

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# **Regeneración de Blastómeros de Trucha Arco Iris *Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum 1792 (Pisces : Salmonidae)**

TESIS para optar el Título Profesional de BACHILLER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

:

**KARIN MARGOT FLORES GARRIDO**

**LIMA – PERÚ 2002**

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad regenerativa de blastómeros de *Oncorhynchus mykiss* de 60 horas de desarrollo utilizando vitamina A, insulina, suero 2% (v/v) de “Trucha arco iris” en estadíos previos y posteriores al desove y medio Leibovitz L-15. Primero se obtuvo la sangre de trucha anestesiando a los peces en un baño de clorobutanol (600 mg/ml). A partir de ello, la relación encontrada entre el peso del animal, el tiempo de sedación y el tiempo de recuperación fue directa y en promedio la inducción se realizó en un tiempo menor que el reportado para el anestésico. Luego, el suero de trucha obtenido fue tratado con varias temperaturas por separado, obteniéndose la inactivación de las proteínas del complemento sólo con el suero tratado a 30°C. A continuación, las concentraciones más adecuadas de vitamina A e insulina para obtener regeneración de blastómeros fueron 0.6 UI/ml de vitamina A y 0.7 UI/ml de insulina. Utilizando otros tipos de sueros, como los de mujeres grávidas y no grávidas, se estableció que ninguno de ellos son útiles para este tipo de cultivo por tanto la utilidad del suero de “Trucha arco iris” es específica en la concentración probada (2%v/v). Finalmente, cada uno de los elementos componentes del medio regeneratriz – vitamina A, insulina, suero de trucha, medio Leibovitz L-15- desempeñan diferentes roles en el proceso. En ausencia de vitamina A e insulina de manera simultánea, de vitamina A, de suero, y en presencia sólo de medio Leibovitz la capacidad regenerativa de los embriones fue casi nula a diferencia de los cultivos sin insulina. La vitamina A fue de mayor importancia debido a su rol morfógeno y la insulina jugó un papel permisivo en el proceso regenerativo. Los resultados de la ausencia del suero demostraron que este elemento es clave para mantener la adherencia entre los blastómeros del embrión de trucha mientras que el medio Leibovitz no tuvo ninguna participación en el proceso regenerativo.

Se establecieron las necesidades del proceso de regeneración de blastómeros de “Trucha arco iris”, basado en la importancia de cada uno de los factores que contribuyeron en el proceso regenerativo, con concentraciones adecuadas de vitamina A e insulina necesarias para desencadenar dicho fenómeno. Su aplicación futura es de suma relevancia tanto en acuicultura, medicina veterinaria y medicina humana.

## SUMMARY

The regenerative capacity of the 60 hours development *Oncorhynchus mykiss* blastomeres was evaluated utilizing vitamin A, insulin, pre or post-spawning rainbow trout serum 2%(v/v) and medium Leibovitz L-15. First, trout blood was obtained when the fishes were anesthetized with a bath of clorobutanol at 600 mg/ml. The relationship among animal weight, sedation time and recovery time was proportionally direct and the induction is realized in a less time than the reported for the anesthetic. Then, the trout serum obtained was treated with several temperatures, the proteins complement inactivation was optimal on treated serum at 30°C. Next, the more adequate concentrations of vitamin A and insulin for blastomeres regeneration were 0.6 IU/ml vitamin A and 0.7 IU/ml insulin. Using another kind of sera such as from pregnant and non-pregnant women, it is found out that no one was useful for the culture, so the usefulness of rainbow trout serum is specific in the proven concentration (2% v/v). Finally, each regenerating medium components – vitamin A, insulin, trout serum, medium Leibovitz– have different roles into the process. Without vitamin A and insulin of simultaneous manner, without vitamin A, serum and only utilizing medium Leibovitz the embryos regenerative capacity was almost null. The vitamin A was the more important factor to its morphogenic role and the insulin played a permissive paper in the regenerative process. The results from free-serum culture showed that element is key to maintain the adherence between blastomeres of trout embryo while medium Leibovitz had no participation into regenerative process. It is established the necessities for regeneration process in rainbow trout blastomeres, based on the importance of each factors that contributed for regeneration with adequate concentrations of vitamin A and insulin to trigger this phenomenon. Its application is relevant in aquaculture, veterinary and human medicine.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente el término “regeneración celular” se aplica clínicamente en pacientes al transplantar células embrionarias en el lugar de la afección para promover la regeneración de tejidos diferenciados (Lewis, 2001). Se han estudiado episodios regenerativos en todas las clases de vertebrados, como en: aves, reptiles, anfibios y peces, pero con poco éxito en los mamíferos. En peces, las células embrionarias de estadios tardíos se regeneran con sorprendente éxito pero algunas características, como por ejemplo el tamaño, podrían verse disminuidas, aunque en *Oncorhynchus mykiss* es un fenómeno natural la regeneración de partes del sistema nervioso central en individuos adultos (Hieber, et al., 1998). Estos criterios podrían aplicarse en la producción de nuevos individuos de mejor calidad y reducir la tasa de mortalidad que se eleva hasta niveles alarmantes entre los meses de junio a diciembre en el Valle del Mantaro. Los huevos fertilizados (ovas embrionadas) producidas en esta época son pequeñas y poco resistentes al menor golpe o la más leve sacudida producidos muchas veces al momento de limpiar el lugar de incubación, lo que conlleva a la muerte del blastodermo.

Surge la posibilidad de la utilización de la vitamina A debido a que es una sustancia regenerante (Jangir, et al., 2001) pero hasta el momento no se han reportado concentraciones efectivas de esta vitamina para regenerar embriones de peces en estadios embrionarios tempranos. Lo que se ha comprobado es la manipulación exitosa *In vitro* de blastómeros de *O. mykiss* (Calvi y Maisse, 1998) por lo que se puede predecir un potencial regenerativo en etapas tempranas del desarrollo embrionario.

En nuestro país, se requiere incrementar la producción de embriones de “Trucha arco iris” para evitar la importación de ovas embrionadas y la tasa de mortalidad característica del período de desarrollo más temprano el cual es el más crítico de la incubación. La importación de ovas embrionadas es la alternativa usada hasta el momento para apoyar la producción de carne en las piscigranjas, pero a su vez es el camino más directo para la introducción de nuevos patógenos de naturaleza bacteriana o viral, lo cual repercute ambiental y económicamente a largo plazo en la piscigranja.

## ANTECEDENTES

En la regeneración celular ocurre un fenómeno en particular, la zona de crecimiento mesenquimal o blastema y la epidermis cicatrizante se convierten en fuentes de ácido retinoico (Brockes, 1996) cuyas concentraciones excretadas van desde 0.1 hasta 1nM (Viviano et al., 1995), o específicamente del retinoide 9-cis ácido retinoico (Viviano y Brockes, 1996) ambos procesados a partir de la vitamina A, luego de que el blastema se formara 9 horas después del daño. Un derivado de la vitamina A es el ácido retinoico, morfógeno que se encuentra endógenamente en peces (Maden et al., 1996) y en otros vertebrados. La primera vitamina en reportarse fue la vitamina A, identificada en 1913 por dos grupos de investigadores (McCullum y Davis, 1913; Osborne y Mendel, 1913) y Karrer (1931) fue quien dio a conocer su estructura, descubriéndose su rol vital en el crecimiento, desarrollo, reproducción, regeneración, diferenciación celular, comunicación célula a célula durante el desarrollo embrionario además de prevenir la reabsorción del feto por parte de la madre (Mills et al., 1997). En la naturaleza la vitamina A es liposoluble, pero se puede acotar que puede ser producida comercialmente en forma hidrosoluble a 20°C cuyo aspecto es de líquido claro de color amarillo y viscoso, y donde una unidad internacional (UI) equivale a 0.3 µg de retinol (Merck, 1999/2000). La forma inactiva retinol o vitamina A es oxidada mediante las enzimas alcohol o retinol deshidrogenasas ADH1 y ADH4 para formar retinal el que luego se convierte en ácido retinoico por medio de las aldehído o retinal deshidrogenasas ALDH1 y RALDH2 (Duester, 2000). El ácido retinoico unido a las proteínas citoplásmicas de unión al ácido retinoico CRABP entra al núcleo (McCullough et al., 1999) donde se une y activa dos familias de factores de transcripción, los receptores de ácido retinoico RAR y los receptores de retinoides X RXR

los cuales se van a unir a genes o elementos de respuesta al ácido retinoico (**Maden, 2000**) involucrados en los procesos más tempranos de la embriogénesis y en la regeneración (**King et al., 1993**). Tanto retinol como retinal son llamados vitamina A pre formadas (**Groff et al., 1995**). Pero el efecto regenerante de la vitamina A puede tener diferentes resultados dependiendo de su modo de administración, como ejemplo tenemos que localmente causa reducciones esqueléticas a diferencia de su administración por inmersión (**Scadding y Maden, 1986**) la que es menos dañina. Hay tejidos que necesitan un tratamiento previo con vitamina A para aumentar el índice de efectividad en la reparación celular (**Klein, 1975**) pero el exceso de retinoides es contraproducente por lo que la concentración aplicada es decisiva en la proliferación celular (**Tang et al., 2002**). Estas apreciaciones se condicen con los resultados sorprendentemente favorables que han sido estudiados en la regeneración de la región ocular de *Bufo melanostictus* con 15UI/mL de vitamina A en inmersión (**Jangir et al., 2001**).

Pero la regeneración no se apoya solamente en un grupo de sustancias mitogénicas sino también requiere de la participación de factores de crecimiento entre los que se encuentra la insulina (**Michalopoulos y De Frances, 1997**). La presencia de los factores de crecimiento semejantes a insulina ha sido reportada en aves, reptiles, anfibios y peces. Los factores de crecimiento semejantes a insulina I y II de “Trucha arco iris” son 79.6% y 64.8% homólogas (**Méndez et al., 2001**) y poseen una identidad de 70.8% y 53.6% y una similaridad de 79.6% y 64.8% con las I y II humanas respectivamente y con la insulina de “Salmón coho” ambas son 40.2% y 41.1% idénticas y 62.2% y 62.3% similares respectivamente (**Shamblott y Chen, 1992**). El factor de crecimiento semejante a insulina I humano y el de pez tiene el mismo efecto tanto en bioensayos efectuados sobre células de



peces como de mamíferos; se expresa en todos los estadios del pez desde huevos no fertilizados hasta adultos y con la insulina exógena se estimula la proliferación celular (Duan, 1998). La concentración de insulina en cultivo es importante, menos de 0.5ng inhibe el desarrollo de embriones normales de rata (Pratten, 1997) pero con 5? g/ml de insulina se obtuvo ovulación *in Vitro* en ovarios de ratón (Rose et al., 1999).

Para lograr que la vitamina A y la insulina ingresen al interior del embrión de pez estas deben pasar por todas las capas que ofrece la ova embrionada. Además se debe tener en cuenta que la permeabilidad de los embriones de peces no está bien entendida, el blastodermo y el vitelo son sus más grandes compartimientos y ambos poseen permeabilidades muy similares ya que el vitelo está encerrado por la membrana vitelina (Hagedorn et al., 1998), barreras que no son fáciles de traspasar. El embrión típico de un teleosteo se compone del embrión en desarrollo propiamente dicho y un gran saco de vitelo, ambos rodeados por una cubierta selectivamente permeable, la zona radiata, con un espacio perivitelino entre ella y el saco vitelino (Eddy, 1974). Para los embriones estas estructuras representan un gran obstáculo en la captación de sustancias desde el exterior, haciéndose necesaria que estas barreras de permeación sean retiradas. Para ello la zona radiata puede eliminarse mediante una técnica de tres pasos (Schantz, 1985). Pero esta técnica aún deja la capa sincitial intacta la que es otra barrera más. En otro reporte los embriones de “Trucha arco iris” de 60 horas de incubación a 10°C fueron despojados manualmente de todas sus envolturas y de su vitelo, luego fueron disgregados en un medio sin calcio para que pueda penetrar una sustancia crioprotectora en el interior de los blastómeros aislados y finalmente éstos se reagregaron con gran éxito en medio Leibovitz L-15 enriquecido con 2% (v/v) de Ultrosor U el cual es un suero sintético (Calvi y Maisse, 1998). Pero cuando la zona radiata

es removida, el embrión requiere calcio adicional y tiene que ser mantenido en un medio que pueda soportar su crecimiento (**Westerfield, 2002**). Frente a estas condiciones, las estrategias de cultivo celular son diversas dependiendo de las necesidades del material en cultivo. Por ello se puede intentar el cultivo en medio LDF, el cual es una mezcla de Leibovitz L-15, Dulbecco modificado por Eagle y Ham F-12 en la proporción 5:3:2, con 0.15mg/ml de bicarbonato de sodio, 15mM de HEPES pH 7,  $10^{-8}$  M de selenio, 200UI/ml de penicilina, 200<sup>?</sup>g/ml de sulfato de estreptomicina, 25<sup>?</sup>g de ampicilina, 10<sup>?</sup>g/ml de insulina, 20ng de factor de crecimiento epidérmico, 2% de suero de “Trucha” y 10% de suero bovino fetal (**Ma y Collodi, 1996**). En el caso de células más grandes como las de ovocitos en maduración de pez, el medio base se puede suplementar con 100mg de sulfato de estreptomicina, 60mg de penicilina G-sódica y 1.2g de bicarbonato de sodio (**Patiño y Thomas, 1990**). Hay soluciones que también otorgan todas las condiciones fisiológicas como la solución Ringer modificada para peces que se compone de diversas sales (**Harvey y Ashwood-Smith, 1982**). Estas formulaciones de cultivo se apoyan en el conocimiento de que los embriones en desarrollo de los animales ovíparos dependen de las reservas de vitelo (**Hartling et al., 1997**) y los embriones de pez son muy exigentes en cuanto a la demanda de nutrientes. Por ello el crecimiento óptimo de las células en cultivo requiere de suero en el medio.

En las células procedentes de tejido diferenciado de vertebrados, entre ellos los peces, existe un factor que controla dicho estado diferenciado que al ser retirado inicia la regeneración (**Mitashov, 1996**). Por ello, para estudios de regeneración, el uso de células madre es preferible al uso de células diferenciadas aunque el tejido producido *in Vitro* a partir de ellas sea anormal en cuanto a apariencia, función, etc. (**Stocum, 2000**). A partir de

esto se desprende que la apariencia de los blastómeros en cultivo es importante porque mientras mayor sea el número de características normales mayor será la sobrevivencia de los embriones (**Shields et al., 1997**).

Para que ocurra la regeneración existen sustancias como el suero que suplementan al medio de cultivo que se utiliza para regenerar al embrión. En este suero se encuentran las proteínas del complemento las que son termolábiles y cuya actividad en los peces se ha estudiado en base a la actividad hemolítica del suero la cual es indicadora de la vía lítica y que se expresa altamente de 15 a 20°C y aún entre 0 a 4°C, para peces de aguas frías su inactivación procede en la exposición del suero entre 40 a 45°C por 20min (**Holland y Lambris, 2002**) mas en los humanos la inactivación de la actividad del complemento del suero o del plasma se realiza a 56°C por 30 min equivalente a 60°C por 20 min (**Ogundele, 1998**). El sistema del complemento incluye un grupo de proteínas plasmáticas y de receptores celulares que juegan un rol importante en las respuestas inmunes específicas y no específicas, desde los teleósteos hasta los mamíferos, tanto en la vía clásica como en la alterna (**Sunyer et al., 1998**), en los peces es muy desarrollado, juega un rol muy importante y tiene características únicas como la hemólisis de muestras provenientes de ovejas, cabras, perros o conejos (**Sunyer et al., 1997**) al detectar a estas células como extrañas, siendo su presencia un factor condicional para cultivos celulares.

En la finalidad de un mejor entendimiento, actualmente se encuentran en estudio el rol de los factores de crecimiento y los morfógenos en la regeneración (**Needleman et al., 2002**) en cultivos *in Vitro*, además del suero. El estudio de la regeneración ha conllevado a la aparición de la Biología Regenerativa la que estudia los mecanismos de regeneración

natural de los tejidos, intenta comprender las diferencias entre tejidos regenerantes y no regenerantes y a su vez marca el inicio del desarrollo de la Medicina Regenerativa (**Stocum, 2002**) por medio de la cual en el futuro el trasplante de células competentes para la regeneración y el de tejidos producidos *in Vitro* o la inducción de la regeneración *In vivo* a partir de los tejidos adyacentes a la zona involucrada utilizando sustancias regenerantes serán técnicas usadas de manera convencional (**Brittberg et al., 1994**).

En vista de todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de la tesis fue determinar los requerimientos mínimos y esenciales para el proceso de regeneración en embriones de estadíos tempranos de “Trucha arco iris” en base al rol que cumplen los suplementos en la regeneración de blastómeros en esta especie y la utilidad de sueros no específicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

Los peces fueron provistos por el Centro Piscícola “El Ingenio” dependencia perteneciente a la Dirección Regional de Pesquería del Consejo Transitorio de Administración Regional CTAR-Junín. Fueron alimentados con alimento balanceado tipo reproductor pigmentante. Las ovas utilizadas correspondieron a las producidas entre los meses de Julio y Noviembre de 2001 (invierno y primavera) y entre Agosto y Setiembre de 2002, a partir de hembras de primer desove. El clima en este período se caracterizó por una intensa radiación solar y gran sequedad en invierno, y por intensas precipitaciones y nubosidad en primavera.

### SEDACIÓN DE LOS PECES

Fue preparada una solución de clorobutanol de 600 mg por litro (**Stosskopf, 1993**) disueltos en un recipiente de plástico de 40 litros con agua de estanque donde los peces fueron colocados con una canastilla sin haberse alimentado 24 horas antes. El efecto del estrés por manipulación es importante y debe ser minimizado para que su recuperación sea lo más pronto posible, para lo cual el baño de anestesia debe durar sólo lo necesario, tener la misma temperatura del agua del estanque de crianza, ser bien oxigenado al igual que el lugar de recuperación (**Summerfelt, 1990**). El tiempo en el cual se produjo el adormecimiento fue considerado desde que el animal era incluido en el recipiente (Foto 1) hasta cuando ya no mantenía su posición de nado sino que flotaba mostrando su región

ventral (Foto 2). Así anestesiado se le regresó al estanque. Se llamó tiempo de recuperación al período comprendido desde el instante del adormecimiento hasta que nuevamente comenzó a nadar libremente. Fueron registrados los pesos corporales de los diferentes animales analizados. En la última década el uso de los peces, entre los que destaca *O. mykiss* y otros salmónidos, se ha incrementado y para ello se necesita una analgesia efectiva con amplio margen de seguridad. Casi todos los protocolos que involucran peces requieren del manejo físico de los animales para lo cual la sedación es una opción para reducir el dolor e inmovilizar al pez durante el procedimiento sin parar el latido cardíaco, los numerosos anestésicos reprimen el sistema nervioso, hipnotizan al pez, etc. (**McFarland y Klontz, 1969**). Existe una lista numerosa de anestésicos para salmónidos entre los que se encuentra el clorobutanol el cual es un cristal incoloro o blanco de olor alcanforado característico.

#### OBTENCIÓN DE LOS SUEROS HUMANOS Y DE TRUCHA

La sangre humana, tanto de mujer grávida como de no grávida, fueron colectadas directamente de la vena, se dejó reposar a temperatura ambiente hasta que se separó el suero de la fase forme. La sangre de trucha fue obtenida de hembras en estadios previos o posteriores al desove por punción de la arteria caudal con una jeringa de 5 ml con aguja de 21 G – ½ heparinizada debido a la rápida formación de coágulo. Luego, la sangre fue transferida a tubos de prueba de vidrio de 10 x 1.2 cm previamente heparinizados. Todas las sangres fueron centrifugadas a 2000 rpm por 15 min. El suero recuperado fue colectado con pipeta Pasteur provista de chupón. Los tubos con los diferentes sueros colectados fueron sellados con láminas de parafilm y guardados por separado a 4°C (**Sunyer et al.,**

**1996; Sunyer et al., 1997; Sunyer et al., 1998; Hartling et al., 1997).** Es importante señalar que para obtener sangre a partir de los lugares principales que tiene el pez para este fin: arteria caudal, corazón o vena dorsal es necesaria la anestesia de los animales a fin de reducir el estrés ya que su delicada piel es una barrera osmótica para ellos (**Hoar y Randall, 1969**).

#### INACTIVACIÓN DE LOS SUEROS

Los sueros humanos fueron tratados a 56°C por 30 min en baño maría (**Ogundele, 1998**). El suero de trucha fue tratado con diferentes temperaturas, las cuales fueron 56, 54, 52, 50, 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 31, 30, 29 y 28° C en baño maría, todos por 30 min

#### FERTILIZACIÓN DE LAS OVAS

Primero fueron seleccionados peces machos y hembras óptimos para la reproducción. Los peces hembra fueron desovados por masaje abdominal sobre el bastidor. Inmediatamente después, los ovocitos obtenidos fueron lavados con solución salina al 1% (Anexo A), trasladados a un tazón de fierro enlozado sobre el cual fue vertido el semen del pez macho. Veinte minutos después, el semen excedente fue lavado y las ovas fueron depositadas en un recipiente con agua del mismo estanque para ser hidratadas por espacio de una hora. Luego de este período, la cantidad de ovas producidas fue evaluada por el método de Von Bayer (**Blanco, 1995**). Finalmente, las ovas hidratadas fueron colocadas en un bastidor más grande dentro de la poza de incubación para continuar con su desarrollo

(Foto 3). El momento considerado como tiempo inicial del período de fecundación fue el instante preciso en que se unieron el semen y los óvulos.

## DISECCIÓN DE EMBRIONES

Aproximadamente veinte embriones que cumplieron las 60 horas de desarrollo fueron colectados con ayuda de una pluma de ave dentro de una vasija cilíndrica de vidrio 10 x 5 cm con agua de su propio estanque. La pluma de ave fue utilizada para evitar que el traslado de las ovas desde el bastidor hacia el recipiente de vidrio no fuese demasiado brusco, asimismo es un método utilizado en la Piscigranja para la manipulación de las ovas embrionadas a lo largo de todo el desarrollo embrionario, ya sea para limpieza del estanque de incubación o para el traslado de ovas embrionadas de una sala de incubación a otra. El transporte de la sala de incubación al laboratorio fue realizado en condiciones de oscuridad puesto los primeros tejidos en formación son los tejidos nerviosos y la luz podría dañarlos y por supuesto matar a los embriones, de manera que muy pocos sobrevivirían al transporte; además, la incubación de los embriones es realizado en condiciones de oscuridad, de esta manera se evitó la introducción de un agente disturbante que pudiese propiciar la muerte de los blastómeros. En el laboratorio cada uno de los embriones fue colocado en una placa petri de vidrio de 10 x 2 cm con solución Ringer modificada para peces (Foto 4, Anexo B) y con ayuda de una pinza punta roma. La extracción de los blastómeros bajo el microscopio estereoscópico fue realizada sujetando a la ova embrionada con la pinza punta roma por el lado izquierdo y mostrando al embrión en posición frontal a los objetivos del microscopio. Con la aguja de 25 G  $\frac{1}{2}$  acondicionada a una jeringa de 1 ml fue hecha una pequeña punción en el lado derecho y por el lado izquierdo se presionó con una pinza para extraer el



vitelo por el lado perforado. En este mismo lado, con una pinza punta fina y con la misma aguja fueron retiradas las membranas cuidadosamente tratando de no dañar los blastómeros (Esquema 1).

## PRUEBA DEL ESTADO DE INACTIVACIÓN DEL SUERO DE “TRUCHA ARCO IRIS”.

Se colocaron gotas de suero sin inactivar y suero tratado con 32, 31, 30, 29 y 28°C en sendas placas petri de poliestireno de 10 x 1.5 cm. Por cada suero se hicieron 10 repeticiones, cada repetición estuvo conformada por seis placas y en cada placa hubieron seis gotas del suero correspondiente. En cada gota fue sembrado un blastómero entero, sin ningún daño.

## EMBRIOTOLERANCIA DE VITAMINA A E INSULINA

Las concentraciones de insulina utilizadas (nombre comercial: Humulin N) estuvieron entre 0.5µg/ml equivalente a 0.7UI/ml (Rose et al., 1999) y 0.5 ng/ml de insulina (Pratten, 1997). Como los tejidos en regeneración sintetizan desde 0.1 hasta 1nM de retinoides (Viviano et al., 1995) se utilizaron concentraciones superiores a 1nM, el cual equivale a 0.6UI/ml. De esta manera, las concentraciones probadas de insulina fueron 0.7, 0.4 y 0.2UI/ml; mientras que las de vitamina A fueron 2.6, 1.3 y 0.6UI/ml (Anexo C). Estas seis concentraciones fueron probadas combinadas entre sí en placas petri de poliestireno con medio de cultivo Leibovitz L-15 (Gibco 41300-039) suplementado con antibióticos (Anexo D) y suero de trucha al 2% del volumen total (Calvi y Maisse, 1998, Esquema 2).

Todas las placas fueron cubiertas a fin de brindar la misma oscuridad de la sala de incubación, dejando una ventilación adecuada. El sembrado y la evaluación de los resultados fueron realizados por visualización directa bajo el microscopio estereoscópico y el microscopio compuesto, considerando como vivos a los embriones que se adhirieron a la placa petri sin alterar su morfología (**Shields et al., 1997**) y como regenerados a aquellos embriones cuyo plano de corte no era tan definido, sino más bien irregular (**Viviano et al., 1995**).

#### EFFECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES TIPOS SÉRICOS

Fueron utilizados medio de cultivo Leibovitz L-15 con antibióticos y las concentraciones estandarizadas de insulina y vitamina A, con dos diferentes tipos séricos por separado –sueros de mujer grávida y de mujer no grávida- y en la misma proporción (2%v/v).

#### ROL DE LA VITAMINA A, INSULINA, SUERO Y MEDIO LEIBOVITZ EN LA REGENERACIÓN

Para determinar el rol de cada suplemento fueron realizados los siguientes tratamientos: el primero consistió de medio de cultivo Leibovitz L-15, suero de trucha 2% v/v e insulina, sin vitamina A. En el segundo tratamiento fueron usados medio de cultivo Leibovitz L-15, vitamina A y suero de trucha 2%v/v, sin insulina. El tercer tratamiento sólo utilizó medio de cultivo Leibovitz L-15. El cuarto tratamiento incluyó medio de cultivo Leibovitz L-15 y suero de trucha 2%v/v, sin insulina ni vitamina A. Finalmente, en el

quinto tratamiento fueron probados medio de cultivo Leibovitz L-15, insulina y vitamina A, sin suero de trucha. Las concentraciones de vitamina A e insulina utilizadas en esta prueba fueron las concentraciones estandarizadas para regeneración.

## MUESTRAS

Para la Prueba de inactivación del suero de “Trucha arco iris” se utilizaron sólo blastómeros enteros (Foto 5). Para las muestras control se sembraron blastómeros en suero sin tratar con calor, y las muestras problema se sembraron en sueros tratados con 28, 29, 30, 31 y 32°C. En los demás tratamientos las muestras control fueron embriones disectados enteros y sin daño. Las muestras problema fueron blastómeros cortados por la mitad con bisturí No. 11 (Foto 6).

## ESPACIO MUESTRAL

Se utilizaron 10 placas petri en cada una de las cuales se colocaron seis gotas de suero, inactivo o no, para la verificación del estado de inactivación del suero de trucha; en cada gota fue sembrado un embrión entero y cada placa constituyó una repetición. En la prueba de embriotolerancia, se utilizaron 1080 placas repartidas en seis muestras problema y seis muestras controles cada uno de ellos cultivados en placas diferentes, 9 tratamientos y 10 repeticiones. Al probar la efectividad de los tres diferentes tipos séricos, se utilizaron 320 placas distribuidas en seis muestras problema y seis muestras controles, sembradas en placas diferentes con 10 repeticiones por tipo sérico. En las demás pruebas, se utilizaron

120 placas en las cuales hubieron seis muestras controles y seis muestras problemas sembradas por separado y por cada repetición, donde el total de repeticiones fue 10.

## PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Las pruebas estadísticas utilizadas fueron: Análisis Exploratorio de datos, Diseño Factorial, Correlación de Pearson, Prueba Dunnett, Análisis de Varianza ANOVA y Prueba de Tukey. Todas ellas fueron realizadas con un nivel de significación de 0.01 utilizando el paquete estadístico SPSS.

## CONDICIONES DE ESTERILIDAD

Los instrumentos de metal, vidrio y otros fueron autoclavados a 121°C por 15 min o fueron expuestos en un horno para esterilización al seco a 180°C por 30 min. El lugar de cultivo – pisos y mesas - fue convenientemente mantenido limpio y asépticamente mediante limpieza con alcohol de 96°. El alcohol de 70° fue utilizado como combustible de los mecheros. La vestimenta usada constó de mandil, mascarilla, gorro y botas de tela previamente autoclavados.

## TEMPERATURA DE TRABAJO

Fue siempre entre 11 y 12 °C

## REGISTRO FOTOGRÁFICO

Las macrofotografías fueron realizadas con cámara fotográfica tipo Réflex y película asa 100; las microfotografías fueron desarrolladas en película asa 100 y con cámara incorporada al microscopio. Las demás fotos fueron obtenidas con cámara fotográfica de 125 mm y película asa 400

## RESULTADOS

La anestesia de los peces fue realizada para la extracción de sangre en los peces como se ha mencionado anteriormente. El análisis de los resultados (Tabla 1) indicaron que existe una correlación significativa entre el tiempo de sedación, peso del animal y tiempo de recuperación ( $p < 0.01$ ). La relación entre estos tres grupos fue directa (Fig. 1). El tiempo de inducción promedio fue de 38.3 seg y el tiempo de recuperación promedio fue 218.3 seg. Ninguno de los animales sufrió daño o muerte durante las pruebas.

Una vez obtenido el suero de “Trucha arco iris”, durante la inactivación del complemento inicialmente se observó la formación de precipitado en diversa gradación (Fotos 7, 8 y 9) a partir del tratamiento térmico con 31°C hasta 56°C (Tabla 2). Las temperaturas probadas con los blastómeros reflejaron un efecto significativo en la integridad del embrión ( $p < 0.000$ ). Las comparaciones múltiples a partir de los resultados obtenidos (Tabla 3) mostraron que 30°C es la temperatura más adecuada para la inactivación del complemento de “Trucha arco iris”, con un tiempo de exposición de 30 min, por encima de las demás temperaturas probadas ( $p < 0.000$ , Fig. 02). La inactivación de las proteínas del complemento se verificó en base a la integridad de los blastómeros, contrariamente a cuando el suero estaba activo. En este último se producía muerte celular y disgregación de los blastómeros aún cuando los embriones acababan de sembrarse (Foto 10).

Con la inactivación de las proteínas del complemento del suero del pez, los elementos que participaron en la regeneración estuvieron listos para usarse. Los resultados de blastómeros regenerados mostrados en la Tabla 4 y el análisis estadístico estableció que la concentración de vitamina A más favorable para la regeneración fue 0.6UI/ml (Fig. 03, 04 y 05) mientras que la dosis más efectiva de insulina fue 0.7UI/ml (Fig. 06), asimismo 0.6UI/ml de vitamina A fue la dosis más regenerativa para las diferentes dosis de insulina en los diferentes tratamientos. Las concentraciones de vitamina A 2.6 y 1.3 UI/ml; 0.2 y 0.4 UI/ml de insulina tuvieron mayor dispersión en los datos mostrados (Fig. 07). Aproximadamente el 93% de la variabilidad alcanzada en las respuestas de los embriones se debió a los tipos de muestras -control y problema ( $p < 0.000$ )- a las dosis de insulina ( $p < 0.005$ ), a las dosis de vitamina A ( $p < 0.000$ ), así como a la interacción muestras -vitamina A y la interacción dosis de vitamina A - insulina (Cuadro 05,  $R^2_{\text{ajust}} = 0.928$ ). En el análisis de varianza las dosis de vitamina A e insulina afectaron significativamente el proceso regenerativo ( $p < 0.000$ ) y el mismo resultado, pero con menor efecto, se observó con las muestras y la Vitamina A ( $p < 0.004$ ). Las interacciones entre las muestras con las dosis de insulina y entre las muestras, dosis de insulina y dosis de vitamina A no afectaron el proceso regenerativo. La mejor tasa de regeneración se obtuvo con el protocolo conformado por 0.7UI/ml de insulina y 0.6 UI/ml de vitamina A (Fig. 08). El análisis de Comparaciones múltiples mostró que existen diferencias entre la muestra control y la muestra problema ( $p < 0.000$ , Fig. 9 y 10). Los embriones control ayudaron a descartar cualquier efecto detrimental que no fuese producido por las sustancias participantes en los diferentes protocolos de manera que los controles con 0.6UI/ml de vitamina A fueron los que mejor soportaron la composición del medio ( $p < 0.000$ ). La concentración 0.7UI/ml de

insulina se diferencia significativamente de 0.4UI/ml ( $p?0.001$ ) pero no de 0.2UI/ml. Este análisis corroboró que la dosis 0.6UI/ml de vitamina A produjo una tasa de regeneración promedio mayor que las obtenidas con 2.6UI/ml ( $p?0.000$ ) y 1.3UI/ml ( $p?0.000$ ) (Cuadro 09) y que el tratamiento conformado por 0.6UI/ml de vitamina A y 0.7UI/ml de insulina era el más efectivo ( $p?0.000$ ) dado que estas concentraciones son las máximas y mínimas respectivamente para que estas sustancias puedan desencadenar el proceso regenerativo. Los blastómeros regenerados, tal como se esperaba, mostraron un borde irregular en el plano de corte (Foto 11) mientras que los blastómeros no regenerados se destrozaron y desagregaron (Foto 12).

Pero al reemplazar el suero de “Trucha arco iris” por el suero de mujer grávida o por el suero de mujer no grávida, se registró una tasa regenerativa casi nula y una muy escasa tolerancia de los embriones control en este último suero. El panorama mejoró un poco tanto para los problema como para los controles en el caso del suero de la mujer grávida y fue excepcional al usarse suero de “Trucha arco iris” ( $p?0.01$ , Tabla 5, Fig. 11), cada tipo sérico condicionó el cultivo de manera diferente en un 94.5% al igual que el tipo de muestra usada (control y problema). Al comparar el efecto del suero de “Trucha arco iris” con los sueros humanos, el suero de pez se mostró muy superior ( $p?0.000$ , Fig. 12). A pesar de la respuesta regeneracional mínima de los sueros humanos, el suero de mujer grávida fue más efectivo que el suero de mujer no grávida. El tipo de muestra también se comportó de manera diferente en los tres tipos séricos probados donde la muestra problema toleró con mayor eficiencia los sueros utilizados ( $p?0.000$ ).



Al realizar los cultivos por exclusión de vitamina A, insulina y suero se probó el rol que cumple cada uno de suplementos en la regeneración. Los cultivos carentes de vitamina A e insulina en simultáneo verificaron la interacción de ambas sustancias y el cultivo sólo en medio Leibovitz L-15 evaluó la participación de este medio en el proceso regenerativo. El comportamiento de los elementos del medio regenerante mostrado en la Fig. 13 indican que la vitamina A, el suero, el medio y la presencia concomitante de vitamina A e insulina son realmente importantes en la regeneración, además existe interacción significativa entre todos los elementos participantes en la regeneración, incluso con la insulina ( $p < 0.000$ ). El mismo análisis estableció que el 76.9% de la variabilidad de la capacidad regenerativa embrionaria se debió a todos ellos ( $R^2_{\text{ajust}}=0.769$ ). Los embriones control por lo general toleraron bien los medios probados, mas los embriones problema respondieron según la composición del medio. En ausencia de vitamina A (Tabla 6) y suero (Tabla 7), en el cultivo sólo con medio Leibovitz (Tabla 8) y sin vitamina A ni insulina simultáneamente (Tabla 9) los embriones regeneraron pobremente y de manera similar en todos ellos, en cambio el efecto de la ausencia de insulina (Tabla 10) se diferencia significativamente de los demás en el proceso regenerativo ( $p < 0.000$ ). Hubo desagregación de blastómeros en ausencia de suero (Foto 13).

## DISCUSIÓN

La concentración de clorobutanol utilizada cumplió efectivamente con las características de un buen anestésico tales como analgesia, buena inmovilización, inducción rápida del adormecimiento y rápida recuperación en concordancia con las fases de la sedación las cuales se observaron muy definidas, como en el momento de la inducción donde el pez nadaba erráticamente y con poco equilibrio, y la fase de anestesia que en sí se caracteriza por la anulación del movimiento opercular con el cuerpo en plano quirúrgico **(De Tolla et al., 1995)** demostrando con ello ser ideal para peces grandes como es el caso de los peces en estadio reproductivo. Los tiempos promedio obtenidos para inducir la sedación y el tiempo de recuperación fueron mucho menores frente a los esperados 3 min y 6 a 20 min respectivamente por lo que es importante tomar en cuenta la relación encontrada entre el peso del animal y el adormecimiento, deduciéndose que la relación inducción del adormecimiento – tiempo de recuperación es directa, condición que permite la manipulación del tiempo de sedación dependiendo de la finalidad del mismo pero sin llegar a niveles de letalidad dado que el clorobutanol causa la muerte de los animales en todas sus concentraciones **(Stosskopf, 1993)**. La elección de la inmersión como vía de administración del anestésico fue adecuada para la extracción de sangre puesto que esta actividad requiere obligatoriamente de un manejo prolongado y cuidadoso del animal **(Hoar y Randall, 1969)**.

En cuanto a la temperatura de inactivación de las proteínas del complemento del suero, la temperatura obtenida como la más adecuada se encontró dentro del rango de las temperaturas esperadas para peces que habitan aguas frías **(Holland y Lambris, 2002)**

como es el caso de la “Trucha arco iris”, y siempre teniendo en cuenta que dicha temperatura se aplicó por espacio de 30 min. El hecho de verificar la destrucción o integridad de los blastómeros nos sirvió como indicador de la actividad del complemento a partir de la capacidad de este conjunto de proteínas de lisar células por medio de la vía alterna (**Sunyer et al., 1997**) la cual se activa al detectar células como si fuesen agentes extraños. Si esta fuese la vía utilizada en la lisis celular, a 30°C por 30 min se destruirían las proteínas C2, C3b, Ba, Bb y C5. Los blastómeros no toleraron los sueros tratados con temperaturas mayores a 30°C al parecer debido a que por encima de esta temperatura los factores de adhesión celular además de otros componentes favorables para la integridad del embrión habían sido desnaturalizados, mientras que por debajo de esta temperatura las proteínas del complemento aún estarían activas. La desnaturalización de los diversos componentes proteicos del suero se evidenció por intermedio de la precipitación observada desde los sueros tratados a 56°C hasta los tratados a 31°C

La respuesta regenerativa efectiva mostrada con la mejor dosis de vitamina A demostró que el embrión de “Trucha arco iris” de 60 horas de desarrollo fue capaz de captar la vitamina A del medio y transformarla *in Vitro*. El metabolismo de la vitamina A se realiza mediante una cascada de reacciones en las cuales el retinol se oxida para formar retinal y este último se convierte en ácido retinoico sustancia que va a desencadenar el proceso regenerativo (**Duester, 2000**). El procesamiento de la vitamina A se realizó cuando los blastómeros regenerados al igual que un epitelio en cultivo, cubren el plano de corte convirtiéndose en fuente de producción de ácido retinoico dentro de las 24 horas de cultivo (**Viviano et al., 1995**) favoreciendo su propia regeneración de manera autocrina (**Viviano y Brockes, 1996**). Las concentraciones 1.3UI/ml y 2.6UI/ml de vitamina A produjeron

resultados pobres porque son excesivas para el cultivo realizado y por tanto producen efectos negativos en la regeneración (**Olson, 1996; Maden, 1998**) demostrándose de esta manera que la máxima concentración de ácido retinoico, 1 nM equivalente a 0.6UI, reportada para la regeneración de la epidermis en urodelos es efectiva en *Oncorhynchus mykiss*.

Los factores de crecimiento semejante a insulina I y II están estructuralmente relacionados con la insulina y conjuntamente con sustancias mitogénicas son capaces de activar ciertas proteínas que participan en el proceso regenerativo (**Pozios et al., 1999**), el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I reanuda la división celular *in Vitro* en tejidos dañados (**Mozdziak et al., 2001**) y ambos factores de crecimiento pertenecientes a “Trucha arco iris” tienen altas similitudes e identidades con sus homólogos de tipo humano y con la insulina de otro pez como es el “Salmón coho” (**Shamblott y Chen, 1992**). Por tanto se puede esperar que la insulina humana se comporte de modo parecido a estos factores de crecimiento en la regeneración de blastómeros de *Oncorhynchus mykiss* (**Duan, 1998**) como realmente ocurrió durante el cultivo. La concentración de insulina más efectiva fue probada debido a que ésta había producido ovulación en cultivos *in Vitro* de “Ratón” (**Rose et al., 1999**) y a partir de esta dosis se probaron la mitad (aproximadamente 0.4UI/ml) y la cuarta parte (0.2UI/ml) debido a que el crecimiento embrionario en “Rata” es anormal cuando la concentración de insulina es menor a 0.5ng o 0.0005? g (**Pratten, 1997**) con lo cual se comprobó que la insulina tiene la misma eficacia tanto en cultivo de células de mamíferos como en cultivos celulares de peces. Como el efecto regenerativo de las concentraciones 0.7UI/ml y 0.2UI/ml de insulina son similares, la Fig. 07 demostró que con la primera concentración los resultados se observaron con mayor resolución, además

hay que considerar que el suero de los peces contiene abundante cantidad de proteínas de unión a los factores de crecimiento semejante a insulina los cuales también incluso pueden capturar a la insulina (**Duan, 1998**) necesitándose por tanto de la mayor concentración de insulina entre ambas para evitar que su acción sea bloqueada por estos receptores. La insulina utilizada en este estudio es insulina zinc isófana humana, con óxido de zinc como parte de su composición, cuya actividad tiene una duración intermedia (**Eli Lilly, 2001**) apropiada para un cultivo de 24 horas como el realizado y que además de las alcohol deshidrogenasas promueve la conversión de retinol a retinal porque contiene el zinc necesario para efectuar dicha reacción (**Christian y West, 1998**). Todo ello indicó que la presencia de vitamina A e insulina es necesaria para obtener buenos resultados en el proceso regenerativo, independientemente del modo de acción de ambas sustancias.

Para que pueda efectuarse el proceso regenerativo en tejidos diferenciados se necesita la ayuda de células madre o progenitoras debido a que este tipo celular puede crecer de manera ilimitada (**Stocum, 2000**) pero a medida que avanza el desarrollo se pierde esta capacidad (**De Angelis et al., 1999**) y necesita la participación de los factores de crecimiento. Por ello, el modelo del embrión de 60 horas de desarrollo es factible por su estado ideal de totipotencia (**Calvi y Maisse, 1998**). El hecho de que la interacción muestras-dosis de insulina-dosis de vitamina A y la interacción muestras-dosis de insulina no afecten el proceso regenerativo podría explicarse por el papel que juega la insulina, el cual se analiza más adelante.

La diferencia de los resultados producidos por el hecho de que el suero de “Trucha arco iris” soporte el proceso regenerativo de sus blastómeros a diferencia de los sueros

humanos radica fundamentalmente en la composición del suero del pez, el cual contiene elementos propios que varían especialmente en los estadios próximos a la ovulación y que pasan desde el torrente sanguíneo hacia el ovocito durante la gametogénesis; la efectividad del suero de mujer grávida por encima del suero obtenido a partir de la mujer no grávida demuestra esta condición dado que la composición sérica varía con la edad de madurez, el sexo del donante, su estado nutricional, entre otros (**Tiffan y Rondorf, 2000**). Por ello el suero de pez aporta una gran cantidad de nutrientes que originariamente se hallan en el vitelo, recreando de esa manera el ambiente natural de los blastómeros. Como el suero es una mezcla compleja cuyos componentes inhiben o promueven el crecimiento, la proliferación, etc. y para el crecimiento óptimo de las células se requieren de 5 a 20% de suero en el cultivo (**Becker et al., 2000**) la concentración de sueros humanos utilizados al 2%v/v no es la adecuada y por tanto se necesitan mayores cantidades de estos sueros en el cultivo para que puedan ser útiles en la regeneración de blastómeros de “Trucha arco iris”. También es importante considerar el tipo de muestra dado que los blastómeros control al estar enteros son potencialmente más resistentes frente a las condiciones del cultivo que los problemas los cuales se encuentran dañados. Al afectarse las muestras en igual medida tanto controles como problemas al inspeccionar cada suero utilizado se comprueba que la respuesta regenerativa está condicionada por el tipo sérico correspondiente en cada prueba.

Tanto la ausencia de vitamina A, suero, vitamina A e insulina simultáneamente y el cultivo sólo en medio Leibovitz mostraron el mismo grado detrimental en el proceso regenerativo, pero el modo de acción o el papel que juegan cada uno, incluso la insulina, en la regeneración es diferente debido a su interacción significativa de modo que cada uno explica dichos resultados según su propio rol. La ausencia de vitamina A compromete

grandemente al potencial regenerativo de los blastómeros debido a que es un morfógeno necesario e importante para el desarrollo normal y para la reparación celular en peces (**Maden et al., 1996**) verificándose esta condición en el experimento. El cultivo carente de vitamina A e insulina se asemeja a la crianza de animales con dietas sin vitamina A en los cuales se produce la disminución del factor de crecimiento semejante a insulina I mas no de la expresión de sus receptores ni de los receptores de insulina a través de los cuales también actúa dicho factor de crecimiento (**Fu et al., 2001**) motivo por el cual al no haber tampoco insulina, la tasa regenerativa tiende a ser muy baja. Por el contrario, la ausencia de insulina afecta tan poco el desarrollo del proceso regenerativo en concordancia con la afirmación de que esta sustancia no es un mitógeno completo sino más bien un co-mitógeno, sustancia que no estimula la proliferación celular a menos que un mitógeno verdadero, como la vitamina A, se encuentre presente, pudiéndose denominar a su rol como permisivo (**Michalopoulos y De Frances, 1997**). Las muestras controles de los cultivos carentes de vitamina A, y sin insulina ni vitamina A ambos en simultáneo descartaron posibles efectos tóxicos por parte del medio que pudiesen producirse al no participar algunas de estas sustancias en el cultivo según protocolo. Sin embargo al no estar presente el suero en el cultivo los embriones control soportan un poco más el medio que los problema, debido fundamentalmente a que la presencia del suero es particularmente casi tan importante como la vitamina A en la regeneración porque sus componentes propician la adherencia entre células (**Tiffan y Rondorf, 2000**) manteniendo así la unión célula a célula y como los embriones problema en principio estaban dañados, no van a responder positivamente a esta carencia. La integridad del tejido, dañado o no, es un requisito indispensable para iniciar un proceso regenerativo. El cultivo que se realizó sólo en medio Leibovitz produjo resultados negativos tanto en las muestras control y problema al parecer porque su composición no fue

suficiente para que los blastómeros se pudieran mantener vivos en el cultivo ya que los embriones al ser removidos de sus lugares originales para ser cultivados *in Vitro* deben ser provistos de todas las sustancias necesarias para sobrevivir (**Becker et al., 2000**) demostrándose que este medio sintético no tiene participación alguna en la regeneración.



## CONCLUSIONES

- La utilidad del tipo de suero en el proceso regenerativo es específica siempre y cuando la composición sérica soporte el cultivo en la concentración probada en este estudio (2% v/v).
- Todos los suplementos: vitamina A, medio Leibovitz, suero e insulina son igualmente importantes ya que cada uno juega un rol específico en el proceso regenerativo de los embriones de “Trucha arco iris”.
- La insulina aumenta la respuesta de la vitamina A pero no la condiciona.
- Los blastómeros de *Oncorhynchus mykiss* son un buen modelo para estudios de regeneración en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario.

## RECOMENDACIONES

- ✍ El sembrado y la manipulación de los blastómeros, controles o problema, se debe hacer con mucho cuidado. Por ello se debe evitar en lo posible la movilización de las placas en cultivo. La fragilidad de los embriones los hace susceptibles a la fragmentación, entre otros daños.
  
- ✍ Guardar siempre las medidas de esterilidad pertinentes por ser un material que corre un gran riesgo de contaminarse.
  
- ✍ Las condiciones de oscuridad deben ser provistas considerando una amplia ventilación para el cultivo.
  
- ✍ Probar el protocolo de cultivo reportado en este trabajo con concentraciones superiores a 0.7UI/ml de insulina, menores a 0.6UI/ml de vitamina A y mayores a 2% (v/v) de sueros humanos para averiguar si es posible regenerar blastómeros de 60 horas de desarrollo de *O. mykiss* en esas condiciones.

# **ILUSTRACIONES**



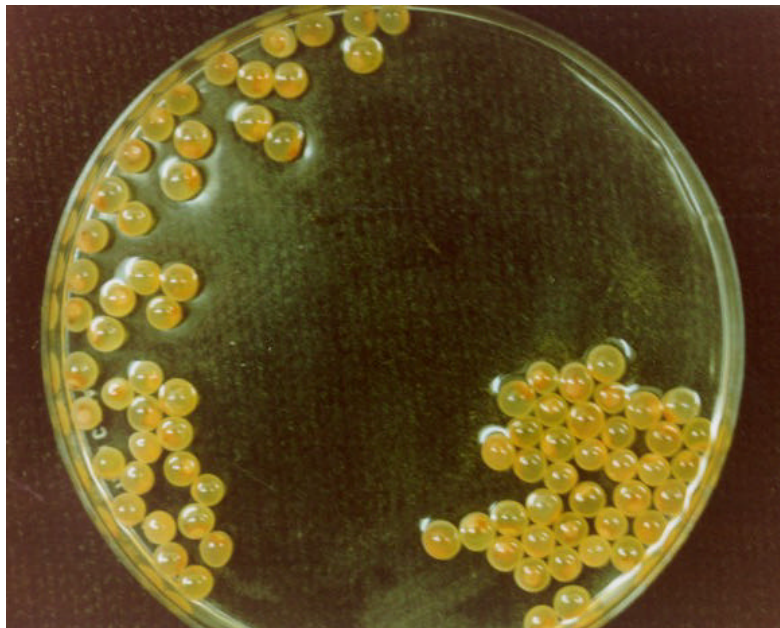
**Foto 1.** INDUCCIÓN DE LA SEDACION. El pez es recién incluido en el baño de anestésico.



**Foto 2.** FASE DE SEDACION. El pez se coloca en plano quirúrgico (mostrando el vientre)

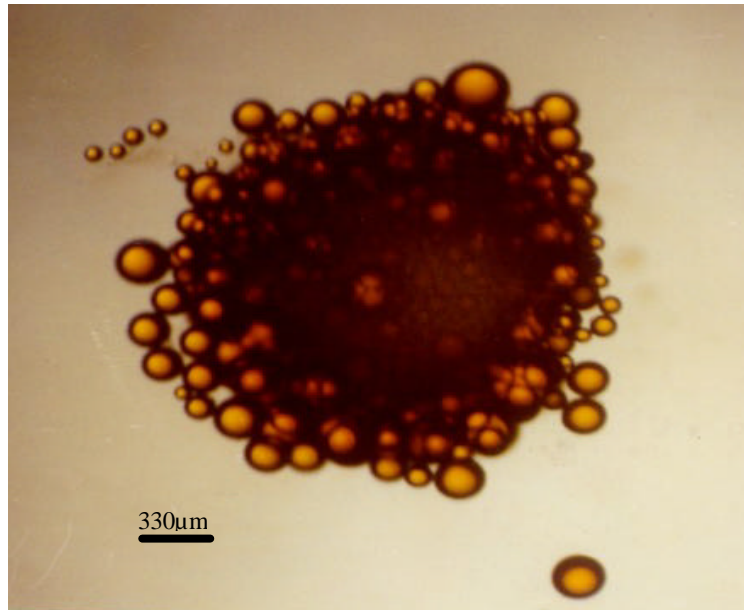


**Foto 3.** INCUBACIÓN DE LOS EMBRIONES DE *Oncorhynchus mykiss*. Vista aérea.

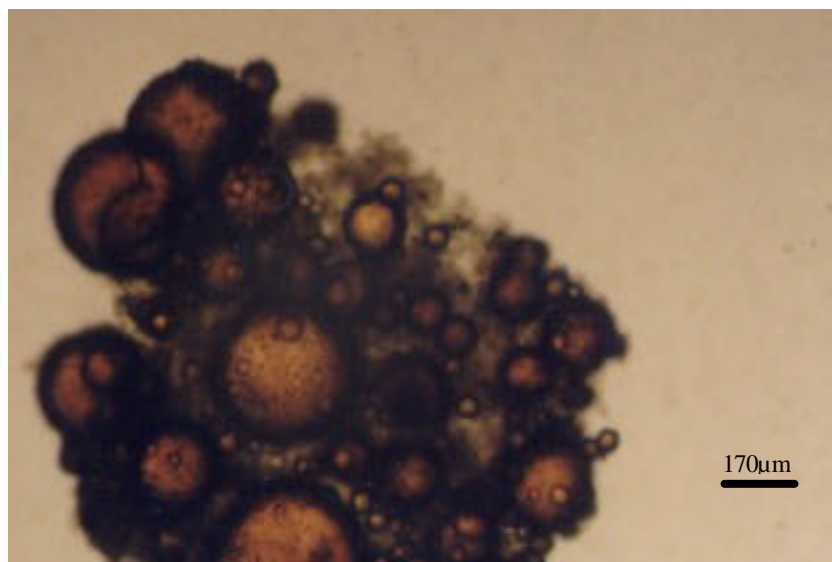


**Foto 4.** EMBRIONES DE *Oncorhynchus mykiss* DE 60 HORAS DE DESARROLLO.

Vista aérea.

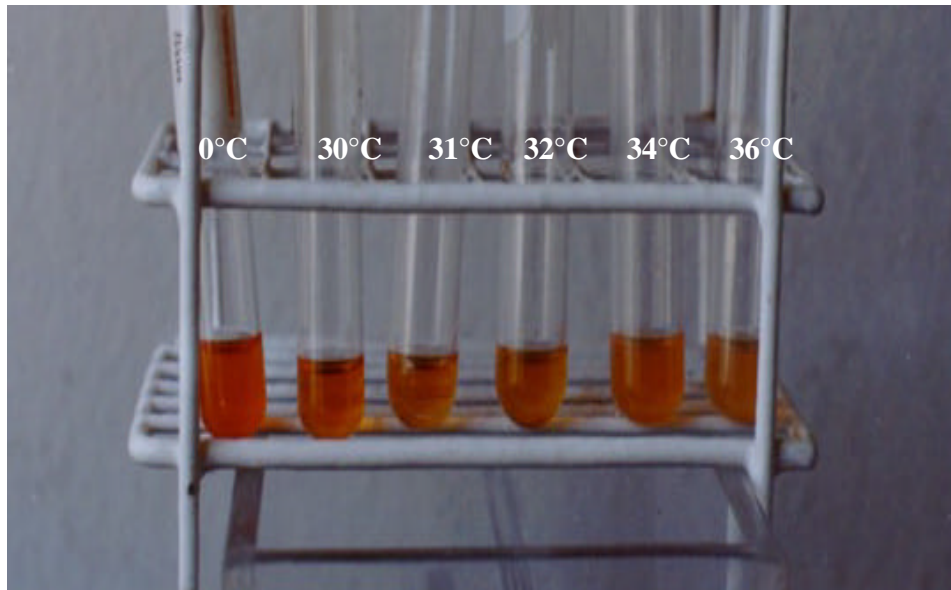


**Foto 5.** EMBRIÓN ENTERO DE *Oncorhynchus mykiss*. Nótese las grandes gotas lipídicas que lo rodean hasta casi cubrirlo.

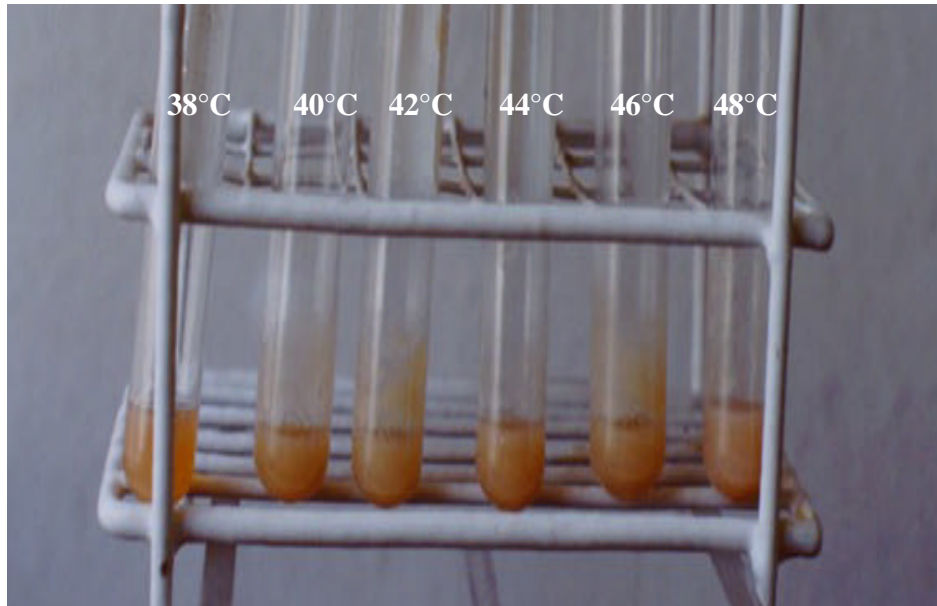


**Foto 6.** EMBRIÓN DAÑADO. Nótese el plano de corte situado en la región superior.

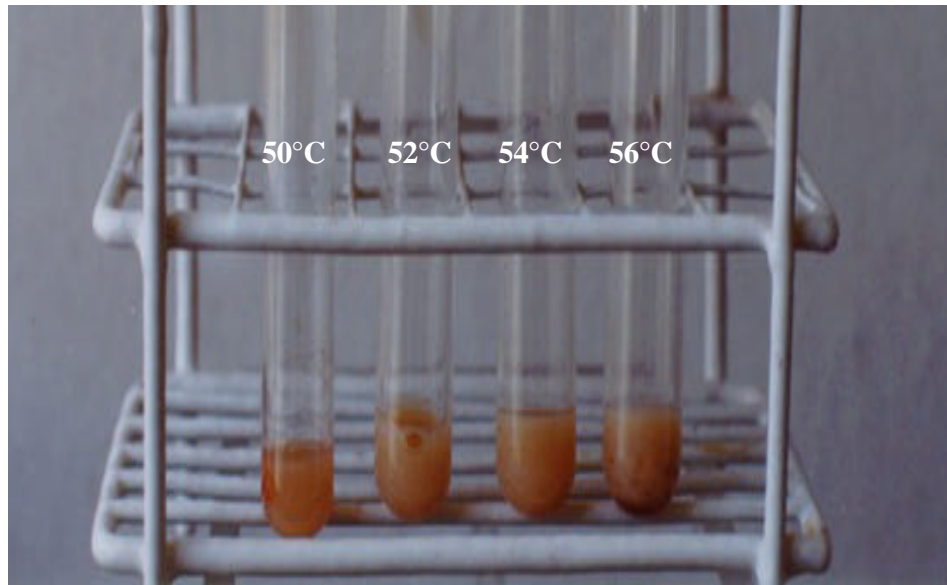




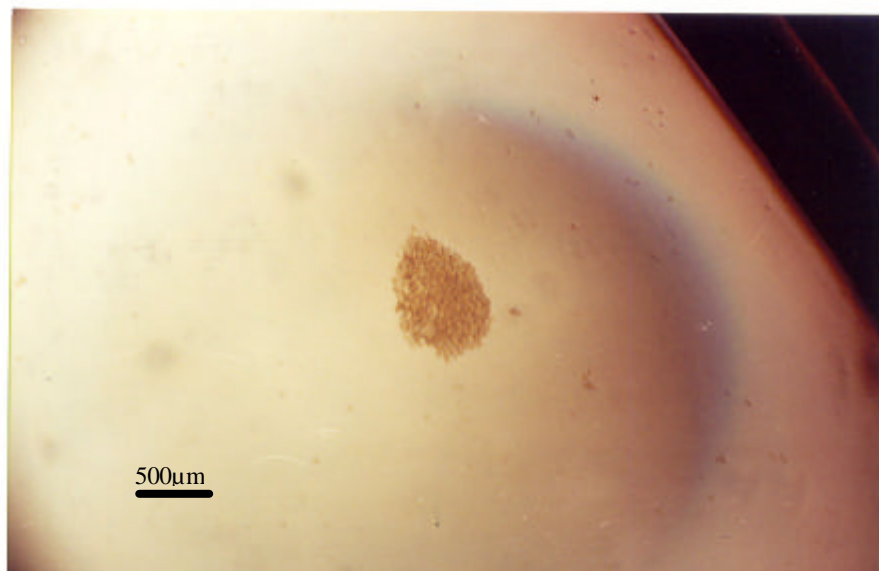
**Foto 7.** INACTIVACION DEL COMPLEMENTO. Nótese en temperaturas superiores a 31°C la aparición de precipitado.



**Foto 8.** INACTIVACION DEL COMPLEMENTO. En todos los casos se observa formación de precipitado.

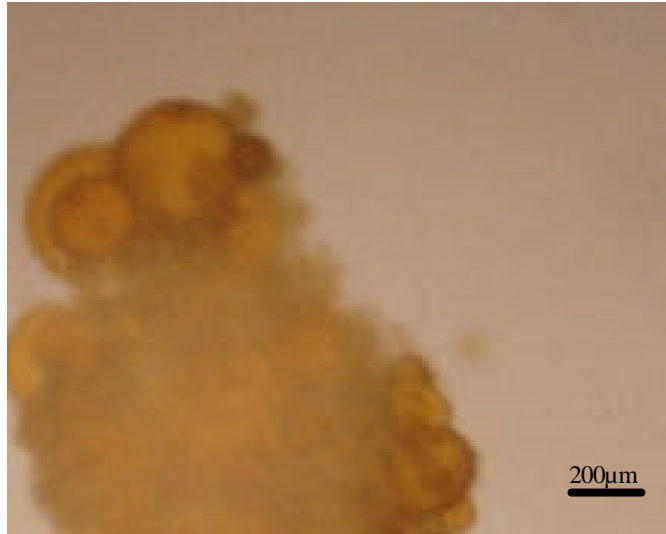


**Foto 9. INACTIVACION DEL COMPLEMENTO.** En todos los sueros tratados se observó la formación de un precipitado muy denso.

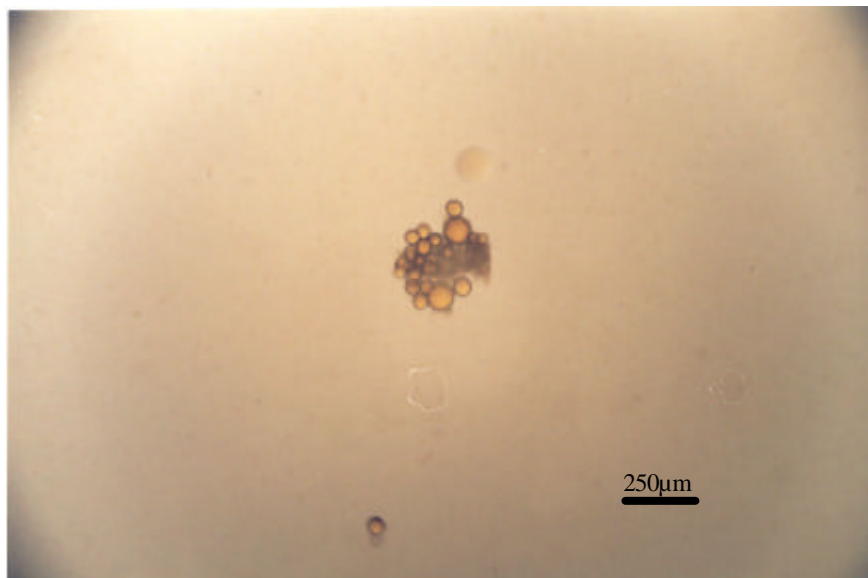


**Foto 10. ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO.** El embrión entero redujo su tamaño y las trazas de los blastómeros se observan alrededor de lo que queda de la muestra original, como resultado de las proteínas del complemento aún activas a 29°C.

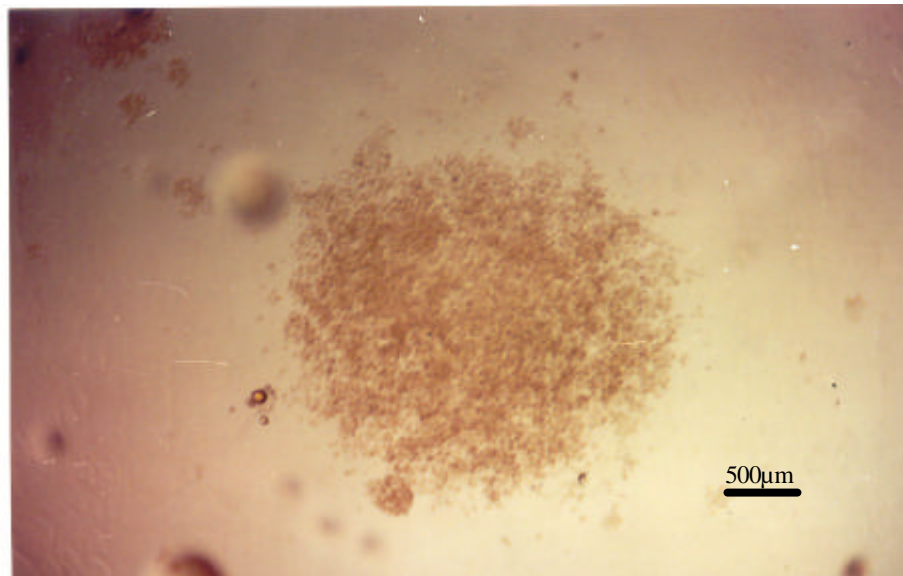




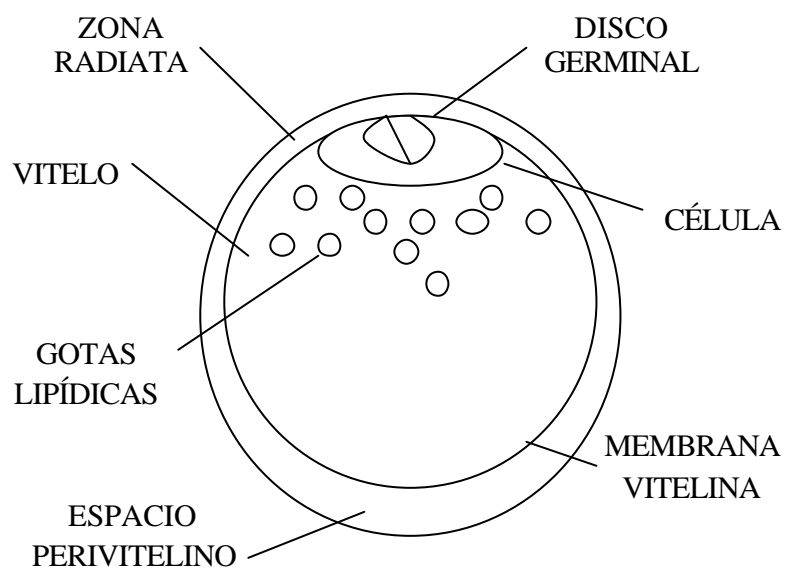
**Foto 11.** EMBRIÓN REGENERADO. Las gotitas lipídicas se han dispersado y en el plano de corte se ha atenuado el borde debido a la proliferación de los blastómeros dando la apariencia de que el embrión es más pequeño que cuando se sembró. La coloración oscura inicial del embrión sembrado (Foto 6) se ha cambiado por uno más claro.



**Foto 12.** EMBRIÓN NO REGENERADO. Hacia la derecha aún se observa el plano de corte que no ha respondido a la experimentación. Falta la mayor parte de la muestra.

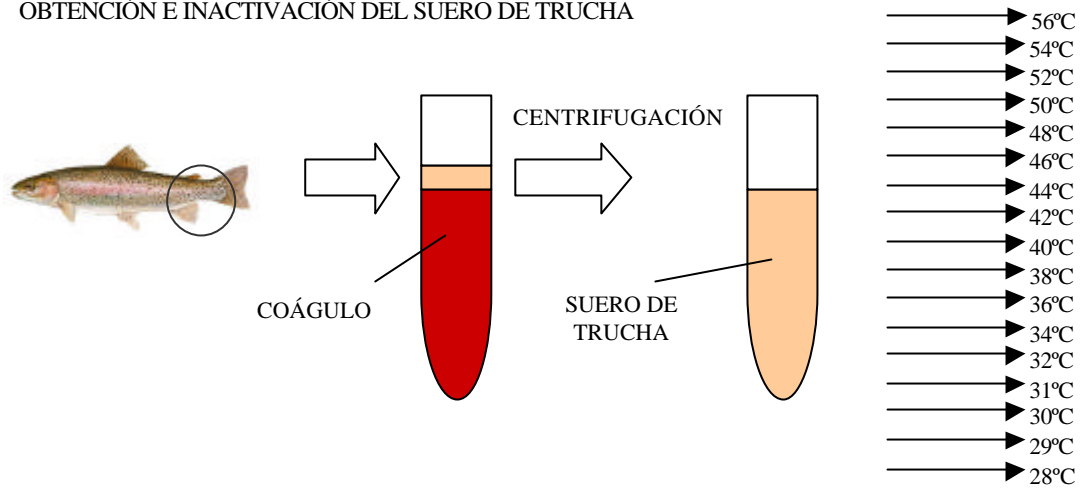


**Foto 13.** EMBRIÓN CONTROL DISGREGADO. En ausencia de suero en el cultivo, los blastómeros se encuentran sueltos en el medio, no hay integridad.

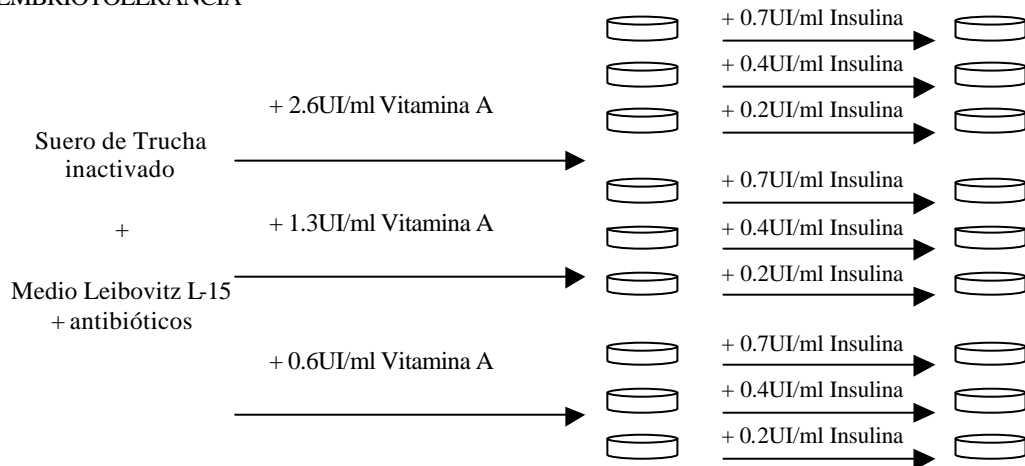


**Esquema 1.** ESTRUCTURA DEL EMBRIÓN DE TELEOSTEOS. Nótese todas las capas celulares y la gran cantidad de vitelo que contienen.

OBTENCIÓN E INACTIVACIÓN DEL SUERO DE TRUCHA



EMBRIOTOLERANCIA



**Esquema 2. DISEÑO EXPERIMENTAL DESDE LA OBTENCIÓN DE LA SANGRE DE TRUCHA HASTA LA PRUEBA DE EMBRIOTOLERANCIA** en la cual se definieron las concentraciones de vitamina A e Insulina más favorables para la regeneración.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKER, W.; KLEINSMITH, L.; HARDIN, J. **The World of the cell**. Cuarta edición. Addison Wesley Longman Publishers. 2000. 923 pp.

BLANCO, C. **La Trucha: Cría industrial**. Primera edición. Ediciones Mundi – Prensa. Barcelona, España. 1995. 503 pp.

BRITTBERG, M.; LINDAHL, A.; NILSSON, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O.; PETERSON, L. 1994. **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation**. *New Engineering and Journal of Medicine*, 331:889-895

BROCKES, J. 1996. **Retinoid signaling and retinoid receptors in amphibian limb regeneration**. *Biochemic Society Symposium*, 62:137-142

CALVI, L.; MAISSE, G. 1998. **Criopreservación de Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: Influence of Embryo Stage on Postthaw Survival rate**. *Cryobiology*, 36(4):255-262.

CHRISTIAN, P.; WEST, K. 1998. **Interactions between zinc and vitamin A: an update**. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68:435S-441S

DE ANGELIS, L.; BERGHELLA, L.; COLETTA, M.; LATTANZI, L.; ZANCHI, M.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; PONZETTO, C.; COSSU, G. 1999. **Skeletal myogenic**

**progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration** *The Journal of Cell Biology*, 147(4):869-877

DE TOLLA, L.; SRINIVAS, S.; WHITAKER, B.; ANDREWS, Ch.; HECKER, B.; KANE, A.; REIMSCHUESSEL, R. 1995. **Guidelines for the care and use of fish in research**. Institute of Laboratories Associated for Research Journal, 37(4). 12pp.

DUAN, C. 1998. **Nutricional and developmental roles of insulin-like growth factors in fish**. *Journal of Nutrition.*, 128:306S-314S

DUESTER, G. 2000. **Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid**. *European Journal of Biochemic*, 267:4315-4324

EDDY, F. 1974. **Osmotic properties of the perivitelline fluid and some properties of the chorion of Atlantic Salmon eggs (*Salmo salar*)**. *Journal of Zoology*, 174:237-243

ELI LILLY. 2001. **Prospecto de presentación, administración y uso de Humulin N, Humulin R y Humulin 70/30**. México D.F.

FU, Z.; NOGUCHI, T.; KATO, H. 2001. **Vitamin A deficiency reduces Insulin-like growth factor (IGF)-I gene expression and increases IGF-I receptor and insulin**

**receptor gene expression in tissues of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).**

Journal of Nutrition, 131:1189-1194

GROFF, J. y col. **Advanced Nutrition and Human Metabolism.** Segunda edición St.

Paul, MN: West Publishing Co. 1995. Págs. 284-315

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.; ARTEMOV, D.; PILATUS, U. 1998.

**Characterization of a mayor permeability barrier in the zebrafish embryo.** Biology of Reproduction, 59:1240-1250

HARTLING, R.; PEREIRA, J.; KUNKEL, J. 1997. **Characterization of a heat-stable**

**fraction of lipovitellin and development of an immunoassay for vitellogenin and yolk protein in winter flounder (*Pleuronectes americanus*).** The Journal of Experimental

Zoology, 278:156-166

HARVEY, B.; ASHWOOD-SMITH, M. 1982. **Cryoprotectant Penetration and**

**Supercooling in the eggs of salmonid fishes.** Cryobiology, 19:29-40

HIEBER, V.; DAI, X.; FOREMAN, M.; GOLDMAN, D. 1998. **Induction of a1 tubulin**

**gene expression during development and regeneration of the fish CNS.** J. Neurobiol.,

37:429-440

HOAR, W.; RANDALL, D. **Fish Physiology.** Volúmenes 1-7. Academic Press, New

York. 1969

HOLLAND, M.; LAMBRIS, J. 2002. **The Complement system in teleosts**. Fish & Shellfish Immunology, 12:399-420

JANGIR, O.; SHEKHAWAT, D.; PRAKASH, A.; SWAMI, K.; SUTHAR, P. 2001. **Homeotic regeneration of eye in amphibian tadpoles and its enhancement by vitamin A**. Journal of Biosciences., 26(5): 577-581

KING, M.; BLACKWOOD, E.; EISENMAN, R. 1993. **Expression of two distinct homologs of *Xenopus* Max during early development**. Cell Growth and Differentiation, 4:85-92

KLEIN, P. 1975. **Vitamin A acid and wound healing**. Acta Dermatological and Venerological Supplement. (Stockh), 74:171-173

LEWIS, R. 2001. **The Treatment**. Cytotechnology, 6:524-527

MA, C.; COLLODI, P. 1996. **Culture of cells from larval and adult sea lamprey tissues**. Cytotechnology, 21:195-203

McCOLLUM, E.; DAVIS, E. 1913. **The necessity of certain lipins in the diet during growth**. Journal of Biology and Chemic., 15:167-175

McCULLOUGH, F. y col. **The effect of vitamin A on epithelial integrity**. Volumen 58. Proceedings of the Nutrition Society. 1999. Págs. 289-293

MADEN, M.; GALE, E.; KOSTETSKII, I.; ZILE, M. 1996. **Vitamin A-deficient Quail embryos have half a hindbrain and other neural defects**. Current Biology, 6(4):417-426.

MADEN, M. 1998. **Retinoids as endogenous components of the regenerating limb and tail**. Wound Repair Regeneration, 6(4):358-365

MADEN, M. 2000. **The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development**. Proceedings of Nutrition Society., 59(1):65-73

McFARLAND, W.; KLONTZ, G. 1969. **Anaesthesia in fishes**. Federation Proceedings, 28(4):1535-1540

MENDEZ, E.; PLANAS, J.; CASTILLO, J.; NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. 2001. **Identification of a type II insulin-like growth factor receptor in fish embryos**. Endocrinology, 142(3):1090-1097

MERCK. **Reactivos de Productos químicos**. Catálogo Merck 1999/2000. Alemania.

MICHALOPOULOS, G.; DE FRANCES, M. 1997. **Liver regeneration** Science, 270:60

MILLS, J.; SIMPSON, J.; CUNNINGHAM, G.; CONLEY, M.; RHOADS, G. 1997. **Vitamin A and birth defects**. American Journal of Obstetrician and Gynecology, 177:31-

36



MITASHOV, V. 1996. **Cells sources, regulatory factors and gene expresión in the regeneration of the crystalline lens and retina in vertebrate animals.** Izv Akad Nauk Ser Biol, (3):298-318

MOZDZIAK, P.; PULVERMACHER, P.; SCHULTZ, E. 2001. **Muscle regeneration during hindlimb unloading results in a reduction in muscle size after reloading.** Journal of Applied Physiology, 91:183-190

NEEDLEMAN, I.; GIEDRYS-LEPERT, E.; TUCKER, R.; WORTHINGTON, H. 2002. **Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects.** The Cochrane Library, Issue 3:1724-1733

OGUNDELE, M. 1998. **Activation and deposition of human Breast-milk complement C3 opsonins on a Serum sensitive bacteria.** Journal of Immunology and Immunology Disorders, 5: 358-34-62

OLSON, J. **Vitamin A.** Editorial Ziegler, E.E. y Filter, L.J. ILSI Press. Washington D.C. 1996. Págs. 109-118

OSBORNE, T.; MENDEL, L. 1913. **The relation of growth to the chemical constituents of the diet.** Journal of Biology and Chemic., 15:311-326

PATÍÑO, R.; THOMAS, P. 1990. **Gonadotropin stimulates 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one production from endogenous substrates in Atlantic croaker ovarian**

**follicles undergoing final maturation *In vitro*.** General and Comparative Endocrinology, 78:474-478.

POZIOS, K.; TAN, J.; DING, J.; DUAN, C. 1999. **Activation of both Map kinase and P13 kinase signaling pathways is required for IGF-induced zebrafish embryonic cell proliferation.** International Society of Facilities Executives, USA. Abstract number ISFE W-657

PRATTEN, M. 1997. **The role of exogenous growth-promoting factors and their receptors in organogenesis.** International Journal of Development Biology, 41:319-328.

ROSE, U.; HANSEN, R.; KLOOSTERBOER, H. 1999. **Development and characterization of an *In vitro* ovulation model using mouse ovarian follicles.** Biology of Reproduction, 61:503-511

SCADDING, S.; MADEN, M. 1986. **The effects of local application of retinoic acid on limb development and regeneration in tadpoles of *Xenopus laevis*.** Journal of Embryology Experimental and Morphology, 91:55-63

SCHANTZ, A. 1985. **Cytosolic free calcium-ion concentration in cleaving embryonic cells of *Oryzias latipes* measured with calcium-selective microelectrodes.** The Journal of Cell Biology, (100):947-954

SHAMBLOTT, M.; CHEN, T. 1992. **Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species**. Proceedings Natural Academy of Sciences. USA, 89:8913-8917

SHIELDS, R. J.; BROWN, N. P.; BROMAGE, N. R. 1997. **Blastomere Morphology as a predictive measure of fish egg viability**. Aquaculture, 155(1-4):1-12.

STOCUM, D. 2000. **Regenerative Biology and medicine in the 21<sup>th</sup> century**. E-biomed, 1:17-20

STOSSKOPF, M. **Fish Medicine**. New York: W.B. Saunder Co. 1993. Pgs. 79-91

SUMMERFELT, R. 1990. **Anesthesia, surgery and related techniques: Methods for fish biology**. American Fisheries Society, 2:213-272

SUNYER, J.; ZARKADIS, I.; SAHU, A.; LAMBRIS, J. 1996. **Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators**. Proceedings. Natural Academy of Sciences. USA, 93:8546-8551

SUNYER, J.; TORT, L.; LAMBRIS, J. 1997. **Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Spaurus aurata***. Biochemical Journal, 326:877-881

SUNYER, J.; ZARKADIS, I.; SARRIAS, M.; HANSEN, J.; LAMBRIS, J. 1998. **Cloning, structure, and function of two Rainbow Trout Bf molecules.** The Journal of Immunology, 161: 4106-4114.

TANG, S.; QIU, G.; LIU, Z.; LI, J.; LIN, S. 2002. **Experimental studies of effects of retinoic acid on the proliferation of retinal cells.** Chung Hua Yen Ko Tsa Chih, 38(2):112-114

TIFFAN, K.; RONDORF, D. 2000. **Physiological development and migratory behavior of subyearling fall Chinook Salmon in the Columbia River:** New American Journal Fisheries Maganement., 20:28-40

VIVIANO, C.; HORTON, C.; MADEN, M.; BROCKES, J. 1995. **Síntesis and release of 9-cis retinoic acid by the urodele wound epidermis.** Development, 121:3753-3762

VIVIANO, C.; BROCKES, J. 1996. **Is retinoic acid an endogenous ligand during urodele limb regeneration?** International Journal of Development Biology, 40(4):817-822

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book.** Chapter 1, General methods for zebrafish care, University of Oregon, USA, 1994 – 2002. 3pp.

# **ANEXOS**

## PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS

### A) SOLUCIÓN SALINA 1%

Se disuelven 100 g de sal yodada por cada 10 litros de agua de estanque a utilizar.

### B) SOLUCIÓN RINGER MODIFICADA PARA PECES

Se disuelven 6.5g de cloruro de sodio, 0.25g de cloruro de potasio, 0.2g de bicarbonato de sodio y 0.3g de bicloruro de sodio por cada litro de agua destilada estéril. Fijar el pH a 7.4 y esterilizar por filtración con membrana 0.45 $\mu$ m. Conservar a temperatura ambiente (**Harvey y Ashwood-Smith, 1982**).

### C) PREPARACIÓN DE LA VITAMINA A

Se prepara 200ml de solución concentrada de vitamina A de 53.3 UI/ml. Remover bien con bagueta y pasar por papel filtro No. 2. Esterilizar con filtro de membrana de 0.45 $\mu$ m, guardar en frasco de vidrio forrado con papel aluminio a temperatura ambiente. Cada 0.344 $\mu$ g de vitamina A equivale a 10<sup>6</sup> UI (Merck, 1999/2000). Un mililitro de la solución de 53.3UI/ml de vitamina A llevado a 20ml de volumen de cultivo se convertirá en 2.6 UI/ml, 0.5ml en 1.3 UI/ml y 0.25 ml en 0.6UI/ml.

#### D) RESUSPENSIÓN DEL MEDIO LEIBOVITZ L-15

Por cada litro de medio Leibovitz L-15 resuspendido en agua bidestilada estéril se adicionan 100mg de sulfato de estreptomicina, 60 mg de bencilpenicilina y 1.2g de bicarbonato de sodio. Filtrar con membrana de 0.45 $\mu$ m y guardar entre 2 y 8°C (**Patiño y Thomas, 1990**). La fórmula del medio Leibovitz L-15 es:

Sales inorgánicas	mg/l
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	140.00
KCl	400.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60.00
MgCl <sub>2</sub> (anhidro)	94.00
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	98.00
NaCl	8000.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	190.00
Otros componentes	
D(+)-Galactosa	900.00
Rojo fenol	10.00
Piruvato de sodio	550.00
Aminoácidos	
L-Alanina	225.00
L-Arginina	500.00
L-Asparagina	250.00
L-Cisteína	120.00
L-Glutamina	300.00
Glicina	200.00
L-Histidina	250.00
L-Isoleucina	125.00
L-Leucina	125.00
L-Lisina	75.00
L-Metionina	75.00
L-Fenilalanina	125.00
L-Serina	200.00
L-Treonina	300.00
L-Triptofano	20.00
L-Tirosina	300.00
L-Valina	100.00
Vitaminas	
D-Ca Pantotenato	1.00
Cloruro de colina	1.00
Ácido fólico	1.00
i-Inositol	2.00
Niacinamida	1.00
Piridoxina HCl	1.00
Riboflavina-5'- fosfato, 2H <sub>2</sub> O	0.10
Tiamina monofosfato	1.00

# TABLAS



TABLA 1

ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE SEDACIÓN

No. DE REPETICIONES	CLOROBUTANOL (600mg/l)		
	PESO (g)	TIEMPO DE EXPOSICION (seg)	TIEMPO DE RECUPERACION (seg)
1	1800	29	170
2	2000	32	180
3	3200	45	260
4	2500	37	210
5	2200	35	195
6	2900	42	240
7	3100	44	250
8	3500	49	270
9	2400	36	200
10	3000	43	240
11	2300	35	200
12	1900	30	180
13	3300	47	260
14	2800	40	230
15	2400	35	200
16	2000	33	190
17	3100	43	250
18	2900	41	235
19	2250	36	200
20	3000	42	260
21	2300	34	200
22	1900	32	180
23	2750	40	225
24	3200	44	250
25	2600	39	220
26	2100	32	190
27	2400	34	200
28	2600	38	210
29	2500	38	205
30	3200	44	250
<b>TOTAL</b>	<b>78100</b>	<b>1149</b>	<b>6550</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>2603.3</b>	<b>38.3</b>	<b>218.3</b>

En el análisis estadístico utilizando la Correlación de Pearson, se encontró una correlación significativa entre el tiempo de exposición-Peso del animal, Tiempo de exposición-Tiempo de Recuperación y Peso-tiempo de recuperación con nivel de significación de 0.01

TABLA 2  
INACTIVACIÓN DEL PLASMA DE TRUCHA

		TEMPERATURA (°C)															
PP	56	54	52	50	48	46	44	42	40	38	36	34	32	31	30	29	28
<b>T</b>	X	X	X														
<b>A</b>				X	X	X											
<b>P</b>							X	X									
<b>B</b>									X								
<b>R</b>										X							
<b>Bu</b>											X						
<b>E</b>												X					
<b>M</b>													X	X			
<b>N</b>															X	X	X

PP: Precipitado  
T: Total  
A: Abundante  
P: Parcial

B: Bastante  
R: Regular  
Bu: Bueno  
E: Escaso

M: Mínimo  
N: Nulo

TABLA 3  
ESTADO DE INACTIVACIÓN DEL SUERO DE TRUCHA

NUMERO DE REPETICIONES	SUERO SIN INACTIVAR	SUERO INACTIVO				
		32°C	31°C	30°C	29°C	28°C
1	0	5	4	6	1	0
2	0	4	5	6	1	0
3	0	2	3	6	0	0
4	0	2	3	6	0	0
5	0	1	3	6	0	0
6	0	3	4	6	0	1
7	0	4	2	6	1	0
8	0	4	3	6	0	0
9	0	4	3	6	0	0
10	0	3	4	6	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>60</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

En Prueba ANOVA, se encontró diferencia significativa entre los grupos probados ( $p < 0.000$ ). En las comparaciones múltiples por Dunnett, los resultados de 30°C en relación a las demás temperaturas probadas fueron significativamente diferente ( $p < 0.000$ )

TABLA 4

EMBRIOTOLERANCIA DE VITAMINA E INSULINA

No. DE REP	T <sub>1</sub>		T <sub>2</sub>		T <sub>3</sub>		T <sub>4</sub>		T <sub>5</sub>		T <sub>6</sub>		T <sub>7</sub>		T <sub>8</sub>		T <sub>9</sub>	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
1	0	0	5	5	6	4	0	0	4	0	6	3	0	3	5	4	6	4
2	2	1	4	3	6	2	1	0	3	1	5	4	2	0	4	3	6	0
3	3	1	3	2	6	5	3	1	4	3	4	3	3	1	5	3	4	3
4	2	2	5	1	6	4	3	1	4	1	5	4	0	0	5	3	5	4
5	1	1	5	4	6	6	2	0	3	2	5	3	3	1	5	2	5	3
6	0	0	3	3	6	6	1	1	3	3	5	2	3	0	4	1	5	3
7	1	0	4	1	6	6	3	2	3	1	6	4	3	1	6	3	5	4
8	0	0	5	2	6	6	3	1	2	2	6	5	2	2	5	2	4	4
9	0	1	4	3	6	4	1	1	4	3	4	3	2	1	5	2	6	4
10	1	1	3	3	6	4	1	1	4	1	5	2	1	1	5	2	6	5
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>41</b>	<b>27</b>	<b>60</b>	<b>47</b>	<b>18</b>	<b>8</b>	<b>34</b>	<b>17</b>	<b>51</b>	<b>33</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>49</b>	<b>25</b>	<b>52</b>	<b>34</b>
<b>% VIVOS</b>	<b>16.7</b>	<b>11.7</b>	<b>68.3</b>	<b>45.0</b>	<b>100</b>	<b>78.3</b>	<b>45.0</b>	<b>13.3</b>	<b>56.7</b>	<b>28.3</b>	<b>85.0</b>	<b>55.0</b>	<b>60</b>	<b>16.7</b>	<b>81.7</b>	<b>41.7</b>	<b>86.7</b>	<b>56.7</b>

P: Muestras problema.

C: Muestras control.

T<sub>n</sub> : Tratamientos.

	VITAMINA A UI/ml	INSULINA (UI/ml)		VITAMINA A (UI/ml)	INSULINA (UI/ml)
T <sub>1</sub>	2.6	0.7	T <sub>6</sub>	0.6	0.4
T <sub>2</sub>	1.3	0.7	T <sub>7</sub>	2.6	0.2
T <sub>3</sub>	0.6	0.7	T <sub>8</sub>	1.3	0.2
T <sub>4</sub>	2.6	0.4	T <sub>9</sub>	0.6	0.2
T <sub>5</sub>	1.3	0.4			

En el Diseño factorial anidado, hay interacción significativa entre muestras (control y problema), dosis de insulina, dosis de vitamina A y muestras-dosis vitamina A ( $R^2_{ajus} = 0.936$ ). Nivel de significación: 0.01

TABLA 5

EFFECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES TIPOS SÉRICOS

R E P	SUERO DE MUJER GRÁVIDA				SUERO DE MUJER NO GRÁVIDA				SUERO DE TRUCHA			
	CONTROL		PROBLEMA		CONTROL		PROBLEMA		CONTROL		PROBLEMA	
	ENT.	%	REG.	%	ENT.	%	REG.	%	ENT.	%	REG.	%
1	2	33.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	83.3	5	83.3
2	3	50.0	2	33.3	0	0.0	0	0.0	6	100.0	3	50.0
3	4	66.7	4	66.6	0	0.0	0	0.0	6	100.0	4	66.7
4	2	33.3	1	16.7	0	0.0	0	0.0	6	100.0	6	100.0
5	3	50.0	1	16.7	0	0.0	0	0.0	6	100.0	4	66.7
6	2	33.3	0	0.0	1	16.7	0	0.0	6	100.0	4	66.7
7	4	66.7	1	16.7	0	0.0	0	0.0	6	100.0	5	83.3
8	3	50.0	1	16.7	0	0.0	0	0.0	6	100.0	6	100.0
9	2	33.3	1	16.7	0	0.0	0	0.0	6	100.0	5	83.3
10	1	16.7	1	16.7	1	16.7	0	0.0	6	100.0	5	83.3
<b>T</b>	<b>26</b>	<b>43.3</b>	<b>12</b>	<b>20.0</b>	<b>2</b>	<b>3.3</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>59</b>	<b>98.3</b>	<b>47</b>	<b>78.3</b>

Leyenda: T: Total.

La Prueba de los efectos entre grupos tratados (sueros de trucha, de mujer grávida y de mujer no grávida) fueron significativamente diferentes en las muestras control y problema y entre ellos con un nivel de significancia de 0.01

TABLA 6

VERIFICACIÓN DEL ROL QUE CUMPLE LA VITAMINA SOBRE LA CAPACIDAD REGENERATIVA

No. DE REPETICIONES	CONTROL		PROBLEMA	
	ENTEROS	%	REGENERADOS	%
1	6	100.0	0	0.0
2	5	83.3	1	16.7
3	6	100.0	0	0.0
4	5	83.3	0	0.0
5	6	100.0	1	16.7
6	6	100.0	1	16.7
7	5	83.3	1	16.7
8	6	100.0	0	0.0
9	4	66.7	0	0.0
10	5	83.3	0	0.0
<b>TOTAL</b>	<b>54</b>	<b>90.0</b>	<b>4</b>	<b>6.7</b>

TABLA 7

VERIFICACIÓN DEL ROL QUE CUMPLE EL SUERO SOBRE LA CAPACIDAD REGENERATIVA

No. DE REPETICIONES	CONTROL		PROBLEMA	
	ENTEROS	%	REGENERADOS	%
1	3	50.0	1	16.7
2	5	83.3	0	0.0
3	4	66.7	0	0.0
4	3	50.0	0	0.0
5	5	83.3	1	16.7
6	4	66.7	2	33.3
7	3	50.0	0	0.0
8	4	66.7	0	0.0
9	5	83.3	0	0.0
10	3	50.0	0	0.0
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>65.0</b>	<b>2</b>	<b>3.3</b>

TABLA 8

VERIFICACIÓN DEL ROL QUE CUMPLE EL MEDIO LEIBOVITZ L-15 SOBRE LA CAPACIDAD REGENERATIVA

No. DE REPETICIONES	CONTROL		PROBLEMA	
	ENTEROS	%	REGENERADOS	%
1	0	0.0	0	0.0
2	0	0.0	0	0.0
3	0	0.0	0	0.0
4	0	0.0	0	0.0
5	0	0.0	0	0.0
6	1	16.7	0	0.0
7	0	0.0	1	16.7
8	0	0.0	0	0.0
9	0	0.0	0	0.0
10	1	16.7	1	16.7
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>3.3</b>	<b>2</b>	<b>3.3</b>

TABLA 9

VERIFICACIÓN DEL ROL QUE CUMPLEN LA VITAMINA A Y LA INSULINA  
SIMULTÁNEAMENTE SOBRE LA CAPACIDAD REGENERATIVA

No. DE REPETICIONES	CONTROL		PROBLEMA	
	ENTEROS	%	REGENERADOS	%
1	5	83.3	0	0.0
2	3	50.0	1	16.7
3	6	100.0	0	0.0
4	6	100.0	1	16.7
5	5	83.3	0	0.0
6	5	83.3	0	0.0
7	6	100.0	0	0.0
8	6	100.0	1	16.7
9	5	83.3	0	0.0
10	5	83.3	0	0.0
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>86.7</b>	<b>3</b>	<b>5.0</b>

TABLA 10

VERIFICACIÓN DEL ROL QUE CUMPLE LA INSULINA SOBRE LA CAPACIDAD  
REGENERATIVA

No. DE REPETICIONES	CONTROL		PROBLEMA	
	ENTEROS	%	REGENERADOS	%
1	6	100.0	4	66.7
2	6	100.0	3	50.0
3	6	100.0	4	66.7
4	6	100.0	5	83.3
5	5	83.3	0	0.0
6	6	100.0	4	66.7
7	6	100.0	2	33.3
8	5	83.3	4	66.7
9	5	83.3	3	33.3
10	6	100.0	3	33.3
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>95.0</b>	<b>32</b>	<b>53.3</b>

TABLA 11

RESUMEN DE LA VERIFICACIÓN DEL ROL DE CADA UNO DE LOS FACTORES PARTICIPANTES EN EL PROTOCOLO DE REGENERACIÓN

No. DE REPETICIONES	VITAMINA A		INSULINA		SUERO		MEDIO LEIBOVITZ		VIT. A E INSULINA	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
1	6	0	6	4	3	1	0	0	5	0
2	5	1	6	3	5	0	0	0	3	1
3	6	0	6	4	4	0	0	0	6	0
4	5	0	6	5	3	0	0	0	6	1
5	6	1	5	0	5	1	0	0	5	0
6	6	1	6	4	4	2	1	0	5	0
7	5	1	6	2	3	0	0	1	6	0
8	6	0	5	4	4	0	0	0	6	1
9	4	0	5	3	5	0	0	0	5	0
10	5	0	6	3	3	0	1	1	5	0
<b>TOTAL</b>	<b>54</b>	<b>4</b>	<b>57</b>	<b>32</b>	<b>39</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>52</b>	<b>3</b>

Existe interacción significativa entre todos los elementos participantes en un 77% aproximadamente (R= 0.769). Se observó el mismo efecto significativo entre la vitamina A, el suero, el medio Leibovitz y la interacción vitamina A-insulina, a diferencia de las pruebas en ausencia de insulina, por Prueba de Dunnett con un nivel de significación de 0.01

# FIGURAS



Fig. 1

ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE INDUCCIÓN DEL ANESTÉSICO  
Asociación entre las variables Tiempo de Exposición (TIE\_EXP), Peso y Tiempo de Recuperación (TIE\_REC).

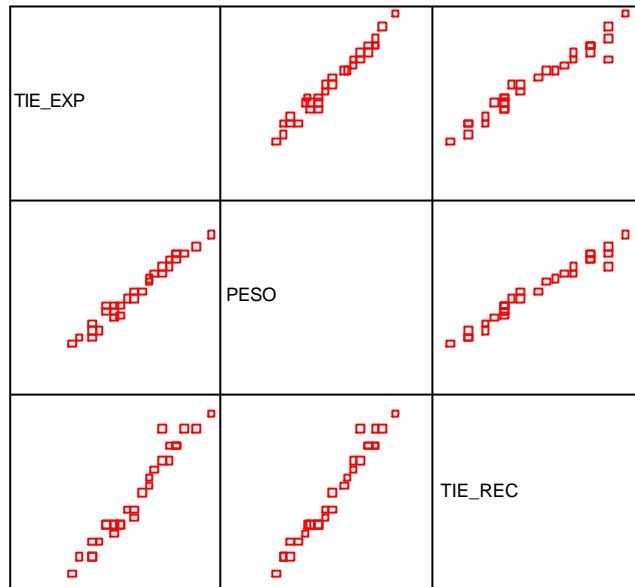


Fig. 2

EXPOSICIÓN TÉRMICA PARA LA INACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

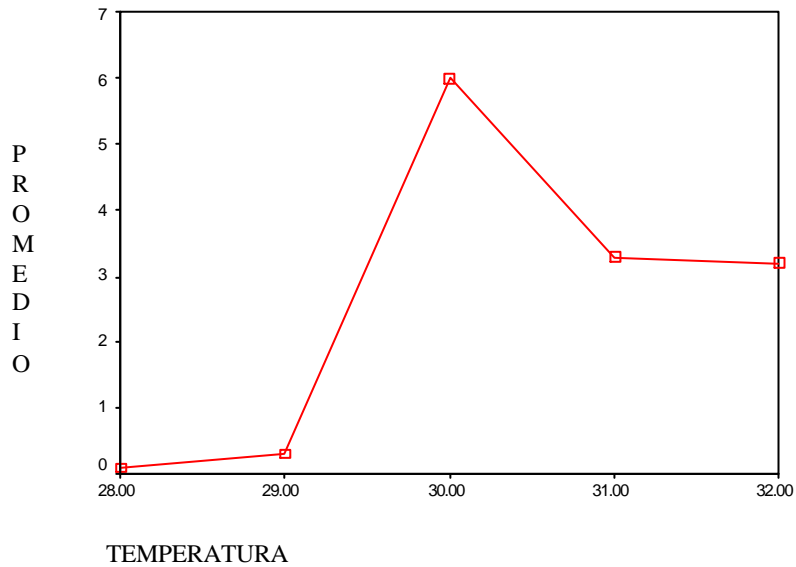


Fig. 3

REGENERACIÓN DEL EMBRIÓN POR TIPO DE MUESTRA

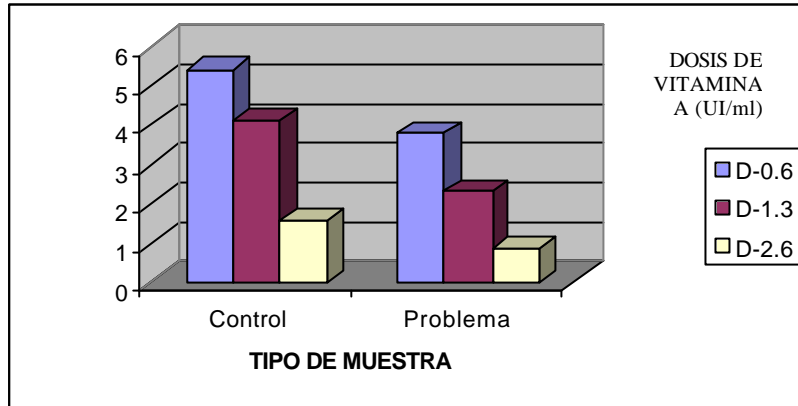


Fig. 4

REGENERACIÓN DEL EMBRIÓN POR DOSIS DE VITAMINA A

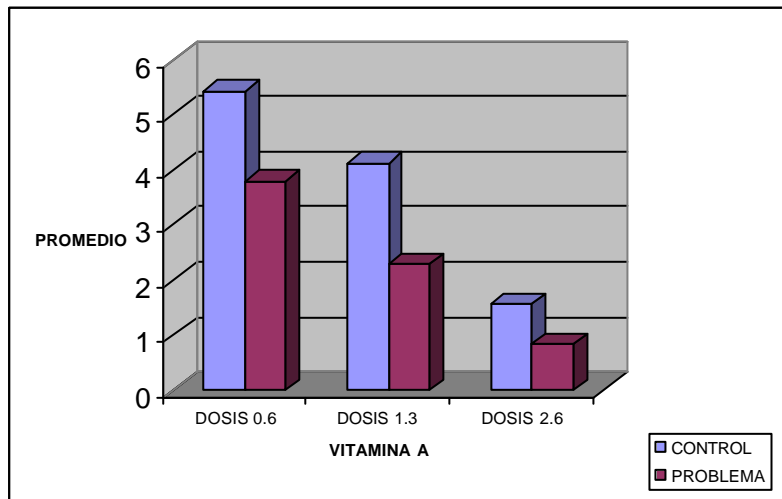


Fig. 5

GRÁFICO SOBRE LA REGENERACIÓN DEL EMBRIÓN

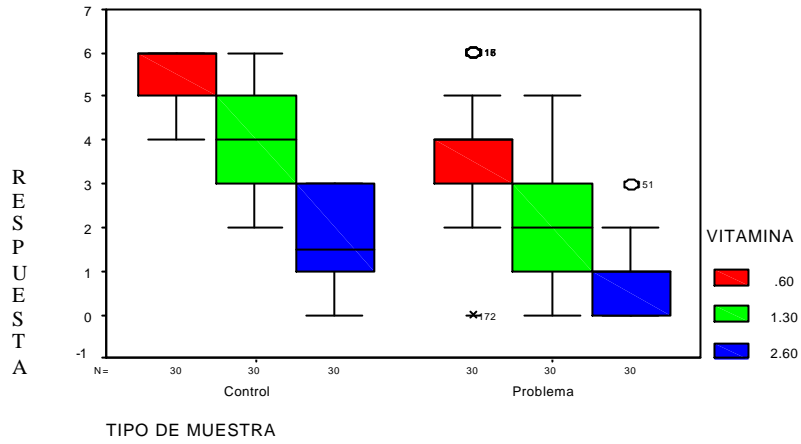


Fig. 6

REGENERACIÓN DEL EMBRIÓN VITAMINA-A-INSULINA

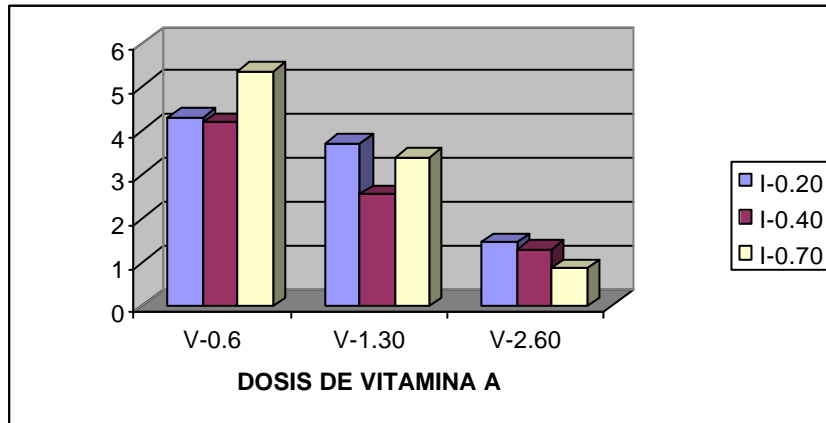


Fig. 7

GRÁFICO SOBRE LA REGENERACIÓN PROMEDIO DEL EMBRIÓN

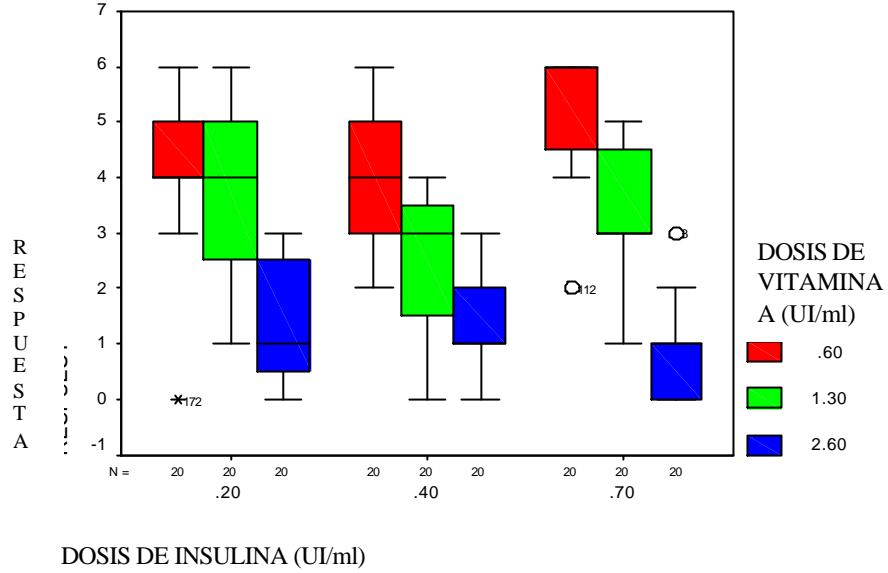


Fig. 8

REGENERACIÓN DEL EMBRIÓN BASADO EN LA VITAMINA A PARA LOS DIFERENTES NIVELES DE INSULINA

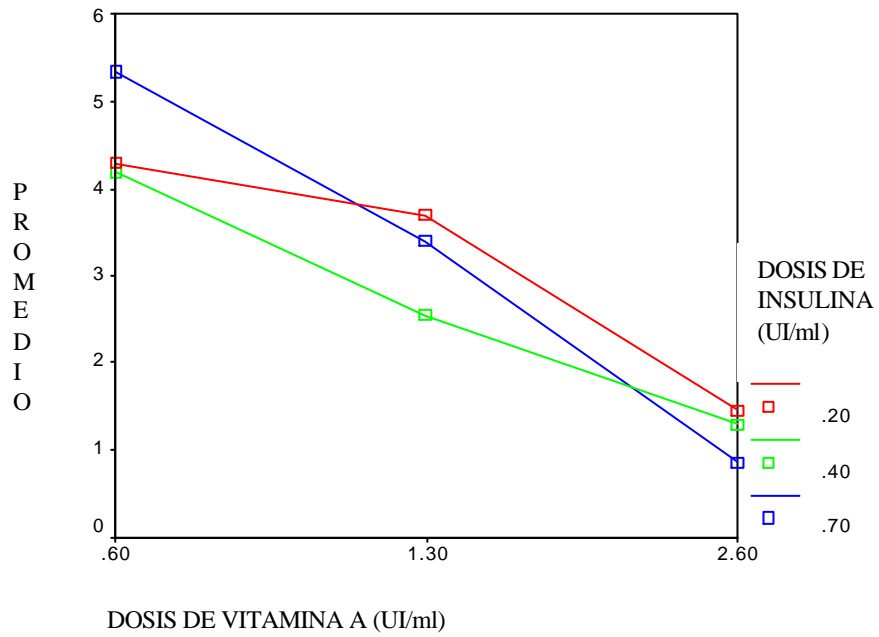


Fig. 9

REGENERACIÓN DE LOS EMBRIONES BASADO EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRA POR VITAMINA A

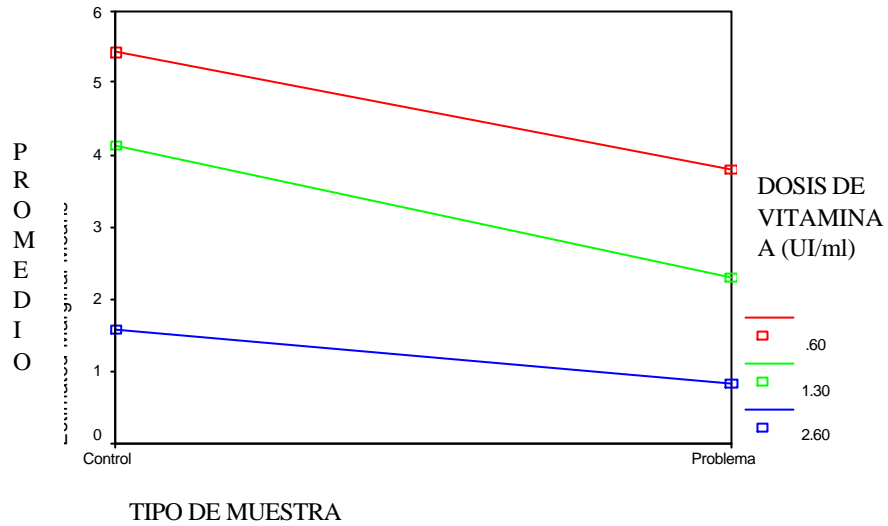


Fig. 10

REGENERACIÓN DEL TEJIDO EMBRIONARIO VITAMINA-A-INSULINA

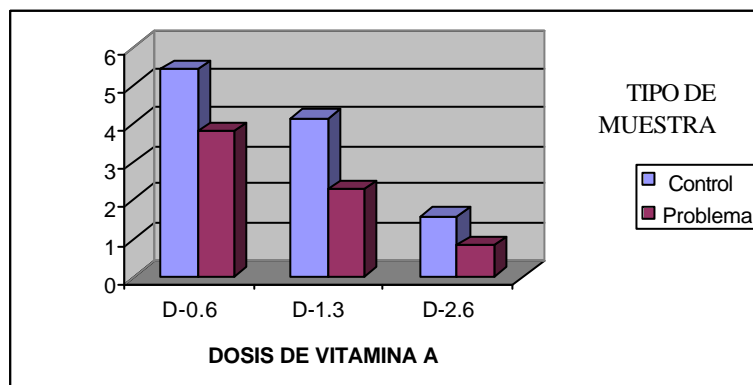


Fig. 11

REGENERACIÓN DE LOS EMBRIONES POR TIPO DE SUERO

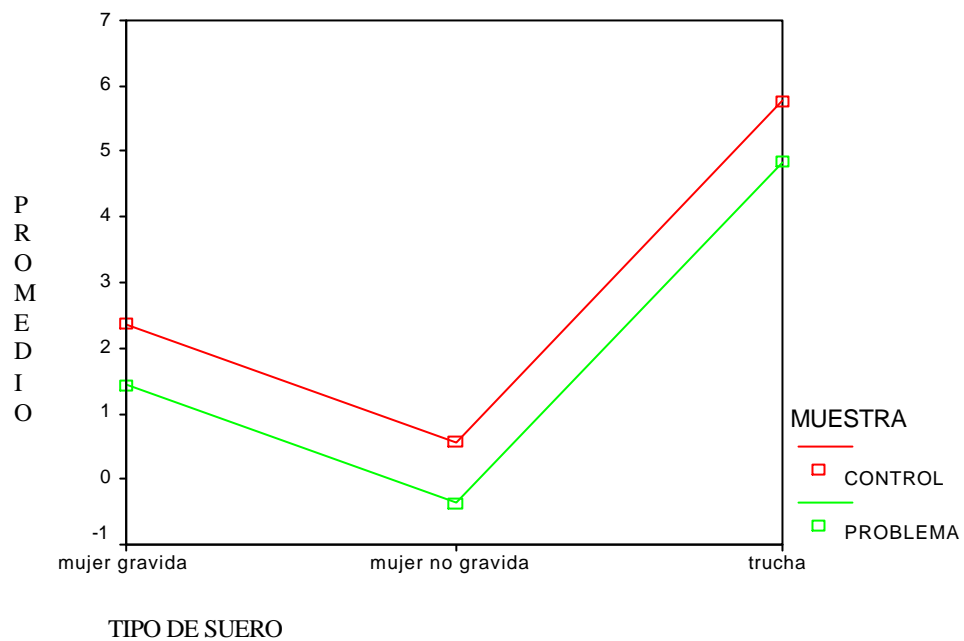


Fig. 12

REGENERACIÓN DE LOS EMBRIONES POR TIPO DE MUESTRA

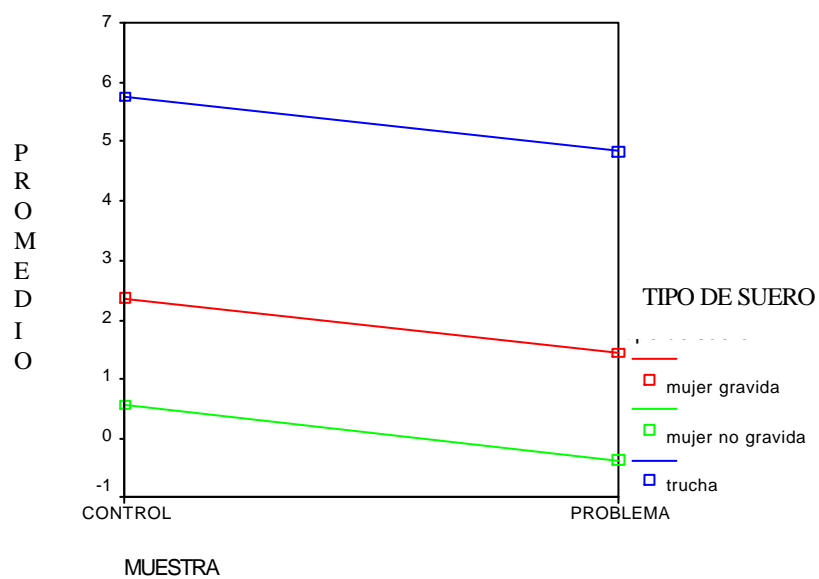


Fig. 13

IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS DEL MEDIO

