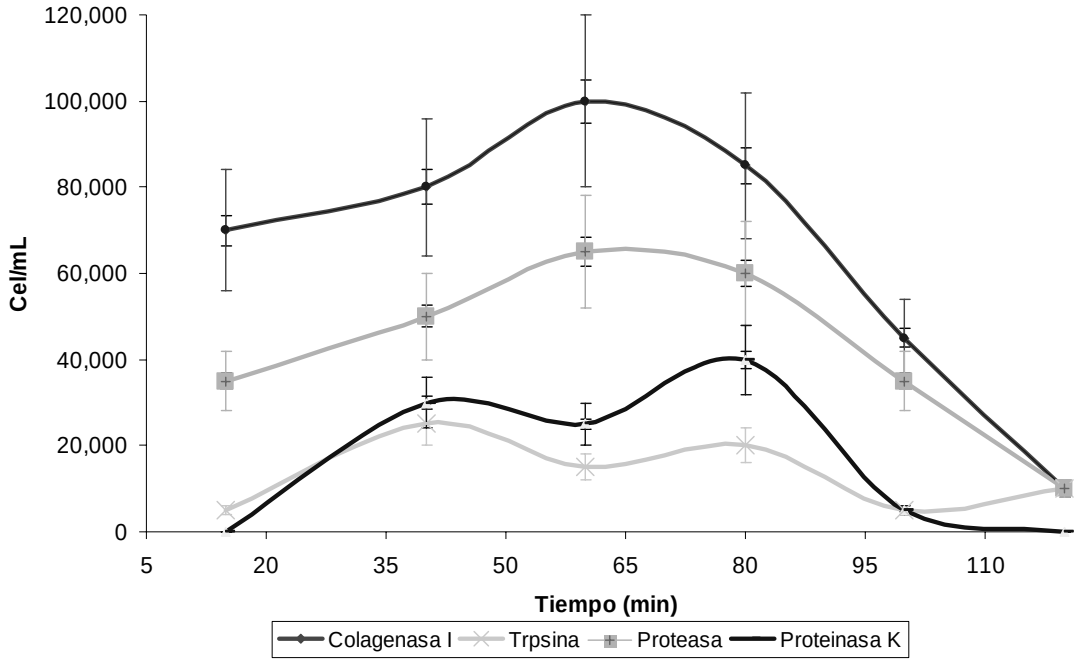

Figura 11. Rendimiento celular (cel/mL) de manto de madreperla (*Pinctada mazatlanica*) incubado a 15°C bajo el tratamiento de varias enzimas.

La disgregación enzimática a la temperatura de 15°C resultó ser la menos eficiente al obtener rendimientos por debajo de las 100,000 cel/mL (figura 11). Aunque la colagenasa tipo I dio mejores resultados en un tiempo de 60 minutos, únicamente se obtuvo un rendimiento de 100,000 cel/mL. De la misma forma, resulta evidente que a tiempos mayores de 65 minutos, las células mueren.

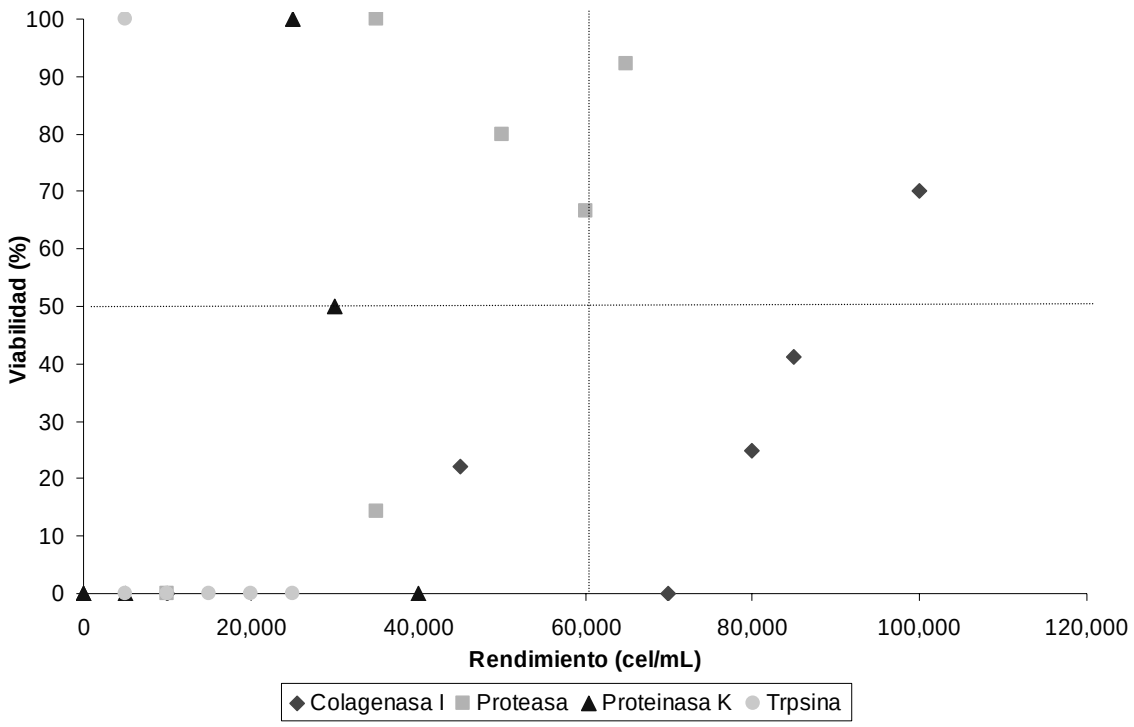

Figura 12. Rendimiento (cel/mL) y viabilidad (%) de células disgregadas del manto de madreperla (*Pinctada mazatlanica*) incubado a 15°C bajo el tratamiento de varias enzimas.

En la figura 12 se puede observar que la colagenasa tipo I a una temperatura de 15°C incrementó el rendimiento (100,000 cel/mL) y la viabilidad celular (70%). Aparentemente la tripsina llego a liberar células, sin embargo ninguna era viable. Por otro lado, para la proteasa se puede observar una buena viabilidad celular, aunque el rendimiento fue bajo. Por último, la proteinasa K resultó tener rendimientos muy bajos por debajo de las 40,000 cel/mL.

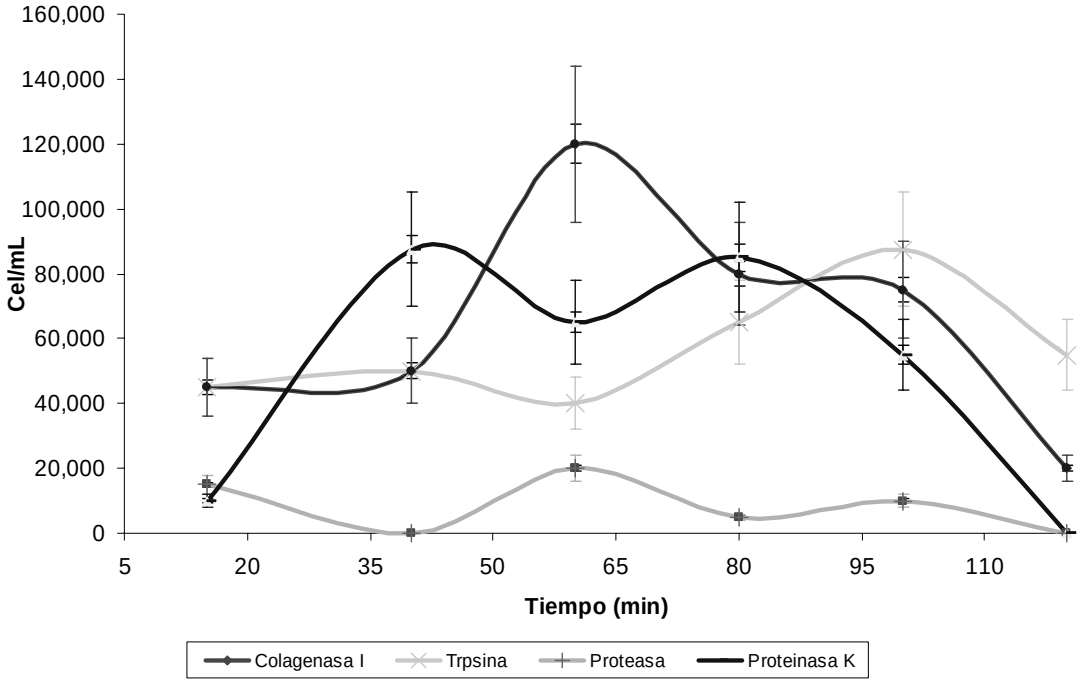

Figura 13. Rendimiento celular (cel/mL) de manto de madreperla (*Pinctada mazatlanica*) incubado a 37°C bajo el tratamiento de varias enzimas.

Para el experimento de disgregación enzimática a 37°C se puede observar que la tripsina a esta temperatura tiene su máximo liberador de células a los 95 minutos. La proteinasa K duplica los números y mantiene junto con la colagenasa un población de 20,000 a 60,000 células viables aún a un tiempo de 120 minutos de exposición y proporciona un mejor rendimiento entre los 40 y 90 minutos liberando entre 60 y 87,000 cel/mL en ese intervalo de tiempo. Por otro lado, la proteasa, demostró ser ineficiente en estas condiciones, ya que su rendimiento nunca sobrepasó las 20,000 cel/mL. Sin embargo, la colagenasa presentó su óptimo a los 60 minutos con un rendimiento de 120,000 cel/mL, aunque después disminuyó su rendimiento. A diferencia de la colagenasa, el número de

células liberadas por la tripsina parecen incrementarse a los 100 minutos, pero después se mantiene entre las 40 y las 60,000 cel/mL liberadas como al inicio del experimento.

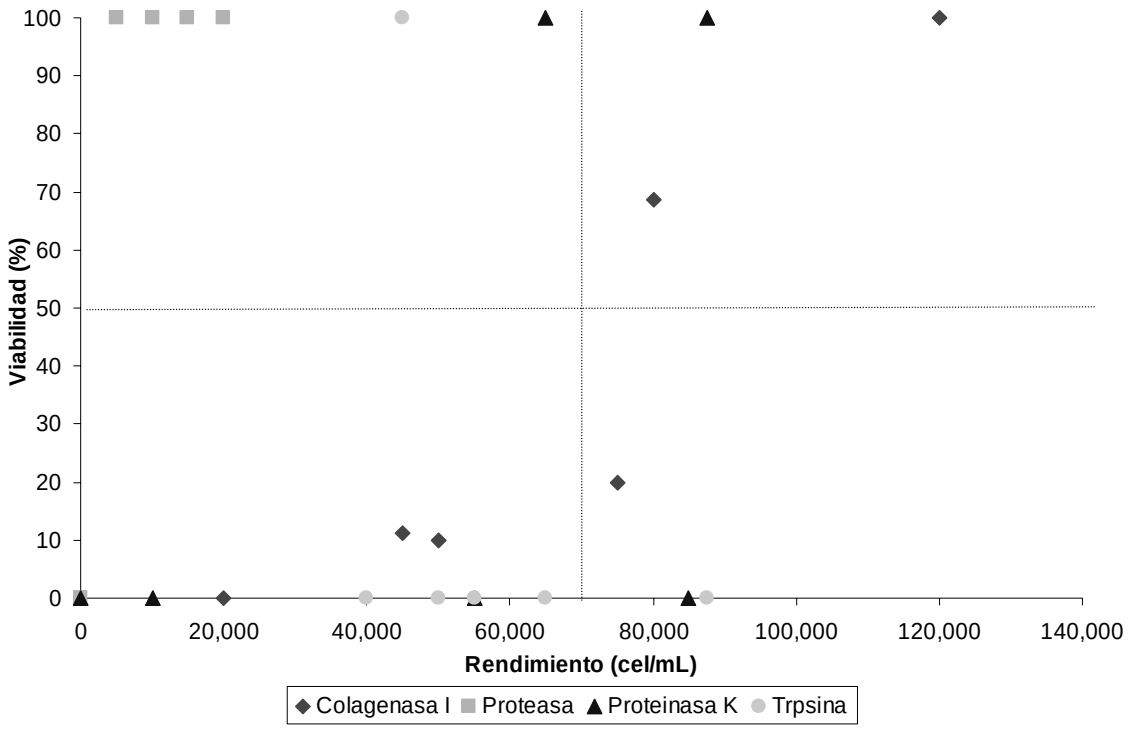

Figura 14. Rendimiento (cel/mL) y viabilidad celular (%) de manto de madreperla (*Pinctada mazatlanica*) incubado a 37°C bajo el tratamiento de varias enzimas.

El análisis de la figura 14 revela resultados muy contrastantes, ya que las cuatro enzimas llegan a tener un alto y bajo porcentaje de viabilidad a 37°C. La colagenasa y protesa parecen ser las enzimas más eficientes, a diferencia de la tripsina y la proteasa, que aunque permiten que las células tengan buena viabilidad, presentan un rendimiento muy bajo.

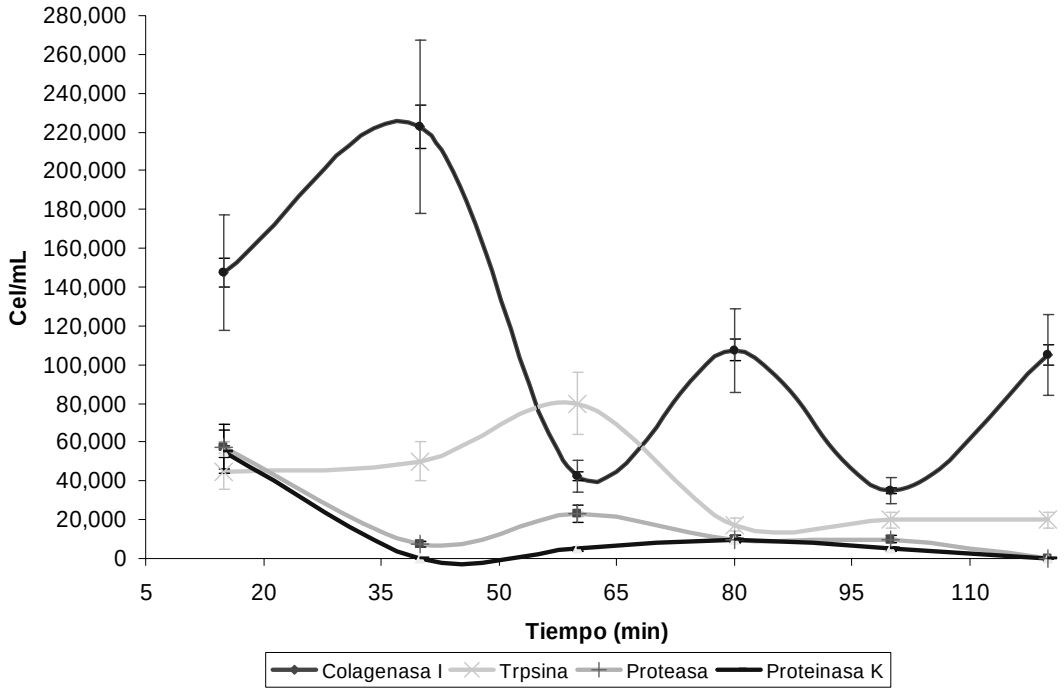

Figura 15. Rendimiento celular (cel/mL) de manto de madreperla (*Pinctada mazatlanica*) incubado a 46°C bajo el tratamiento de varias enzimas.

A diferencia de las temperaturas de 15 y 37°C, al utilizar la colagenasa a 46° se obtienen los mayores rendimientos con 222,000 cel/mL a los 40 minutos. Sin embargo, transcurrido este tiempo se aprecia un descenso en el número de células liberadas, por debajo incluso de las 100,000 cel/mL. En lo que respecta a la proteinasa K y proteasa, el comportamiento fue muy similar, ya que los rendimientos registrados fueron por debajo de las 60,000 cel/mL.

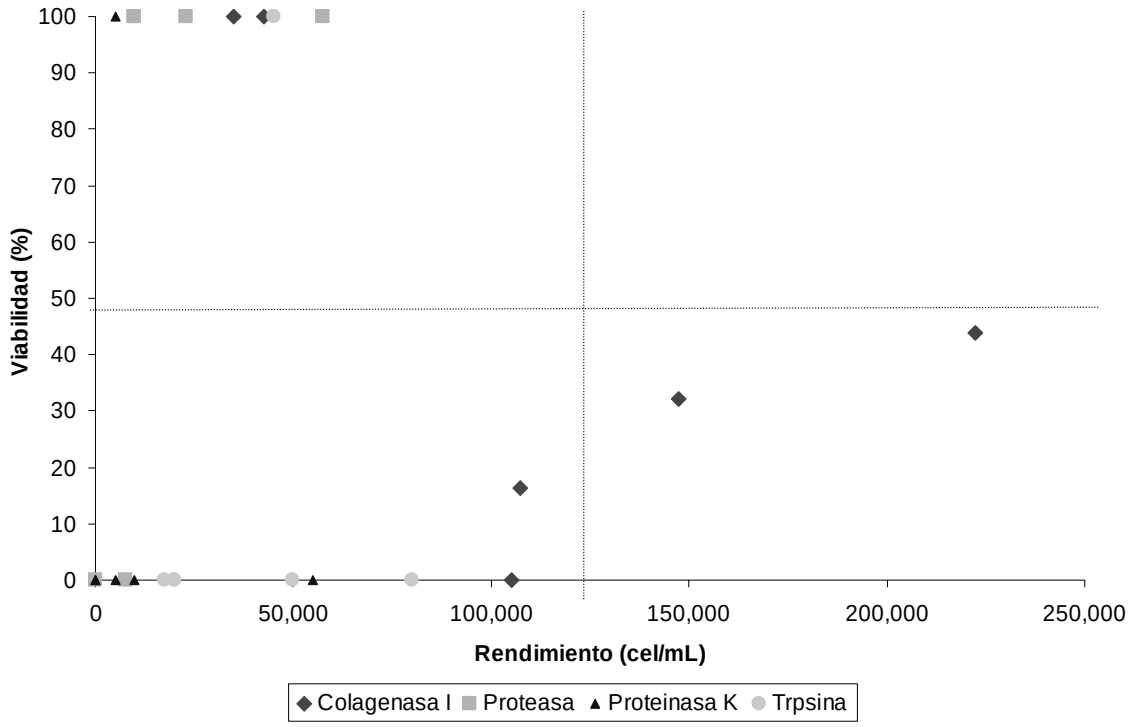

Figura 16. Rendimiento (cel/mL) y viabilidad celular (%) de manto de madreperla (*Pinctada mazatlanica*) incubado a 46°C bajo el tratamiento de varias enzimas.

De nuevo, la colagenasa I presentó los más altos rendimientos, pero a costa del daño celular provocado, puesto que se obtuvieron valores por debajo del 50%. Las cuatro enzimas llegaron a permitir viabilidades del 100%, sin embargo de manera general el rendimiento fue mínimo.

Los mejores resultados en cuanto a eficiencia y viabilidad enzimática se pueden observar con la colagenasa I utilizada a una temperatura de 37°C durante 60 minutos (figura 13). Sin embargo, se aprecia también en la misma figura que la proteasa y la proteinasa K, si bien no favorecen mucho el rendimiento de las células, si permiten una

viabilidad alta de éstas. Igualmente, la tripsina provocó que algunas células se desprendieran, pero no favoreció su viabilidad.

7.4.2. Siembra de células disgregadas

Dados los resultados anteriores, se decidió utilizar la colagenasa I a una temperatura de 37°C durante 60 minutos para el siguiente experimento, en donde se probaron los tres medios de cultivo y el sustrato celular. Este bioensayo se repitió en tres ocasiones.

A diferencia de los otros medios, el mejor resultado en esta parte se obtuvo únicamente con el medio RPMI 1640, mantenido a 37°C con sustrato poli-D-lisina, ya que fue en donde se observó que después de tres días las células comenzaron a adherirse y cambiar a la forma de fibroblasto. Pese a esto, y a que los cultivos se lograron mantener hasta por 12 días, no se identificaron células en mitosis (figura 17).

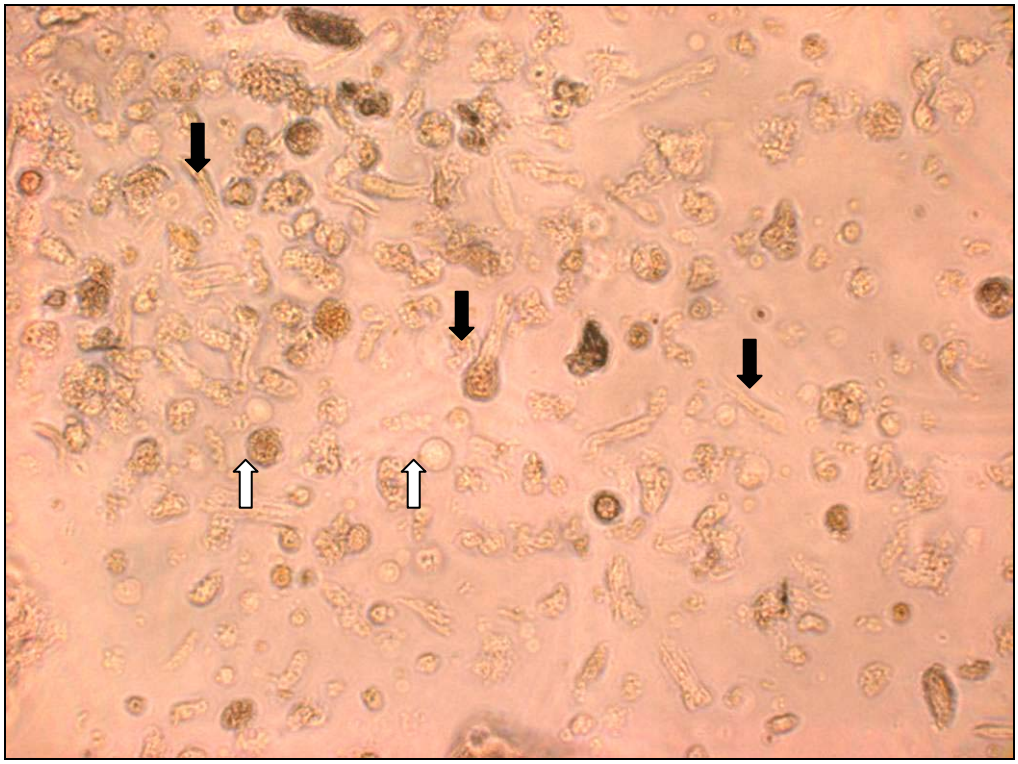

Figura 17. Células de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* cultivadas en medio RPMI 1640 en un sustrato de poli-D-lisina (40X). Las flechas negras indican células con forma de fibroblastos y las flechas blancas células redondas sin adhesión al sustrato.

Los mejores resultados de la disgregación enzimática celular fueron aceptables bajo las condiciones referidas, sin embargo no se registró proliferación celular alguna. Sólo se registró contaminación aparente en solo uno de los pozos que contenían medio RPMI 1640. El agente se identificó *in situ* como un protozoario. Se realizó la técnica de tinción Gram del medio de cultivo de este pozo, no obstante el resultado fue negativo y no se pudo identificar con mayor precisión algún patógeno bacteriano. El medio RPMI 1640 contenido en los pocillos cambiaba de un color rojo a amarillo durante los dos primeros días, por lo que se cambió el medio de cultivo cada segundo día.

7.5. Corte y siembra de explantes

Los explantes se sembraron en los tres medios de cultivo y el control, con sustrato y sin sustrato. Sin embargo, en una ocasión en el medio de cultivo RPMI 1640 sin sustrato se observó una proliferación celular. La figura 18 muestra una fotografía de la parte central del explante que alcanzó a cubrir la totalidad del pozo hasta tocar las paredes. Este procedimiento se realizó dos veces, sin embargo la primera fue la única ocasión que el cultivo resultó con éxito permaneciendo vivo durante siete días, hasta que cubrió la totalidad de la superficie del pozo y murió.

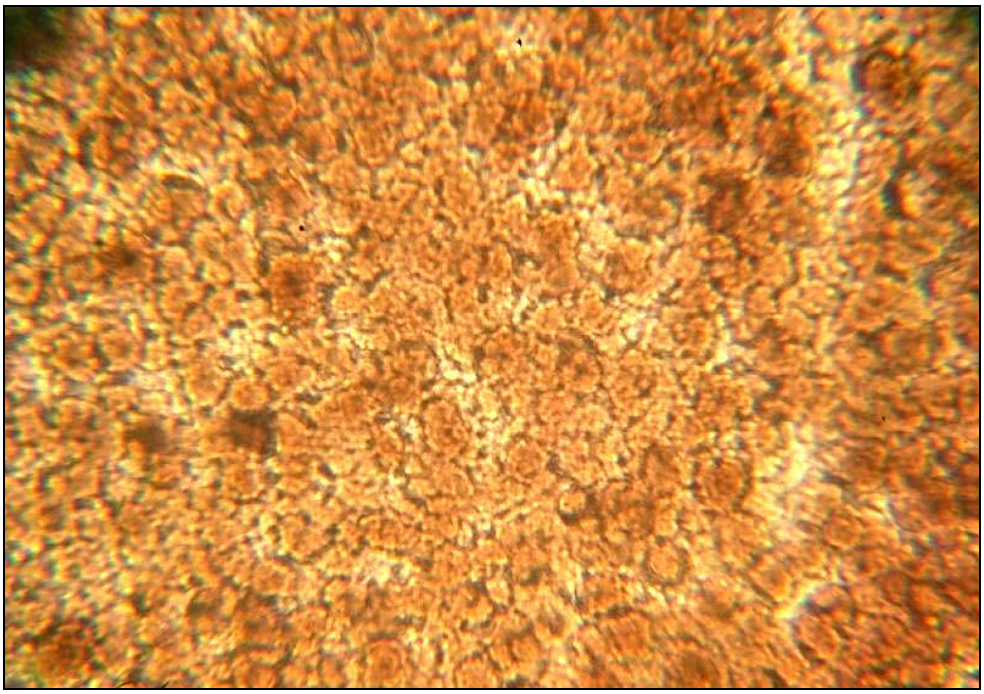

Figura 18. Explante de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* cultivado en medio RPMI 1640. El explante creció hasta alcanzar las paredes del pozo.

El medio RPMI 1640 contenido en los pocillos presentó un cambio de color de naranja-rojo a amarillo. En este medio, durante los tres primeros días el tejido se descompactaba de manera espontánea, tornándose laxo y disgregándose con facilidad para registrar un crecimiento aparente a partir del quinto día. Sin embargo, esto no ocurrió la segunda vez que se realizó el ensayo. Este fue el tejido que se utilizó para identificar la estructura celular por medio de la técnica histológica convencional de hematoxilina-eosina (HE).

7.6. Osmolaridad

Previo al inicio de los experimentos de osmolaridad, se tomó la decisión de trabajar con el medio RPMI 1640, sin sustrato, y utilizando explantes, dado que estas variables fueron las que arrojaron los mejores resultados. A diferencia de los medios de 15, 30 y 45 mM, se logró observar un crecimiento de los explantes en los pozos que contenían medio a 60 mM. Se apreciaron conglomerados de células alrededor del tejido (figura 19) a partir del tercer día después de la siembra, de tal suerte que al cuarto día el explante cubría la totalidad de la superficie del pozo.

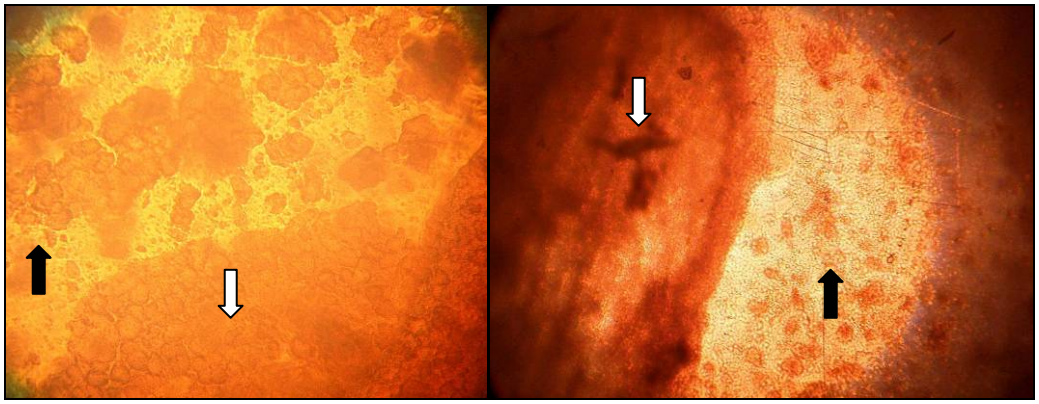

Figura 19. Explante de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* cultivado en medio RPMI 1640, sin sustrato a 60 mM. Las Flechas blancas señalen el explante y las flechas negras las células migrando fuera de este.

Al realizar este bioensayo, no se registró crecimiento bacteriano aparente en ninguno de los lotes experimentales. No obstante, a partir del día 14 comenzó a crecer un hongo en dos de los explantes, por lo que se procedió a eliminar la placa completa para preservar la integridad del cuarto de cultivo.

7.7. Absorción de calcio

No se observó en las laminillas teñidas con Rojo de Alizarina S evidencia aparente de acumulación de calcio a ninguna de las osmolaridades evaluadas durante los siete días del experimento, tanto extracelular como intracelularmente. En la figura 20 se observan únicamente las fibras musculares transversales y longitudinales rodeadas de tejido conectivo laxo. De acuerdo al fundamento de la tinción, el calcio presentaría una coloración de roja a naranja, misma que no se observó de manera evidente. Probablemente, si hubo acumulación de calcio, ésta fue muy poca y no se detectó con esta técnica que es cualitativa.

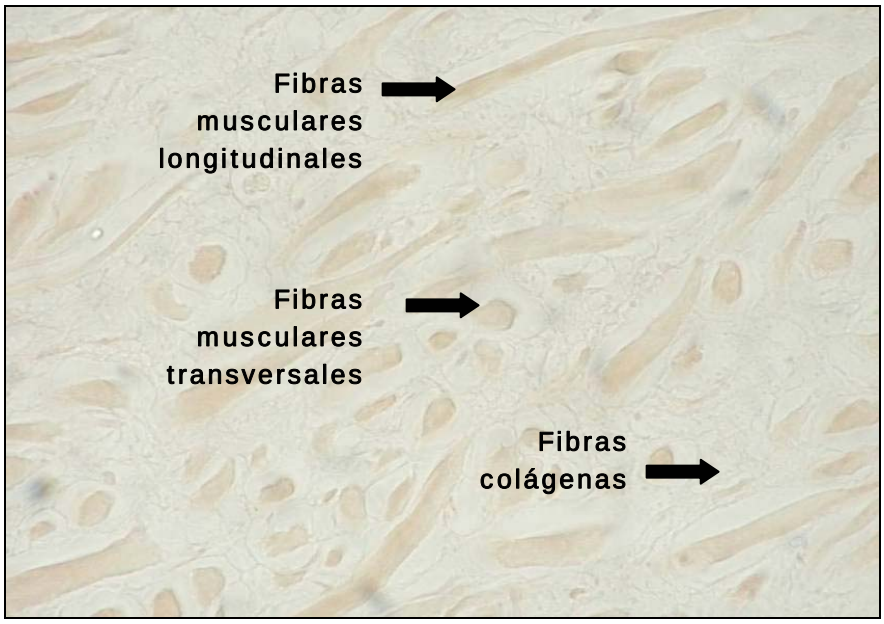

Figura 20. Corte transversal de un explante de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* incubado a 60 mM y teñido con rojo de Alizarina S.

7.8. Espectrofotometría de absorción atómica

Los resultados de la evaluación de la absorción de calcio en los diferentes medios a través de espectrofotometría de absorción atómica se muestran en la figura 21. En ésta se observa una notable mayor diferencia entre la absorción de calcio en el medio de 60 mM y los restantes. Durante el ensayo la concentración de este elemento en el medio a 60 mM se abatió 55% (de 335 a 210 µg/mL) entre el primer y último día de cultivo, a diferencia de los otros tratamientos (15, 30 y 45 mM), en donde la concentración osciló muy poco sin una tendencia clara. La concentración de calcio inicial esta expresada en el día 1.

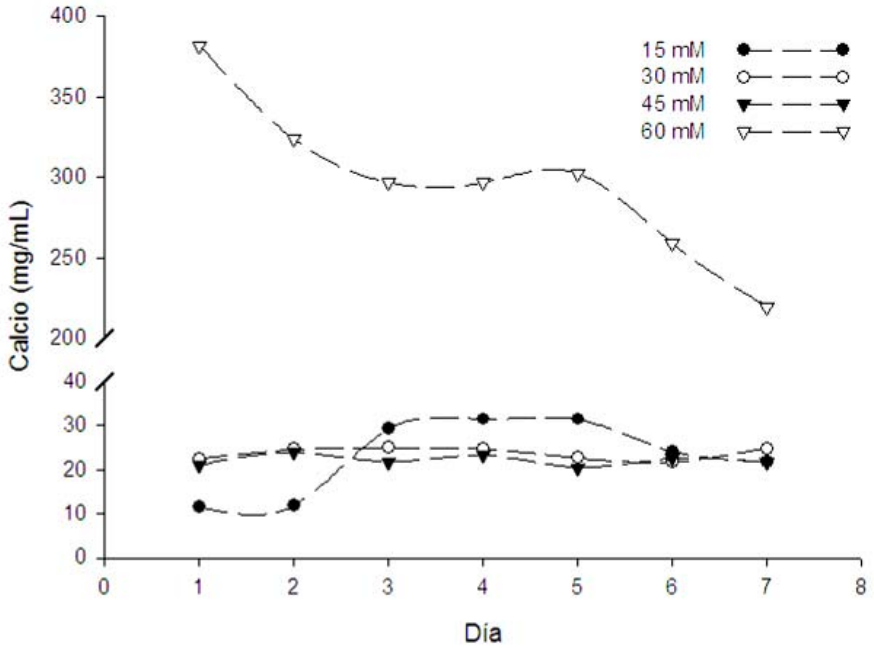

Figura 21. Concentración de calcio en medio de cultivo RPMI 1640 a diferentes osmolaridades 15, 30, 45 y 60 mM con explantes de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica*.

7.9. Estructura celular

Las tinciones de hematoxilina-eosina (HE) permitieron identificar el tipo de células de los explantes: fibras musculares transversales y longitudinales con tejido conectivo alrededor (figura 22). Estos paquetes de fibras se mantuvieron durante 6 días en cultivo, sin embargo no presentaron crecimiento aparente. En ninguno de los lotes experimentales se observó alguna estructura diferente a la típica del manto de madre perla que valga la pena resaltar.

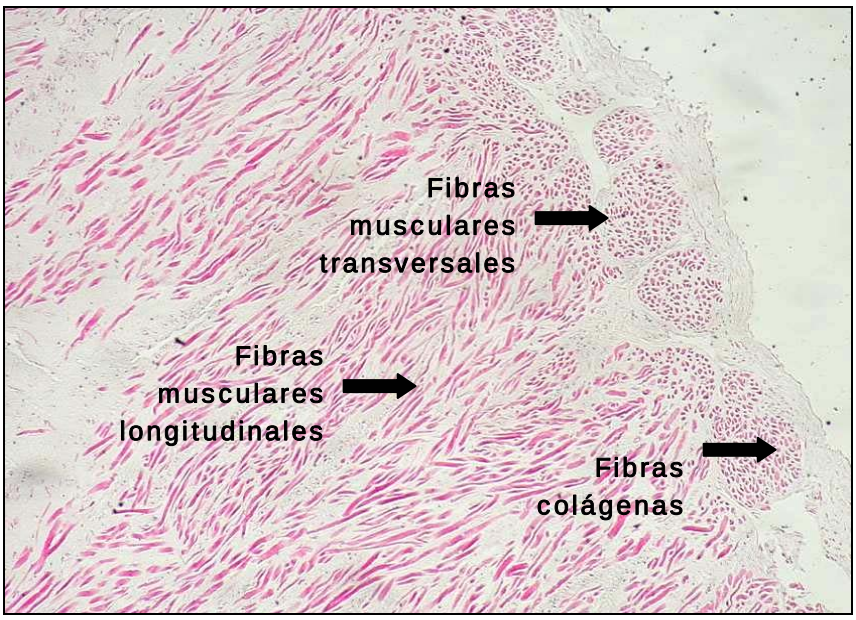

Figura 22. Corte transversal de un explante de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* cultivado en medio RPMI 1640 durante 6 días y teñido con hematoxilina-eosina (10X).

8.0. Discusión

La falta de progreso significativo en los cultivos celulares de invertebrados marinos puede deberse a una comparación inapropiada de los requerimientos celulares de muchos fila con las líneas celulares ya establecidas para los vertebrados (Rinkevich, 1999). Es posible también que gran parte de esta problemática se puede deber a la existencia de requerimientos especiales no tomados en cuenta para los invertebrados (Bayne, 1998). En principio, se podría suponer que las células de los invertebrados fueran más fáciles de cultivar debido a su capacidad de totipotencia, es decir, que una célula pueda cumplir con diferentes funciones, sin embargo la escasez de trabajos publicados en este sentido pudieran

demostrar lo contrario. Otra gran dificultad a vencer ha sido la contaminación, pues muchos experimentos y bancos de células han sufrido de este problema en todo el mundo, lo que ha llevado a la pérdida de material biológico que son producto de investigaciones importantes. Los agentes que pueden causar la contaminación son diversos, tales como químicos (como sustancias o reactivos indeseados) o biológicos (invertebrados, bacterias, hongos, parásitos, virus e inclusive otras células) (Mirjalili et al., 2005).

Mientras más de 200 líneas celulares se han reportado para el caso de insectos, la gran mayoría de los esfuerzos por desarrollar cultivos celulares permanentes de invertebrados marinos han sido infructuosos (Rinkevich et al., 1994). Contraria a la considerable atención que se le ha dado al uso *in vitro* de células de peces marinos y plantas, la literatura solo indica una actividad limitada hacia el cultivo *in vitro* de células de invertebrados marinos. A esto han contribuido las fallas experimentales que no han sido consideradas en su momento por lo autores como resultados valiosos para una publicación científica. Sin embargo, es necesario considerar que tanto fracasos como éxitos son de gran importancia para el avance de frontera de la ciencia y la tecnología, y ello se logra compartiendo entre la comunidad científica los resultados científicos, cualesquiera que esos sean, ya que sirven de escaños para definir futuras investigaciones. De lo contrario, existe la posibilidad de que uno o más autores de forma aislada pretendan experimentar sobre la misma vía, cometiendo los mismos errores, con elevados costos de tiempo y económicos, haciendo del desarrollo de nuevas biotecnologías un proceso lento.

Por lo anterior, el presente trabajo, lejos de presentar un resultado positivo y contundente con respecto al cultivo *in vitro* de células del manto de la madreperla *P. mazatlanica*, plantea más rutas y cuestionamientos para futuras investigaciones. Con este escrito el futuro investigador tendrá una serie de elementos a considerar para definir los pasos a seguir para alcanzar un objetivo concreto en este campo de investigación.

Existen diversos motivos por los cuales se decide comenzar con un cultivo celular primario como objetivo base de una nueva línea de investigación en la que se trabaja con un organismo por primera vez. En los cultivos celulares primarios se presenta la oportunidad de estudiar eventos moleculares y celulares que ocurren durante la proliferación celular, tales como la diferenciación y/o el metabolismo celular básico. De hecho, desde hace tiempo han habido muchos intentos por establecer cultivos primarios de células de moluscos (Lebel et al., 1996). Sin embargo, a pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado, se ha alcanzado poco progreso a la fecha. Esto es debido a que la mayoría de las investigaciones realizadas son modificadas y adaptadas de metodologías originalmente diseñadas para células y tejidos de humanos, en donde se han alcanzado mayores logros. En este sentido, resulta evidente que cada tejido y/o célula posee requerimientos nutrimentales diferentes, inclusive dentro de un mismo organismo, por lo que llegar a obtener un medio definido, puede ser un proceso que lleve muchos años de investigación. Además, los problemas fuertes de contaminación también han sido una dificultad constante, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, se sabe que los cultivos celulares primarios de organismos marinos multicelulares pueden proveer de excelentes oportunidades de contribuir con desarrollos biotecnológicos (Koyama y Aizawa,

2000). Más aún, los cultivos primarios de las células epiteliales del manto son de gran importancia para estudiar el proceso de formación de perlas, ya que el mecanismo celular por el cual se inicia el depósito de nácar es todavía desconocido (Barik et al., 2004). Es por ello, que la mayoría de los estudios realizados con ostras perleras se han dirigido a la obtención de cultivos celulares primarios (Anjin y Shuna, 1995; Koyama y Aizawa, 2000; Barik et al., 2004).

Con base en lo anterior, no debe perderse de vista que al utilizar métodos físicos y enzimáticos para separar las células, como en la presente tesis, se induce al explante a una selección artificial por parte de las células más aptas o fuertes. De esta forma solo quedarán en el cultivo aquellas células que sean, por una parte, capaces de superar el proceso de disgregación mecánica y enzimática, y por otra, las que puedan adherirse al sustrato (en su caso) y proliferar en forma de monocapa o en suspensión en las condiciones en que se mantenga el cultivo.

Para evitar la contaminación es importante tener buenas técnicas de depuración. En el caso de moluscos bivalvos es de gran facilidad depurar los organismos (incluyendo *P. mazatlanica*), ya que éstos pueden permanecer durante varios días sin recibir alimento alguno por su gran plasticidad en el metabolismo. Al respecto, se sabe que, además de realizar respiración anaeróbica por periodos de tiempo prolongados, la mayoría de los moluscos son capaces de almacenar reservas de nutrientes en sus tejidos (como el músculo abductor y la glándula digestiva) durante periodos de alta disponibilidad de alimento, los cuales son subsecuentemente movilizados para garantizar la gametogenesis, durante la falta

de alimento y/o la alta demanda de energía (Barber y Blake, 1981, 1991). Ello permite dejar de alimentar al organismo y eliminar posibles fuentes de contaminantes que fueran transportados de manera pasiva en el tracto digestivo.

Lo anterior se comprobó de manera eficaz, ya que gracias a las prácticas asépticas utilizadas y el cuidado extremo en evitar fuentes de contaminación, se logró implementar un método de depuración exitoso, ya que durante este estudio, únicamente en una ocasión se tuvieron problemas de contaminación por hongos en cultivos mantenidos por más de una semana. Sin embargo, hay que tener cuidado el no dejar las ostras por mas de 48 horas sin alimento alguno, ya que podrían utilizar y/o agotar sus reservas de glucógeno para metabolizarlas en lípidos (lipogénesis) y/o proteínas, afectando con ello las células de otros tejidos (como el manto). La temperatura a la cual se mantuvieron las ostras vivas (20°C) es un parámetro importante a considerar, ya que a una temperatura baja, dentro de los límites de tolerancia de una especie, se pueden reducir considerablemente el número de bacterias en el agua (ver revisión de Kinne, 1971).

El efecto del sustrato en la adhesión de células de moluscos se ha mantenido como un aspecto controversial (Ponce et al., 2000). Por un lado, Odintsova y colaboradores (1994) han demostrado que algunas moléculas como las poli-L-lisinas y fibronectinas mejoran la adhesión en las células del manto de los moluscos. Igualmente, Naganuma y colaboradores (1994) reportaron que la poli-D-lisina y fibronectina favorecen el anclaje de células disociadas de larvas trocóforas de *Haliotis rufescens*. En contraste, Robledo y Cajaraville (1997) observaron que no existe un efecto significativo de la poli-D-lisina sobre

las propiedades adhesivas de las células de la glándula digestiva de algunos mejillones como *Mytilus galloprovincialis*.

Los presentes resultados no permiten dirimir la controversia antes mencionada, ya que el mejor resultado con las células disociadas del manto de *P. mazatlanica* se obtuvo únicamente con el medio RPMI 1640, mantenido a 37°C con sustrato poli-D-lisina. Bajo estas condiciones, el RPMI fue el único medio en donde se observó que las células comenzaron a adherirse y cambiar a la forma de fibroblasto después de tres días. Sin embargo, en el cultivo de explantes, fue evidente que en el medio de cultivo RPMI 1640 sin sustrato se presentó una proliferación celular a diferencia de los otros medios.

Resulta evidente que si las células del manto se adhieren al sustrato, se podría producir un crecimiento en monocapa, lo que significa que se iniciará la proliferación celular. En este sentido, se sabe que muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación sino hasta que las células se han adherido al sustrato. En este proceso la poli-D-lisina es de gran ayuda, puesto que es una molécula sintética que contiene una carga positiva que promueve la adhesión celular alterando las cargas de la superficie en el sustrato de cultivo; este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células. La razón de ello se debe a que el crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores (Martin, 1994). Es de destacar también que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en

suspensión. A pesar de ello, no está claro si esto aplica únicamente para las células germinales (*stem cells*) indiferenciadas (Martin, 1994). Por lo tanto, al obtener éxito medido como células o fragmentos de tejido estructurado (explantes) sobreviviendo -o aún multiplicándose- como resultado de un aislamiento primario, es necesario señalar que éstos no son la fase terminal de un experimento, sino el inicio de una gran cantidad de actividades de investigación por venir. Ello debido a que no es posible generalizar que en una repetición del procedimiento se obtengan resultados similares o reproducibles. Si hay alguna diferencia ligera en el proceso de aislamiento, hay también una buena probabilidad de que los cultivos generados sean diferentes.

Lo anterior quiere decir que una vez que se establecen los cultivos primarios, debe de caracterizarse la población celular. Por ejemplo, reconociendo que los tejidos no son prefusionados antes del procedimiento de digestión o de obtención del explante, no es posible asegurar *a priori* si las estructuras que se establecieron como fibroblastos derivan de la hemolinfa o son parte del tejido del manto. Si bien esta caracterización requiere invertir una considerable cantidad de tiempo y recursos económicos para obtener resultados confiables, los resultados del presente trabajo constituyen un avanzado punto de partida para diseñar estos experimentos.

En lo que respecta a *P. mazatlanica*, se podría suponer en primera instancia que las células obtenidas por digestión del manto son anclaje-dependientes, dado que éstas crecen en un tejido muy elástico, no obstante dentro del explante se pudiera inferir que ya no necesitan de un anclaje. Por ello, de acuerdo a los resultados preliminares de este estudio,

sería quizá un poco difícil clasificar a las células del manto de *P. mazatlanica* como anclaje dependientes o no dependientes, ya que las células disgregadas mostraron una afinidad aparente al adherirse a la Poli-D-lisina, a diferencia de los explantes que no lo hicieron. Se podría sugerir que las células, una vez en confluencia, ya no dependerán del sustrato artificial y podrán crear uniones intercelulares. Por lo tanto, se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes componentes celulares que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos.

Dado que los avances en los cultivos celulares de invertebrados son producto de las modificaciones en las técnicas y medios de cultivo para humanos aplicados en medicina, muy pocos medios de cultivo se han logrado definir con éxito hasta la fecha. Por tanto, la elección de los medios RPMI 1649, M199, DMEM y MEM, utilizados en este experimento se hizo con base en los trabajos realizados previamente con invertebrados marinos (Lebel et al., 1996; Girad, 1998; Poncet et al., 2000; Uthaiwan, 2001; Gauthier y Vasta, 2002), así como en las recomendaciones del mismo fabricante. En general, todos los medios de cultivo comerciales consisten de una solución compuesta por sales inorgánicas (i.e. $CaCl_2$, $MgSO_4$, NaCl, $NaHCO_3$), aminoácidos (i.e. L-alginina, L-glutamina, L-isoleucina), vitaminas (i.e. ácido fólico, riboflavina), azucares (i.e. D-glucosa) y otros compuestos menores (i.e. rojo fenol) (anexo 3). Lo que realmente hace la diferencia en el cultivo celular es que los ingredientes y concentraciones se asemejen a los requerimientos metabólicos de las células estudiadas. Para este caso, el medio RPMI 1640, originalmente diseñado para células de mamíferos, fue el que brindo los mejores resultados, tanto en los experimentos

con células disgregadas, como con los explantes. Actualmente, este medio es ampliamente utilizado en experimentos de cultivos celulares de diversas especies de invertebrados (i.e. Porifera, Cnidaria, Mollusca, Crustacea, etc.). Dada la complejidad de los medios de cultivo utilizados aquí en cuanto al número de ingredientes, sería difícil determinar cual o cuales de éstos fueron los que marcaron la diferencia. Los medios de cultivo se podrían visualizar como una caja negra, en donde se sabe cual dio los mejores resultados, pero no se sabe a ciencia cierta por qué. Por ello, mientras no se conozcan los requerimientos nutrimentales específicos de las células, sería difícil determinar si fue uno o varios componentes, o la combinación de éstos, lo que se asemeja más a los requerimientos de las mismas. En este momento de la investigación, sería muy difícil tratar de explicar por que el medio RPMI 1640 brindó resultados positivos a diferencia de los otros. Empero, esto daría pie a un estudio posterior en donde se podrían evaluar diferentes variables como los componentes del medio. Considerando estos resultados preliminares, se presenta ahora la posibilidad de seguir otras directrices, como las marcadas por el origen epitelial de algunas capas celulares del manto, lo que requiere la presencia específica de hormonas de crecimiento de células epiteliales y queratinocitos, los cuales se han perfeccionado con la utilización de insulina, hidrocortisona y factor de crecimiento epidérmico (Hsieh y Acosta, 1991), así como insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico y selenio (Ellington et al., 1999). Sin embargo, estos experimentos son muy costosos y solo se justifica abordarlos una vez que ya se tienen resultados preliminares como los que se presentan en este trabajo.

La disociación tisular y el subcultivo celular representan dos aplicaciones en las que es necesario separar las células entre sí de un sustrato, pero manteniendo la viabilidad celular. Para conseguirlo es necesario romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que las mantiene unidas mediante procesos que separen las moléculas proteicas de la matriz extracelular (i.e secuestrando los iones calcio que permiten la unión), o bien rompiendo proteolíticamente (mediante la acción de proteasas) las mismas proteínas (Martin, 1994). Los resultados obtenidos muestran que ninguna de las enzimas funcionó al 100% de efectividad, ya que no se obtuvieron grandes concentraciones de células viables, lo que indica que no todas las enzimas utilizadas en este experimento eran específicas para este tejido, sino que actuaron sobre sustratos análogos.

Se sabe que las enzimas actúan con máxima eficacia sobre el sustrato natural y con menor eficacia sobre los sustratos análogos (Lehninger, 1990). Entre las enzimas poco específicas están las proteasas digestivas, que rompen enlaces de proteínas y péptidos de muy diverso tipo. Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general por efecto de la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica aproximadamente por cada 10°C de aumento de temperatura (Lehninger, 1990). Sin embargo, por tratarse de proteínas, a partir de cierta temperatura, las enzimas se empiezan a desnaturalizar por el calor y pierden su funcionalidad. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Esta aparente temperatura “optima” es por lo tanto, la resultante de dos procesos: (1) el incremento habitual de la velocidad de reacción y (2) el

incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica (Lehniger, 1990). Por encima de esta temperatura optima, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

En el presente trabajo se buscó evaluar temperaturas dentro de las cuales cada enzima tuviera una mejor actividad catalítica, y así definir la mejor combinación de temperatura, tiempo y rendimiento celular. Para esto se seleccionaron tres temperaturas e intervalos de tiempo hasta un máximo de 120 minutos, teniendo como mejor combinación la colagenasa I a 37°C durante 60 minutos (figura13). Lo anterior podría explicar las diferencias de cada enzima probada en este estudio a diferentes temperaturas, ya que cada una presentó una dinámica en su actividad dentro de las diferentes temperaturas, lo que se traduce en un cambio en la afinidad por el sustrato, que en este caso es primordialmente la colágena. Al analizar la respuesta medida como mayor eficiencia de la digestión (en esta matriz en particular), que es igual a un mayor número de células obtenidas (viables o no) (figuras 11, 13 y 15), se observan tres comportamientos diferentes; uno donde la colagenasa y la tripsina aumentan su rendimiento con la temperatura (de 15°C a 46°C), otro donde la proteinasa K presenta un óptimo a 37°C y un tercero en el que la proteasa presenta su óptimo a 15°C y después disminuye notoriamente su eficiencia. Considerando los valores reportados de eficiencia de las enzimas para estimación de su actividad específica (colagenasa, proteasa y proteinasa K a 37°C y tripsina a 27°C), es evidente que la variable principal está dada por la composición de la matriz extracelular del tejido empleado, la cual

esta compuesta principalmente por colágeno, proteoglicanos y amebocitos (Suzuki et al., 1991).

Por otro lado, cuando asociamos en el análisis la variable viabilidad de las células obtenidas, la imagen es completamente diferente (figuras 12, 14 y 16). A todas las temperaturas trabajadas, la colagenasa muestra una tendencia general a incrementar la viabilidad de las células obtenidas conforme aumenta el número de ellas, es decir, en el óptimo de eficiencia de digestión (el cual se alcanza a diferentes tiempos y a diferentes temperaturas). La proteasa tiene un comportamiento similar a 15°C, en tanto que a 37°C y 46°C, la viabilidad es excelente pero el rendimiento celular muy bajo. La proteinasa K y la tripsina solo producen poblaciones con alta viabilidad en las etapas primeras de la digestión, haciendo evidente que con el tiempo actúan agresivamente sobre la membrana celular y afectan la viabilidad de las células.

Las colagenasas (EC 3.4.24.3) degradan hebras helicoidales de colágeno. Este compuesto es el componente más abundante del tejido conectivo extracelular de muchos organismos y está formado por tres cadenas polipeptidicas asociadas lateralmente en un mismo eje de rotación. La secuencia de aminoácidos es característica del tejido de origen y más de 19 tipos de colágeno se han descrito en vertebrados, cada uno con su propia distribución y función; esta heterogeneidad parece ser comparable en los invertebrados (Engel, 1997). Mizuta et al. (2002) reportaron la presencia de colágeno en la ostra perlera *P. martinesii*. Wada (1991) por su parte observó el proceso de regeneración de la matriz extracelular del manto de la ostra perlera *P. fucata* (la cual consiste de colágeno

principalmente) después de ejecutada una herida al mismo. Por lo tanto, la colagenasa juega un papel importante en el metabolismo del tejido conectivo y es producida por células específicas que participan en la reparación y procesos de remodelación (cicatrización).

Como se ha mencionado anteriormente, el manto se retrae a casi una tercera parte de su tamaño extendido al ser manipulado, lo cual se debe a la presencia de colágeno. García-Gasca (1994) afirma que en el tejido conectivo del manto de *P. mazatlanica* hay fibras colágenas, pero no fibras reticulares ni elásticas. En el tejido conectivo denso predominan las fibras colágenas sobre otro tipo de fibras. Estas fibras existen como una adaptación para ofrecer protección mecánica y se orientan de modo tal que ofrezcan mayor resistencia a las fuerzas que normalmente actúan sobre el tejido.

Con estos antecedentes, y considerando la consistencia elástica de manto, se esperaría claramente que la colagenasa actuara sobre el tejido. Por ello, no sorprende que los mejores resultados en cuanto a eficiencia y viabilidad enzimática se puedan observar con la colagenasa utilizada a una temperatura de 37°C durante 60 minutos (figura 13). Sin embargo, se aprecia también que la proteasa y la proteinasa K, esta última a 15°C, si bien no favorecen mucho el rendimiento celular, permiten una viabilidad alta de estas. Ello pudiera deberse a una baja afinidad de esta enzima con el sustrato representado por el tejido del manto de madreperla. Por otro lado, la tripsina provocó que algunas células se desprendieran, pero no favoreció su viabilidad, lo que pudiera explicarse dada la afinidad de esta enzima por algún componente de la membrana celular y no a los componentes intercelulares. Debe recordarse que la colagenasa tipo I que se utilizó en un experimento

preliminar no dio resultados positivos, por lo que se cambió a una de mayor actividad catalítica, de 5 U/mg por una de 414 U/mg. Hipotéticamente, la enzima más adecuada sería la colagenasa tipo II, pero no fue posible obtenerla en cantidades suficientes para este trabajo.

Se sabe que varias cepas de *Trichoderma* son capaces de secretar enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas y b-glucanasas que permiten la disgregación celular. Sin embargo, se podría suponer que no hay algún sustrato específico para estas enzimas en el manto de *P. mazatlanica*, ya que durante los bioensayos se observaron resultados negativos al respecto; sin embargo, alternativamente puede suponerse que el romper los enlaces de los sustratos no es suficiente para disgregar el tejido. En este sentido, la tripsina dio mejores resultados que la enzima de *T. harzianum* en términos de disgregación celular, pero más pobres que la colagenasa I, que arrojó los mejores rendimientos en todas las temperaturas con viabilidades superiores al 40%.

La tripsina es empleada comúnmente para disgregar células de tejidos humanos como el páncreas, y se aplica normalmente a la temperatura corporal 37°C. Sin embargo, dado que esta enzima presenta una actividad catalítica muy agresiva, se utiliza preferentemente en exposiciones muy cortas, ya que según datos del fabricante, el dejar mucho tiempo la acción de la tripsina sobre las células provocará daño a la membrana celular y consecuentemente producirá lisis celular. Esta enzima corta los péptidos en el extremo C-terminal de los aminoácidos lisina y arginina (Sigma). Por su parte, la proteasa presentó su mayor actividad a 15°C (≈20,000 cel/mL), aunque en general con bajos niveles

del rendimiento celular en las tres temperaturas. A pesar de ello, se puede observar que esta enzima favoreció una buena viabilidad con las pocas células disgregadas. En el caso de la proteinasa K, parece ser que la mejor actividad de esta enzima sobre el manto de *P. mazatlanica* se dio a 37°C, a diferencia de las otras dos temperaturas, donde sus rendimientos estuvieron por debajo de las 20,000 cel/mL.

Adicionalmente, considerando que *P. mazatlanica* en su ambiente natural difícilmente estará sujeta a temperaturas superiores a los 32-33°C, que sería una situación extrema cercana al punto crítico o letal de la especie (Saucedo et al., 2004), se puede suponer que, además de la actividad de la enzima *per se*, la temperatura pudiera estar dañando las células en exposiciones prolongadas (37°C y 46°C).

Es importante señalar que los cultivos celulares se iniciaron agregando 1.5 mL de medio de cultivo a cada pocillo de la placa y, a pesar de que la incubadora de CO_2 mantenía un ambiente estable a 23°C, se llegaba a presentar evaporación del medio, razón por la cual éste se cambiaba cada segundo día. Como se mencionó anteriormente, todos los medios de cultivo están adicionados con rojo fenol, que actúa como un indicador de pH que provoca que éstos cambien a color amarillo si hay acidez, lo cual ocurrió en las células contenidas en el medio RPMI 1640 únicamente. Esto sucede comúnmente en los cultivos cuando las células realizan algún proceso metabólico, lo que obliga a renovar el medio continuamente. Esta aparente actividad metabólica nos indica que el medio RPMI 1640 representó la mejor opción para mantener la integridad de las células disgregadas. Este medio, al igual que los otros, contiene más de 40 ingredientes, y según el fabricante, fue diseñado para el cultivo

de leucocitos. A pesar de ello, actualmente se utiliza para el cultivo de una gran variedad de células, incluyendo las de invertebrados.

Por otro lado, también cabría afirmar que tal vez no se registró crecimiento y/o proliferación celular en los diferentes sistemas experimentales por la carencia en los medios de cultivo de alguna sustancia promotora de crecimiento celular (i.e. neurosecrecion) que es producida *in vivo* por el ganglio cerebral de las ostras. Esto da pie a futuras investigaciones dirigidas a buscar la presencia de factores de crecimiento que pudieran estar presentes en la hemolinfa de *P. mazatlanica*.

Cabe mencionar que el presente trabajo se realizó durante el 'clímax' de un embargo aplicado a nivel internacional hacia el suministro de productos de origen animal (i.e. suero fetal de bovino) utilizados en la investigación científica para preparar compuestos, soluciones y/o medios de cultivo como los requeridos en este estudio. Lo anterior debido al potencial riesgo de contagio que dichos productos representaban por el denominado Síndrome de las Vacas Locas. En México en particular, dicho embargo provocó el cierre a las importaciones de suero fetal de bovino de desde las zonas endémicas de este padecimiento, lo cual afectó retrasando el abasto de gran parte de los medios y suplementos que se necesitaban para cumplir con las actividades planeadas.

El cultivo de explantes del manto de moluscos es un procedimiento que se ha realizado con anterioridad (Koyama y Aizawa, 2000). Dichos autores lograron cultivar el manto de *Calyptogena soyoae* (Vesicomyidae) a diferentes temperaturas, en un medio de

cultivo DMEM y en un sustrato de poli-D-lisina. El tejido solo se adhirió al sustrato a 4°C durante 13 días, sin embargo registraron proliferación de las células y síntesis de ADN durante este lapso hasta que un aumento en la temperatura las eliminó. Al parecer, para las células de esta almeja resultó ser determinante la temperatura para la fijación al sustrato celular, la cual se obtuvo a 4°C, que es similar a la de su ambiente, ya que es un organismo de profundidad.

Para el caso de *P. mazatlanica* se utilizó la temperatura a la cual la incubadora operaba, que fue de 23°C. Este valor se considera dentro del intervalo natural de tolerancia de la especie y no muy lejano del valor óptimo fisiológico reportado recientemente, que es de 25°C (Saucedo et al., 2004). Este resultado pudiera dar pie a evaluar otras temperaturas con el fin de ampliar el panorama de respuesta que del manto pudiera presentar hacia la fijación al sustrato (figuras 17 y 18).

Dharmaraj y Suja (2002) reportan la secreción de material orgánico, como células epiteliales y la depositación de cristales alrededor de un núcleo formando, que según los autores, es una perla *in vitro* de *P. radiata* cultivada en el medio M199 con 10% de suero fetal de bovino, a 28°C y pH 7.4. Sin embargo, los autores no detallan mucho sobre el diseño empleado en su experimento y tampoco sobre los resultados obtenidos, lo cual, por desgracia, impide una comparación que pudo resultar valiosa, dados los objetivos de la presente tesis. Si bien en el presente experimento no se registraron resultados similares a los de Dharmaraj y Suja (2002), aún utilizando el mismo medio de cultivo, ni con las células aisladas ni con el manto como unidad tisular, podría argumentarse un manejo y/o

utilización de una composición diferente de las sustancias contenidas en el medio. Dichos autores únicamente explican que se utilizó el medio M199 con una solución de sales nutritivas, las cuales no detallan.

Existe a la fecha una controversia entre si la estrategia mas adecuada al diseñar experimentos sobre cultivos *in vitro* debe ser a partir de células disgregadas o con explantes de tejidos estructurados. Con base en las revisiones bibliográficas realizadas, así como en los resultados obtenidos de estos bioensayos, no es posible favorecer un camino más que el otro, pues ambos ofrecen aspectos favorables y desfavorables. Por ejemplo, los explantes no son controlables en cuanto a la difusión de los componentes del medio en los intersticios celulares, por lo que no es posible asegurar la permeabilidad de nutrientes y de gases a las células internas del tejido. De manera similar, no se pueden eliminar las células dañadas y muertas de los bordes del explante, las que pueden producir sustancias que hacen incompatible el establecimiento de un cultivo primario, o aún de la viabilidad y supervivencia del mismo explante. Adicionalmente, no es posible observar los procesos metabólicos o de ciclo celular al interior del explante, por lo que necesariamente se trabaja con una caja negra, que solo permite analizar los resultados al término del experimento y mediante técnicas invasivas o destructivas (histología). Con respecto a las células obtenidas de tejidos disgregados mecánicamente, con ayuda de enzimas o ambos, se ha mencionado anteriormente que participan multitud de procesos de selección que, en último término, condicionaran la supervivencia del cultivo. Si bien bajo estas condiciones el acceso de las células a nutrientes y gases vitales está garantizado, se desestiman los contactos célula-célula, la participación de mediadores entre diversas estirpes celulares en un mismo tejido

(cooperatividad entre células) y/o la inhabilidad de proliferación de ciertas estirpes de células cuando la densidad de éstas es baja. Ante esto, resulta conveniente continuar experimentando en ambos caminos (células disgregadas *vs.* explantes), al tiempo que se acumula la información y se perfeccionan las técnicas de cultivo de células y tejidos de invertebrados.

Por otro lado, se sabe que en condiciones naturales, todos los organismos marinos enfrentan problemas osmóticos. Para lidiar con ellos, estos han desarrollado una variedad de mecanismos que emplean para mantener las concentraciones osmóticas internas apropiadas y prevenir el desarrollo de presiones que puedan provocar problemas como la plasmolisis y muerte celular. Por sus propiedades físicas y químicas, el agua de mar constituye, para gran parte de los animales que lo habitan, un medio favorable desde el punto de vista fisiológico. Ello debido a que, tanto el agua marina, como los líquidos intersticiales, poseen osmolaridades y concentraciones de sales similares. Esta situación aplica para el caso de especies de bivalvos, como el sujeto de la presente investigación (*P. mazatlanica*). Por lo tanto no es de extrañar que el medio RPMI 1640, preparado con agua de mar y mantenido a 60 mM de NaCl, favoreciera los mejores resultados en el bioensayo en referencia a la actividad metabólica medida como cambio de color del medio de cultivo. No obstante, como se verá mas adelante, es posible evidenciar indirectamente un consumo de calcio del medio circundante por los explantes mantenidos en estas condiciones.

Las dos pruebas utilizadas para demostrar la absorción de calcio por parte del manto dieron resultados diferentes. Por un lado, el método histoquímico no permitió identificar

variaciones en la concentración de calcio que fueran lo suficientemente notorias para suponer su absorción a partir del medio de cultivo. Si bien es probable que haya habido incorporación de calcio, la técnica empleada no permitió detectarla. Por el otro lado, con el método de espectrofotometría de absorción atómica si se logró observar una clara disminución en la concentración de calcio del medio preparado a 60 mM de NaCl, con lo cual se podría suponer que el manto lo secuestro del entorno. Con base en lo anterior, parece claro que el método histoquímico de rojo de alizarina S no tuvo la suficiente sensibilidad para detectar la absorción de calcio, y/o que el método se debió de haber complementado con alguna herramienta moderna de análisis digital de imágenes que permitiera cuantificar un proceso metabólico tan importante. En este sentido, conviene señalar que las técnicas histoquímicas han sido utilizadas durante décadas como herramientas de tipo cualitativo únicamente, pues dependen 100% de la apreciación humana (debe recordarse que el ojo humano discierne tan solo unos 15 diferentes tonos de color). Por ello, esta limitante debe tomarse con cautela a la hora de reportar resultados que, a final de cuentas, pueden ser subjetivos. Queda la recomendación para futuras investigaciones de utilizar el análisis digital de imágenes como método de cuantificación de procesos importantes como la absorción de calcio, partiendo de la base que los programas especializados logran discernir entre unos 250 tonos de color.

Realizando una revisión de la literatura referente a métodos histoquímicos para la determinación de calcio (McGee-Russell, 1957), se logró confirmar que la sensibilidad de la técnica de rojo de alizarina S depende de la concentración del colorante, el pH de la reacción e incluso de la estirpe celular. Esto sugiere la necesidad de probar otros métodos

alternos para confirmar el resultado obtenido, así como manipular un poco las variables antes mencionadas. Además, la prueba de espectrofotometría de absorción atómica se realizó en dos diferentes ocasiones, de las cuales solo en una se pudo obtener resultados representativos (figura 21); en la segunda ocasión el medio de cultivo se evaporó por la poca cantidad de muestra (1.5 mL) colocada inicialmente en el medidor para determinar la concentración de calcio. Partiendo del hecho de que la concentración de calcio presente en el medio de cultivo es de 16.39 µg/mL, aunado al hecho de que la concentración de calcio en el agua de mar es de aproximadamente 350 µg/mL, es comprensible que únicamente en el medio suplementado a 60mM con agua de mar se obtuvieron resultados adecuados. Ello probablemente debido a que únicamente en este medio había biodisponibilidad de calcio para ser consumido por las células. Por el contrario, a 30 y 45 mM (alcanzando esta molaridad por la adición de NaCl al medio) no hubo cambios aparentes. Finalmente, la curva perfilada a 15 mM (figura 21) podría atribuirse a un pequeño consumo de calcio al inicio del cultivo, ya que por diferencias de presión osmótica, el explante liberó calcio al medio. Debe de recordarse que la actividad metabólica más eficiente se obtuvo en la concentración de 60 mM. Al parecer, bajo estas condiciones se favorece la permeabilidad del medio (y de los gases disueltos) a los intersticios celulares, ya que las presiones osmóticas de las células y el medio son similares, y por lo tanto, el equilibrio en el metabolismo del explante es alcanzado mas eficientemente. Contrariamente, en las condiciones representadas por las otras osmolaridades experimentales, el tejido invirtió más energía en sobrevivir.

Con base en todo lo anterior, se puede concluir que, si bien los resultados preliminares generados en la presente investigación no son concluyentes y deben tomarse con precaución, proporcionan un panorama claro del rumbo que deben seguir los futuros estudios dentro de este campo tan novedoso de la investigación científica y tecnológica. Queda claro también que los bioensayos por realizarse deben ser muy similares a los incluidos en esta tesis, quizá evaluando las mismas variables, pero con diferentes valores, aunque también probando otro tipo de variables, como por ejemplo los relativos a los factores de crecimiento, particularmente en la hemolinfa. Sin duda, se hace necesario en este tipo de bioensayos llevar acabo más repeticiones para dar mayor confiabilidad a los resultados y evitar ambigüedad en éstos al tener solo un caso de éxito en dos intentos realizados. Los resultados observados son alentadores, por lo que se recomienda en futuros trabajos comenzar utilizando este mismo tipo de variables. Se recomienda también iniciar este tipo de investigación con la otra especie de ostra nativa del Golfo de California (*Pteria sterna*), la cual ha demostrado ser un excelente candidato para la producción de perlas de carácter “exótico”.

9.0. Conclusiones

- El procedimiento de depuración de los organismos y la técnica de manejo en esterilidad aplicada demostró una reducción en el riesgo de contaminación de los aislamientos primarios de tejidos de *P. mazatlanica*.

- Se logró verificar la hipótesis de que la colagenasa (tipo I con una actividad específica de 414 U/mg) proporcionó los mejores rendimientos medidos como número de células viables disgregadas a 37°C por 60 minutos.

- Tomando como referencia la viabilidad celular, se puede suponer que la utilización de proteinasas se ve restringido porque estas lesionan rápidamente las membranas celulares disminuyendo abruptamente la viabilidad celular a partir de los 10-15 minutos de exposición.

- Aparentemente la utilización de poli-D-lisina fue apropiado para el establecimiento de células aisladas en la superficie de las placas de cultivo, como se estableció en la hipótesis, pero no es necesario su uso para el trabajo realizado con explantes.

- Se pudo verificar la hipótesis en cuanto a la siembra de células disgregadas, ya que se dio mejor en el medio RPMI 1640, mantenido a 37°C con sustrato poli-D-lisina. Después de tres días las células comenzaron a adherirse y cambiar a la

forma de fibroblasto. Algunas células en solución incluso iniciaron su proliferación.

- La morfología de las células disgregadas obtenidas del manto de *P. mazatlanica*, es muy diversa y corresponde al origen del tejido, observándose al menos fibroblastos y fibras musculares.

- Se obtuvieron buenos resultados al mantener la actividad metabólica de las células disgregadas en medio RPMI-1640 adicionado con suero fetal de bovino, a 23°C durante 7 días.

- El medio de cultivo RPMI-1640, adicionado con suero fetal de bovino (3%), resultó el más apropiado para el mantenimiento en condiciones metabólicamente activas de las células y explantes de *P. mazatlanica.*

- Se logró observar un crecimiento de los explantes en los pozos que contenían medio RPMI 1640 ajustados a 60 mM con agua de mar estéril. Se apreciaron conglomerados de células alrededor del tejido a partir del tercer día después de la siembra, de tal suerte que al cuarto día el explante cubría la totalidad de la superficie del pozo.

- Se observa una diferencia aparente entre la absorción de calcio en el medio ajustado a 60 mM y los restantes medios utilizados. La cantidad de calcio presente en el medio de cultivo disminuyó casi a la mitad en una semana de cultivo el cual necesariamente debe de haber sido secuestrado por el tejido.

- Como se plantea en la hipótesis, la utilización de agua de mar estéril para incrementar la presión osmótica del medio de cultivo permitió un mejor establecimiento de los explantes en las condiciones de cultivo.

- No se registró crecimiento celular en los análisis de la estructura celular de *P. mazatlanica*, lo que concuerda con la observación macroscópica, ya que en ese bioensayo no hubo crecimiento del explante.

- La hipótesis general de este trabajo fue verificable, puesto que se lograron determinar las condiciones básicas de un cultivo primario de células de manto de *P. mazatlanica* en condiciones controladas. De hecho, el cultivo *in vitro* de células de ésta y otras especies de bivalvos comerciales nativos de Baja California Sur se vislumbra como una posibilidad tangible al corto o mediano plazo, en función del progreso que se logre de las investigaciones que se sigan realizando en adelante.

10.0 Recomendaciones

- Se recomienda incrementar el periodo de utilización de antimicóticos (amfotericina B y nistatina) durante la primera semana de cultivo para evitar el crecimiento de hongos.

- Se recomienda probar otras temperaturas (inferiores y superiores) utilizando las condiciones más apropiadas que se fueron definiendo durante el presente trabajo.

- Se recomienda realizar la determinación de calcio por espectrofotometría de absorción atómica tanto en el medio de cultivo como en los tejidos utilizados.

- Se recomienda utilizar el análisis digital de imágenes como método de cuantificación de procesos importantes como la absorción de calcio, partiendo de la base que los programas especializados logran discernir entre unos 250 tonos de color.

- Se recomienda la utilización de agua de mar estéril para incrementar la presión osmótica del medio de cultivo con células disgregadas.

11.0. Literatura citada

Acosta-Salmon H. y P.C. Southgate. 2005. Wound healing after excision of mantle tissue from the Akoya pearl oyster, *Pinctada fucata.* Comp. Biochem. Pysiol. Part A. 143:264-268.

Addadi L. y S. Weiner. 1997. A pavement of pearl. Nature. (389) 912-915.

Anjing S. y C. Shuna. 1995. Polarization microscope observation on the secretion of the in vitro cultured mantle of *Critaria plicata*. Acta Zool. Sin., 41(1) 35-39.

Anon E. 1985. Artificial pearls with cultivated cells. Technocrat, 18: 93.

Atlan, G., N. Balmain, S. Berland, B. Vidal y E. Lopez. 1997. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. Acad.Sci.Paris, Sciences de la vie/Life Sciences. 320,253-258.

Atlan G., O. Delattre, S. Berland, A. LeFaou, G. Nabias, D. Cot y E. Lopez. 1999. Interface between bone and nacre implants in sheep. Biomaterials. 20, 1017-1022.

Attardi G. y F. Moro. 1953. In vitro culture of malignant melanoma of the choroids. Arch De Vecchi Anat Patol. 1953 Nov;20(1):125-80

Auffret M. y R. Oubella. 1997. Hemocyte aggregation in the oyster Crassostrea gigas: In vitro measurement of experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. 118A, 705–712.

Awaji M. y T. Suzuki. 1995. The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster. Fisheries Science. 61(5), 747-751.

Barber B.J. y N.J. Blake. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 52:121-134.

Barber B.J. y N.J. Blake. 1991. Reproductive physiology. En: S.E. Shumway (ed.), Scallops: Biology, Ecology, and Aquaculture. Elsevier, Netherlands, pp. 377-420.

Barik S.K., Jena J.K. y K. Janaki-Ram. 2004. $CaCO_3$ crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel. Current Science, Vol. 86, No. 5, 10 March 2004.

Bayne, C.J., 1998. Invertebrate cell culture considerations: insects, ticks, shellfish, and worms. In: Mather, J.P., Barnes, D. (Eds.), Methods in Cell Biology, vol. 57. Academic Press, New York, pp. 187–201.

Brewster F., Nicholson, B.L., 1979. In vitro maintenance of amoebocytes from the American oyster (*Crassostrea virginica*). J. Fish. Res. Bd. Can. 36, 461–467.

Cahn A.R., 1949. Pearl Culture in Japan. U.S. Dep. Int. Fish and Wildlife Service, Washington, 81 pp.

Checa A. 2000. A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). Tissue & Cell. 32 (5) 405-416.

Dharmaraj S. y C.P. Suja. 2002. Development of technology in in-vitro pearl production in India. Bulletin of the Malacological Society of London. Número 39. (http://socrates.edsc.ulst.ac.uk/bull/Bull39/pearls.htm)

Dix T.G. 1973. Histology of the mantle and pearl sac of the pearl oyster *Pinctada maxima* (Lamellibranchia). J. Malacol. Soc. Aust. 2 (4). 365-375 pp.

Doumenege F., A. Toulemon y J. Branellec. 1991. THE SOUTH SEA PEARL The Philippine golden pearl. Musée Océanographique. Monaco. 54pp.

Ellington J.E., Broemeling, L.D., Broder, S.J., Jones A.E., Choker D.A. y R.W. Wright. 1999. Comparison of fresh and cryopreserved human sperm attachment to bovine oviduct (uterine tube) epithelial cells in vitro. Journal of Andrology, 20: 492-499

Engel J. 1997. Versatile collagens in invertebrates. Science 277: 1785–1786.

Fassler R.C. 1991. Farming jewels: the aquaculture of pearls. Aquaculture Magazine, Sep/Oct 1991: 34-52.

Fassler R.C. 1995. Farming jewels: new development in pearl farming. World Aquaculture 26: 5-10.

Fieschi A. 1950. Results of in vivo and in vitro culture of normal and pathological bone marrow. An Inst Med Trop (Lisb). Sep.7(Suppl):203-14

Fougerouse-Tsing, A. y C. Herbaut. 1994. Atlas anatomique de l'huitre perliere *Pinctada margaritifera*. Etablissement pour la Valorisation des Activités Aquacoles et Maritimes. Centre Universitaire de Polynése Francaise. EVAAM, Programme General de Recherche sur la Nacre, 89 pp.

García-Gasca A., Ochoa-Baez R.I. y M. Betancourt M. 1994 Microscopic anatomy of the mantle of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). J Shellfish Res 13:297-303.

Gauthier J.D. y G.R. Vasta. 2002. Effects of plasma from bivalve mollusk species on the *in vitro* proliferation of the protistan parasite *Perkinsus marinus*. Journal of Experimental Zoology. 292:221–230

Gervis M.N. y N.A. Sims. 1992. Biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). Overseas Dev. Adm. U.K. Int. Cent. Living Aqua. Res. Man., Manila, Philippines, 49 pp.

Guiard W., Lebel J.M., Boucaud-Camou E. y P. Favrel. 1998. Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L.: an in vitro study. J Comp Physiol B. 168: 81-86.

Hsieh G.C. y D. Acosta. 1991. Dithranol-induced cytotoxicity in primary cultures of rat epidermal keratinocytes. Toxicology and Applied Pharmacology, 107: 16-26.

Hsu Y., Y. Yang, Y. Chen, M. Tung, J. Wu, M. Engelking y J. Leong. 1995. Develpoment of an in vitro subculture system for the oka organ (Lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*. Aquaculture. 136:43-55.

Kinne O. 1971. Temperature. 3.3. Animals. Invertebrates. En: Kinne O. (ed.). Marine Ecology, Vol. 1. Environmental Factors, Part 1. Wiley-Interscience, London, pp. 407-514.

Koyama S. y M. Aizawa. 2000. Tissue culture of the deep-sea bivalve *Calyptogena soyoae*. Extremophiles. 4:385–389

Lamghari M., M.J. Almeida, S. Berland, H. Huet, A. Laurent, C. Milet y E. Lopez. 1999. Stimulation of Bone Marrow Cells and Bone Formation by Nacre: In Vivo and In Vitro Studies. Bone. Vol 2. No. 2, Suplemento.

Laursen J.R., Liu H-d., Wu X-J. y T.P. Yoshino. 1997. Heat-shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA. J. Invertebrate Pathol. 70, 226–233.

Lebel J.M., Giard W., Favrel P. y E. Boucaud-Camou. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusk, *Haliotis tuberculata*. Biol Cell 86, 67-72.

Lehninger A.L. 1990. Bioquímica. Ediciones Omega, España. 1117 pp.

Levi Y., Albeck S., Brack A., Weiner S. y L. Addadi. 1998. Control over aragonite crystal nucleation and growth: an in vitro study of biomineralization. Chem. Eur. J. 4, No. 3. 389-396 p.

Machii A. y Wada, K.T. 1989. Invert. Cell. Sys. Appli. 2, 225-233.

Malek F.A. y T.C. Cheng. 1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press Inc., E.U.A. 155-263 pp.

Martin B.M. 1994. Tissue Culture Techniques an Introduction. Birkhäuser. 245 pp.

McGee-Russell S.M. 1958. Histochemical methods for calcium. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 6:22-42.

Mirjalili A., E. Parmoor, B.S. Moradi y B. Sarkari. 2005. Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. Biologicals. Jun;33(2):81-5. Epub 2005 Apr 26.

Mizuta S., Miyagi T., Nishimiya T. y R. Yoshinaka. 2002. Partial characterization of collagen in mantle and adductor of pearl oyster (*Pinctada fucata*). Food Chem. (7) 319-325.

Monteforte M. 1990. Ostras perleras y perlicultura: situación actual en los principales países productores y perspectivas para México. Serie Científica UABCS. 1:3-18.

Monteforte M. 1991. Las perlas, leyenda y realidad: un proyecto actual de investigación científica. Panorama. 38: 28-35.

Mouriès, L.P., M.J. Almeida, C. Milet, S. Berland y E. Lopez. 2002. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pictada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 132,217-229.

Naganuma, T., Degnan, B.M., Horikoshi, K., and Morse, D.E. 1994. Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. Mol Mar Biol Biotechnol 3:131–140.

Norton J.H., M. Dshorst, T.M. Lansky y R.J.Mayer. 1996. An evaluation of some relaxants for use with pearl oysters. Aquaculture. 144, 39-52.

Nowel C.P. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. Science. 194: 23-28.

Odintsova, N.A., Ermak, A.V., and Tsal, L.G. 1994. Substrate selection for long-term cultivation of marine invertebrate cells. Comp Biochem Physiol. 107A:613–619.

Pedler S., C. J. Fuery, P. C. Withers, J. Flanigan y M. Guppy. 1996. Effectors of metabolic depression in an estivating pulmonate snail (*Helix aspersa*): whole animal and in vitro tissue studies. J. Comp. Physiol. B. 166: 375-381.

Pérez C. 2000. Descripción anatómica e histológica de la concha nácar *Pteria sterna*, Mollusca: Pteriidae. Tesis de Licenciatura. U.A.B.C.S. México.

Poncet J.M., A. Serpentini, B. Thiébot, C. Villers, J. Bocquet, E. Boucaud-Camou, y J.M. Lebel. 2000. *In vitro* Synthesis of Proteoglycans and Collagen in Primary Cultures of Mantle Cells from the Nacreous Mollusk, *Haliotis tuberculata*: A New Model for Study of Molluscan Extracellular Matrix. Mar. Biotechnol. 2, 387–398.

Posalaky Z., Toro I. y T. Barka. 1953. Role of nucleic acid in growth of liver tissue in vitro. Kiserl Orvostud. Nov. 5(6):401-10.

Rinkevich, B., Rabinowitz, C., 1994. Acquiring embryoderived cell cultures and aseptic metamorphosis of larvae from the colonial protochordate Botryllus schlosseri. Invertebrate Reprod. Dev. 25, 59–72.

Rinkevich, B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. J. Biotechnology. 70,133-153.

Robledo Y. y M.P Cajaraville. 1997. Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells in vitro. Eur. J. Cell. Biol. 72:362–369.

Sarashina I. y K. Endo. 1998. Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implications for calcium carbonate biomineralization. American Mineralogist. 83, 1510-1515.

Saucedo P., C. Rodríguez-Jaramillo, C. Aldana-Avilés, P. Monsalvo-Spencer, T. Reynoso-Granados, H. Villareal y M. Monteforte. 2001. Gonadic conditioning of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), under two temperature regimes. Aquaculture. 195, 103-119.

Saucedo P., I. Racotta, H. Bervera, H. Villreal y M. Monteforte. 2001. Differential gonadal development of grafted and ungrafted specimens of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae). Inver. Repro. Dev. 39(3):183-193.

Saucedo P.E., Ocampo, L., Bervera, H., Monteforte. M., 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Aquaculture. 229, 377-387.

Southgate P.C., P.E. Saucedo. En prensa. Growth and Reproduction. En: Southgate, P.C. (Ed.), The Biology and Culture of Pearl Oysters. Elsevier, Nueva York. EUA.

Spannhof, L. 1966. Histoquímica Práctica. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 195 pp.

Sud D., D. Doumec, E. Lopez y C. Milet. 2001. Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). Tissue & Cell. 33(2)154-160.

Suzuki T., R. Yoshinaka, S. Mizuta, S. Funakoshi y K. Wada. 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. Cell Tissue Res. 266(1):75-82.

Uthaiwan K., N. Noparatnaraporn y J. Machado. 2001. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. Aquaculture 195, 61–69p.

Wada, K.T., 1991. The pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) (family Pteriidae). En: Estuarine and marine bivalve culture. Menzel, W. (Ed.), CRC press, Boca Raton, 362 pp.

Youbin Z., S. Anjing y Z. Honyuan. 1994. The pharmacological functions of nacrum secreted by the cultured pallium cells of fresh water oyster. Acta Hydrobiol. Sin. 18(4) 327-333.

Zitcer E.M. y P.L. Kirk. 1954. The effect of serum ultrafiltrate on cultivated mast cells and fibroblasts from human skin. Science. 1954 Jan 15;119(3081)

Zuñiga C.P. 1998. Descripción anatómica e histológica de la Madre Perla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) (Mollusca: Petriidae). Tesis de Licenciatura. UABCS. 78 pp.

Anexo 1. Histoquímica de Rojo de Alizarina

Hacer del procedimiento una microtécnica utilizando tubos eppendorf de 1.5 mL

1. Fijar las muestras en solución de Davidson o formol al 10%.
2. Enjuagar las muestras con agua corriente cada 15 minutos y repetir el procedimiento 3 veces más.
3. Ponerlas progresivamente durante 30 minutos en alcohol al 70, 80, 90 y 96%., después en:
4. Alcohol absoluto (100%) durante 60 minutos.
5. Alcohol-Xilol durante 10 minutos.
6. Xilol durante 5 minutos.
7. Parafina-Xilol durante 10 minutos (en la incubadora).
8. Parafina I durante 45 minutos.
9. Parafina II durante 60 minutos.
10. Parafina III durante 16 horas.
11. Incluir las muestras en parafina.
12. Cortarlas en el microtomo y dejarlas 24 horas.
13. Ponerlas laminillas progresivamente en Xilol I, II y III durante 5 minutos, y después ponerlas en:
14. Xilol-Alcohol al 100% durante 2 minutos.
15. Alcohol del 96, 80 y 70% durante 2 minutos en cada uno.
16. Agua común durante 5 minutos.
17. Alcohol al 50% de 2 a 5 minutos.
18. Agua destilada de entrada por salida.
19. Rojo de Alizarina S durante 2.30 minutos y escurrir el exceso.
20. Acetona durante 15 segundos.
21. Acetona Xilol durante 20 segundos.
22. Citrosol durante 5 minutos.
23. Montar.

Anexo 2. Lista de Reactivos

- Solución de Tripsina-EDTA (E.C. 3.4.21.4) 1 X (SIGMA T-4299)
- Colagenasa I (E.C. 3.4.24.3) (SIGMA C-9891) 414 U/mg
- Proteasa Tipo XIV (3.4.24.31) (SIGMA P-5147) 4.9 U/mg Lot. 32K1363
- Proteinasa K (E.C. 3.4.21.64) (SIGMA P-6556) 30 U/mg Lot. 44H6880
- Enzima lisante de *Trichoderma harzianum* (Fluka 62815) Contiene actividad β-glucanasa, celulasa, proteasa y quitinasa
- Suero Fetal de Bovino Definido. Filtrado a 40 µm. Hyclone. Cat. No. SH30070.1, Lot. No. AHF8555, Botella No. 71, Volumen 50 mL
- Azul tripano (0.4%) (SIGMA T-8154) 20 mL. Lot. 45H2350
- L-glutamina (SIGMA G8540 25G) Lote 074K0362
- Solución de Penicilina-Streptomicina (SIGMA P-7539 20 mL) Lot. 93H4644
- Medio Megacell® RPMI-1640 (SIGMA M3817-500mL)
- Medio M199 (SIGMA M2154-500mL)
- Medio MegaCell® Dulbecco´s Modified eagle's (SIGMA M3942-500mL)
- MegaCell® Minimun essential medium eagle (SIGMA M4067-500mL)
- Solución Hanks SIGMA (H8264 1L)
- Penicilina Estreptomicina (SIGMA P7539- 20mL) Lote 33H46291

Anexo 3. Composición de los medios de cultivo

El fabricante de los medios marca Megacell® no proporciona sus componentes, sin embargo se enlistan los ingredientes de los mismos medios que no poseen marca.

	MEDIOS			
COMPONENTES	**M199**	**MEM**	**DMEM**	**RPMI 1640**
Sales inorgánicas	**g/L**	**g/L**	**g/L**	**g/L**
Ca(NO3)2•4H_2O				0.1
CaCl2 • 2H_2O	0.265	0.265	0.265	
Fe(NO3)3•9H_2O	0.00072		0.0001	
MgSO4 (anhyd)	0.09767	0.09767	0.09767	0.04884
KCl	0.4	0.4	0.4	0.4
NaHCO3	2.2		3.7	
Na•Acetato (anhyd)	0.05			
NaCl	6.8	6.8	6.4	6.0
Na2HPO4 (Anhyd)	0.122	0.122	0.109	0.8
Ácido Succinico•6H_2O•Na				0.1
Ácido Succinico (ácido libre)				0.075
Aminoácidos				
DL-Alanina	0.05			
L-Arginina HCl	0.07			
L-Arginina		0.126	0.084	0.2
L-Asparagina (anhydrous)		0.0313		0.05
L-Ácido aspártico	0.06			0.02
L-Cisteina•HCl•H_2O	0.00011			
L-Cistina•2HCl	0.026		0.0626	0.0652
L- Ácido Glutámico	0.1336	0.292		0.02

L-Glutamina		0.042	0.584	
Glicina	0.05		0.030	0.01
L-Histidina			0.042	0.015
L-Histidina•HCl•H_2O	0.02188			
Hydroxy-L-Prolina	0.01			0.02
L- Isoleucina	0.04	0.052	0.105	0.05
L –Leucina	0.12	0.052	0.105	0.05
L-Lysina•HCl	0.07	0.0725	0.146	0.04
L-Metionina	0.03	0.015	0.030	0.015
L-Fenilalanina	0.05	0.032	0.066	0.015
L-Prolina	0.04			0.02
L-Serina	0.05		0.042	0.03
L-Threonina	0.06	0.048	0.095	0.02
L-Triptophano	0.02	0.01	0.016	0.005
L-Tirosina				0.02
L-Tirosina•2Na•2H_2O	0.05766	0.0519	0.10379	
L-Valina	0.05	0.046	0.094	0.02
Vitaminas				
Ácido ascórbico Na	0.000056			
D-Biotina	0.00001			0.0002
Calciferol	0.0001			
Coline Colorida	0.0005	0.001	0.004	
Choline Bitartrato				0.00544
Ácido Fólico	0.00001	0.001	0.004	0.001
Bisulfito de sodio	0.000016			
Myo-Inositol	0.00005	0.002	0.0072	0.035

Niacinamida	0.000025	0.001	0.004	0.001
Ácido nicitinico	0.000025			
p-Amino Ácido Benzoico	0.00005			0.001
D- Ácido Pantotenico •½Ca	0.00001	0.001	0.004	0.00025
Piridoxina•HCl	0.000025	0.001		0.001
Acetato de retinol	0.00014			
Riboflavina	0.00001	0.0001	0.0004	0.0002
Tiamina•HCl	0.00001	0.001	0.004	0.001
DL-a -Fosfato de Tocoferol •Na	0.00001			
Vitamina B-12				0.00000
Otros compuestos				
D-Glucosa	1		4.5	2.0
Glutatione (reducido) PES	0.00005			0.001
Rojo Fenol•Na	0.0213	0.011	0.0159	0.00318
Adenine Sulfato	0.01			
Adenosine Trifosfato•2Na 1	0.00			
Adenosine Monofosfato•Na	0.000238			
Colesterol	0.0002			
Deoxyribosa	0.0005			
Guanina•HCl	0.0003			
Hypoxanthina	0.0003			
Tween 80	0.02			
Ribosa	0.0005			
Timina	0.0003			
Uracilo	0.0003			
Xanthina•Na	0.000344			

- Solución Hanks

COMPONENTE	g/L
Sales inorgánicas	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.185
$MgSO_4$(anhyd)	0.09767
KCl	0.4
KH_2PO_4(anhyd)	0.06
$NaHCO_3$	0.35
NaCl	8.0
Na_2HPO_4(anhydrous)	0.04788
Otros	
D-Glucosa	1.0
Rojo Fenol•Na	0.011

Glosario

Confluencia celular: Se refiere a la cubierta o proliferación que las células logran formar en un cultivo celular. Un confluencia de 40% significa que las células tiene la posibilidad de crecer dentro del recipiente, pero en una confluencia del 100% las células dejarán de crecer por inhibición por contacto ocupando toda la superficie del recipiente.

Crecimiento en monocapa: El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación.

Cultivo celular: Conjunto de técnicas que permiten el cultivo y mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración se habla de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios

Cultivo de tejidos o de órganos: Implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que

obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada hetereogeneidad.

Cultivo primario: Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano. Las células mantienen la viabilidad un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo. En general en cultivo presentan una reducción en el número total de células vivas a lo largo del tiempo. Ejemplos: hepatocitos obtenidos de hígado adulto, neuronas, etc...

Explantes: Fragmentos de tejidos o de órganos en la que proliferan las células de la periferia.

Laboratorio de cultivo de tejidos: una sala aislada y a la cual se le suministra aire filtrado (normalmente mediante un equipo de filtración y regulador de la temperatura). Esto produce un aumento de presión atmosférica en el interior del laboratorio (típicamente entre 15 y 20 mm de Hg) que impide la entrada de aire no filtrado al área limpia.

Línea celular continua: Cultivo que se establece a partir de un tejido u órgano, en muchos casos de un tumor, y que se mantiene en cultivo un tiempo ilimitado. Se trata de células 'inmortales'.

Línea primaria: Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano que se mantiene un periodo de tiempo limitado pero con reproducción de las células en el cultivo.

Manto: Órgano de los moluscos, en el caso de los bivalvos y gasterópodos tiene una función sensorial y es el encargado de secretar la concha de carbonato de calcio.

Solución Hanks: Una solución salina equilibrada con una mezcla de sales inorgánicas, incluyendo usualmente bicarbonato sódico, y suplementada con glucosa. Se usan para diluir medios más completos, como medio de disección o lavado, o para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente.

Sustrato celular: es el que promueve la adhesión celular. Este puede esta conformado por una molécula sintética que contiene una carga positiva que altera las cargas de la superficie en el sustrato de cultivo, como la poli-D-lisina. También puede estar conformado por una capa de células las cuales le van a proporcionar un medio adecuado de adición y alimentación a las células en cultivo (*feeder layer*).