

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGIA ANIMAL

**APLICACIÓN Y EVALUACIÓN DE METODOLOGIAS PARA EL CULTIVO
PRIMARIO DE CELULAS Y EXPLANTES DE ORGANOS DE ABALON ROJO
(*Haliotis rufescens*).**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TITULO DE
MEDICO VETERINARIO.

PAULA ANDREA PINTO RIOS

VALDIVIA- CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Ricardo Enríquez

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Mónica Monras

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Orlando Garrido O.

Firma

José De La Vega M.

Firma

FECHA APROBACION:

08 de Junio del 2005

INDICE

| | |
|-----------------------|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCION | 3 |
| 4. MATERIAL Y METODOS | 9 |
| 5. RESULTADOS | 13 |
| 6. DISCUSIÓN | 19 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 25 |
| 8. ANEXOS | 28 |
| 9. AGRADECIMIENTOS | 32 |

1. RESUMEN

APLICACION Y EVALUACION DE METODOLOGIAS PARA EL CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS Y EXPLANTES DE ORGANOS DE ABALON ROJO (*Haliotis rufescens*).*

Los objetivos de esta investigación fueron aplicar y evaluar metodologías para el cultivo primario de células obtenidas desde la hemolinfa (hemocitos) de abalones rojos (*H. rufescens*) adultos y cultivos primarios por degradación enzimática y por explantes de órganos de abalones rojos (*H. rufescens*) juveniles y adultos.

Para los cultivos primarios de hemocitos se extrajo la hemolinfa desde el seno cefálico, resuspendiéndola inmediatamente en una solución 1:5 con L-15 modificado I (Anexo 2). Al desarrollar los cultivos primarios por degradación enzimática se utilizaron abalones juveniles y adultos, procesados con tripsina al 0,25%, mantenidos alternadamente con tres medios de cultivo, L-15 modificado I, II y III (Anexo 2). Para los cultivos primarios de explantes de órganos de abalón, se desinfectaron con formalina 10 ppm por un minuto, luego se enjuagados con agua de mar estéril, para luego ser picados en trozos de 1 mm³ e incubados con L-15 modificado II y III alternadamente. Todas las placas fueron incubadas a 15 °C y 20 °C, en forma paralela.

De los resultados obtenidos, los hemocitos no lograron sobrevivir más de 24 h de incubación, por lo tanto no se logro desarrollar el cultivo primario, a diferencia de lo realizado por otros autores que obtuvieron resultados exitosos. En cuanto a lo obtenido en los cultivos primarios por degradación enzimática, las células no lograron adherirse al fondo del frasco de cultivo, sin embargo en otros estudios realizados en moluscos y crustáceos, las células lograron adherirse y desarrollar una monocapa de células. El cultivo primario de explantes de órganos, se logro desarrollar parcialmente, ya que el crecimiento celular se detuvo después de 15 días de cultivo. Respecto a los diferentes medios de cultivo y temperaturas no se observaron diferencias en el comportamiento celular. Los resultados obtenidos podrían deberse a la falta de algunos nutrientes requeridos por la célula para su sobrevivencia.

Palabra clave: Abalón; *Haliotis rufescens*; cultivos primarios.

* Financiado por: Proyecto FONDEF D 01 I 1074 “Desarrollar nueva tecnología para el diagnóstico y control de enfermedades de abalones”.

2. SUMMARY

APPLICATION AND EVALUATION OF METHODOLOGIES FOR THE PRIMARY CULTURE OF CELLS AND EXPLANTS FROM ORGANS OF RED ABALONE (*Haliotis rufescens*).*

The objectives of this research was application and evaluation methodologies for the primary culture of cells obtained from the hemolymph (hemocytes) of adult red abalones (*H. rufescens*), primary cultures by enzymatic degradation and from explants of organs of red abalone of both, juveniles and adults.

For the development of primary cultures of hemocytes adult abalones were used, extracting the hemolymph from the cephalic cavity, resuspending it immediately in a solution 1:5 of L-15 modified I (Annex 2). To develop primary cultures by enzymatic degradation juvenile and adult abalones were used, processed with 0.25% trypsin, kept alternatively with three culture mediums, L-15 Modified I, II and III (Annex 2). For primary cultures of explants from organs of abalones, they were disinfected with 10 ppm Formalin for one minute and soaked in sterile sea water after which they were cut in 1 mm³ pieces and incubated with L-15 modified II and III, alternatively. All the plates of cell culture were incubated at 15 °C and 20 °C, together.

From the results obtained, the hemocytes didn't survive more than 24 hours therefore it was not possible to develop the primary culture. Regarding the primary cultures by enzymatic degradation, the cells were not able to fix to the bottom of the culture glass after 120 days of incubation at 15 °C and 20 °C. The primary culture of explants from organs, was partially developed since the cell growth stopped after 15 days of incubation, nevertheless the cells stayed fixed to the bottom of the culture plate. Regarding the different culture mediums and temperatures no differences in cell behavior was noted. The results obtained may be due to the lack of certain nutrients required by the cell for its survival.

Keywords: Abalone, *Haliotis rufescens*, primary cultures.

* Grant: proyecto FONDEF D 01 I 1074 "Desarrollar nueva tecnología para el diagnóstico y control de enfermedades de abalones".

3. INTRODUCCION

El abalón que pertenece al *Phylum Mollusca* clase *Gastropoda*, es una especie dioica con un ciclo reproductivo estacional y un desove anual. Posterior a la fertilización comienzan los estadios larvales de larva “trocófora” y larva “veliger”, para luego iniciar el asentamiento larval (metamorfosis) y pasar de la forma pelágica a la bentónica (post larva). El tiempo desde la fertilización al asentamiento puede variar entre 4 a 7 días dependiendo de la temperatura del agua (Hickmann y col 2002).

Luego continúa la etapa juvenil para terminar como adultos, ya sea como machos o hembras según corresponda (Shepherd y col 1992) (Figura 1).

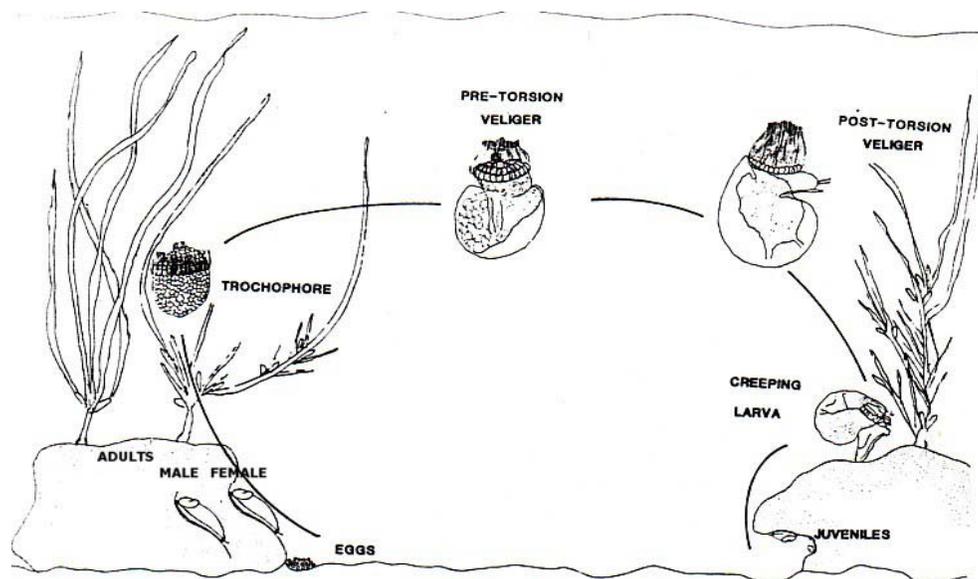


Figura 1: Ciclo de vida del abalón rojo (*Haliotis rufescens*) (Shepherd y col 1992).

Existen alrededor de cien especies conocidas de abalones distribuidos alrededor del mundo en ambos hemisferios, principalmente a lo largo de las costas de regiones tropicales con altas temperaturas, a excepción de Sudamérica y el Oeste de Norteamérica. Sólo diez son consideradas de importancia comercial, encontrándose principalmente en Corea, Japón, México, Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y China (Hahn 1989).

El abalón rojo (*Haliotis rufescens*) se encuentra naturalmente por todas las costas del Oeste de Estados Unidos y México, donde la mayoría habita en la zona intermareal, encontrándose generalmente entre los 7 y 20 metros bajo la superficie, aunque puede llegar hasta los 200 metros de profundidad (Nuestro Mar 2002).

El abalón rojo (*H. rufescens*) a diferencia del abalón japonés (*Haliotis discus hannai*) es la especie más grande del mundo, alcanzando longitudes máximas de 27,5 cm y un peso de hasta 1,7 kg (Shepherd y col 1992, Guzmán 2003). Prefiere un rango de temperatura entre los 7 °C y 16 °C, así como también las áreas protegidas de marejada, viento y corriente (Hahn 1989).

El cuerpo del abalón es el típico de un caracol marino, la región cefálica contiene la boca, un par de tentáculos cefálicos y los tallos oculares, la concha externamente es áspera, pero el interior de esta es lisa cubierta con nácar, otorgándole un aspecto muy atractivo, lo cual le da un valor productivo siendo en algunos casos tan valiosa como la carne (Fallu 1991, Guzmán 2003).

Su locomoción esta dada por el pie muscular y por la capacidad de adherirse a las rocas desplazándose sobre ellas (Hickmann y col 2002) (Figura 2 y 3, tomado de Manual de Necropsia y Envío de Muestras de Abalón (*Haliotis sp.*)).

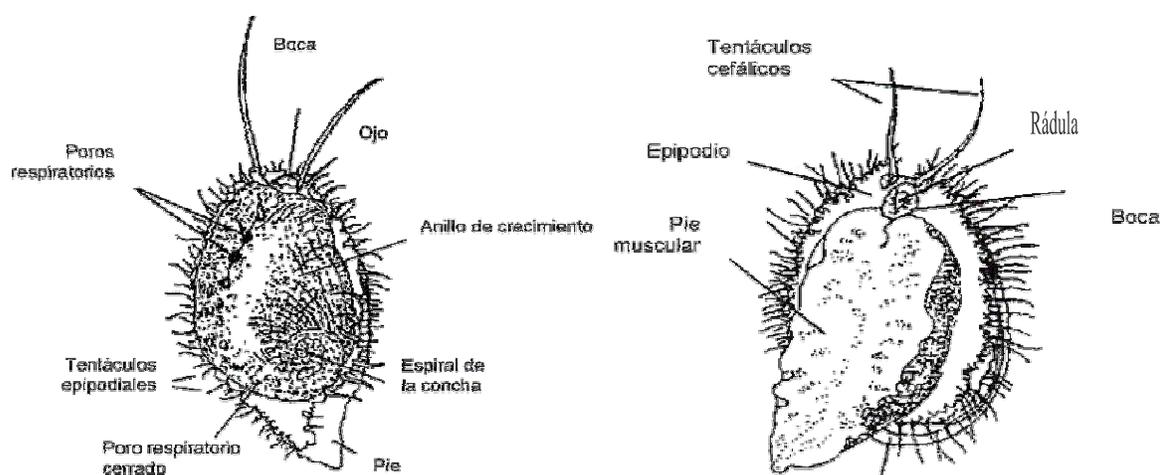


Figura 2: Vista dorsal general del abalón. Figura 3: Vista ventral general de un abalón.

La anatomía interna está compuesta por el manto que secreta los precursores de los componentes minerales y orgánicos de la concha, la cavidad que este forma acumula orina y gametos, las branquias que realizan el intercambio gaseoso, el corazón compuesto por un ventrículo y dos atrios, la hemolinfa es impulsada por el corazón, siendo oxigenada en las branquias específicamente en lo seno palial y seno craneal (Fallu 1991, Enríquez y col 2003) (Figura 4).

El abalón es considerado vegetariano estricto, se alimenta especialmente de *Macrocyctis sp.* y *Eisenia sp.* (Hickmann y col 2002)

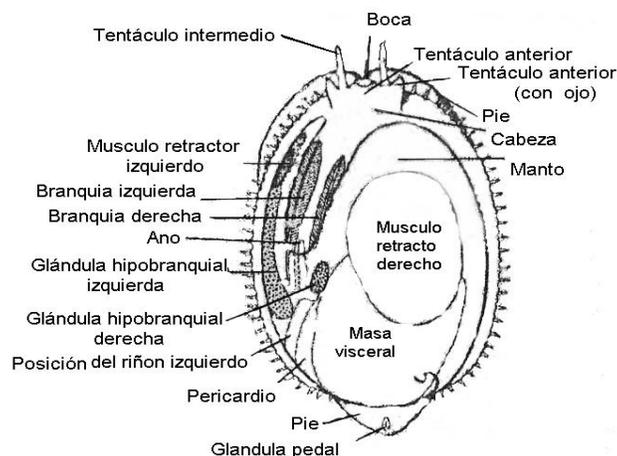


Figura 4: Anatomía interna del abalón (*Haliotis sp.*)¹.

Es muy importante considerar que el abalón es una de las especies más nuevas que se cultivan en Chile, siendo considerada en el extranjero como una “exquisitez”. Al ser un molusco muy cotizado internacionalmente, la demanda de esta especie está por sobre lo que ofrece el mercado (Nuestro Mar 2002, Guzmán 2003). Los consumidores del abalón rojo (*Haliotis rufescens*) chileno se encuentran principalmente en Estados Unidos, Singapur y China, no ocurriendo lo mismo para el abalón japonés (*Haliotis discus hannai*) donde su único comprador es el país nipón (Guzmán 2003). En éste último el precio alcanza entre US\$ 50 y US\$ 100 /kg con concha (Salmonicultura 2002 a), mientras que en el mercado americano el precio bordea los US \$35/kg (Guzmán 2003).

El abalón no forma parte de la fauna propia de las costas de Chile; es así como los primeros intentos por introducir los abalones a Chile fueron realizados en 1978, por Fundación Chile que junto a la Universidad Católica del Norte (UCN) desarrollaron un proyecto para introducir abalón rojo (*H. rufescens*). A ello le siguió la incorporación de semillas de abalón japonés durante la década de los '80 y ya en 1988 a través de Cultimar S.A. –filial de Fundación Chile en Tongoy– se presentó el primer Estudio de Impacto Ambiental de la Acuicultura, para cultivar abalón rojo en la X Región. En 1992 fue aprobado, lo cual permitió el cultivo abierto de la especie en la zona comprendida al sur del canal de Chacao, entre las latitudes 41°21'55'' Sur y 46°00'00'' Sur (Rivera e Illanes 2000, Guzmán 2003).

¹ Marcos Godoy, 3 de Junio del 2003 presentación realizada en Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Más tarde en 1996, la UCN y la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA) financiaron la instalación de un centro de producción en estanques en tierra de abalón japonés (*H. discus hannai*) en las provincias de Copiapó y Coquimbo (Guzmán 2003). Así entonces, Chile puede contar con las dos especies de más alto valor en los mercados internacionales, posicionando al país en una situación muy favorable con respecto al resto del mundo (Salmonicultura 2002 a).

En Chile existen 13 empresas dedicadas a este cultivo, de las cuales 5 son productoras de semillas. Se cultiva principalmente abalón rojo (*H. rufescens*) y abalón japonés (*H. discus hannai*), preferentemente en la III, IV y V región (norte del país), mientras que desde la X región al sur solo se cultiva abalón rojo (*H. rufescens*) (Rivera e Illanes 2000, Guzmán 2003).

La producción de esta área es aun incipiente al compararla con la producción de Salmónidos. Aunque existió una disminución en los precios durante el 2002, las perspectivas de esta actividad son promisorias. Es así como entre Enero y Octubre del 2004 el abalón presentó un desarrollo sustancial a nivel nacional con un crecimiento del 70,6 %, con respecto al mismo periodo del 2003, aumentando sus exportaciones a 135,6 toneladas (Aquanoticias 2005).

Son tres los factores que preocupan a los productores nacionales de abalones: por una parte la producción de semillas con la finalidad de conseguir volúmenes estables a costos razonables; la engorda, para lograr cultivar con tasas de crecimiento, mortalidad y densidad aceptables; y finalmente, el alimento que actualmente corresponde a macroalgas de extracción para abastecer los centros de engorda (Salmonicultura 2002 b).

En Chile existen principalmente 2 sistemas de cultivo, el primero en el mar en contenedores plásticos o jaulas suspendidas, que presentan ventajas relacionadas con una baja inversión en infraestructura, equipos y terreno. El otro sistema utilizado es el estanque en tierra o “raceway”, que presenta ventajas para siembra, alimentación, monitoreo, manejo y cosecha, estas ventajas están asociadas a un mayor control sobre variables importantes como oxígeno, densidad y alimentación (Durandeu 2000, Guzmán 2003).

Al ser este un sistema de cultivo intensivo, existen muchas variantes que afectan negativamente el desarrollo y crecimiento de los abalones, ya sean enfermedades o problemas de manejo.

En cuanto a las enfermedades que afectan al abalón en Chile, podemos decir que entre las infecciosas se encuentran aquellas que son producidas por bacterias pertenecientes al género *Vibrio* sp, que puede causar hasta un 80% de mortalidad en post larvas (Faune y col 2003). Whithering Síndrome (Síndrome de Deshidratación), causada por un microorganismo intracelular *Candidatus Xenohalictis californensis* que es denominada también como Procarionte like-rickettsia (RLP) y puede causar entre un 1-10% de mortalidad² (Guzmán 2003).

² Marcos Godoy, 3 de Junio del 2003 presentación realizada en Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Dentro de las enfermedades causadas por protozoos existe en nuestro país la Coccidiosis renal, su agente etiológico es *Margosiella haliotis* y causa alteraciones renales. En las causadas por metazoos están: Sabélidos (*Terebrasabella heterouncinata*), causa una disminución del crecimiento de hasta un 20%, provocando alteraciones en la concha y un aumento de la mortalidad. Además simbiontes, como *Polydora sp.*, *Megabalanus*, *Romanchela*, *Crepidula*². Entre las enfermedades no infecciosas se encuentran el abultamiento de la glándula digestiva o “bloat”, causado por alteraciones nutricionales y por una mala calidad de agua, deformaciones de la concha y el síndrome de mortalidad aguda que afecta a semillas de abalón rojo² (Godoy y Muñoz 2003, Guzmán 2003).

El estudio de las enfermedades de los moluscos de interés comercial, se ha ido desarrollando, por la necesidad de encontrar las causas de mortalidad ocurridas dentro de las poblaciones en cultivo intensivo³.

Es indispensable optimizar el control de las enfermedades, lo que implica mejorar las técnicas diagnósticas, de esta forma se puede identificar con mayor eficiencia cual es la enfermedad que esta afectando al animal, lo que se traduce en menor mortalidad y por ende mayor producción.

La información disponible demuestra que el cultivo intensivo de abalones en Chile requiere en forma urgente de tecnologías para implementar en los laboratorios de diagnóstico, ya que con el creciente desarrollo de esta actividad, también comienzan a aumentar y aparecer enfermedades disminuyendo la productividad.

Una técnica muy utilizada a nivel mundial en la detección y caracterización de patógenos intracelulares son las líneas celulares, las cuales provienen directamente de los cultivos primarios (Smith 1985).

Importante es destacar que existen muchos cultivos primarios de invertebrados marinos, los cuales son utilizados con éxito para procesos de investigación específicos. Por ejemplo el uso de cultivos primarios de branquias de bivalvos para el estudio de enfermedades que afectan a las semillas de almejas (Auzoux y col 1993).

Respecto de los cultivos primarios, estos provienen de células derivadas directamente de un órgano o tejido en particular de un organismo viviente, pueden provenir directamente del organismo original o de la hemolinfa de este, estas células no son morfológica y fisiológicamente uniformes (Smith 1985).

³ Fundación Chile 2000, Seminario de Abalones: enfermedades y manejo de salud, Puerto Montt.

Se han descrito variadas técnicas para desarrollar cultivos primarios, las técnicas pueden ser completamente mecánicas, con o sin el proceso de maceración y técnicas de degradación enzimática. La disección fina o explantes que es un técnica mecánica, se utiliza cuando se dispone de una pequeña cantidad de tejido, a diferencia de la degradación enzimática, la cual se utiliza cuando el tejido disponible es abundante, esencialmente se debe realizar una disección mecánica previamente (Clynes 1998).

La técnica de explantes primarios fue originalmente desarrollada por Harrison en 1907 y Carrel en 1912, al comenzar con el cultivo de tejidos. En esta metodología se colocaba el trozo de tejido en un frasco con plasma sanguíneo o linfa, mezclado con suero y extracto de embrión (Clynes 1998).

La degradación enzimática da origen a células libres, que son obtenidas de trozos de tejidos sometidos a reiteradas tripsinizaciones quedando las células en suspensión, estas células posteriormente se adhieren a una superficie, ya sea vidrio, colágeno o metal, formando una monocapa de células (Smith 1985).

Desarrollar cultivos primarios de moluscos es de gran importancia, ya que la utilidad de estos en el diagnóstico y caracterización de patógenos intracelulares es muy relevante. Actualmente no existe a nivel mundial una línea celular de moluscos, la cual se requiere con rapidez, debido a que este rubro acuícola tiene un importante desarrollo a nivel nacional e internacional.

Implementar cultivos primarios de abalones, es de vital importancia para el desarrollo exitoso y eficiente de tecnologías diagnósticas de aplicación en la acuicultura nacional, que enfrenta desafíos no menores en materia productiva.

El objetivo general de esta investigación fue aplicar y evaluar metodologías para cultivo primario de células y explantes de órganos de abalón rojo (*Haliotis rufescens*), y específicamente:

- Aplicar y evaluar metodologías para obtener cultivos primarios de células provenientes desde la hemolinfa (hemocitos) de abalones rojos (*H. rufescens*) adultos.
- Aplicar y evaluar metodologías para obtener cultivos primarios por degradación enzimática de órganos de abalones rojos (*H. rufescens*) juveniles y adultos.
- Aplicar y evaluar metodologías para obtener cultivos primarios por explantes de órganos de abalones rojos (*H. rufescens*) juveniles y adultos.

4. MATERIAL Y METODOS

La presente investigación se realizó en las dependencias del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, en el marco del Proyecto FONDEF D 01 I 1074 “Desarrollo de nuevas técnicas para la prevención y control de enfermedades infecciosas y no infecciosas en los cultivos de Abalón”.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Entre Julio y Diciembre del 2004, se procesaron 28 abalones rojos (*H. rufescens*), de los cuales 11 ejemplares eran juveniles y 17 ejemplares adultos, tanto machos como hembras, provenientes de 4 centros de cultivo; los Liles en Corral, San Rafael en Calbuco, Quemu en Coquimbo y Rilán en Castro.

4.2 MATERIALES DE LABORATORIO Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron los materiales y medios de cultivos que se detallan en los Anexos 1 y 2.

4.3 METODOS

Previo a ser procesados los abalones fueron mantenidos en estanques circulares de 250 litros, con agua de mar traída desde el Laboratorio de Recursos Acuáticos Calbuco de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, con una salinidad de 33 ‰, una temperatura promedio de 12 °C y oxígeno constante, fueron alimentados principalmente con algas frescas de *Macrocystis* sp. Se realizó un cambio de agua cada 2 semanas y el alimento fue repuesto cuando se requería.

4.3.1 Diseño experimental:

El diseño experimental se presenta en un esquema detallado en el Anexo 3.

4.3.2 Protocolo de necropsia del abalón, para la extracción de órganos o tejidos:

4.3.2.1 Identificación del abalón: Procedencia del abalón.

4.3.2.2 Mediciones: Se midió la concha del abalón, el largo total, el ancho y se registró el peso total y peso de la concha.

4.3.2.3 Examen externo del pie: Se observó el color, el grado de retracción y la presencia de lesiones.

4.3.2.4 Examen interno: Se anestesió el abalón con BZ 20, luego se procedió a desconchar el abalón cortando con bisturí el músculo del pie, para luego separar los órganos internos de la concha. Se examinó la glándula digestiva (color, grado de repleción), gónada (color, tamaño) (Enríquez y col 2003).

4.3.3 Protocolo cultivos de hemocitos:

Se utilizaron abalones adultos de 6 a 9 cm. Previo a la anestesia se colocó el abalón en una bandeja de necropsia, desinfectando la superficie entre la cabeza y el pie con alcohol 70% (Brody y Chang 1989), con una pinza anatómica estéril se levantó el pie, insertando una jeringa de 21 G (jeringa de tuberculina estéril) en el área del seno cefálico, succionando y buscando hasta la obtención de hemolinfa, esta se resuspendió inmediatamente en una solución 1:5 con L-15 modificado I (Anexo 2), este procedimiento se efectuó dentro del área de esterilidad que origina el mechero.

La osmolaridad fue ajustada a 1080 mOsm/kg y con un pH ajustado entre 5.5 – 6.6, se incubó en placas o frascos de cultivo de 25 cm² a 15 °C (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996, Otsu y Sasaki 1997, Nagai y col 1998).

En Octubre, se suplementó el medio de cultivo de los nuevos cultivos con phytohemaglutinina líquida en una relación de 25 ul por cada 5 ml de medio de cultivo, para estimular la división celular.

Los frascos de cultivo fueron evaluados por medio de fotografías a las 3, 24 y 72 h de incubación.

4.3.4 Protocolo cultivo de células de órganos:

Se utilizaron abalones juveniles de 2 a 5 cm y adultos de 6 a 9 cm. Se colocaron 1 ó 2 abalones en un recipiente con agua de mar y anestésico. Cuando estos estuvieron anestesiados se pesaron en una balanza electrónica, se midió el largo y ancho de la concha. Posterior a esto se procedió a desconchar cuidadosamente el abalón, tratando de no dañar los órganos internos. Luego para desinfectarlos se colocaron por 1 minuto en un vaso precipitado con 100 ml de formalina a 10 ppm (Naganuma y col 1996).

Luego se ingresaron los abalones a la cámara de flujo laminar; se enjuagaron pasándolos tres veces por placas petri con agua de mar estéril (Rosenthal y Diamant 1990), alternando con una solución de lavado (Birmelin y col 1999). Posteriormente a los ejemplares juveniles se les extrajo, branquias, tentáculo y manto, y en los adultos branquia, tentáculo, pericardio, riñón, manto y gónada. Se dejaron incubar en tubos con 3 ml de solución antibiótica (Anexo 2), durante una hora a 15 °C (Domart-Coulon y col 1994).

Transcurrida la hora, se ingresaron nuevamente los tubos con los órganos a la cámara, se vertió el contenido del tubo sobre una placa petri estéril, luego se tomó con una pinza anatómica estéril el órgano y se colocó en otra placa petri con 1ml de solución de picado (Anexo 1), con un bisturí estéril el órgano fue cortado en trozos de aproximadamente 1mm^3 (Rosenthal y Diamant 1990). Se tomaron los trozos con el mismo bisturí y se colocaron en un vaso precipitado con imán estéril (Clynes 1998), que contenía 10 ml de tripsina 0,25% en buffer fosfato Dulbecco modificado (33g/l de NaCl, libre de Ca^+ y Mg^+) y se mantuvieron con agitación constante por 15 y por 60 minutos en paralelo (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996).

Se ingresaron nuevamente los vasos a la cámara de flujo laminar, se vertió el contenido a un vaso con gasa estéril para ser filtrado, se extrajo 9 ml y se colocaron en un tubo con tapa estéril, se agregó 1 ml de suero fetal bovino para detener la acción de la tripsina.

Se centrifugaron los tubos a 400 G durante 10 minutos a $15\text{ }^\circ\text{C}$ (Wolf 1976), se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 ml de medio L-15 modificado I, II o III (Anexo 2). Se volvió a centrifugar a 400 G durante 10 minutos a $15\text{ }^\circ\text{C}$ (Wolf 1976). Nuevamente se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2,5 ml de medio de cultivo, posteriormente se transfirió con una pipeta Pasteur a frascos de cultivo de 25 cm^2 , se homogenizó suavemente y fueron incubados a $15\text{ }^\circ\text{C}$ y $20\text{ }^\circ\text{C}$ en paralelo (Naganuma y col 1994).

El tipo de medio de cultivo utilizado se alternó entre un L-15 modificado I, II y III (Anexo 2), la osmolaridad del medio fue mantenida en 1080 mOsm/Kg y el pH entre 7.6-7.8 (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996).

Las placas de cultivo fueron evaluadas por medio de fotografías a los 4, 15, 30, 60 y 120 días de incubación.

4.3.5 Protocolo cultivos de explantes de órganos:

Ídem al punto anterior 4.3.4, hasta “incubar los tubos con solución antibiótica durante una hora a $15\text{ }^\circ\text{C}$ ”.

Transcurrida la hora, se ingresaron nuevamente los tubos con los órganos a la cámara. Se vertió el contenido sobre una placa petri estéril, luego se tomó con una pinza anatómica estéril el órgano y se colocó en otra placa petri con 1ml de solución de picado (Anexo 1). Con un bisturí estéril se picó el órgano en trozos de aproximadamente 1mm^3 (Rosenthal y Diamant 1990, Domart-Coulon y col 1994, Clynes 1998). Con una pipeta Pasteur se traspasaron los trozos a un frasco de cultivo de 25 cm^2 y con la misma pipeta se esparcieron por toda la superficie del frasco y aspirando la mayor cantidad de líquido posible (Clynes 1998), se dejaron escurrir a $20\text{ }^\circ\text{C}$, con el frasco semi inclinado por un periodo de 2 a 3 h, se extrajo el líquido restante. Posteriormente se agregó 1ml de medio de cultivo, de tal forma que cubriera solo la superficie del frasco (Clynes 1998).

El medio de cultivo se alternó entre un L-15 modificado II y un L-15 modificado III (Anexo 2), la osmolaridad del medio fue ajustada a 1080 mOsm/Kg y el pH entre 7.6-7.8 (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996). Los frascos fueron incubados a 15 °C y 20 °C, en paralelo (Naganuma y col 1994).

Al tercer día se agregaron 1,5 ml de medio de cultivo a cada frasco, a la semana se agregaron 2,5 ml de medio de cultivo más para completar los 5 ml, posteriormente cada 15 días se cambió la mitad del medio de cultivo.

En Octubre, se suplementó el medio de cultivo de los nuevos cultivos con phytohemaglutinina líquida en una relación de 25 ul por cada 5 ml de medio de cultivo, para estimular la división celular. De igual manera se suplementó el medio con una solución de levadura al 1%. Esta última se utilizó solamente en algunos frascos de cultivo, en forma paralela a otros sin ella. Posteriormente se decidió suplementar todas las placas.

Al crear nuevos cultivos en Diciembre, se adicionó hemolinfa al medio de cultivo (Rosenthal y Diamant 1990). Unos frascos de cultivo con 1% de hemolinfa y otros con 10% de hemolinfa.

Los frascos de cultivo fueron evaluados por medio de fotografías a los 4, 15, 30 y 60 días de incubación.

4.3.6 Evaluación de resultados:

Los cultivos primarios de hemocitos y degradación enzimática, fueron evaluados por medio de fotografías, considerando el porcentaje de células adheridas al fondo del frasco en relación a la superficie vacía total. Para los explantes se consideró el porcentaje de células que se prolongan desde el trozo de tejido en relación a la superficie vacía total del frasco, de lo cual se obtiene la siguiente escala.

| | | |
|---------------------------------|-----------------|-----------|
| Crecimiento celular negativo: | 0% | (-) |
| Crecimiento celular bajo: | 5% - 15% | (+) |
| Crecimiento celular medio: | 16% - 30% | (+ +) |
| Crecimiento celular medio alto: | 31% - 55% | (+ + +) |
| Crecimiento celular alto: | 56% en adelante | (+ + + +) |

Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital SONY DSC-S30, a través del ocular del microscopio óptico invertido JURGENS, utilizando el objetivo 4X, 10X, 40X y ajustando el lente de la cámara a 3X.

5. RESULTADOS

5.1 CULTIVOS DE HEMOCITOS:

Luego de 3 h de incubación se examinaron las placas, observándose células adheridas con forma estrellada, cubriendo casi todo el fondo del frasco (Figura 5 a).

Transcurridas 24 h de incubación se examinaron nuevamente las placas. Se visualizó que la mayoría de las células estaban sueltas y flotando en el medio de cultivo, con forma redondeada, quedando solamente algunas células de forma estrellada adheridas al frasco (Figura 5 b).

Posteriormente a las 72 h de incubación, se observó que las células estaban totalmente despegadas, sin proliferación celular en ninguna de las placas, tanto las incubadas a 15 °C como a 20 °C.

En las placas que fueron adicionadas con phytohemaglutinina líquida, no se observó diferencia en el crecimiento celular, al compararlas con las placas que no fueron suplementadas.

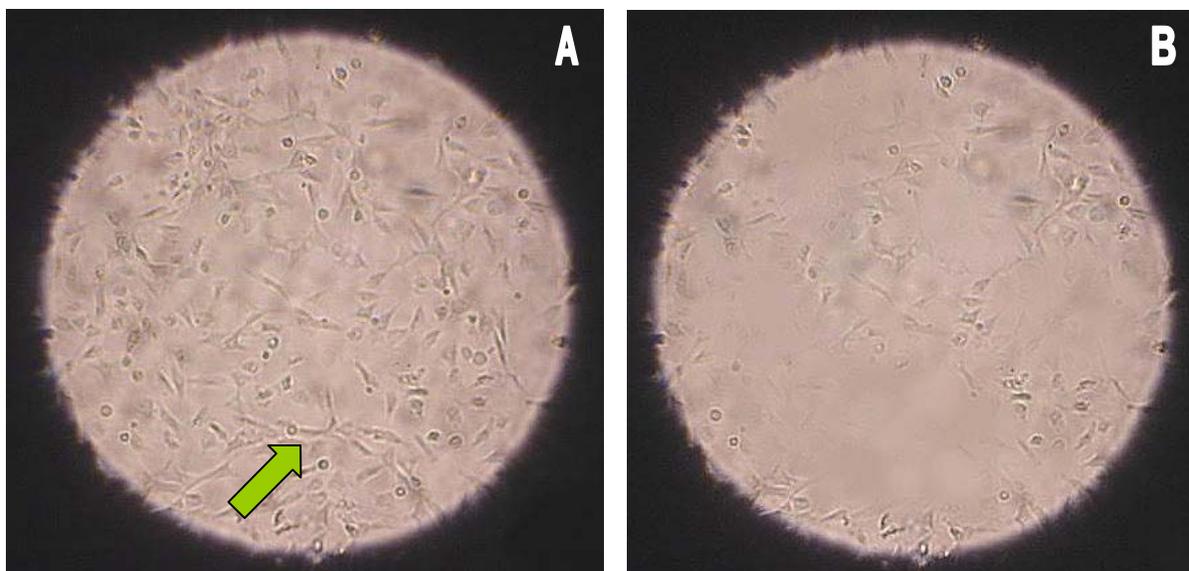


Figura 5: Hemocitos cultivados a 15 °C, 10 X. A) Hemocitos a 3 h de incubación, se observa una gran cantidad de células con forma estrellada (flecha verde), adheridas al fondo del frasco de cultivo. B) Hemocitos a 24 h de incubación, se observa una considerable disminución de células adheridas al fondo del frasco.

5.2 CULTIVO DE CELULAS DE ORGANOS:

Al examinar las placas de cultivos primarios, derivados del tratamiento enzimático a los 4 días de incubación, se observaron las células flotando en el medio de cultivo con forma redondeada. A los 15 días de incubación, no se visualizaron células adheridas al fondo del frasco, por lo tanto tampoco se observó proliferación celular y al realizar la tercera evaluación a los 30 días de cultivo, no se detectó proliferación celular.

La evaluación realizada a los 120 días de incubación, arrojó resultados negativos, es decir no se observó adhesión como tampoco proliferación celular.

Con respecto a los diferentes medios de cultivo L-15 modificado I, II y III (Anexo 2), a las diferentes temperaturas (15 °C y 20 °C) de incubación y a los distintos tiempos de tripsinizado, 15 y 60 minutos, no se evidenciaron diferencias en el comportamiento celular, ya que en ninguno de los casos las células se adhirieron al fondo del frasco y no se manifestó proliferación celular.

5.3 CULTIVOS DE EXPLANTES DE ORGANOS:

Se examinaron en forma paralela las placas con medio de cultivo L-15 modificado II y III (Anexo 2) y las incubadas a 15 °C y 20 °C (Cuadro 1), las suplementadas con solución de levadura al 1% más phytohemaglutinina (25 ul/5ml) (Cuadro 2), y las suplementadas con hemolinfa al 1% y 10% (Cuadro 3).

Cuadro 1: Crecimiento celular de explantes de órganos de abalón rojo (*H. rufescens*), frente a distintos medios de cultivo y diferente temperatura de incubación,

| Órgano | Medio de cultivo L-15 mod. II | | Medio de cultivo L-15 mod. III | |
|-------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|
| | Incubación a 15 °C | Incubación a 20 °C | Incubación a 15 °C | Incubación a 20 °C |
| Branquia | - | - | - | - |
| Tentáculo | + | + | + | + |
| Manto | + | + | + | + |
| Pericardio | - | - | - | - |
| Riñón | - | - | - | - |
| Gónada | - | - | - | - |

Negativo: - Bajo: + Medio: ++ Medio alto: +++ Alto: +++++

Solo se observó bajo crecimiento celular en explantes derivados de tentáculo y manto de abalón rojo (*H. rufescens*), frente a las diferentes condiciones de incubación y de medios de cultivo.

Los resultados obtenidos de la suplementación a las placas con levadura y phytohemaglutinina se presentan a continuación.

Cuadro 2: Comparación del crecimiento celular a los 90 días, de explantes de órganos de abalón rojo (*H. rufescens*) en placas con medios de cultivo L-15 modificado II y III, adicionadas con levadura al 1% más phytohemaglutinina (25 ul/5ml) y placas que no fueron adicionadas.

| Órgano | Sin levadura al 1% y phytohemaglutinina (25 ul/5ml) | Con levadura al 1% y phytohemaglutinina (25 ul/5ml) |
|-------------------|---|---|
| Branquia | - | - |
| Tentáculo | + | ++ |
| Manto | + | ++ |
| Pericardio | - | - |
| Riñón | - | - |
| Gónada | - | - |

Negativo: - Bajo: + Medio: ++ Medio alto: +++ Alto: +++++

Los explantes en medios de cultivo adicionados con levadura al 1% y phytohemaglutinina (25 ul/5ml), respondieron con un mayor crecimiento. Por los resultados obtenidos de esta suplementación se decidió usarla en todas las placas.

Los resultados obtenidos de la suplementación a las placas con hemolinfa al 1% y 10% se presentan a continuación.

Cuadro 3: Comparación del crecimiento celular a los 150 días, de explantes de órganos de abalón rojo (*H. rufescens*) en placas con medios de cultivo L-15 modificado II y III, suplementadas con hemolinfa al 1%, al 10% y placas que no fueron suplementadas.

| Órgano | Sin Hemolinfa | Con Hemolinfa al 1% | Con Hemolinfa al 10% |
|-------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| Branquia | - | - | - |
| Tentáculo | ++ | +++ | +++ |
| Manto | ++ | +++ | +++ |
| Pericardio | - | - | - |
| Riñón | - | - | - |
| Gónada | - | - | - |

Negativo: - Bajo: + Medio: ++ Medio alto: +++ Alto: ++++

La respuesta positiva de las placas adicionadas con hemolinfa al 1 % y al 10 %, se evidenció en la pronta visualización de las primeras manifestaciones de proliferación celular, observándose prolongaciones aproximadamente 1 semana antes de las no suplementadas. Estas proyecciones solo se desarrollaron en órganos como tentáculo y manto (Figura 6).

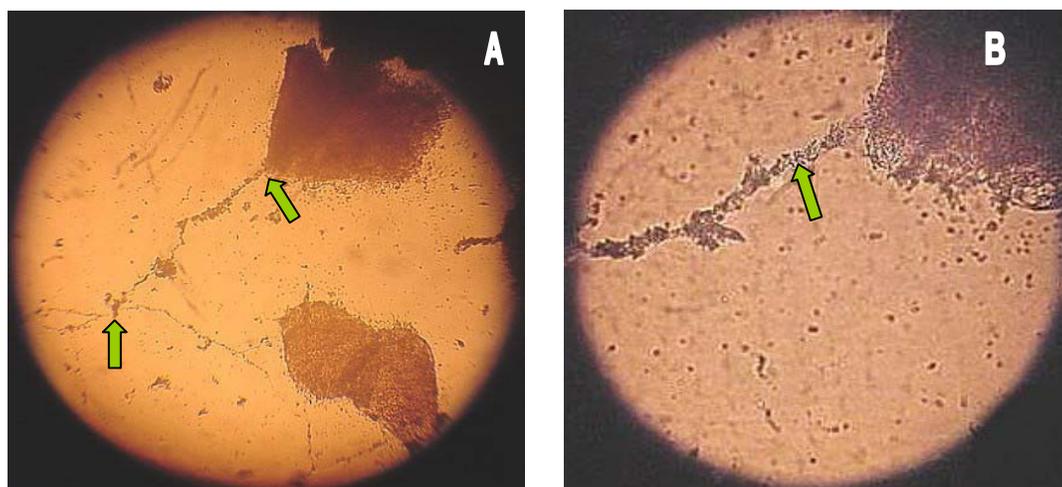


Figura 6: Prolongaciones (flecha verde) en explante de manto suplementado con phytohemaglutinina (25 ul/5ml), levadura (1%), hemolinfa (1%), incubado a 20 °C. A) Se observan prolongaciones que nacen desde 2 trozos de tejido uniéndose en un punto, 10X. B) Prolongaciones a 120X.

Los resultados obtenidos de los explantes de manto adicionados con phytohemaglutinina (25 ul/5ml), levadura (1%), hemolinfa (1%) y mantenido a 15 °C, se presentan a continuación:

A los 15 días de incubación se visualizó crecimiento celular (Figura 7 a y b), sin embargo este crecimiento no siguió proliferando a los 30 días de incubación (Figura 7 c y d), evidenciándose un estancamiento en el desarrollo del cultivo (Figura 7 e y f).

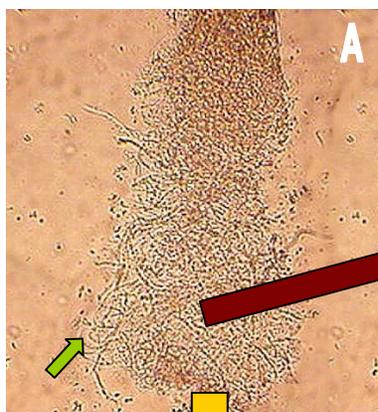


Figura 7: Explante a los 15 días de cultivo. A) se observa crecimiento celular, el cual se evidencia por las células alargadas que se prolongan desde el trozo de tejido (flecha verde), 40X. B) ídem A con aumento 120X.

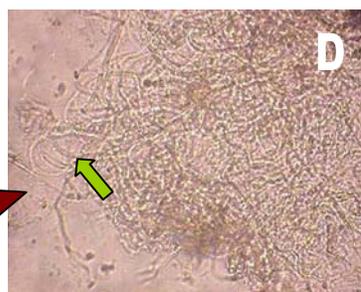
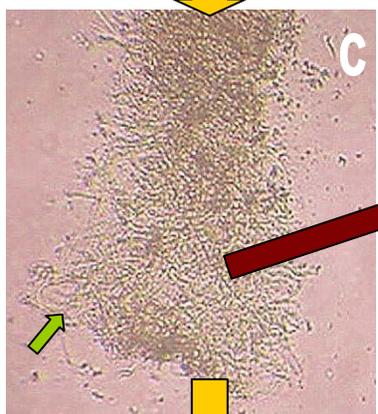


Figura 7: Explante a los 30 días de cultivo. C) no se observa crecimiento celular (flecha verde), 40X. D) ídem C con aumento 120X.

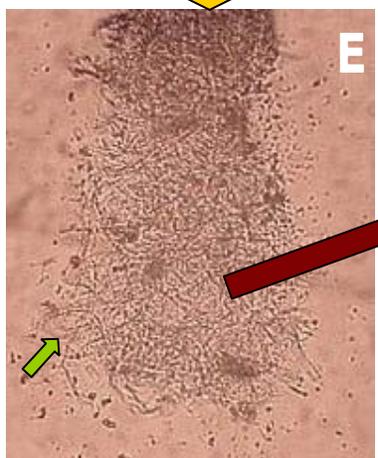


Figura 7: Explante a los 60 días de cultivo. E) se observa que el crecimiento celular no presenta importantes diferencias con respecto a los 15 y 30 días de incubación, las células alargadas no evidencian proliferación celular (flecha verde), 40X. F) ídem E con aumento 120X.

Los resultados obtenidos de los explantes de tentáculo adicionados con phytohemaglutinina (25 ul/5ml), levadura (1%), hemolinfa (1%) y mantenido a 20 °C, se presentan a continuación:

A los 15 de incubación se observó proliferación celular (Figura 8 a y b), pero a los 30 días de cultivo, se visualizo que el crecimiento celular era escaso (Figura 8 c y d) y a los 60 días de cultivo se observa una limitada expansión celular, sin crecimiento celular (Figura 8 e y f).

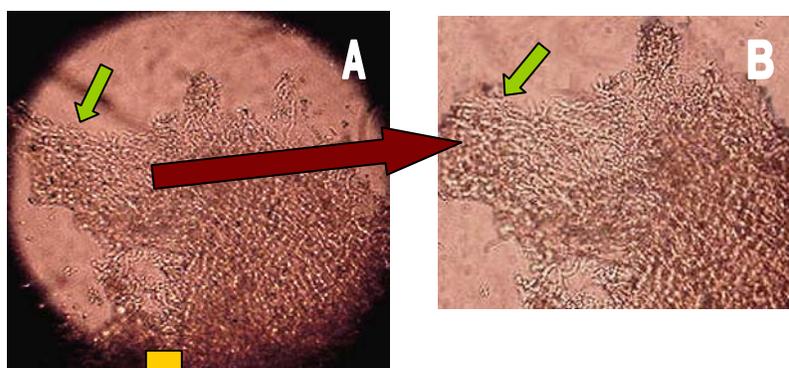


Figura 8: Explante a los 15 días de cultivo. A) se observa crecimiento celular (flecha verde), evidenciado por el alargamiento de células desde el trozo de tejido, 40X. B) idem A con aumento 120X.

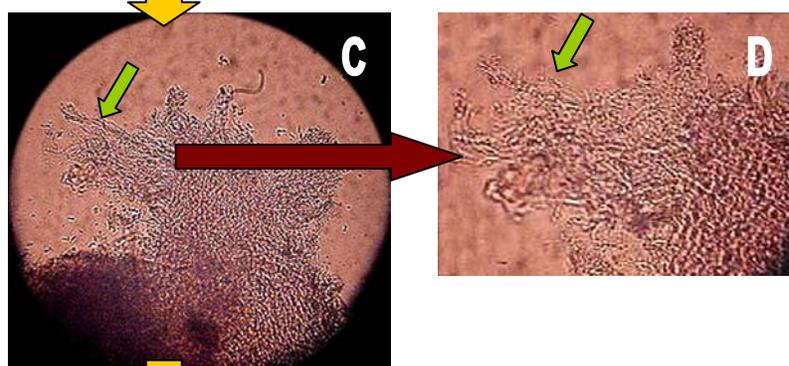


Figura 8: Explante a los 30 días de cultivo. C) se evidencia escaso crecimiento celular (flecha verde), 40X. D) idem C con aumento 120X.

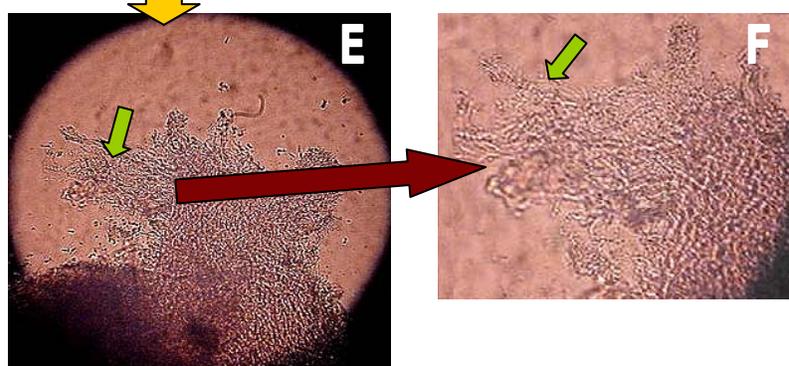


Figura 8: Explante a los 60 días de cultivo. E) no se observa proliferación celular, evidenciado por la falta de crecimiento de las células alargadas (flecha verde), 40X. F) idem E con aumento 120X.

No se observó diferencias en el crecimiento celular de los cultivos realizados con órganos de abalones juveniles y adultos.

6. DISCUSION

Los abalones son moluscos marinos, por lo tanto es de vital importancia la osmolaridad que tiene el medio donde son mantenidos, es decir el medio debe tener una osmolaridad similar al agua de mar, debido a que por su osmorregulación no son capaces de sobrevivir en un medio con una osmolaridad menor.

Entonces para desarrollar esta investigación, se debió medir la osmolaridad de todos los medios utilizados en el desarrollo de los cultivos primarios y ajustar su osmolaridad a 1080 mOsm/kg (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996). Para este procedimiento se utilizó un osmómetro, el cual fue facilitado por el CECS (Centro de Estudios Científicos del Sur).

Respecto de la información disponible de cultivos primarios de hemocitos, se encontró en la literatura algunos estudios en moluscos y crustáceos tales como los realizados por Ellender y col (1992), Nagai y col (1998), Cao y col (2003), de los cuales todos obtuvieron resultados exitosos.

Los primeros intentos por extraer hemolinfa en este trabajo no fueron exitosos en un 100%, debido a que la técnica utilizada, no fue la más apropiada y la cantidad de hemolinfa extraída era insuficiente. Posteriormente se aplicó otra técnica, extrayendo hemolinfa desde el seno cefálico y no del seno palial de los abalones. Al aplicar esta técnica se logró obtener la cantidad de hemolinfa necesaria para el desarrollo del cultivo primario. Otro problema fue la contaminación de la hemolinfa al momento de extraerla. Esto fue solucionado desinfectando la zona del seno cefálico en forma repetida con alcohol al 70% y extrayendo la hemolinfa dentro del área de esterilidad que origina el mechero.

Transcurridas 3 h de incubación de las placas, los hemocitos se adhirieron al fondo de estas, observándose una gran cantidad de células con forma estrellada. Luego de 24 h de incubación los hemocitos se observaron desprendidos y flotando en el medio de cultivo, quedando solo algunas células adheridas al fondo del frasco y después de 72 h de incubación la totalidad de las células estaban despegadas y flotando en el medio de cultivo con forma redondeada.

Al comparar las placas incubadas a distintas temperaturas 15 °C y 20 °C, se pudo constatar que presentaron un comportamiento celular muy similar entre ellas, por lo tanto se puede deducir que la diferencia de temperatura no fue un factor determinante en el desprendimiento de los hemocitos.

Los resultados obtenidos en Japón por Nagai y col (1998), describen que a las 3 h de incubación los hemocitos de abalón negro (*Nordotis discus discus*), estaban adheridos al fondo del frasco de cultivo, desarrollándose la primera monocapa celular a los pocos días de incubación, sin embargo no se evidenció proliferación celular. Estos hemocitos fueron mantenidos entre 15 °C y 20 °C durante un mes sin cambio de medio.

El estudio realizado por Ellender y col (1992) en *Penaeus sp.*, un crustáceo marino, concuerda con lo expuesto por Nagai y col (1998), ya que también describen una rápida adhesión de los hemocitos a la superficie del frasco, logrando mantenerlos vivos por aproximadamente un mes.

Se puede señalar que los resultados de esta investigación difieren de los resultados obtenidos por Nagai y col (1998), ya que no fue posible mantener por más de 24 h los hemocitos vivos y adheridos al fondo del frasco.

Nagai y col (1998) suplementaron el medio de cultivo con 2,5% concentración final de NaCl, 10% suero fetal bovino, 1% solución de levadura y 1% concentrado de lípidos y con una osmolaridad a 1080 mOsm/kg (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996).

El medio de cultivo utilizado en esta investigación, fue suplementado con 2.5% concentración final de NaCl, 10% suero fetal bovino, 1% solución de levadura y se ajustó la osmolaridad a 1080 mOsm/kg. El concentrado de lípidos no fue adicionado al medio de cultivo, debido a que no fue posible encontrarlo en los proveedores, lo que podría explicar la corta sobrevivencia in vitro de los hemocitos.

Lebel y col (1996), señalan que es muy importante para mantener vivos los hemocitos, que el medio de cultivo no altere las propiedades de la célula, manteniendo bajo control la temperatura, pH, osmolaridad y nutrientes. Lo cual explicaría el comportamiento de los hemocitos en este trabajo, ya que no se administraron todos los nutrientes necesarios para la sobrevivencia de las células.

Con el fin de estimular la división celular para favorecer el desarrollo del cultivo de hemocitos, se adicionó a las placas de cultivo phytohemaglutinina líquida, en una proporción de 25 ul/5ml de medio de cultivo. Sin embargo al comparar las placas suplementadas con phytohemaglutinina líquida y las que no fueron suplementadas, no se observaron diferencias en el desarrollo del cultivo, por lo tanto los resultados obtenidos no fueron satisfactorios.

Durante esta investigación, también se trabajó en el establecimiento de cultivos primarios de células de larvas y órganos de abalón rojo (*H. rufescens*).

Es muy importante destacar, que en la literatura solo fue posible encontrar trabajos, referentes a cultivos primarios de larvas de abalón, tales como los desarrollados por Naganuma y col (1994), Naganuma y col (1996). Respecto de los cultivos primarios de células de órganos de abalón, no se han desarrollado a nivel mundial trabajos equivalentes a este, encontrándose en la literatura solo investigaciones similares en moluscos y en crustáceos, siendo algunos de ellos los desarrollados por: Chen y col (1986), Brody y Chang (1989), Chen y Wen (1999).

Uno de los problemas más comunes en los cultivos primarios de órganos, es la contaminación secundaria del cultivo, debido a la utilización de órganos en contacto con el medio externo, que están contaminados con bacterias ambientales. Durante esta investigación se utilizaron explantes de órganos como tentáculo, manto y branquia, los cuales presentaron contaminación secundaria al ser evaluados a los 4 días de incubación, para solucionar el problema se utilizó formalina 10 ppm como desinfectante de los órganos, previo al procesamiento, como también se extremaron las medidas asépticas.

Durante esta investigación no se identificaron las bacterias presentes en el cultivo, lo cual sería recomendable para optimizar el uso de antibióticos, más efectivos y específicos.

Chen y col (1986), establecieron una monocapa de células derivadas de gónada de un crustáceo marino (*Penaeus monodon*), entre los 7 y 10 días de incubación a 31 °C; siendo mantenido el cultivo por aproximadamente dos meses, con una temperatura entre 28 °C y 31 °C. Mientras que las células obtenidas de corazón, solo lograron adherirse al fondo del frasco, sin desarrollar proliferación celular. Sin embargo, no obtuvieron resultados exitosos en el cultivo de otros órganos como manto y glándula digestiva.

En el desarrollo de esta investigación se procesaron diferentes órganos como tentáculo, manto, branquia, pericardio, riñón y gónada, utilizando 2 medios de cultivo en paralelo, L-15 modificado II (Anexo 2) descrito por Chen y col (1986) y L-15 modificado III (Anexo 2), con el objetivo de comparar el comportamiento de las células frente a estos medios de cultivo.

Respecto del medio L-15 modificado II, las evaluaciones realizadas no arrojaron resultados satisfactorios, puesto que a los 4 días de incubación no se observaron células adheridas al fondo del frasco y por ende tampoco proliferación celular, sin existir variaciones en las evaluaciones posteriores; a los 15, 30, 60 y 120 días de incubación.

Con un comportamiento muy similar, se desarrolló el cultivo en las placas mantenidas con medio L-15 modificado III, por lo tanto no se evidenciaron diferencias notables en el desarrollo de cultivos primarios de órganos de abalón rojo (*H. rufescens*), frente a los dos medios de cultivo.

Contrario a lo descrito por Chen y col (1986), no se logró establecer una monocapa de células utilizando como medio de cultivo L-15 mod. II (Anexo 2), ya que las células no se adhirieron al fondo del frasco y por tanto no proliferaron.

Un factor importante es la diferencia de los nutrientes requeridos por las células de *Penaeus monodon*, crustáceo marino, respecto de *Haliotis rufescens* que es un molusco, lo cual habría determinado estos resultados del cultivo primario de células de órganos de abalón.

En cuanto a los resultados obtenidos con L-15 modificado III, la falta de nutrientes podría ser el motivo que determinó la respuesta negativa de las células.

Otro estudio, realizado por Naganuma y col (1994), describe que luego de la degradación con tripsina al 0,25% y manteniendo las células en L-15 modificado I, estas comienzan a adherirse a la superficie de la placa de cultivo después de 6 h de incubación, presentándose durante los primeros 6 días de cultivo la mayor adhesión de células a la superficie del frasco, observándose principalmente células de tipo epitelial. Sin embargo la sobrevivencia de este cultivo fue variable.

Los resultados de este estudio difieren completamente de lo obtenido por Naganuma y col (1994), puesto que transcurridos 4 días de incubación no se presentó adhesión celular a la superficie de la placa de cultivo. A los 15 días de incubación fueron evaluadas nuevamente las placas, sin evidenciar diferencias notables a los resultados obtenidos en la evaluación anterior. Estos resultados no cambiaron a los 30, 60 y 120 días de incubación.

Respecto de las placas de cultivo que fueron mantenidas con diferentes medios de cultivo, no se observó diferencias notables entre ellas, ya que las placas mantenidas con L-15 modificado I, II y III presentaron un comportamiento muy similar, siendo incubados a 15 °C o a 20 °C. De igual forma, no se observaron diferencias en el comportamiento celular frente a los distintos tiempos de tripsinizado, tanto para los 15 minutos como para los 60 minutos, el resultado fue el mismo; sin adhesión celular a la superficie de la placa.

Transcurridos 120 días de incubación y luego de obtener exclusivamente resultados negativos, se decidió concluir con el objetivo de establecer cultivos primarios por degradación enzimática de células en base a órganos de abalones juveniles y adultos.

En un estudio realizado en ostras (*Crassostrea gigas*), utilizando colagenasa se obtienen mejores resultados luego del pre-tratamiento con tripsina al 0,1%. La adhesión celular se presentó en forma individual y en grupos, desarrollándose una monocapa de células después de 5 días de cultivo (Chen y Wen 1999).

Si se comparan estas dos técnicas, degradación enzimática y explantes, la literatura describe que los resultados obtenidos con esta última son mejores en el comportamiento celular para la formación de una monocapa (Chen y col 1986).

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente el tercer objetivo de esta investigación, evalúa el desarrollo de cultivos primarios a partir de explantes de órganos de abalones juveniles y adultos.

Chen y col (1986) describen que utilizando explantes de gónada de un crustáceo marino (*Penaeus monodon*), obtienen un mejor crecimiento celular al utilizar como medio de cultivo L-15 preparado con doble concentración en 50% de solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y 50% de agua de mar estéril.

Se utilizó 2 medios de cultivo en este trabajo, un L-15 modificado II, descrito por Chen y col (1986) y Chen y Wen (1999) y un L-15 modificado III, comparando el desarrollo de los cultivos primarios mantenidos en estos medios.

Las placas de cultivo mantenidas con estos medios, presentaron una escasa migración celular desde el explante, lo cual quedo de manifiesto al realizar la primera evaluación a los 4 días de cultivo, sin presentar diferencias notables de comportamiento celular entre los diferentes medios de cultivo y sin evidenciar un mayor crecimiento celular en las evaluaciones posteriores a los 15, 30 y 60 días de incubación.

Debido a lo expuesto anteriormente y transcurridos 90 días de investigación, se suplementó el medio de cultivo, con phytohemaglutinina líquida (25 ul/5ml de medio) y levadura al 1%, con el objetivo de estimular el desarrollo celular.

Similar a lo descrito previamente, lo realizado por Auzoux y col (1993) en una almeja (*Ruditapes decussatus*), utilizan como medio de cultivo un L-15 suplementado con 10% suero fetal bovino, antibióticos, estimulantes de crecimiento, hormonas y agentes protectores, obteniendo buenos resultados, puesto que a pocos días de iniciado el cultivo observaron migración celular desde el explante, formando una monocapa de células después de 3 o 4 días de incubación. Es muy importante destacar que los estimulantes de crecimiento, las hormonas y los agentes protectores no son especificados por los autores en esta publicación.

Contrariamente a lo descrito por Auzoux y col (1993), al evaluar el cultivo a los 4 días de incubación no logro formarse la monocapa de células, sin embargo se obtuvo una respuesta celular favorable, evidenciada por un leve aumento en el desarrollo celular.

Un estudio realizado en California sobre el análisis y evaluación de la hemolinfa de *Penaeus stylirostris* un crustáceo marino, describe que al comparar la hemolinfa con un medio de cultivo L-15 con doble concentración más 20% SFB, este último contiene una concentración considerablemente menor de aminoácidos libres como Taurina y Prolina, metales como Cu, Sr y Zn, pero una mayor cantidad de otros aminoácidos libres, presentando deficiencias en electrolitos como Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} y Mg^{+2} , mayor cantidad de K^+ y también una menor osmolaridad (Shimizu y col 2001), lo cual demuestra, que el medio de cultivo utilizado es deficiente en algunos nutrientes requeridos por la célula de estos animales.

Tomando en cuenta lo anterior y considerando los resultados insatisfactorios, se suplementó el medio de cultivo con hemolinfa al 1% y al 10%, de igual manera como lo realizó Rosenthal y Diamant (1990) en explantes de hepatopáncreas de un crustáceo marino (*Penaeus semisulcatus*), y que describen un incremento en la proliferación celular al suplementar con hemolinfa.

Los resultados obtenidos en explantes de manto y tentáculo de abalón, fueron positivos solamente durante las dos primeras semanas de incubación, acelerándose la formación de prolongaciones desde el explante, en aproximadamente 1 semana, sin embargo posterior a esto no se evidenció un cambio significativo en el desarrollo del cultivo, ya que la migración celular desde el explante no presentó un desarrollo importante en las evaluaciones posteriores, a los 30 y 60 días de incubación.

Al comparar las placas que fueron incubadas a distintas temperaturas, ya sea 15 °C o 20 °C, no se presentaron diferencias en el comportamiento celular, por lo cual se dedujo que esta diferencia de temperatura no fue factor determinante en los resultados obtenidos.

Se puede mencionar que durante el desarrollo de cultivos primarios de abalón, ya sean de hemocitos, células de órganos y explantes, el medio de cultivo no contaba con todos los nutrientes requeridos por la célula para su sobrevivencia. Otro factor que podría haber alterado la biología de la célula es la osmolaridad, la cual podría no ser correcta, ya que el osmómetro utilizado no estaba en condiciones óptimas y las mediciones realizadas no eran exactas, esto último fue determinado al inicio de la investigación, pero no fue posible contar con otro osmómetro. Por lo tanto los factores presentados anteriormente pudieran determinar el desarrollo exitoso de los cultivos primarios de moluscos.

Así como Lebel y col (1996) describen la importancia de no alterar las propiedades de la célula, se puede sugerir que para obtener resultados positivos, en el desarrollo de cultivos primarios de órganos de moluscos, es necesario conocer todos los nutrientes o suplementos requeridos por la célula y su fisiología, información que aún no está disponible en la literatura.

CONCLUSIONES

- No se logró el desarrollo de cultivos primarios de hemocitos de abalones rojos (*H. rufescens*) adultos al aplicar la metodología descrita, ya que los hemocitos no lograron sobrevivir más de 24 h de incubación.
- No se logró desarrollar cultivos primarios por degradación enzimática de órganos de abalones rojos (*H. rufescens*) juveniles y adultos, puesto que las células no lograron adherirse a la superficie del frasco de cultivo.
- Se logró desarrollar cultivos primarios por explantes de órganos de abalones rojos (*H. rufescens*) juveniles y adultos, de tentáculo y manto, hasta los 15 días de incubación.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aquanoticias. 2005. Estadísticas de acuicultura y pesca: Noviembre 2004, Salmón atlántico continúa liderando exportaciones de Salmónidos. Febrero, 69-73.
- Auzoux S, Domart-Coulon I, Doumenc D. 1993. Gill cell cultures of the butterfish clam *Ruditapes decussatus*. *J. Marine Biotech.* 1, 79-81.
- Birmelin C, Pipe R, Goldfarb P, Livingstone D. 1999. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Mar. Biol.* 135, 65–75.
- Brody M, Chang E. 1989. Development and utilization of crustacean long-term primary cell cultures: ecdysteroid effects in vitro. *Invert. Repr Dev.* 16, 141-147.
- Cao A, Mercado L, Ramos-Martinez J, Barcia R. 2003. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: expression of IL-2R alpha subunit. *Aquaculture.* 216, 1-8.
- Chen S, Wen C. 1999. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding. *Methods Cell Sci.* 21, 183–192.
- Chen S, Chi S, Kou G, Liao I. 1986. Cell culture from tissue of grass prawn; *Penaeus monodon*. *Fish Pathol.* 21 (3), 161-166.
- Clynes, M. 1998. Animal cell cultures technique. *Lab. Manual.* Springer.
- Domart-Coulon I, Doumenc D, Auzoux-Bordenave S, Le Fichant Y. 1994. Identification of media supplements that improve the viability of primary cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology.* 16, 109-120.
- Durandeu A. 2000. Estado actual del cultivo de abalones en Chile. Seminario “*El Cultivo del Abalón en Chile: Situación Actual y Perspectivas*”. Puerto Montt. (Proyecto FDI PD-10).
- Ellender R, Najafabadi A, Middlebrooks B. 1992. Observation on the primary cell culture of hemocytes of *Penaeus*. *J. Crustacean Biol.* 12 (2), 178-185.
- Enríquez V, Godoy M, Monras M, Muñoz G. 2003. Manual de Necropsia y Envío de Muestras de Abalón (*Haliotis sp.*). Proyecto FONDEF D 01 I 1074.
- Fallu R. 1991. Abalone Farming. Editorial Fishing News Books. Oxford.

- Faune C, Monras M, Godoy M, Enríquez V. 2003. Mortality due to *Vibrio sp.* bacteria in larvae of *Haliotis rufescens* in Chile. "5th International Abalone Symposium". Program y Abstracts Ocean University of China. Abstract. Pp. 40-41.
- Godoy M, Muñoz G. 2003. Mayor diseases encountered in japanese abalone (*Haliotis discus hannai*) and red abalone (*Haliotis rufescens*) reared in Chile. "5th International abalone Symposium". Program y Abstracts Ocean University of China. Abstract . Pp. 39-40.
- Guzmán C. 2003. Cultivo de abalón en Chile: Fotografía de una industria cautivante. *Aquanoticias*. Marzo, 32-40.
- Hahn K. 1989. Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. CRC PRESS.
- Hickmann C, Roberts L, Larson S, Paardos F. 2002. Principios integrales de Zoología. 11° ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Lebel J, Girard W, Favrel P, Boucaud-Camou E. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary culture of hemocytes from the gasteropod mollusc *Haliotis tuberculata*. *Biol. cell*. 86, 67-72.
- Nagai T, Nakatsugawa T, Nishizawz T, Muroga K. 1998. Primary culture of hemocytes from Japanese back abalone *Nordotis discus discus*. *Fish Pathol.* 33, 147-148.
- Naganuma T, Deguan B, Horikoshi K, Morse D. 1994. Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. *Mol. Marine Biol. Biotech.* 3, 131-140.
- Naganuma T, Akutsu T, Ishida T, Kato CH, Horikoshi K. 1996. In situ RT-PCR from the *B*-tubulin mRNA in abalone cells in primary cultures. *J. Mar. Biotech.* 4, 75-81.
- Nuestro Mar. 2002. El abalón generará más dólares y empleos. N° 228. Diario Regional, Puerto Montt.
- Otsu R, Sasaki K. 1997. Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease. *J. Inv. Pathol.* 70, 167-168.
- Rivera M, Illanes J. 2000. El cultivo del abalón en Chile. Seminario "El Cultivo del Abalón en Chile: Situación Actual y Perspectivas". Puerto Montt. (Proyecto FDI PD-10).
- Rosenthal J, Diamant A. 1990. In Vitro Primary Cell Cultures From *Penaeus semisulcatus*. *Pathol. in Marine Sci.* 7-13.
- Salmonicultura. 2002 a. (Ed) Roberto Flores. Situación actual del cultivo del abalón en el sur. 58, 50-51.

- Salmonicultura. 2002 b. Grandes tendencias de la industria chilena del abalón: Exótico y exquisito manjar. 54, 44 – 45.
- Shepherd S, Tegner M, Guzman del Proo S. 1992. Abalone of the world. Fishing News Books.
- Shimizu C, Shike H, Klimpel K, Burns J. 2001. Hemolymph analysis and evaluation of newly formulated media for culture of shrimp cells (*Penaeus stylirostris*). *In Vitro Cell. & Dev. Biol. Animal.* 37, 322–329.
- Smith J. 1985. Biotechnology principles. Berkshire: Van Nostrand Reilhold.
- Wolf Q. 1976. Primary monolayer culture of fish cells initiated from trypsinised tissues. Procedure 41541: 453-456 in V. J. Evans, V. P. Perry, and M. M. Vincent, eds. TCA Manual 2. Tissue Culture Association, Rockville, Maryland.

8. ANEXOS

ANEXO 1

MATERIALES DE LABORATORIO

- Agua de mar estéril (115 °C por 10 minutos).
- Alcohol de 70%.
- Anestésico BZ 20.
- Autoclave para la esterilización de los materiales a utilizar.
- Balanza electrónica OHAUS F 400 D.
- Bandeja de necropsia.
- Cámara de flujo laminar STEAG para procesar las muestras y preparación de los medios.
- Centrifuga HERAEUS INSTRUMENTS (Labofuge. 400 R).
- Estufa de cultivo 20°C WTB BINDER.
- Estufa de cultivo 15°C TRILAB.
- Formalina 10 ppm (50 ul de formalina en 100ml de agua de mar estéril).
- Fracos o placas de cultivo de 25cm².
- Gradilla.
- Heparina Sódica 5.000 U.I. /ml Lab. Sanderson S.A.
- Jeringas de tuberculina.
- Material de disección (mango de bisturí, hoja de bisturí, 2 pinzas anatómicas, 1 pinza diente de ratón y tijeras).
- Mechero.
- Micropipeta de 10 a 100 ul.
- Microscopio óptico JURGENS.
- Morteros enlosados estériles.
- Osmómetro.
- Pie de metro.
- Pipetas Pasteur de 1, 5 y 10 ml estériles.
- Placas petri estériles.
- Probetas de 100 y 1000ml.
- Refrigerador FENSA para la mantención correcta de los reactivos utilizados.
- Solución de picado (heparina 10 ul/ml de buffer fosfato Dulbecco con 33g/l de NaCl, libre de Ca⁺ y Mg⁺).
- Toalla desechable.
- Tubos de 15 ml con tapa rosca estériles.
- Vasos precipitados con gasa estériles.
- Vasos precipitados de 200 ml.
- Vasos precipitados para tripsinización estériles.

ANEXO 2

MEDIOS DE CULTIVO

- Buffer fosfato Dulbecco con 33g/l de NaCl, libre de Ca⁺ y Mg⁺.
- Fungizona, antimicótico líquida GIBCO.
- Phytohemaglutinina líquida GIBCO.
- Suero fetal bovino GIBCO.

L-15 modificado I (medio de cultivo para cultivos primarios hemocitos) (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996, Nagai y col 1998).

Leibovitz's L-15 GIBCO.

NaCl: 2,5%(w/v) concentración final.

Antibióticos: Gentamicina: 5 ug/ml.

Estreptomina: 100 ug/ml.

Penicilina: 100 UI.

Fungizona: 0,25 ug/ml.

Concentración de levadura GIBCO: 1% (v/v).

Suero Fetal Bovino GIBCO: 10%.

Disolver y ajustar pH 5.5-6.6, no autoclavar, filtrar para esterilizar.

L-15 modificado II (medio de cultivo para cultivos primarios de órganos y explantes de abalones) *(Chen y col 1986, Chen y Wen 1999).

2X Leibovitz's L-15 GIBCO *.

Hanks Balanced SALT Solution (HBSS): 50%*.

Agua de mar estéril: 50%*.

Antibióticos: Gentamicina: 5 ug/ml.

Estreptomina: 100 ug/ml.

Penicilina: 100 UI.

Fungizona: 0,25 ug/ml.

Suero Fetal Bovino GIBCO: 10%*.

Disolver y ajustar pH entre 7.6-7.8, no autoclavar, filtrar para esterilizar (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996).

L-15 modificado III (medio de cultivo para cultivos primarios de órganos y explantes de abalones).

Leibovitz's L-15 GIBCO.

Buffer fosfato Dulbeccos con 33 g/l de NaCl.

Antibióticos: Gentamicina: 5 ug/ml.

Estreptomina: 100 ug/ml.

Penicilina: 100 UI.

Fungizona: 0,25 ug/ml.

Suero Fetal Bovino GIBCO: 10%.

Disolver y ajustar pH entre 7.6-7.8, no autoclavar, filtrar para esterilizar (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996).

Solución antibióticos para incubar órganos.

Buffer fosfato Dulbecco con 33 g/l de NaCl.

Fungizona: 0.25 ug/ml.

Gentamicina: 5 ug/ml (2X).

Estreptomina: 100 ug/ml (6X).

Penicilina: 100 UI (6X).

Disolver y ajustar pH entre 7.6-7.8, no autoclavar, filtrar para esterilizar (Naganuma y col 1994, Naganuma y col 1996).

Levadura al 1% para adicionar a placas de cultivo.

Extracto de levadura granulada MERCK: 0.1g.

Agua destilada: 10 ml.

Disolver y luego se filtra para esterilizar.

Solución de lavado para los abalones desconchados (Birmelin y col 1999).

Agua destilada: 100 ml.

NaCl: 2.922 g/l.

KCl: 0.0932 g/l.

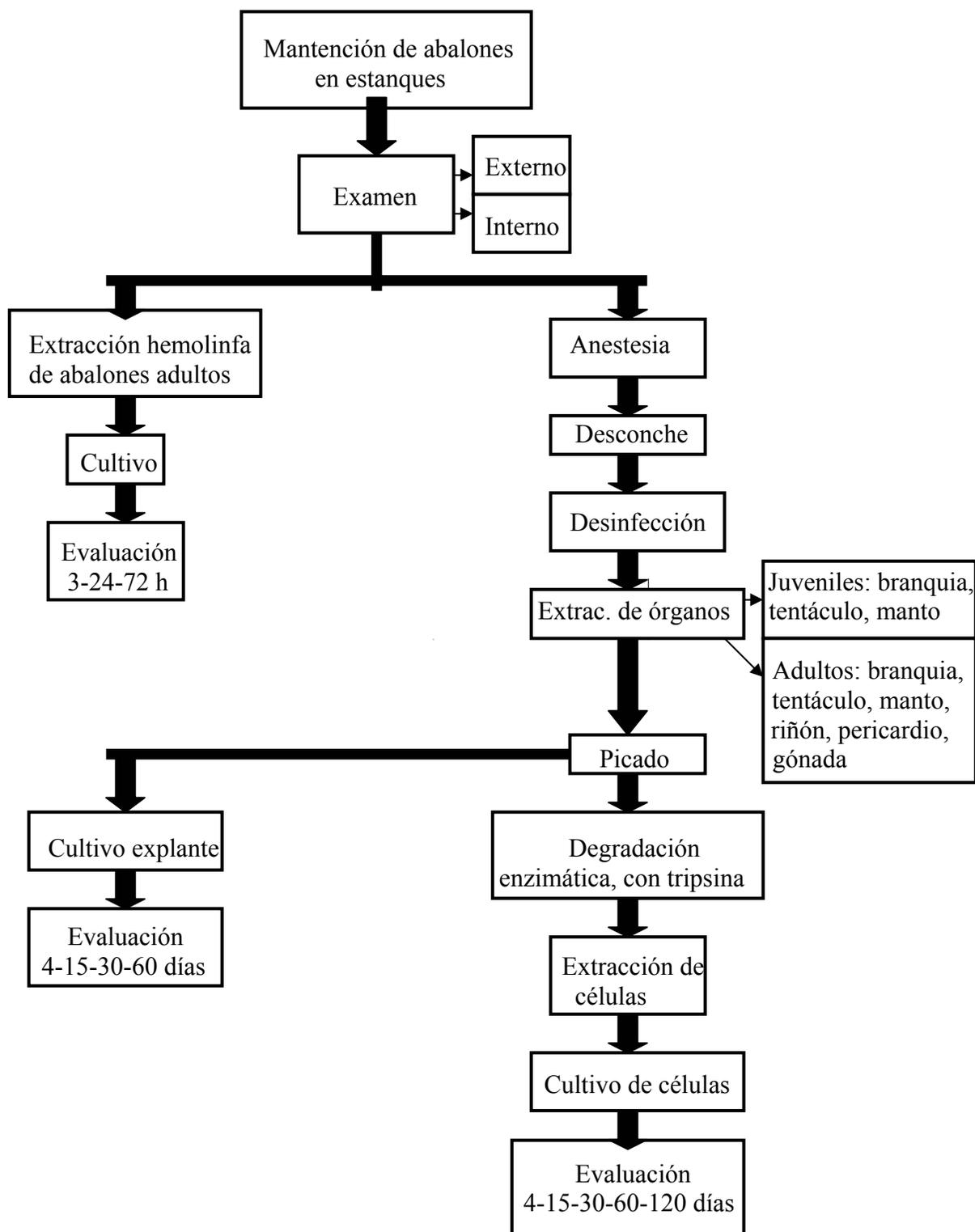
EDTA: 0.18612 g/l.

HEPES: 0.4766 g/l.

Disolver y luego filtrar para esterilizar.

ANEXO 3

ESQUEMA DISEÑO EXPERIMENTAL



9. AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, gracias por confiar en mí, por el apoyo y amor incondicional que siempre me entregaron y sobre todo por hacer de mí una mujer de bien.
- A Fredy, por el amor, paciencia y apoyo que siempre me entregaste.
- Doctor Enríquez, Sra. Mónica, Vania y Esteban, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.