

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR *IN VITRO*  
DE DOS ESPECIES DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* y *O.  
mossambicus*)**

## **TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A**

**MARTIN NICOLAS RAMIREZ DAVILA  
ZAPOPAN, JALISCO. MAYO 1999**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. MARTIN NICOLAS RAMIREZ DAVILA  
PRESENTE.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR *IN VITRO* DE DOS ESPECIES DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicho trabajo a la DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"  
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ABRIL 19 DE 1999

DR. ARTURO OROZCO BAROJO  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE  
TITULACION



CCOBA

M. EN C. MARTHA GEORGINA OROZCO MEDINA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA.- Director del Trabajo.  
c.c.p. Expediente del alumno

AOB/MGOM/bacg\*



BIBLIOTECA CENTRAL

COMITÉ DE TITULACION  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Ustedes, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante: **MARTIN NICOLAS RAMIREZ DAVILA**, código **085705032** con el título: **ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR *IN VITRO* DE DOS ESPECIES DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*)**, consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., abril de 1999.

EL DIRECTOR/DE TESIS



Dra. GALINA ZAITSEVA PETROVNA

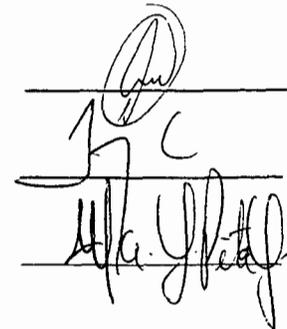
EL ASESOR



Biol. IRMA L. TOTSUKA SUTTO

SINODALES

1. Dr. ARTURO OROZCO BAROCIO
2. M.C. EDUARDO JUAREZ CARRILLO
3. Biol. MA. LUISA PITA LOPEZ



# **AGRADECIMIENTOS**

## **A DIOS**

Por permitirme vivir y brindarme la oportunidad de cumplir nuevas metas.

## **A MIS PADRES**

Por todos los sacrificios que han llevado a cabo durante toda su vida para hacer de mí una persona de bien y de provecho para la sociedad.

## **A MIS HERMANOS Y TIOS**

Por su apoyo y comprensión durante los años de mi formación y el desarrollo de esta tesis.

## **A MIS MAESTROS**

Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias especialmente a mi Director de tesis la Dra. Galina Zaitseva y a mi asesor Irma Totsuka, un reconocimiento especial a los maestros Jesús Castañeda, Salvador Velázquez y Rafael León.

## **A MIS SINODALES**

Arturo Orozco, Eduardo Juárez y María Luisa Pita por sus correcciones para que el trabajo fuera mejor.

## **A LOS COMPAÑEROS**

Generación 91-95 (BOLCHEVIQUES) y los del laboratorio de inmunobiología Gracias por su apoyo y amistad en especial a Laura por aguantar mis histerias y horas bajas.

# **CUCBA**



**BIBLIOTECA CENTRAL**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la **Dra. Galina Zaitseva Petrovna** y la asesoría de la **Biol. Irma Leticia Totsuka Sutto**. Este trabajo forma parte del proyecto "Desarrollo biotecnológico de un banco regional de genoma de tilapia *Oreochromis* sp." el cual es apoyado por CONACYT No. de proyecto 4052 PB.



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR  
IN VITRO DE DOS ESPECIES DE TILAPIA  
(*Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*).**

CELEBRA

CONFERENCIA  
NACIONAL  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

1971

# INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	24
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	40
ABREVIATURAS	43

CUCRA



RECTORIA CENTRAL

# INDICE DE CUADROS Y FIGURAS



BIBLIOTECA CENTRAL

CUADRO		PAGINA
A	Taxonomía de la tilapia.	5
B	Ciclo de vida del género <i>Oreochromis</i> .	6

FIGURA		
1	Comparación del promedio de los I.E. de linfoproliferación de <i>O. niloticus</i> , estimulados con diferentes dosis de PHA suplementados al 5% de SFT a temperaturas de 25 y 28° C.	30
2	Comparación del promedio de los I.E. de linfoproliferación de <i>O. mossambicus</i> , estimulados con diferentes dosis de PHA suplementados al 5% de SFT a temperaturas de 25 y 28° C.	31
3	Promedio de los I.E. de linfoproliferación de <i>O. niloticus</i> , estimulados con diferentes dosis de PHA, suplementados al 5% y 10% de SFT a 28°C.	32
4	Promedio de los I.E. de linfoproliferación de <i>O. mossambicus</i> , estimulados con diferentes dosis de PHA, suplementados al 5% y 10% de SFT a 28°C.	32
5	Promedio de los I.E. de linfoproliferación de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA, a temperatura de 28°C y suplementados al 5% de SFT.	33
6	Índice de Estimulación (I.E.) de esplenocitos de las tilapias con la dosis de PHA 50µg/ml a 28°C.	34
7	Promedio de los cpm de linfoproliferación de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA, a una temperatura de 28°C y suplementados al 5% de SFT.	34
8	Comparación del peso del bazo de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> .	35
9	Promedio de esplenocitos <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , en 1 ml. de RPMI-1640.	35

# INDICE DE TABLAS

## TABLA

1	Promedios de cpm de linfoproliferación de esplenocitos de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA y al 10% de SFT a una temperatura de 28°C.	26
2	Promedios de cpm de linfoproliferación de esplenocitos de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA y al 5% de SFT a una temperatura de 25°C.	26
3	Promedios de cpm de linfoproliferación de esplenocitos de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA y al 5% de SFT a una temperatura de 28°C.	27
4	Indice de Estimulación de proliferación de esplenocitos de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA y suplementados con SFT al 10% a 28°C.	28
5	Indice de Estimulación de proliferación de esplenocitos de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA y suplementados con SFT al 5% a 25°C.	28
6	Indice de Estimulación de proliferación de esplenocitos de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> , estimulados con PHA y suplementados con SFT al 5% a 28°C.	28
7	Peso del bazo de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> .	29
8	Cantidad de esplenocitos obtenidos del bazo de <i>O. niloticus</i> y <i>O. mossambicus</i> .	29

# CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## RESUMEN

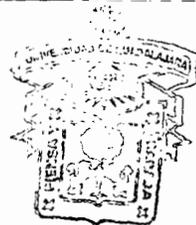
Los peces del género *Oreochromis* son conocidos comúnmente como tilapias, son nativos de Africa y se cultivan en México desde los años 60's, se adaptan bien a condiciones ambientales extremas y tienen baja mortalidad a enfermedades infecciosas. En el presente trabajo se compara el estado funcional de la inmunidad celular a través de la determinación de la actividad proliferativa de los esplenocitos de *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus* a diferentes temperaturas y estimulados por el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) a diferentes dosis por medio de la incorporación de timidina tritiada (Tdr-<sup>3</sup>H). Se determinó que la temperatura óptima de cultivo para los esplenocitos es la de 28°C y la dosis óptima de PHA es la de 50µg/ml para ambas especies. No se encontró diferencia significativa respecto al índice de estimulación (I.E.) en la linfoproliferación de los esplenocitos de estas dos especies de *Oreochromis* sin embargo, se observó la tendencia de una mayor linfoproliferación en *O. mossambicus*. El peso del bazo así como el número de células esplénicas obtenidas fue significativamente mayor en *O. niloticus*.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## INTRODUCCION



BIBLIOTECA CENTRAL

La explotación de cualquier recurso natural actualmente demanda una mayor eficacia y rentabilidad así como un uso racional sin deterioro ambiental para que la actividad pueda ser redituable socialmente. En la actualidad en el cultivo de peces no es recomendable mantener únicamente colecciones de peces vivos y criopreservación de germoplasma, sino que es necesario evaluar la calidad y rendimiento de las diferentes poblaciones que se encuentren en la región Occidente de México, así como obtener datos comparativos sobre el rendimiento de las mismas en condiciones ambientales y de cultivo que se tienen en el estado de Jalisco.

La experiencia de los acuicultores mexicanos indica que en el futuro las especies que se utilizarán en los sistemas de cultivo serán aquellas que ofrezcan una buena tasa de crecimiento a distintos intervalos de temperatura, resistencia a enfermedades, atractivas al consumidor; especies preferentemente micrófagas que reduzcan los costos de alimentación y las que brinden la mejor rentabilidad económica y financiera a las unidades de producción. Por otra parte, existen pocos programas de investigación encaminados a conocer la respuesta inmune (RI) de los peces, aun cuando se conocen una gran cantidad de microorganismos como son virus, bacterias (García, 1996) y otros parásitos (Jiménez, 1996) que pueden ser perjudiciales para los peces y por consecuencia afectan económicamente la producción de las granjas acuícolas, los peces del género *Oreochromis* tienen un alto valor nutricional y comercial, pueden cultivarse adecuadamente en aguas en las que otros peces no se desarrollarían, además tienen una alta tasa reproductiva y se adaptan a condiciones ambientales extremas. En la región Occidente de México encontramos cuerpos de agua con las condiciones propicias para el cultivo de este tipo de especies. Para el presente estudio se eligió *O. niloticus* y *O. mossambicus* (variedad roja); la primera por ser una de las especies más cultivada no solo en México sino en todo el mundo, se considera como la especie más fuerte del género *Oreochromis* y una de las de mayor rendimiento en cultivo la

segunda es una especie introducida en México recientemente, por lo que su cultivo ha sido menor que el de *O. niloticus*, sin embargo las características morfológicas y el sabor de *O. mossambicus* son más apreciadas por el consumidor y podría ser más aceptada por los acuicultores si se les proporcionaran datos comparativos acerca del rendimiento en diferentes rubros de ambas especies.

En el presente trabajo se valora la linfoproliferación bajo el estímulo mitogénico de PHA por ser un parámetro inmunológico que caracteriza la función de las principales células inmunocompetentes que son los linfocitos T. La caracterización cuantitativa de las células involucradas en la respuesta inmune se realizó a través de la determinación de la cantidad de esplenocitos en la suspensión celular del bazo.

La técnica de linfoproliferación que se utilizó en este trabajo es una de las más aceptadas en los laboratorios de inmunología para conocer el comportamiento de la respuesta inmune celular (RIC) ante estímulo de los mitógenos, no obstante ha sido menos practicada en peces que en algunos otros animales como son los mamíferos especialmente el humano y el ratón. El método para determinar el grado de la proliferación de los linfocitos es mediante la incorporación de timidina tritiada ( $Tdr-^3H$ ) en el ácido desoxirribonucleico (ADN) esta molécula radiactiva es detectada fácilmente como pulsos o cuentas en un contador de centelleo para líquidos, el resultado que proporciona el aparato determina una medición cuantitativa de los procesos biológicos que ocurrieron *in vitro* reflejando la posible respuesta inmune *in vivo*. La determinación de los parámetros inmunológicos en dos especies de *Oreochromis* otorga conocimientos sobre la capacidad de resistencia a las enfermedades y proporciona la información para la selección de las especies más idóneas para la acuicultura.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL



### BIBLIOTECA CENTRAL

## ANTECEDENTES

La tilapia es un pez teleósteo herbívoro de aguas cálidas (Coll, 1991), es nativo de África, ha sido introducido en muchos países alrededor del mundo (Bocek, 1996), se caracteriza por ser un pez bastante resistente a las enfermedades, se reproduce fácilmente, consume diferentes tipos de alimento y tolera agua deficiente en su calidad, particularmente con poco oxígeno disuelto; son peces de agua dulce pero muchas especies se adaptan bien al agua salada (Coll, 1991).

La tilapia o mojarra africana fue introducida a México en 1964 procedente de Auburn, Alabama, Estados Unidos de América (EUA). Las especies que se incluyeron fueron: *Tilapia aureus*, *T. melanopleura* y *T. mossambicus*, en 1978 llegó a nuestro país la *T. niloticus* procedente de Panamá. En 1981 es traída al país la tilapia roja *Oreochromis mossambicus* que de acuerdo a la FAO (Por sus siglas en inglés de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), esta variedad es la cruce realizada en Taiwan en 1979 de un mutante blanco de *O. mossambicus* y *O. niloticus* (Morales, 1991).

En el género *Tilapia* se incluyen dos subgéneros respecto al tipo de reproducción que tienen los peces: los de la incubación externa y los que incuban los huevos en la boca. Trewavas y colaboradores en 1972 y Trewavas en 1973 dieron razones para dividir estos dos subgéneros en géneros separados, los primeros conservan el nombre genérico de *Tilapia*, mientras que los segundos se les ha asignado el nombre de *Sarotherodon* (Hepher y Pruginin, 1991).

En la actualidad al grupo genérico *Sarotherodon* se le reconoce con el nombre de *Oreochromis* y está formado por tres especies: *O. niloticus*, *O. mossambicus* y *O. aureus* (Bocek, 1996; Frese, 1997). En el presente trabajo se utilizará esta última nomenclatura es decir, *O. niloticus* para la tilapia del Nilo y *O. mossambicus* para la tilapia de Mozambique.

Taxonomía de la Tilapia	
Reino: Animalia	Orden: Percomorphi
Phylum: Chordata	Suborden: Percoidea
Clase: Osteichthyes	Familia: Cichlidae
Subclase: Neoptergii	Género: <i>Oreochromis</i>

Especie: *Oreochromis niloticus*

Tilapia del Nilo

Especie: *Oreochromis mossambicus*

Tilapia de Mozambique

Pez de San Pedro o

tilapia de Java

La familia Cichlidae se caracteriza por presentar peces de coloración muy atractiva, principalmente son nativos de Africa, América Central y la parte subtropical de América del Sur. Los cíclidos se diferencian de la gran mayoría de los peces dulceacuícolas por presentar un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal, el cuerpo es generalmente comprimido a menudo discoidal, raramente alargado; en muchas especies la cabeza del macho es invariablemente más grande que la de la hembra; algunas veces con la edad y el desarrollo se presentan en el macho tejidos grasos en la región anterior y dorsal de la cabeza (dimorfismo sexual) (Morales, 1991). Las especies del género *Oreochromis* son heterosexuales, su fecundación es externa y el número de huevecillos producidos por hembra varía según la especie, el macho presenta una marcada territorialidad que aumenta en la época de reproducción (Pullin, 1983). La diferenciación de las glándulas sexuales (gónadas) en la tilapia, ocurre en etapas tempranas de su desarrollo; entre los 15 a 20 días de edad. La maduración sexual en la tilapia se alcanza a partir de los 2 o 3 meses de edad a una longitud de 8 a 16 cm. La frecuencia de los desoves puede variar de acuerdo al fotoperíodo y a la temperatura del agua que debe permanecer constante por arriba de 24°C (Morales, 1991).

## CICLO DE VIDA DEL GENERO *Oreochromis*

Estadio	Huevo	Alevín	Cría	Juvenil	Adulto
Talla cm.	0.2-0.3	0.7-1.0	1-3 a 5-7	7 a 10-12	10 a 18-20
Tiempo en días	3-5	10-15	15-30	45-60	70-90



### *Oreochromis niloticus*

#### Descripción:

Tiene una coloración grisácea oscura, la aleta caudal tiene franjas negras delgadas y verticales, el margen superior de la aleta dorsal es negro o gris (Hepher, 1991).

#### Reproducción:

La temperatura óptima para el cultivo es de 25-29°C, se reproducen aproximadamente tres veces por año con 750 a 6000 huevos producidos por

### *Oreochromis mossambicus*

#### Descripción:

Esta variedad es un híbrido que fue creado en Taiwan en 1979, presenta cuatro patrones de coloración que han sido establecidos, basándose en la presencia y ausencia del color rojo y rosa como melanismo en el cuerpo: rosa, rosa moteado de rojo, rojo y manchado de negro (Morales, 1988).

#### Reproducción:

La hembra incuba los huevos en su boca, la temperatura óptima para su cultivo es de 23-28°C, pueden poner huevos de 6 a 12 veces por año y la

hembra por año (Bocek, 1996), los huevos eclosionan en 3 a 5 días y las crías permanecen en la boca de la hembra por 8 o 10 días después de su eclosión (Bocek, 1996; Morales, 1991).

#### Alimentación:

Cuando están en la boca de la madre se alimentan del vitelo del huevo (Morales, 1988), después de eclosionar, su comida principal es el zooplanctón, los adultos comen, fitoplanctón, zooplanctón, insectos y otros organismos pequeños, pueden consumir alimentos artificiales (Bocek, 1996). También esta misma especie ha sido reportada como omnívora, requiere de plantas cuando se mantiene en acuario, puede ser utilizada como control de hierbas acuáticas (Bardach, Ryther y McLamey, 1986).

#### Tolerancia a la salinidad:

Puede soportar aguas salobres por arriba de 20 partes por mil de salinidad (Bardach, 1986; Bocek, 1996). Se ha probado experimentalmente su supervivencia en agua con 50% agua de mar (Ayson, et., al. 1993).

#### Tolerancia a la temperatura:

Tolera bien las temperaturas por encima de 15.5°C; no sobrevive por debajo de 12°C; las temperaturas letales: 11°C y 42°C (Bardach, 1986).

cantidad puede ser de 2000 a 10000 huevos producidos por hembra por año (Bocek, 1996), los huevos eclosionan en 2 a 5 días y la hembra los mantiene en su boca un periodo de 8 a 10 días (Bocek, 1996; Morales, 1991).

#### Alimentación:

Cuando están en la boca de la madre se alimentan del vitelo del huevo, (Morales, 1988) después de eclosionar se alimentan de zooplanctón, cuando son adultos su comida la obtienen del zooplanctón, fitoplanctón y pueden consumir alimento artificial (Bocek, 1996), principalmente de origen vegetal, pero puede aceptar alimento de origen animal (Bardach, 1986).

#### Tolerancia a la salinidad:

Soporta muy bien la salinidad ya que se reporta que se puede criar en aguas marinas (Bardach, 1986; Hephher, 1991; Ayson, et. al, 1991).

#### Tolerancia a la temperatura:

Las temperaturas óptimas varían entre 22 y 30°C pero se pueden cultivar a temperaturas tan bajas como 15.5°C por debajo de los cuales dejan de comer; no

La temperatura baja letal es entre 11 y 12°C (Hepher, 1991); La temperatura óptima se considera entre 25-30°C (Bocek, 1996).

sobreviven mucho tiempo por debajo de 12°C; no crecen durante los meses fríos en climas como los de Alabama (EUA) e Israel ni por encima de 1000 metros de altura en los trópicos (Bardach, 1986). El límite más bajo de temperatura es de 8°C y hasta 12°C. La exposición por varios días a una temperatura de 14°C es letal (Hepher, 1991). La temperatura óptima es entre 25-30°C (Bocek, 1996).

Los comerciantes de pescado mencionan que de la tilapia roja se obtiene más filete que de otras especies del género *Oreochromis* con el mismo peso. La tilapia roja *O. mossambicus* variedad roja morfológicamente tiene un cierto parecido con el huachinango, por lo que es más atractivo y apreciado por los consumidores y su valor comercial es mayor (Com. Pers. locatarios del mercado del mar calle 34 y Francisco de Ayza).

## Inmunología

El conjunto de mecanismos que el organismo utiliza para reconocer lo propio de lo extraño se ha denominado respuesta inmune (RI). Los recursos que utiliza el organismo para protegerse de los agentes externos también los aplica para mantener el orden celular interno. La RI ha evolucionado junto con las especies, aparece en los organismos unicelulares con la necesidad de reconocer a otras células de la misma especie y organismos extraños que podrían destruirlos. Al formarse organismos multicelulares, las células que lo conformaron necesitaron reconocerse entre sí para desempeñar funciones específicas y más elaboradas que cuando estaban aisladas, aparecieron células especializadas para el reconocimiento y la fagocitosis principalmente. El sistema inmune (SI) es el conjunto de órganos y tejidos que realizan

la RI. El SI aparece en los primeros organismos unicelulares, cada nueva característica que se desarrolla se adiciona a las anteriores, así se formó un sistema con una amplia gama de mecanismos de protección, ésta diversificación es una de las características más importantes del SI, ya que al utilizar varios mecanismos para un fin determinado, hace que la respuesta sea muy eficiente (Monilla, 1989).

En los invertebrados, los sistemas de defensa inmune humoral (enzimas líticas) o celular son relativamente poco conocidos y a la vez parecen ser menos específicos. El organismo responde contra cualquier agresión a la integridad tisular mediante una inflamación localizada (vasodilatación, infiltración hemocitaria), la presencia de partículas extrañas y de microorganismos, provoca inmediatamente una intensa actividad fagocitaria que puede ser aumentada por un proceso de opsonización. Cuando las partículas extrañas son demasiado numerosas, los hemocitos se agrupan alrededor mediante un proceso de encapsulación (Bamabé, 1996).

En los **peces** la protección del organismo frente a los bioagresores hace intervenir a las defensas específicas y no específicas, muy similares a las desarrolladas por los vertebrados superiores. Los tegumentos cutáneos, branquiales y digestivos constituyen la primera barrera a la penetración de los agentes microbianos (Piper, et. al, 1992; Bamabé, 1996). El mucus que recubre al pez contiene la mayor parte de las sustancias antibacterianas presentes en el suero (Bamabé, 1996). La epidermis es menos densa que en los vertebrados superiores y no está queratinizada, tiene el poder de cicatrización y de regeneración muy superior a la de los mamíferos, las aletas seccionadas crecen parcialmente (Sakai, 1992).

Lisozimas, hemolisinas, proteínas C reactivas (PCR), interferón y complemento son las principales moléculas humorales de la **inmunidad natural** en los peces teleósteos (Bamabé, 1996). Las PCR tienen una función protectora en los mamíferos, en el plasma de estos aparece durante la fase aguda de muchas infecciones, en los peces las PCR son un constituyente normal y constante en el plasma, lo cual representa una línea de defensa contra cualquier microorganismo. El interferón (IFN) es un agente antiviral presente en todos los vertebrados, su mecanismo de acción es impedir la replicación del ácido nucleico viral (Kinkelin, Michel y Grittino, 1991), fué demostrada su presencia en la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* por De Kinkelin y Dorson en 1973

(Bamabé, 1996). Las propiedades básicas del complemento en los peces las comparten con los mamíferos, el sistema de complemento es un complejo de enzimas formado por once fracciones proteicas independientes que están presentes en el plasma de los peces (Roberts, 1989), el sistema de complemento puede ser activado directamente por ciertos antígenos (vía alterna) o por complejos antígeno-anticuerpo (vía clásica); desempeña su función en la activación de la fagocitosis, en la reacción inflamatoria, en la lisis celular, y participa igualmente en la RI (inmunidad adquirida) (Bamabé, 1996). El sistema de complemento en los mamíferos se inactiva a temperaturas altas (54°C durante 20 minutos), mientras que en los peces es más sensible al calor se inactiva a 45°C y a temperaturas bajas la actividad disminuye pero subsiste aun a 4°C (Roberts 1989).

La **inmunidad humoral** específica está representada por los anticuerpos, en los peces son inmunoglobulinas tetraméricas similares a las IgM de los mamíferos, poseen propiedades de aglutinación, de precipitación y de neutralización de los virus y las bacterias; pueden activar el complemento y producir indirectamente la lisis de las membranas celulares (Bamabé, 1996). Esta Inmunoglobulina en los peces presenta coeficientes de sedimentación de 19s, 16s, 7s y 6.4s con un peso molecular de 700000 daltons y tiene una estructura tetramérica que contiene cadenas pesadas tipo  $\mu$ . Anteriormente se creía que la IgM se encontraba solamente en el suero del pez estudios realizados en los huevos de salmón (*Oncorhynchus keta*) demostraron que en las proteínas de las yemas se encuentra una Ig con un peso molecular de 495000 daltons inferior al peso molecular registrado en la IgM del suero (Fuda, et. al, 1992).

La **inmunidad celular** es otra rama importante de los mecanismos efectores de la inmunología. En este caso la célula central que dirige los mecanismos efectores es el linfocito T que al ser estimulado por un antígeno genera una fase de amplificación para ayudar al proceso inflamatorio a destruir células alteradas en forma eficiente (Morilla, 1989). La inmunidad mediada por células es la responsable de las reacciones de hipersensibilidad retardada y el rechazo de aloinjertos o alotransplantes. Un aloinjerto es el trasplante de un tejido de un individuo a otro de la misma especie pero genéticamente diferente. (Rijkers, 1981) En los peces agnata (peces sin mandíbula) como las lampreas, que se mantienen en buenas condiciones de temperatura, pueden

rechazar aloinjertos de piel si las condiciones de temperatura no son las mejores el rechazo se hace con más lentitud. Los linfocitos se dividen en presencia de células de otra lamprea y PHA. Los peces cartilaginosos al igual que las lampreas rechazan aloinjertos con lentitud, pero los peces teleósteos los rechazan con rapidez. Los injertos repetidos provocan un rechazo acelerado. Los aloinjertos rechazados son infiltrados por linfocitos y muestran destrucción de vasos sanguíneos y células del pigmento. Al igual que todos los poiquilotermos (Organismos en que la temperatura corporal es regulada por la temperatura ambiental), el rechazo de injertos es más lento a temperaturas más bajas. La RI en los organismos poiquilotermos depende de la temperatura ambiente, en aguas frías se puede reducir o retrasar la RI (Piper, 1992). Los monocitos de los teleósteos pueden liberar una molécula muy similar a la Interleucina 1 (IL-1) que es reconocida como sustancia pirogénica y activadora de linfocitos T (Tizard, 1995).

Los macrófagos y los neutrófilos tienen actividad fagocitaria, estas células son capaces de ingerir partículas extrañas antes de que se inicie una respuesta inmune específica (Bamabé, 1996). Los macrófagos en los peces son células altamente fagocíticas y se parecen mucho a los de mamíferos, aunque carecen de receptores para Fc y para C3. Los anticuerpos de los peces parecen carecer de actividad opsonica, aunque esto es discutible. La morfología de los neutrófilos de los peces es similar a la de los mamíferos y a menudo se ven en lesiones inflamatorias, existe poca evidencia de que sean activamente fagocíticos y no hay evidencia de que puedan ingerir material extraño, sin embargo si poseen la mayoría de enzimas de los neutrófilos de mamíferos (Tizard, 1995).

Los peces poseen una circulación linfática independiente de la circulación sanguínea pero carecen de ganglios linfáticos y médula ósea como los mamíferos (Bamabé, 1996), sin embargo a este nivel evolutivo se reconocen algunos órganos que presentan una función linfoide, uno de los órganos linfoides que encontramos en los peces y en los mamíferos es el timo. Otros órganos linfoides reportados para los peces son los siguientes: el bazo (Sailiendri, 1975; Liewes, 1982), el riñón anterior (Sailiendri, 1975; Liewes, 1982; Faisal, et, al. 1989; Faisal, et, al, 1991), el riñón medio (Sailiendri, 1975; Liewes, 1982) y el hígado (Sailiendri, 1975).

El **bazo** en los peces muestra una constitución más sencilla que en los mamíferos. En el bazo de los teleósteos se encuentran linfocitos y centros germinales cubiertos de tejido conjuntivo en forma de trabéculas, los cuales se bifurcan formando una estructura tridimensional al unirse sus extremos a manera de red (Roberts, 1989), el bazo está dividido en pulpa blanca y pulpa roja; la pulpa blanca contiene un área reticular sin centros linfoides definidos donde se encuentran dos tipos de linfocitos T y B con prevalencia de los primeros, mientras que la pulpa roja contiene eritrocitos predominantemente (Sailendri, 1975).

## **Estudios de Mitógenos en los peces**

El estudio de la linfoproliferación con mitógenos a pesar de ser tan útil, ha sido aplicado en peces en un número mucho menor que los estudios realizados en humano, ratón y otros mamíferos. A continuación se describen algunos trabajos elaborados con diferentes peces, en los que se utilizan diversos tipos de células inmunes sometidas a varios mitógenos.

En la carpa común (*Cyprinus carpio*) se realizó un estudio en leucocitos aislados de timo, riñón anterior, bazo, riñón medio y sangre periférica y se estimularon con PHA, lipopolisacáridos (LPS), fitolaca americana (PWM) y Concanavalina A (ConA), se evaluó el tiempo óptimo para el cultivo de los leucocitos derivados de órganos linfoides que fue de 3.5 días y 4.5 días para cultivo de linfocitos de sangre periférica. No se encontraron diferencias en la reactividad a la estimulación por los diferentes mitógenos en los leucocitos obtenidos de las fuentes antes mencionadas (Liewes, Van Dam, Vos-Maas y Bootsma, 1982). Otro estudio en *Cyprinus carpio*, hace referencia a los diferentes requerimientos de un cultivo de linfocitos de sangre periférica, utilizando la incorporación de timidina tritiada (Tdr-<sup>3</sup>H), en el trabajo antes mencionado los investigadores se enfocan a la calidad y cantidad de requerimientos de suero, y las dosis óptimas de: 2-Mercaptoetanol (2-ME), glutamina y PHA así como la adecuada densidad celular inicial del cultivo. Reportan una gran variación individual en la respuesta a los estímulos mitogénicos en las carpas con las que trabajaron, sugieren la existencia de organismos poco respondedores y muy respondedores, para reducir las

variaciones se utilizó suero homólogo al 4%, PHA 10–40  $\mu\text{l/ml}$  y la concentración óptima de células por pozo fue de  $2 \times 10^5$ . El pico de la respuesta en estas condiciones fue en el día 6 y 7 a 28°C (Rosenberg-Wiser y Avtalion, 1982).

DeKoning y Kaattari (1991) en un trabajo en linfocitos de sangre periférica en la trucha arcoiris estudiaron la linfoproliferación celular usando diferentes sueros para suplementar el medio de cultivo, el mitógeno utilizado en el estudio fue lipopolisacárido, el medio fue suplementado con cada uno de los sueros a probar a una concentración de 10%, se compararon los resultados obtenidos con suero homólogo y autólogo del plasma de la trucha arcoiris y con el suplemento de suero más comúnmente usado que es el suero fetal de bovino, los resultados obtenidos fueron que en todos los casos los cultivos respondieron mejor en presencia del plasma de la trucha y esta respuesta se debe a que algunas veces el suero fetal de bovino no proporciona las condiciones óptimas esenciales para el crecimiento celular, y es muy importante la suplementación del medio de cultivo con el suero de trucha el cual puede contener factores estables al calor responsables del incremento de la respuesta mitogénica, el índice de estimulación máximo en los cultivos se obtuvo a los 10 días del cultivo.

En el pez *Leiostomus xanthurus* expuesto a ambientes contaminados con hidrocarburo-policíclico-aromático, se midió la respuesta proliferativa de los linfocitos de riñón anterior utilizando la incorporación de Tdr- $^3\text{H}$  en el ADN, se emplearon diferentes mitógenos como la PHA y ConA para células T y LPS, PWM y aglutinina de cacahuate para los linfocitos B, se observó una supresión de la respuesta de los linfocitos T a ambos mitógenos y un aumento en la respuesta de las células B cuando se les adicionaron LPS, con los otros mitógenos para linfocitos B la respuesta fue menor. La respuesta fue correlacionada con la concentración de hidrocarburo-policíclico-aromático (Faisal, et, al. 1991).

En un trabajo con bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) realizado en nuestro laboratorio se estudio la respuesta de los linfocitos esplénicos a los mitógenos PHA y ConA a diferentes temperaturas de cultivo así como el comportamiento de los linfocitos de los peces estresados con diferentes cambios de temperatura, los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el estrés térmico disminuye la respuesta a los mitógenos, se utilizó además de los mitógenos una sustancia de origen tímico que es

la Tactivina y que es reconocida como inmunomodulador la cual restablece la respuesta de los linfocitos de los bagres estresados a parámetros de mitogénesis normal. La temperatura óptima para los cultivos de bagre de canal fue la de 27°C y la dosis óptima de PHA fue la de 100 µg/ml, los cultivos fueron realizados con RPMI-1640 suplementado con SFT al 5% (Totsuka, 1997).

Referente a tilapia se realizó un estudio en el cual se hace una confrontación de peces y se reporta en los peces subordinados una supresión inmune severa en los parámetros de citotoxicidad no específica y en la respuesta al mitógeno LPS en leucocitos de riñón anterior. El uso del naltrexone que es un antagonista opioide, se demostró que esa inmunosupresión está mediada en parte por el sistema opioide endogeno, por lo que se evidenciaba que la reversión de la inmunosupresión está limitada a las líneas celulares T y citotóxicas, la proliferación a LPS no se afectó por el naltrexone, también demuestran que el suero de los peces subordinados (inmunosuprimidos) tiene un efecto inmunosupresor en peces normales y que ese efecto puede ser revertido con naltrexone, con estos resultados se sostiene una relación entre el sistema neuroendocrino y el SI en peces que son vertebrados inferiores (Faisal, et al. 1989).

## **Cultivo Celular**

Existen varias pruebas empleadas en la evaluación de la inmunidad mediada por células en los animales y en el hombre. La transformación de los linfocitos es una prueba relativamente rápida y reproducible, esta función celular es utilizada para la clínica y experimentos sobre inmunidad.

La prueba de proliferación linfocitaria fue desarrollada posterior al descubrimiento de la PHA por Nowell en 1960, la cual transforma a los linfocitos en células proliferativas en los cultivos de tejidos. En la clínica inmunológica según Barta y Oyekan (1981) la proliferación linfocitaria puede servir para determinar lo siguiente:

- 1.-Sensibilización de los linfocitos a diferentes antígenos específicos.
- 2.-Disfunción de los linfocitos (incremento o disminución de la mitogénesis después de la estimulación con mitógenos o con medio).

3.-Presencia de factores en el suero que modifican la respuesta de los linfocitos a antígenos mitogénicos específicos o no específicos.

La proliferación de linfocitos se puede observar *in vitro* al cultivar células linfoides junto con antígenos específicos, mediante este sistema experimental, puede demostrarse que las lectinas mitógenas, (una lectina es una proteína que se une formando enlaces cruzados, a residuos hidrocarbonados específicos de la superficie celular) estimulan policlonalmente a las células linfoides, estas lectinas mitógenas (mitógenos) se derivan de varias plantas y bacterias, se ha demostrado *in vitro* que la activación de células T y B conlleva a la producción de citocinas así como a la expresión de receptores para citocinas, ello conduce a las células hacia el inicio del ciclo celular (proliferación) y finalmente, hacia la función efectora (maduración). La activación linfocitaria, ya sea por antígeno o por mitógenos da lugar a modificaciones intracelulares y al desarrollo posterior en el sentido de un linfoblasto. Se deduce que la estimulación por mitógenos de los linfocitos *in vitro* imita la serie de eventos que tienen lugar *in vivo* tras su estimulación por los antígenos específicos. Las células T y B se activan por mitógenos diferentes (Roitt, 1991), la PHA y la ConA estimulan preferentemente las células T; los LPS estimulan las células B; el mitógeno PWM (Pokeweed) estimula tanto las células T como las células B humanas (Roitt, 1991; Barta, 1981).

En la realización de un cultivo celular la temperatura es un parámetro importante. Las células en cultivo pueden soportar sin daños importantes variaciones de temperatura siempre y cuando sean por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden. Las células humanas soportan incubaciones a 4°C durante días y pueden ser congeladas a -196°C durante años (con sustancias preservadoras). Sin embargo no sobreviven más que unas pocas horas a variaciones de 2°C por encima de 37°C. Las células procedentes de animales poiquilotermos soportan mejor un amplio rango de temperaturas de incubación. Para la determinación exacta de la temperatura de incubación se debe de tomar en cuenta la temperatura corporal del animal del que proceden las células, así como cualquier variación ambiental de temperatura (Reina y Auladell, 1996). La temperatura óptima para el cultivo celular en peces es de 20 a 30°C, o se puede emplear una temperatura cercana a la temperatura

preferida por el animal (Jakoby y Pastan 1979). Rosenberg-Wiser y Avtalion (1982) reportan 28°C como la temperatura óptima para los cultivos de linfocitos de la carpa, en el bagre de canal la temperatura óptima es de 27°C (Totsuka, 1997).

## **Fitohemaglutinina (PHA)**

La PHA es un extracto del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) con propiedades mitogénicas. La PHA ha jugado un importante papel en el desarrollo de la inmunología celular, fue el primer mitógeno policlonal descubierto, antes de esto era difícil inducir la activación de los linfocitos *in vitro*. El descubrimiento de la PHA permitió a los investigadores la activación de los linfocitos en cultivo *in vitro* y el estudio subsecuente de los eventos que suceden en la producción y el crecimiento de los linfocitos. La PHA es una mezcla de cinco glucoproteínas tetraméricas, cada glucoproteína esta compuesta de dos diferentes subunidades, E y L, que tienen pesos moleculares entre 33 kDa y 31.6 kDa respectivamente, estas subunidades están combinadas en cinco posibles proteínas tetraméricas llamadas E<sub>4</sub>, E<sub>3</sub>L<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>L<sub>3</sub>, y L<sub>4</sub> (La nomenclatura E y L es derivada de las observaciones que la subunidad E aparenta ser la subunidad más efectiva para inducir la eritroaglutinación, mientras que la subunidad L es un más efectivo aglutinador y mitógeno de los linfocitos). La PHA estimula la proliferación de las células mononucleares inmunocompetentes. Las células T son las células respondedoras en las células mononucleares pero su respuesta es dependiente de la presencia de macrófagos o células B monocitos que funcionan como células accesorias. Las células B no proliferan en respuesta a la PHA aun con la presencia de células accesorias, otra variedad de tipos celulares pueden funcionar como células accesorias para inducir la activación de células T por parte de la PHA, se incluyen los fibroblastos y las células endoteliales (Roitt, 1991).

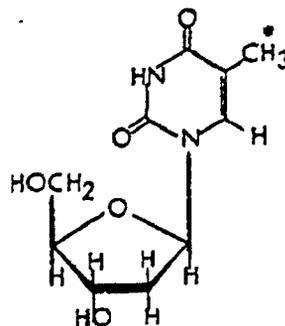
CUBA

## Timidina tritiada (Tdr-<sup>3</sup>H)

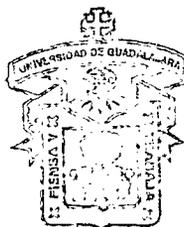
La síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) fue calculada originalmente por una evaluación morfológica del porcentaje de linfoblastos presentes en el cultivo, sin embargo, este método ha sido abandonado debido a la variabilidad extrema y a la subjetividad de los resultados; una medición más precisa de la síntesis de ADN es lograda marcando los cultivos con Tdr-<sup>3</sup>H (Fudenberg, Stites, Caldwell y Wells, 1982). La Tdr-<sup>3</sup>H es el precursor más específico del

ADN, es un nucleósido preparado enzimáticamente de timina [metil-<sup>3</sup>H] se incorpora en el ADN celular durante un corto periodo de tiempo de la fase de síntesis que es el lapso del ciclo celular en el cual el ADN se duplica (Willmer, 1965), la cantidad de Tdr-<sup>3</sup>H incorporada es determinada en cuentas o pulsos en un contador de centelleo para líquidos. La cuenta por centelleo proporciona datos en cuentas por minuto (cpm) que entonces son usadas como medición estándar en la respuesta linfoproliferativa (Fudenberg, et al 1982).

El isótopo radiactivo tritio [<sup>3</sup>H] tiene una vida media de 12.4 años, después del cual decae en el isótopo estable del Helio, la radiación emitida es del tipo β.



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tilapia roja *Oreochromis mossambicus* es la especie introducida a México más recientemente que los peces de otras especies de este género, *O. mossambicus* tiene mayor demanda por los consumidores que las otras tilapias debido a las características morfológicas y degustativas, sin embargo, en Jalisco existe poca distribución de su cultivo comercial debido al desconocimiento de la resistencia de esta especie a las enfermedades infecciosas y al temor por parte de los acuicultores a las posibles pérdidas económicas por la morbilidad, por lo que es necesario realizar trabajos encaminados al estudio de los mecanismos de defensa de esta especie en comparación con otros peces del género *Oreochromis* en particular, con *O. niloticus* que es la especie del género más distribuida actualmente en las granjas acuícolas de México y es considerada como una de las especies más fuertes.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## OBJETIVO GENERAL



BIBLIOTECA CENTRAL

Evaluar la respuesta inmune celular a través de la determinación de la actividad proliferativa de linfocitos esplénicos estimulados con PHA de dos especies de tilapia (*Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*).

## OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la temperatura óptima de los cultivos de linfocitos esplénicos de dos especies de tilapia (*O. niloticus* y *O. mossambicus*).

Establecer la dosis óptima del suero fetal y del mitógeno PHA para la linfoproliferación de *O. niloticus* y *O. mossambicus*.

Valorar la actividad linfoproliferativa de los esplenocitos estimulados con la dosis óptima de PHA y de suero fetal a temperatura óptima de las dos especies en el estudio.

Comparar el peso del bazo y la cantidad de esplenocitos en la suspensión celular del bazo en las dos especies en estudio.

## MATERIAL Y METODOS



BIBLIOTECA CENTRAL

### Peces

Se utilizaron para este trabajo 22 ejemplares machos de tilapia *Oreochromis mossambicus* variedad roja y de *O. niloticus* con edad entre 3 y 5 meses con tallas comerciales y un peso desde 150 a 350 g, de un estanque localizado en Los Belenes, Zapopan, Jalisco. Los peces fueron trasladados a las instalaciones del Departamento de Biología Celular y Molecular de Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), se colocaron individualmente en peceras de 50 X 30 X 35 cm, las cuales tenían una aireación constante y temperatura de 27° C mantenido por calentadores automáticos (Radiant 100w), los peces permanecieron bajo estas condiciones un tiempo de 48 horas como mínimo antes del sacrificio que fue el tiempo en el cual se eliminaba el estrés producido por el traslado, se alimentaron 2 veces al día con alimento balanceado para peces (Anderson Clayton).

Los peces fueron sacrificados uno de cada especie para un cultivo, para comparar la linfoproliferación bajo las mismas condiciones de cultivo *in vitro* (Ver esquema 1).

### Medio de cultivo

Se utilizó el medio RPMI-1640 [(Roswell Memorial Park Institute-1640) Sigma Chem. Co. R-6504] suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 5%.

### Determinación del peso del bazo.

Los peces fueron sacrificados por dislocación cervical, se pesaron en una balanza granataria (Felisa) y posteriormente se extrajo el bazo en condiciones de esterilidad colocándolo en una caja de Petri, que contenía 7 ml de Solución Salina Balanceada de Hank's [(SSBH) Sigma Chem.Co] a 4°C previamente pesada en una

balanza analítica (Sartorius Co. H110), una vez más se pesó la caja de Petri conteniendo el bazo y por diferencia se determinó el peso del bazo.

## **Obtención de los linfocitos esplénicos de la tilapia**

Se disgregó el bazo utilizando una bolsa de nyltex (Malla de microfilamentos de nylon con poros de diámetro de 210  $\mu$ , Teteco Inc., Elmsford, N.Y.) lo anterior se realizó en una campana de flujo laminar (Alder). Para la separación de los linfocitos, la suspensión celular se recolectó de la caja de Petri y se colocó en un tubo cónico de polipropileno que contenía 5 ml de Histopaque-1077 (Sigma Chem. Co. H-8889), los tubos se centrifugaron por 20 min a una velocidad de 1200-1500 rpm en una centrífuga (Sol-Bat 500), se obtuvo el anillo de linfocitos que después fue retirado del tubo con una pipeta Pasteur, se realizaron dos lavados de la muestra que consistieron en lo siguiente: los linfocitos obtenidos se colocaron en tubos de 12X75 mm, se añadió SSBH hasta completar el volumen y se centrifugaron los tubos 10 minutos a 1200-1500 rpm.

Finalmente se obtuvo un botón celular el cual fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5 o 10 % SFT y se hizo la prueba de viabilidad de los linfocitos por exclusión con Azul de Tripano al 0.4 % (Sigma Chem. Co. T-8154), las células se contaron en la cámara de Neubauer, observando la cantidad de esplenocitos obtenidos del bazo, se tomó el volumen de suspensión celular que contenía el número de esplenocitos necesarios para el cultivo se le añadió el volumen necesario de RPMI-1640 suplementado para que la concentración celular final fuera de  $2 \times 10^5$  células en 0.1ml, posteriormente se sembraron los linfocitos en cajas de cultivo de 96 pozos (Coming Glass Works. 25861. New York 14831) adicionándoles:  
0.1ml de células+0.1 ml de RPMI-1640 (para las células no estimuladas)  
0.1ml de células+0.1 ml del mitógeno PHA (Sigma Chem. Co. L-9132) en las concentraciones de 50, 25 y 10  $\mu$ g/ml.

Los cultivos se incubaron 48 horas en una estufa de CO<sub>2</sub> (NAPCO E series modelo 302) en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y aire a una temperatura de 25 o 28°C, al terminar esta incubación se pulsó el cultivo con 1  $\mu$ Ci de Tdr-<sup>3</sup>H (Amersham, 37 Mbq/ml) a cada pozo, el cultivo se incubó nuevamente por 24 horas.

Después de las 72 horas de incubación se cosecharon los cultivos con pipetas Pasteur utilizando un pipeteador (Drumond scientific Co.) y se colocó el contenido del pozo en trozos de papel filtro del No. 2 de 2X3 cm. (un papel para cada pozo), estos papeles se dejaron secar y después se lavaron dos veces por inmersión en ácido tricloroacético (Analytika A 3300) al 7%, en agitación constante por 7 minutos, posteriormente se lavaron 2 veces con alcohol (etanol) al 70%, se dejaron secar y se recortaron en pequeños trozos los cuales se colocaron en viales, a cada vial se le adicionaron 3 ml de líquido de centelleo [PPO 2-5 difeniloxozol (Sigma Chem, Co. D-4630), triton X100 (Sigma Chem. Co.6517), etilenglicol (J. T. Baker Analyzed 21766), etanol absoluto (Merck UN 1177WGKO) y xilol (Sigma Chem. Co. 917)], los viales se llevaron al contador de centelleo (Beckman, USA, LS6000 SE) para medir la síntesis de ADN marcado con timidina tritiada y los resultados fueron expresados en cuentas por minuto (cpm) la cual es utilizada como medición estándar en los estudios de linfoproliferación, después se calculó el índice de estimulación (IE) por medio de la siguiente fracción:

$$\text{IE} = \frac{\text{cpm de los linfocitos estimulados con PHA}}{\text{cpm de los linfocitos no estimulados}}$$

(Barta, 1981; Fudenberg et. al, 1982; Morilla y Bautista, 1986; Nimmo, 1991)

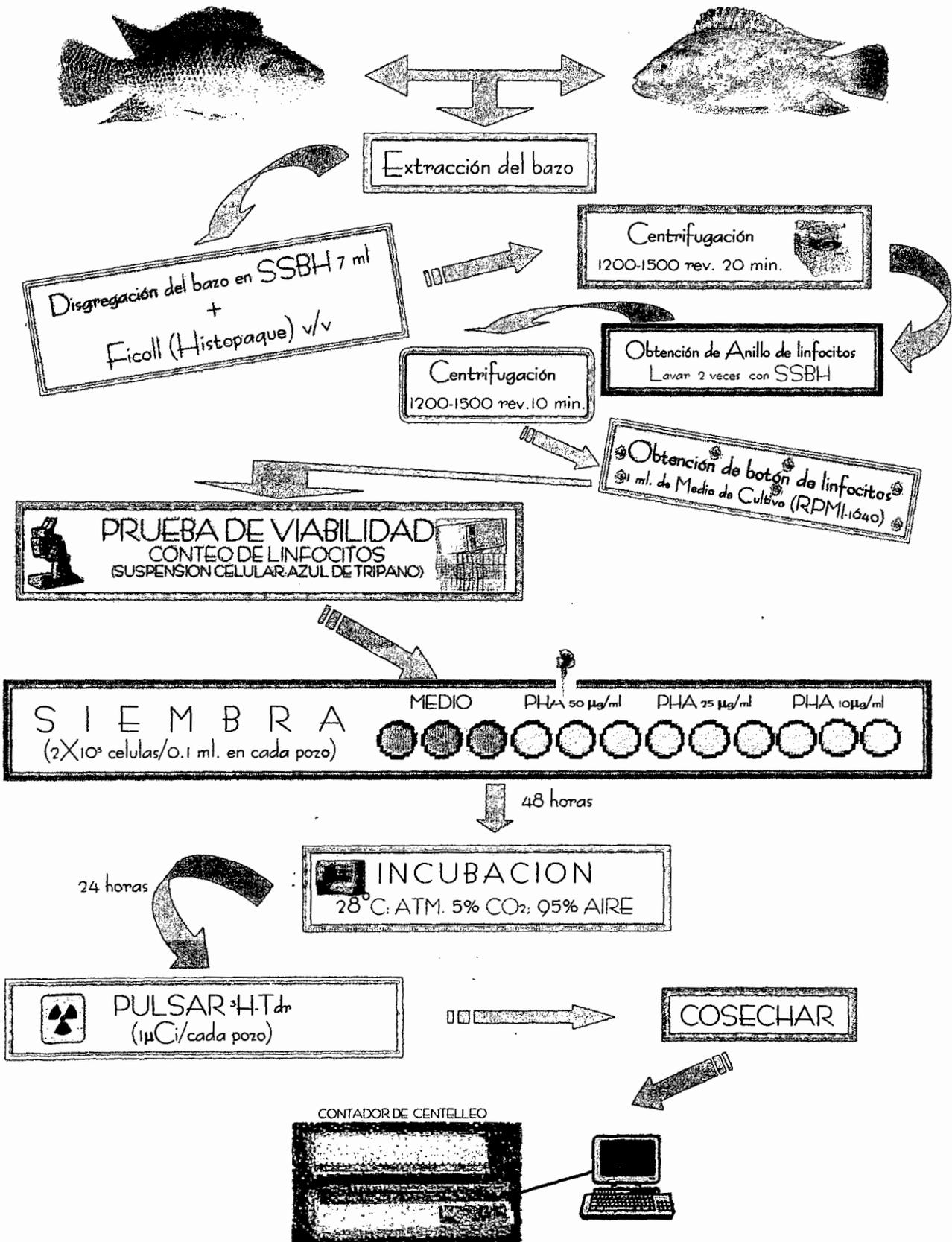
NOTA: La distribución de los peces en el estudio fue la siguiente 2 peces de cada especie a 25°C y con 5% de SFT, 3 peces de cada especie para 28°C y 10% SFT y 6 peces de cada especie para la prueba de 28° C y 5% de SFT.

## **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos en el estudio en ambas especies se compararon utilizando la prueba estadística de t de Students

# Esquema 1.- Cultivo de linfocitos de bazo

23



## RESULTADOS

LA OFICINA CENTRAL

Mediante ensayos de proliferación de linfocitos esplénicos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* se caracterizó la respuesta mitogénica a la PHA a temperatura de cultivo de 25 y 28°C, los resultados fueron los siguientes:

Se realizaron algunos ensayos a 28°C donde se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFT, se obtuvo un alto número de cpm aun en las células no estimuladas con mitógeno, el promedio de cpm fue de  $6099.22 \pm 349.50$  para *O. niloticus* y  $5690.11 \pm 606.06$  para *O. mossambicus* (ver tabla 1).

En los ensayos realizados a 25°C con medio de cultivo suplementado con 5% de SFT, el promedio de cpm fue de  $1839.00 \pm 101.97$  para *O. niloticus* y  $1918.33 \pm 359.74$  para *O. mossambicus* (ver tabla 2).

Cuando se incubó a 28°C con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de SFT, se redujo el número de cpm en la proliferación basal de los linfocitos no estimulados con mitógeno el promedio de cpm para *O. niloticus* fue  $1477.47 \pm 332.20$  y en *O. mossambicus* el promedio fue de  $1513.22 \pm 208.88$  (ver tabla 3). Para ambas especies el número de cpm de las células estimuladas se resumen en la figura 7.

Los Indices de Estimulación (I.E.) que se observan en los cultivos realizados a 28°C y suplementados con 10% de SFT en ambos casos la dosis de PHA 10 µg/ml fue la que tuvo los valores más altos  $1.33 \pm 0.25$  para *O. mossambicus* y  $1.12 \pm 0.15$  para *O. niloticus* (ver tabla 4).

En la tabla 5 se observan los promedios de I.E. obtenidos a 25°C suplementados con 5% de SFT, estimulados con PHA 50 µg/ml, PHA 25 µg/ml y PHA 10 µg/ml resultando respectivamente  $1.07 \pm 0.01$ ,  $0.93 \pm 0.01$  y  $0.98 \pm 0.02$  para *O. niloticus* y  $1.06 \pm 0.01$ ,  $1.06 \pm 0.05$  y  $1.01 \pm 0.06$  para *O. mossambicus*.

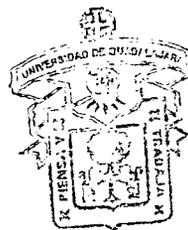
En los cultivos realizados a 28°C y suplementados con 5% de SFT a diferentes dosis del mitógeno PHA los I.E. más altos se obtuvieron con la dosis de 50 µg/ml en ambas especies obteniendo los siguientes valores  $2.12 \pm 0.24$  para

*O. niloticus* y  $2.49 \pm 0.45$  para *O. mossambicus*, la diferencia fue significativa para ambas especies cuando se compararon los I.E. con la dosis de PHA  $10 \mu\text{g/ml}$  la estimulación lograda fue de  $1.01 \pm 0.07$  para *O. niloticus* y  $1.35 \pm 0.21$  en *O. mossambicus*. El I.E. que se obtuvo con PHA  $25 \mu\text{g/ml}$  fue de  $1.20 \pm 0.10$  para *O. niloticus* y  $1.49 \pm 0.21$  en *O. mossambicus* (ver tabla 6 y figura 5).

En la figura 6 se observa la significancia estadística de los índices de estimulación de ambas especies obtenidas con la dosis de PHA  $50 \mu\text{g/ml}$ .

Se determinó el peso (g) de los bazo de ambas especies obteniendo un promedio de  $0.72 \pm 0.05$  para *O. niloticus* y  $0.25 \pm 0.11$  para *O. mossambicus* (ver tabla 7, figura 8). El número de esplenocitos obtenidos fue de  $14'080,000.00 \pm 3'954,230.44$  en *O. niloticus* y  $4'266,113.33 \pm 1'871,364.66$  para *O. mossambicus* (ver tabla 8, figura 9).

CUCBA



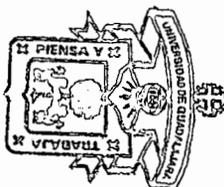
BIBLIOTECA CENTRAL

**Tabla 1.** Promedios de cuentas por minuto (cpm) de proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* estimulados con PHA, suplementados al 10% SFT a una temperatura de 28°C.

<i>O. niloticus</i>				<i>O. mossambicus</i>				
			X±E.E.				X±E.E.	
<b>MEDIO</b>	5745.00	6886.00	5666.67	<b>6099.22±394.50</b>	5325.00	6872.33	4873.00	<b>5690.11±606.06</b>
PHA 50µg/ml	7215.33	6909.33	5252.33	<b>6459.00±610.49</b>	7496.00	7318.00	5346.00	<b>6720.00±689.74</b>
PHA 25µg/ml	7738.33	6743.00	4875.33	<b>6452.22±840.16</b>	7444.33	7581.00		<b>5008.44±68.54</b>
PHA 10µg/ml	8073.33	7072.00	5206.00	<b>6783.78±841.17</b>	8438.67	7453.67		<b>5297.45±493.97</b>

**Tabla 2.** Promedios de cuentas por minuto (cpm) de proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* estimulados con PHA, suplementados al 5% SFT a una temperatura de 25°C.

<i>O. niloticus</i>				<i>O. mossambicus</i>			
			X±E.E.				X±E.E.
<b>MEDIO</b>	1940.67	1737.33	<b>1839.00±101.97</b>	2277.00	1559.66		<b>1918.33±359.74</b>
PHA 50µg/ml	2087.67	1837.33	<b>1962.50±125.54</b>	2435.00	1642.00		<b>2038.50±397.68</b>
PHA 25µg/ml	1813.00	1604.33	<b>1708.67±104.65</b>	2310.33	1724.33		<b>2017.33±293.88</b>
PHA 10µg/ml	1860.50	1743.00	<b>1801.75±58.93</b>	2171.00	1651.66		<b>1911.33±260.45</b>



**Tabla 3.** Promedios de cuentas por minuto (cpm) de proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* estimulados con PHA, suplementados al 5% de SFT a una temperatura de 28°C.

	MEDIO	PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml
<b><i>O. niloticus</i></b>	774.33	2401.00	805.30	782.00
	1766.50	2991.67	1883.33	1842.67
	2854.00	7095.33	4603.50	2856.57
	577.33	982.33	825.33	721.67
	1451.00	2298.00	1654.00	1012.50
	1441.67	3127.00	1341.00	1560.32
X±E.E.	<b>1477.47±332.20</b>	<b>3149.22±848.07</b>	<b>1852.08±577.98</b>	<b>1462.62±332.26</b>
<b><i>O. mossambicus</i></b>	737.50	2993.50	715.37	722.78
	2033.00	6099.33	4251.00	4555.00
	1937.33	3837.00	2619.33	2058.50
	1412.50	1557.50	1167.50	1810.50
	1822.00	5777.00	3442.00	1476.33
	1137.00	1830.50	2083.50	1938.50
X±E.E.	<b>1513.22±208.88</b>	<b>3682.47±788.93</b>	<b>2379.78±548.17</b>	<b>2093.60±529.91</b>

BIENESTAR CENTRAL



CUJUBA

**Tabla 4.** Índice de Estimulación (I.E.) de proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* estimulados con PHA y suplementados con SFT al 10% a 28°C.

<i>O. niloticus</i>			<i>O. mossambicus</i>		
PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml	PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml
1.26	1.35	1.41	1.41	1.40	1.58
1.00	0.98	1.03	1.06	1.10	1.08
0.93	0.86	0.92	1.10		
X±E.E.					
<b>1.06±0.10</b>	<b>1.06±0.15</b>	<b>1.12±0.15</b>	<b>1.19±0.11</b>	<b>1.25±0.15</b>	<b>1.33±0.25</b>

**Tabla 5.** Índice de Estimulación (I.E.) de proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* estimulados con PHA y suplementados con SFT al 5% a 25°C.

<i>O. niloticus</i>			<i>O. mossambicus</i>		
PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml	PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml
1.08	0.93	0.96	1.07	1.01	0.95
1.06	0.92	1.00	1.05	1.11	1.06
X±E.E.					
<b>1.07±0.01</b>	<b>0.93±0.01</b>	<b>0.98±0.02</b>	<b>1.06±0.01</b>	<b>1.06±0.05</b>	<b>1.01±0.06</b>

**Tabla 6.** Índice de Estimulación (I.E.) de proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* estimulados con PHA y suplementados con SFT al 5% a 28°C.

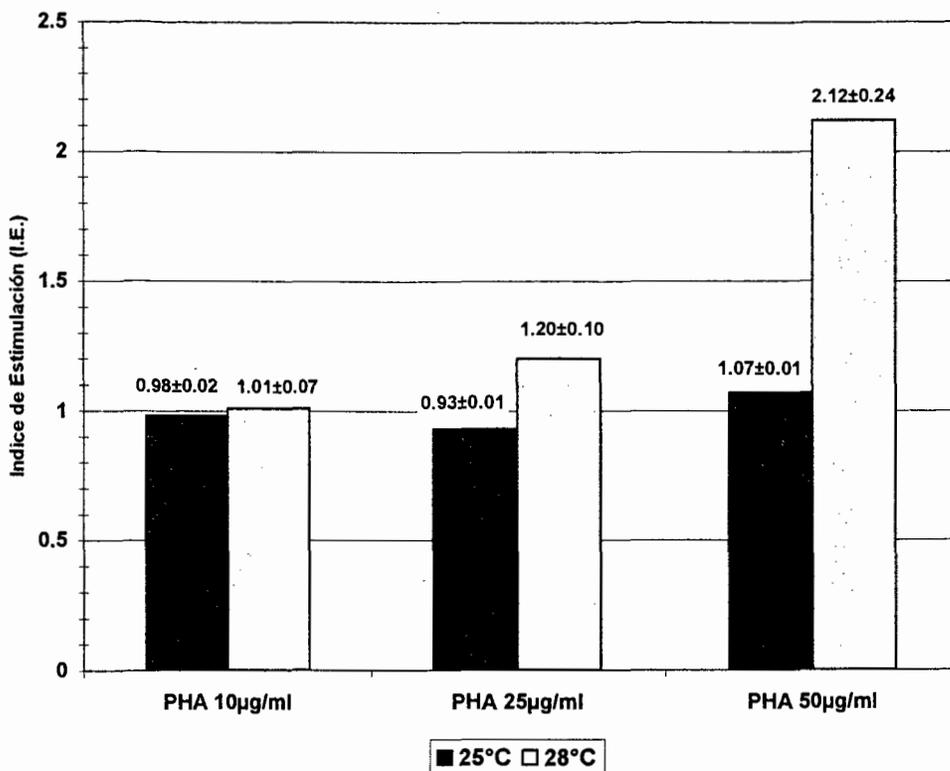
<i>O. niloticus</i>			<i>O. mossambicus</i>		
PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml	PHA 50µg/ml	PHA 25µg/ml	PHA 10µg/ml
3.10	1.04	1.01	4.06	0.97	0.98
1.69	1.07	1.04	3.00	2.09	2.24
2.49	1.61	1.00	1.98	1.35	1.06
1.70	1.43	1.25	1.10	0.83	1.28
1.58	1.14	0.70	3.16	1.89	0.81
2.17	0.93	1.08	1.61	1.83	1.70
X±E.E.					
<b>2.12±0.24</b>	<b>1.20±0.10</b>	<b>1.01±0.07</b>	<b>2.49±0.45</b>	<b>1.49±0.21</b>	<b>1.35±0.21</b>

**Tabla 7. Peso del bazo de *O. niloticus* y *O. mossambicus*.**

	Peso del bazo (g)	Peso del pez (g)	% del peso del bazo
<b><i>O. niloticus</i></b>	0.67	253.00	0.27
	0.67	344.00	0.20
	0.82	255.00	0.32
<b>X±E.E.</b>	<b>0.72±0.05</b>	<b>284.00±30.04</b>	<b>0.26±0.03</b>
<b><i>O. mossambicus</i></b>	0.04	180.00	0.03
	0.37	345.00	0.11
	0.34	260.00	0.13
<b>X±E.E.</b>	<b>0.25±0.11</b>	<b>261.67±47.70</b>	<b>0.09±0.03</b>
	<b>P &lt; 0.05</b>	<b>P &gt; 0.05</b>	<b>P &lt; 0.05</b>

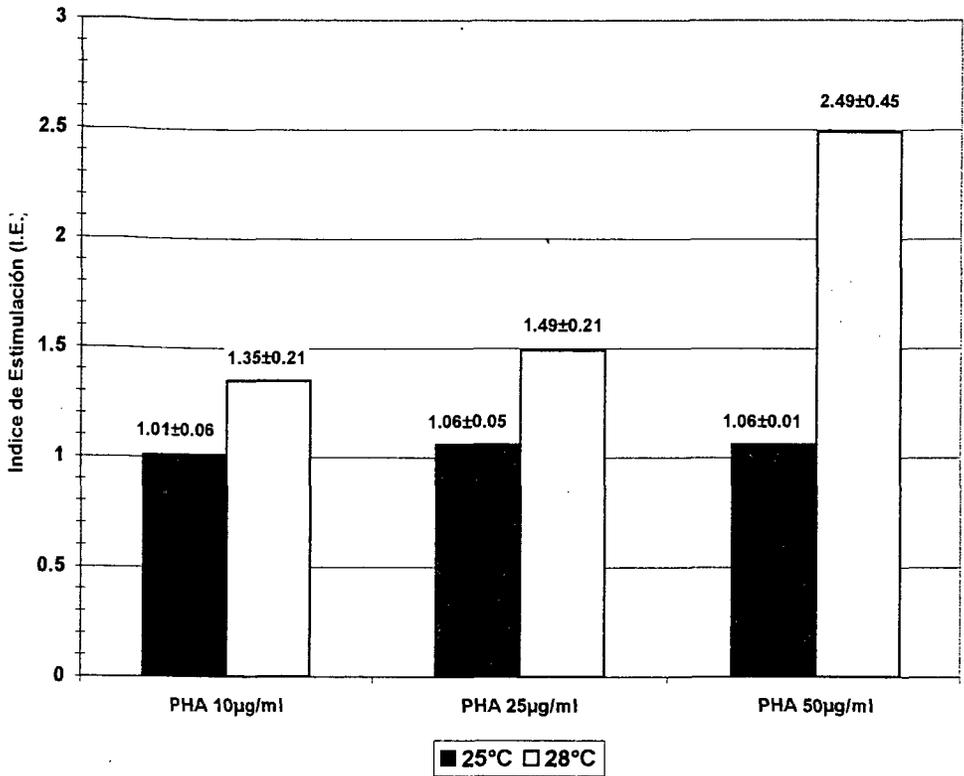
**Tabla 8. Cantidad de esplenocitos obtenidos del bazo de *O. niloticus* y *O. mossambicus*.**

	Peso del bazo (g)	Esplenocitos en la suspensión celular
<b><i>O. niloticus</i></b>	0.67	11'840,000.00
	0.67	8'640,000.00
	0.82	21'760,000.00
<b>X±E.E.</b>	<b>0.72±0.05</b>	<b>14'080,000.00±3'954,230.44</b>
<b><i>O. mossambicus</i></b>	0.04	1'240,000.00
	0.37	3'878,400.00
	0.34	7'680,000.00
<b>X±E.E.</b>	<b>0.25±0.11</b>	<b>4'266,113.33±1'871,364.66</b>
	<b>P &lt; 0.05</b>	<b>P &lt; 0.05</b>



*O. niloticus*      25°C (PHA50µg/ml) vs. 28°C (PHA50µg/ml)      P > 0.05  
                          25°C (PHA25µg/ml) vs. 28°C (PHA25µg/ml)      P > 0.05  
                          25°C (PHA10µg/ml) vs. 28°C (PHA10µg/ml)      P > 0.05

Figura 1. Comparación del promedio de los I.E. de linfoproliferación de *O. niloticus*, estimulados con diferentes dosis de PHA, suplementados al 5% de SFT a temperaturas de 25 y 28°C.



*O. mossambicus* 25°C (PHA50µg/ml) vs. 28°C (PHA50µg/ml) P > 0.05  
 25°C (PHA25µg/ml) vs. 28°C (PHA25µg/ml) P > 0.05  
 25°C (PHA10µg/ml) vs. 28°C (PHA10µg/ml) P > 0.05

Figura 2. Comparación del promedio de los I.E. de linfoproliferación de *O. mossambicus*, estimulados con diferentes dosis de PHA, suplementados al 5% de SFT a temperaturas de 25 y 28°C.

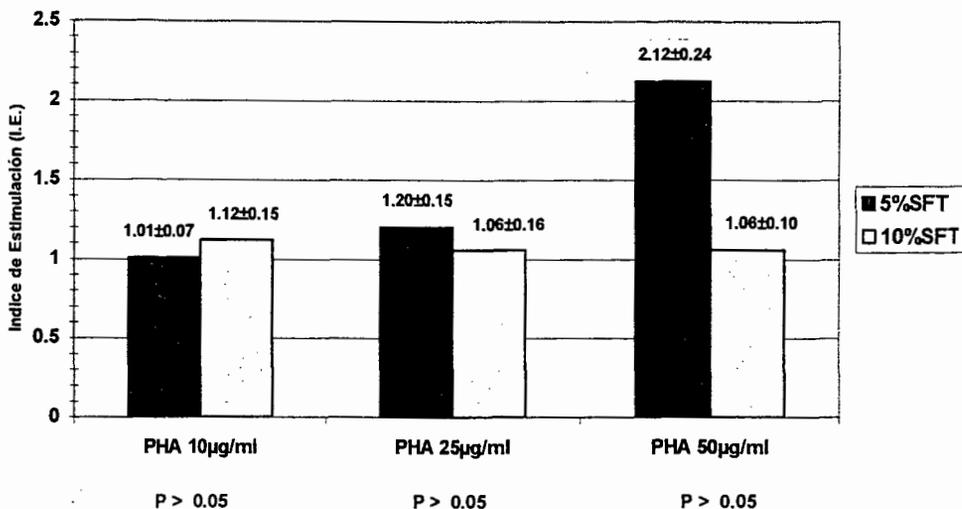


Figura 3. Promedio de los I.E. de linfoproliferación de *O. niloticus*, estimulados con diferentes dosis de PHA, suplementados al 5% y 10% de SFT a 28°C.

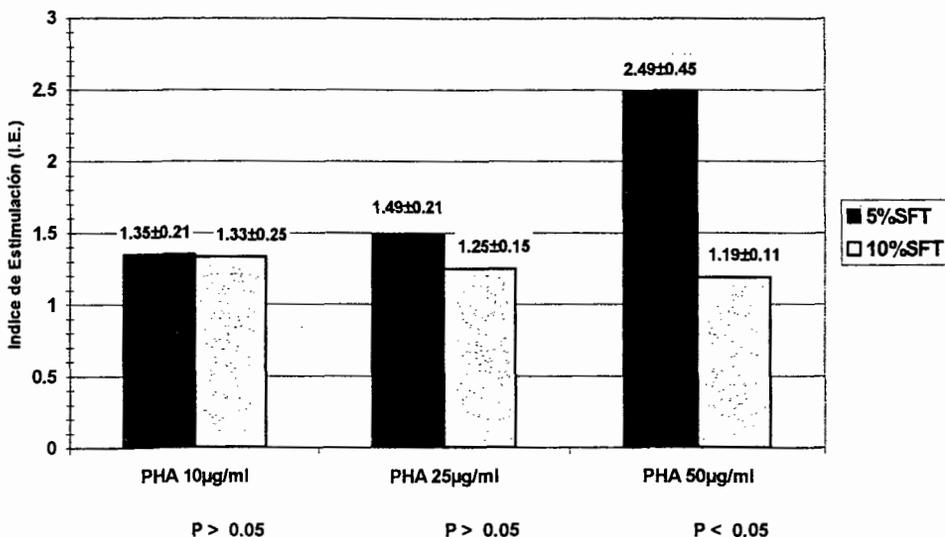
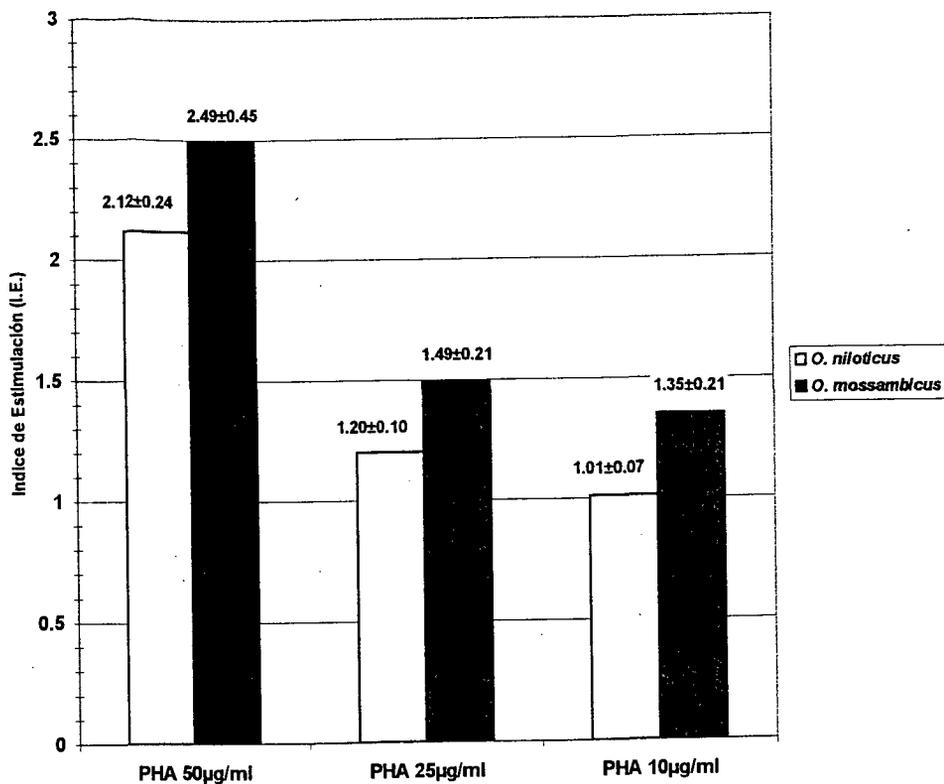


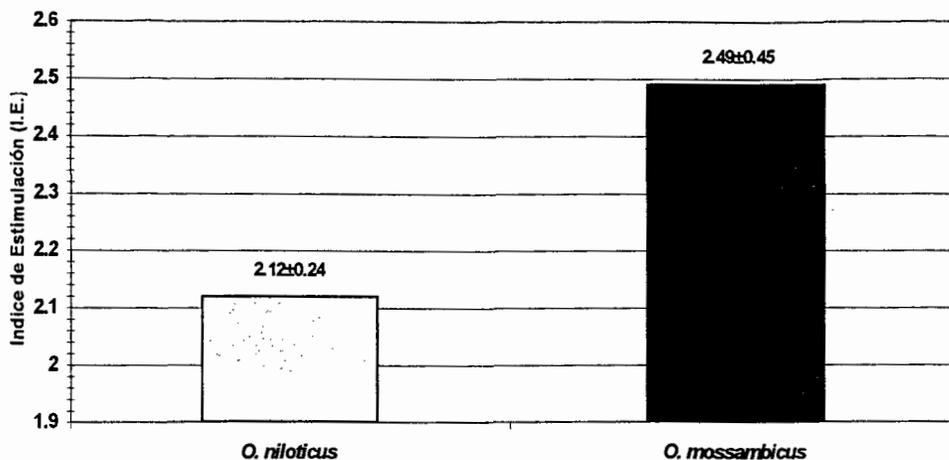
Figura 4. Promedio de los I.E. de linfoproliferación de *O. mossambicus*, estimulados con diferentes dosis de PHA, suplementados al 5% y 10% de SFT a 28°C.



<i>O. niloticus</i>	PHA 50µg/ml vs. PHA 25µg/ml	P > 0.05
	PHA 25µg/ml vs. PHA 10µg/ml	P > 0.05
	PHA 50µg/ml vs. PHA 10µg/ml	P < 0.05
<i>O. mossambicus</i>	PHA 50µg/ml vs. PHA 25µg/ml	P < 0.05
	PHA 25µg/ml vs. PHA 10µg/ml	P > 0.05
	PHA 50µg/ml vs. PHA 10µg/ml	P < 0.05

Figura 5. Promedio de los I.E. de Linfoproliferación de *O. niloticus* y *O. mossambicus*, estimulados con PHA a temperatura de 28°C y suplementados al 5% de SFT.

PHA 50µg/ml



P > 0.05

Figura 6. Indice de estimulación (I.E.) de esplenocitos de las tilapias con la dosis de PHA 50µg/ml a 28°C.

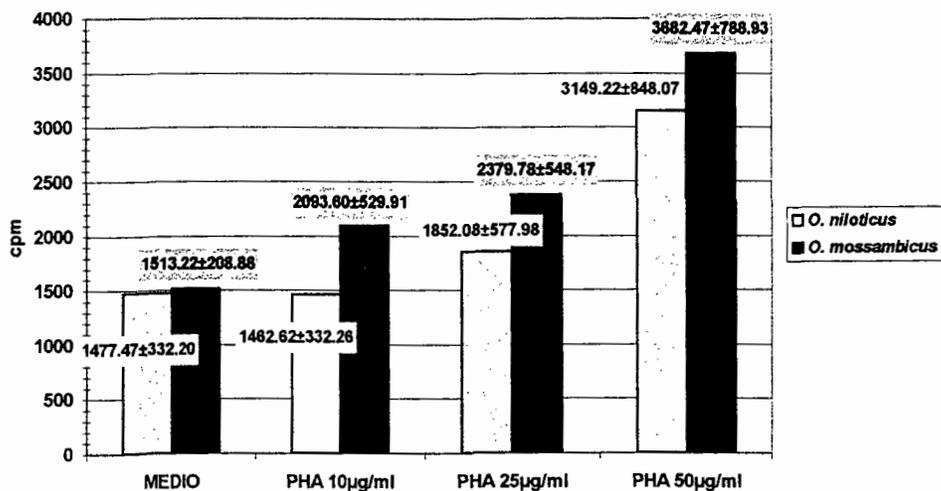
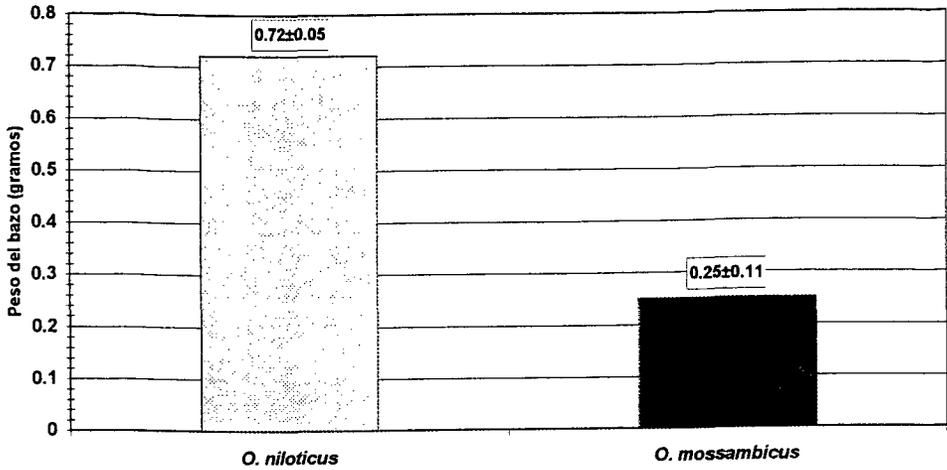
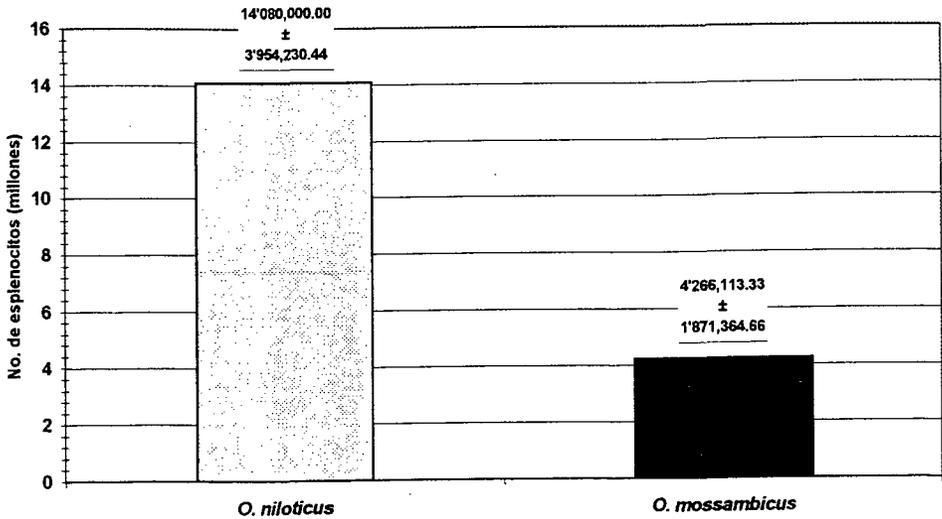


Figura 7. Promedio de las cpm de Linfoproliferación de *O. niloticus* y *O. mossambicus*, estimulados con PHA a temperatura de 28°C y suplementados al 5% de SFT.



P < 0.05

Figura 8. Comparación del peso del bazo de *O. niloticus* y *O. mossambicus*



P < 0.05

Figura 9. Promedio de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* en 1 ml de RPMI-1640.

## DISCUSION



BIBLIOTECA CENTRAL

Se reconoce que para los organismos poiquiloterms la temperatura es un factor determinante para sus funciones. A cierta temperatura el pez logra desarrollar sus funciones de una manera óptima. Fisiológicamente la tilapia tiene como temperatura óptima en cultivo el rango entre 25-30°C y para reproducción la temperatura en la que coinciden ambas especies esta en el rango entre 25-28°C según Bocek (1996). Por la falta de datos acerca de la temperatura adecuada para el cultivo celular en tilapia y según las recomendaciones para el cultivo celular de Reina y Auladell, (1996) se debe considerar la temperatura corporal óptima del organismo del que proceden las células mientras que Jakoby y Pastan (1979) mencionan que los rangos óptimos para el cultivo celular de los organismos poiquiloterms son de 20 a 30°C o una temperatura cercana en la cual el pez fisiológicamente se encuentra mejor, por lo que los ensayos fueron realizados a la temperatura mínima y máxima para la reproducción de ambas especies 25 y 28°C respectivamente (ver tabla 2 y 3), estos valores son muy cercanos a la temperatura reportada como óptima para el cultivo celular de leucocitos de la carpa (Rosenberg-Wiser y Avtalion, 1982) que es de 28°C. Para los esplenocitos de bagre de canal Totsuka (1997) reporta como temperatura óptima 27°C, de las temperaturas probadas en cultivo celular se obtuvo mayor I.E. a 28°C, sin embargo no se encontró diferencia significativa en la comparación con los cultivos realizados a 25°C con ninguna concentración de mitógeno en las dos especies evaluadas (ver figuras 1 y 2). Nosotros consideramos que al ser ambas especies de origen tropical a la temperatura de reproducción más alta que es de 28°C es donde ellas logran un funcionamiento celular mayor para responder a los estímulos antigénicos simulados en nuestro estudio por la PHA.

La PHA es una de las sustancias más utilizadas para evaluar la RIC *in vitro* en muchas especies, se reporta con un buen funcionamiento en peces (Rosenberg-Wiser, 1982; Liewes, et. al, 1982; Totsuka, 1997; Faisal, et. al, 1991), las dosis óptimas

varían para cada especie, en nuestro estudio la dosis óptima fue 50 µg/ml para ambas especies (ver figura 5), este valor es muy cercano al reportado por Rosenberg-Wiser y Avtalion (1982) para la carpa 10-40 µg/ml, nosotros al igual que estos autores encontramos una variabilidad entre individuos (ver tabla 3) ellos sugieren la existencia de organismos respondedores y poco respondedores al mitógeno. La dosis óptima que encontramos para el cultivo de los esplenocitos de tilapia es menor a la reportada por Totsuka (1997) para los esplenocitos del bagre de canal que fue 100 µg/ml. Nosotros probamos en algunos ensayos esa dosis y también la de 75 µg/ml (datos no mostrados) y observamos valores de cpm por debajo de la proliferación basal para ambas especies, por lo que suponemos que esto podría estar relacionado con el número de receptores de superficie o la avidéz de estos hacia la PHA y que hay una variación de lo anterior, entre especies así como entre individuos; otra razón diferente tal vez sea la presencia y el número de las células accesorias para iniciar la función de los linfocitos T ante el mitógeno, no se encontró información de lo anterior por lo que se requiere investigación al respecto.

En lo que concierne a la dosis óptima del suero fetal para el cultivo de esplenocitos de tilapia probamos la suplementación de nuestros cultivos al 10 y 5 % de SFT, se observó un mayor I.E. con el medio suplementado con 5% SFT (ver figuras 3 y 4), consideramos que esto se debe a la disminución de las cpm de la proliferación basal, lo que confirma que la suplementación del medio es muy importante ya que el exceso de SFT impide la estimulación por el mitógeno, Rosenberg-Wiser y Avtalion (1982), en la carpa utilizaron suero homólogo al 4% y con ello redujeron las variaciones entre individuos en la respuesta celular al mitógeno. De Koning y Kaattari (1991) en la trucha arcoiris probando diferentes tipos de suero optimizaron sus resultados con suero homólogo de la trucha, por lo que sería conveniente el probar suero homólogo de la especie en estudio para determinar su efecto.

Al comparar la linfoproliferación entre ambas especies con la dosis óptima del mitógeno (50 µg/ml) y a la temperatura óptima de cultivo (28°C) no encontramos diferencia significativa en los I.E. de los esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* (ver figura 6) sin embargo en las figuras 5 y 7 se observa una tendencia de un mayor

índice de estimulación de los esplenocitos de *O. mossambicus* en comparación con los de *O. niloticus* con todas las concentraciones de PHA.

Al respecto del peso del bazo y la cantidad de esplenocitos observamos que en ambos parámetros es mayor en *O. niloticus* en comparación con los de *O. mossambicus* (ver figuras 8 y 9) y si encontramos una diferencia significativa, tomando en cuenta que el promedio del peso de los peces no difiere significativamente (ver tabla 7) la diferencia entre el peso promedio del bazo de *O. niloticus* en comparación con el de *O. mossambicus* es absoluta, consideramos que el parámetro inmunológico cuantitativo (cantidad de esplenocitos) que es menor en *O. mossambicus* se compensa en esta especie con el mayor índice de estimulación frente a un mitógeno que es un parámetro inmunológico cualitativo funcional. Para la valoración de la resistencia a las enfermedades *in vivo* de estas especies de tilapia esta realizándose una investigación sobre el comportamiento de la RI frente al reto bacteriano con *Aeromonas spp.*

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## CONCLUSIONES

1.-La temperatura óptima para los cultivos de esplenocitos, tanto de *O. niloticus* como de *O. mossambicus*, fue de 28° C.

2.-La dosis óptima del mitógeno PHA para la proliferación de esplenocitos de *O. niloticus* y *O. mossambicus* fue de 50 µg/ml y la dosis óptima del suero fetal de ternera 5%.

3.-En el índice de estimulación de los esplenocitos de *O. mossambicus* con todas las concentraciones de PHA no encontramos diferencia significativa con los I.E. de *O. niloticus*, sin embargo se observa la tendencia de mayor I.E. en los esplenocitos de *O. mossambicus* en todas las concentraciones de PHA.

4.-El peso del bazo y la cantidad de esplenocitos en la suspensión celular fue significativamente mayor en *O. mossambicus* en comparación con *O. niloticus*.

CUCEBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## BIBLIOGRAFIA



**BIBLIOTECA CENTRAL**

**Ayson, F.G., Kaneko, T., Tagawa, M., Hasegawa, S., Grau, E.G., Nishioka, R.S., Bern, H.A. and Hirano, T.** 1993. Effects of acclimation to hypertonic environment on plasma and pituitary levels of two prolactins and growth hormone in two species of tilapia, *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis niloticus*. **Gen.-Comp.-Endocrinol.** 89(1):138-148.

**Bocek, A.** 1996. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Swingle Hall. Auburn University, Alabama, USA. <http://www.arizona.edu/azaqua/ata.html>

**Bardach, J.E., Ryther, J.H. y McLaren, W.O.** 1986. **Acuicultura crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce.** 1ª. Edición en Español. Editorial AGT Editor. Mexico. Pag 288-326.

**Barnabé, G.** 1996. **Bases Biológicas y Ecológicas de la acuicultura.** Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 496.

**Barta, O. and Oyekan, P.P.** 1981. Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** 2(4):209-221.

**Coll, M.J.** 1991. **Acuicultura marina animal.** 3ª. Edición. Ediciones Mundi-Prensa. pp. 672.

**DeKoning, J. and Kaattari, S.** 1991. Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness. **In Vitro Cell Dev Biol** 27 A (5):381-386

**Frese, J.T.** 1997 AquaSol, Inc. <http://www.fishfarming.com/tilapia.html>

**Faisal, M., Chiapelli, F.Cooper, E.L., Ahmed, I.I. and Weiner, H.** 1989. Social confrontation "stress" in aggressive fish is associated with an endogenous opioid-mediated suppression of proliferative response to mitogens and nonspecific cytotoxicity. **Brain-Behav-Immun** 3(3):223-33.

**Faisal, M., Marzouk, M.S., Smith, C.L. and Huggett, R.J.** 1991. Mitogen induced proliferative responses of lymphocytes from spot (*Leiostomus xanthurus*) exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environments. **Immunopharmacol-immunotoxicol.** 13(3):311-27

**Fuda, H., Harat, A., Yamasaki, F., and Kobayashi, K.** 1992. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum Salmon (*Oncorhynchus Keta*). *Dev.Com. Immunol.* University, Sapporo Hokkaido, Japan: 16:415-423.

**Fudenberg, H.H.; Stites, P.D.; Caldwell, J.L. y Wells, J.V.** 1982. **Inmunología clínica.** 3ª. Edición. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. México, D. F. Pag.390-406.

**García, M.L.J.** 1996. **Enfermedades bacterianas de las tilapias.** 19-27. Primer curso internacional de producción de Tilapia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F.

**Hepher, B. y Pruginin, Y.** 1991. **Cultivo de peces comerciales.** 3ª. Reimpresión. Noriega Editores. Editorial Limusa. México. pp. 316.

**Jakoby, W.B. and Pastan, I.H.** 1979. **Cell culture. Methods in Enzimology.** Academic Press. Inc. San Diego, California. Pag 466-477.

**Jiménez, G.F.** 1996. **Enfermedades de la Tilapia ocasionadas por parásitos.** 105-136. Primer curso internacional de producción de tilapia. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, D.F.

**Kinkelin, P., Michel, Ch. y Grittino, P.** 1991. **Tratado de las enfermedades de los peces.** Capitulo Inmunología. Editorial Acribia, S.A. España.

**Liewes, E.W., Van Dam, R.H., Vos-Maas, M.G. and Bootsma, R.** 1982. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 3(3):325-343.

**Morales, D.A.** 1988. **Manual técnico para el cultivo de la tilapia en los centros acuícolas de la Secretaría de Pesca.** 1ª edición. Secretaría de Pesca.

**Morales, D.A.** 1991. **La tilapia en México, biología, cultivo y pesquerías.** AGT Editor. México. pp.190

**Morilla, G.A.** 1989. **Inmunología Veterinaria.** 1ª. Edición en Español. Editorial Diana. México. pp 509.

**Morilla, G.A. y Bautista, G.C.R.** 1986. **Manual de Inmunología.** 1ª. Edición. Editorial Diana. México. pp.433.

**Nimmo, J.S.W.** 1991. In vitro lymphocyte stimulation by Concanavalin A and with histamine as a co-mitogen in dogs with atopic dermatitis. **Vet.Immunol. and Immunopathol.** 28: 67-80.

**Piper, G.R.; McElwain, B.I.; Orme, E.L.; McGraren, P.J.; Fowler, G.L. and Leonard, R.J.** 1992. **Fish Hatchery Management.** Chap. 5 Fish health management. Department of the interior U.S. Fish and Wildlife Service.

**Pullin R., S.V.** 1983. Choise of tilapia species for aquaculture. Pag. 64-67. In: Fishelson, L. and Yaron, Z. (Compilers). **Proceedings of the first International Symposium on tilapia in aquaculture.** Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel.

**Roitt, I.; Brostoff, J. y Male, D.** 1991. **Inmunología.** 2ª. Edición. Salvat Editores S.A. Barcelona España.

**Reina, M. y Auladell, C.** 1996. Curso Doctorado "Técnicas de estudio de líneas celulares. <http://porthos.bio.ub.es/biocel/practica/cap2.htm>.

**Rijkers, G.T.** 1981 Introduction to fishimmunology. **Dev.Com.Immunol.** 5:527-534.

**Roberts, R.J.** 1989. **Fish Pathology.** 2<sup>nd</sup>. Edn. Baillière Tindall, London.

**Rosenberg-Wiser, S. and Avtalion, R.R.** 1982. The cells involved in the immune response of fish. III. Culture requirements of PHA-stimulated carp *Cyprinus carpio* lymphocytes. **Dev.Comp.Immunol.** 6(4): 693-702.

**Sailiendri, K. and Muthukkaruppan V.** 1975. Morphology of lymphoid organs in a cichlid teleost. *Tilapia mossambica* (Peters). **J. Morphol.** 147(1): 109-121.

**Tizard, I.** 1995. **Inmunología Veterinaria.** 4ª. Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. Pag. 514-527.

**Totsuka, S.I.L.** 1997. **Efecto inmunorregulador de la tactivina in vitro en el ensayo de transformación blastoide de linfocitos T del Bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), a diferentes temperaturas bajo condiciones de estrés.** Tesis de licenciatura de la División de Ciencias Biológicas. U. de G. pp.74

**Van Muiswinkel, W.B.; Lamers, C.H.J. and Rombout, J.H.W.M.** 1991. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. **Res. Immunol.** 142: 362-366.

**Wilmer, E.N.** 1965. **Cells and tissues in culture, Methods Biology and Physiology.** Vol. 1. Chapter 6 Cell division. Pag. 203-237. Academic Press London.

CUCBA

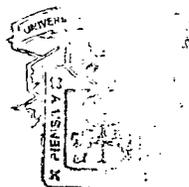


BIBLIOTECA CENTRAL

## ABREVIATURAS

<b>2-ME</b>	2-mercaptoetanol
<b><math>_3\text{H}</math></b>	Tritio
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bioxido de carbono
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
<b>I.E.</b>	Indice de estimulación
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>PCR</b>	Proteínas C reactivas
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PWM</b>	Fitolaca americana
<b>RI</b>	Respuesta inmune
<b>RIC</b>	Respuesta inmune celular
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI-1640</b>	Medio de cultivo (Roswell Memorial Park Institute-1640)
<b>SFT</b>	Suero fetal de temera
<b>SI</b>	Sistema inmune
<b>SSBH</b>	Solución salina balanceada de Hank's
<b>Tdr<sub>3</sub>H</b>	Timidina tritiada
<b><math>\mu\text{Ci}</math></b>	Microcurie
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Microgramo
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Microlitro

CIT



BIBLIOTECA