

“Efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* desintegrada y tres fracciones en una línea celular y como aditivo alimentario en el cultivo de *Artemia*”

**Tesis presentada en opción al Título Académico
de Master en Biología Marina y Acuicultura
con Mención en Ecología Marina**

**Autora: Lic. Yamilé Comabella Soto
Tutoras: Dra. Tsai García Galano
Dra. Olimpia Carrillo Farnés**

**Ciudad de La Habana
-2003-**

RESUMEN

En el presente estudio se evalúa el efecto que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de forma desintegrada (LD) y tres fracciones obtenidas de ella (complejo pared-membrana (FP), núcleo-proteínas (FN) y citoplasma (FC)) produce en dos modelos biológicos experimentales: la línea celular MB16-F10 y la especie *Artemia franciscana*. Para los estudios celulares se empleó la parte soluble de cada una de estas fracciones probándose las concentraciones de 0.5, 1, 2, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ adicionándose el valor de 25 $\mu\text{g/mL}$ para LD y FC. Se determinó el efecto en la proliferación, vitalidad y fases del ciclo celular a las 48 y 72 horas. Como resultado se obtuvo una acción estimulante de la proliferación celular con LD $5 \mu\text{g/mL}$ a las 48 horas y con FN 0.5 y $1 \mu\text{g/mL}$ a las 72 horas. Sin embargo, FC 0.5 , 1 y $2 \mu\text{g/mL}$ mostraron un marcado efecto inhibitorio en el crecimiento de estas células, induciendo acumulación de las mismas en la fase G_0 - G_1 . Se exponen posibles efectores de esta respuesta pero sin ser dilucidado el agente causal de este fenómeno. Para la evaluación del efecto como aditivo alimentario en artemias, se cuantificó la influencia ejercida en el crecimiento, biomasa seca, porcentaje proteico, supervivencia y estadios del desarrollo en nauplios y juveniles; así como en los niveles de microorganismos presentes en el agua de cultivo. Se aplicaron diferentes concentraciones de los aditivos (6, 10 mg/L) en una dieta basal con el alga *Nannochloropsis oculata*. Los nauplios alimentados con LD fueron los que alcanzaron las mayores longitudes corporales (0.70 mm) y la mayor biomasa seca (310.5 mg), diferenciándose significativamente del control ($p \leq 0.05$). En los juveniles, el incremento de la concentración de los aditivos promovió un mayor crecimiento y los alimentados con LD y FP (10 mg/L) fueron los que obtuvieron las mayores longitudes (2.53 mm y 2.49 mm) y las más altas supervivencias (75.8% y 72.5% respectivamente). El mayor desarrollo se alcanzó con LD a esta concentración, encontrándose el 24.4 % de los individuos en el estadio más avanzado. El menor porcentaje proteico y los niveles más altos de microorganismos en el agua se hallaron para FC. Los mejores resultados se obtuvieron con LD, esta es la fracción que conserva de forma más íntegra los elementos celulares a los cuales tienen acceso tanto las células en cultivo como las enzimas digestivas de las artemias debido al proceso de desintegración al que fue sometida la levadura seca, lo que induce a considerar que son importantes los efectos sinérgicos o cooperativos entre los distintos componentes de la misma.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura mundial ha alcanzado un desarrollo vertiginoso en las últimas dos décadas, proporcionando fuentes de empleos y ganancias económicas importantes para los países productores. No obstante, su crecimiento incontrolado en muchas regiones ha hecho evidente los efectos en el medio ambiente y ha generado numerosos conflictos con otras empresas productivas por el uso del agua, del suelo y de las materias primas para la producción de los alimentos necesarios para el mantenimiento de estas poblaciones cautivas.

Este marcado auge motivó que una parte de la comunidad científica mundial dirigiera sus investigaciones hacia este campo, centrándose los esfuerzos principalmente en la creación y el perfeccionamiento de las técnicas de cultivo, el control sanitario y la búsqueda de alimentos balanceados; todos con el objetivo final de garantizar un manejo adecuado que permita la obtención de beneficios económicos.

Uno de los aspectos más delicados es la elaboración de los alimentos para este sector, no sólo por la repercusión en el crecimiento, reproducción, supervivencia y estado de salud de las especies de cultivo, sino también por el peso importante que tienen en el balance económico, pues la alimentación puede llegar a representar hasta dos tercios de los costos de operación de las granjas (Civera *et al.*, 1999)

Por otra parte, los organismos acuáticos como peces y crustáceos, tienen altos requerimientos proteicos (Martínez *et al.*, 1999) siendo este un criterio a tener en cuenta para la elaboración de sus alimentos. Tradicionalmente la principal fuente de proteínas utilizada en un mayor porcentaje en sus dietas ha sido la harina de pescado. Sin embargo, en los últimos años, la demanda de este producto ha sobrepasado ampliamente a la oferta, por lo que se ha hecho evidente la exploración de nuevas fuentes, nutritivas y económicas, que garanticen la sostenibilidad del sector. En este sentido, la diversificación de alternativas proteicas ha sido amplia, abarcando desde la sustitución parcial o total de las dietas tradicionales con

productos de diversos orígenes, hasta la utilización de subproductos de la agricultura, la ganadería y la industria.

A esto se le suma otro de los grandes problemas que enfrenta la acuicultura mundial: la dependencia de cultivos masivos de algas unicelulares, rotíferos y artemias. Los altos costos de producción que estos presentan, así como las variaciones temporales tanto en su disponibilidad como en su valor nutricional, siguen siendo factores que limitan las operaciones acuícolas y han sido el incentivo principal para la creación e introducción de dietas artificiales.

Una vía para dar solución a estas problemáticas ha sido el empleo de fuentes no convencionales, como las proteínas unicelulares. Específicamente, las levaduras han sido una opción interesante por presentar un tamaño de partículas y una estabilidad adecuada en la columna de agua que permiten su fácil ingestión por los organismos filtradores; una producción masiva en poco tiempo cuyo costo es menor con relación al cultivo de algas vivas (Coutteau y Sorgeloos, 1997); así como la existencia de altos niveles de proteínas y de vitaminas del complejo B (Martínez *et al.*, 1999), aunque hay que tener en cuenta que su composición química varía de acuerdo a la especie, al medio de cultivo y a las condiciones físico-químicas en que se desarrollan.

La literatura científica mundial recoge numerosos artículos donde se evalúan diferentes tipos de levadura como ingredientes en dietas para especies de cultivo como camarones (Jones *et al.*, 1987; Abdel-Rahman, 1996; Cuzón, 1996; Soundarapandian *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 2002), moluscos (Coutteau *et al.*, 1990a, 1994; Southgate *et al.*, 1998), peces (Matty y Smith, 1978; Mahnken *et al.*, 1980; Steffens *et al.*, 1992; Goddard y Martín, 1993) entre otros. En la mayoría de estos estudios se prueban las levaduras como sustitutos (parciales o totales) de otros componentes (Coutteau *et al.*, 1992; 1993; Oliva y Gonçalves, 2001).

En Cuba, la levadura más utilizada para dietas de especies de cultivo acuícola ha sido la torula (*Candida utilis*) (Gelabert *et al.*,1988; García *et al.*, 1992; Ramos y García, 1992; Fraga *et al.*, 1996; Álvarez, 1997) debido a la buena disponibilidad que existe, por ser uno de los tantos subproductos que se obtienen de la caña de azúcar, mediante la utilización de las mieles como sustrato para el desarrollo de estos microorganismos. No obstante, la levadura más empleada como suplemento o sustituto dietético en la acuicultura mundial es *Saccharomyces cerevisiae* (Nell *et al.*, 1996). En nuestro país ha sido evaluada la calidad proteica de esta levadura como alimento para camarones mediante su digestibilidad *in vitro* utilizando el homogenado de hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti* (Forrellat *et al.*,1988).

Sin embargo, el uso de fracciones de levadura como aditivo en la nutrición acuícola no se encuentra muy generalizado, encontrándose los trabajos de Rumsey *et al.* (1991**b**) quienes evaluaron el efecto en la digestibilidad y valores energéticos de células de levadura intactas, desintegradas y sus extractos en dietas para truchas; el de García *et al.* (1997) donde aislaron dos fracciones proteicas de la levadura torula: una que contenía proteínas de un peso molecular mayor a 10 000 daltons y la otra con proteínas de peso molecular menor a esa cifra; y el de Supphantharika *et al.*, (2003) quienes separaron β glucanos de *S. cerevisiae* para determinar el efecto inmunoestimulante en camarones. El resto de los estudios analizados utilizan la levadura sin fraccionar o realizan el tratamiento químico sugerido por Coutteau *et al.* (1990**b**) con el cual se logra una mayor permeabilidad en la pared celular de la levadura a las enzimas digestivas del consumidor.

Como se observa, los aportes de las investigaciones sobre el empleo de fracciones de levaduras como aditivos para dietas de uso en la acuicultura, tanto a escala mundial como nacional, demuestran que son todavía insuficientes, por lo que se hace necesaria la realización de estudios que permitan dilucidar el efecto que estas pueden ejercer en el desarrollo general de los organismos en cultivo. Con estos fines, el empleo de modelos biológicos resulta valioso, pues independientemente de las ventajas experimentales que ofrecen, ellos permiten la realización de un análisis

más profundo y rápido de la relación dosis–respuesta del producto de interés con un menor costo. A esto se le añade la posibilidad de utilización de modelos con niveles diferentes de organización biológica como es el celular y el de organismo, lo que permite la realización de una valoración más integral del producto a probar como alimento. Por estas razones, en el presente estudio se evalúa el efecto que ejercen fracciones de levadura sobre dos modelos experimentales diferentes: la línea celular MB16-F10 y el crustáceo *Artemia franciscana*, formulándose como hipótesis de trabajo:

“La levadura panadera *Saccharomyces cerevisiae* desintegrada y/o las fracciones obtenidas favorecen la proliferación y la vitalidad de las células de la línea MB16-F10 y empleadas como aditivo alimentario, mejoran el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de *Artemia franciscana*”

OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la levadura panadera *Saccharomyces cerevisiae* desintegrada y tres fracciones celulares obtenidas de esta en:

1. La proliferación, la vitalidad y el ciclo celular en la línea MB16-F10
2. El crecimiento, la biomasa seca y el porcentaje de proteína corporal en nauplios de *Artemia franciscana*.
3. El crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de juveniles de *Artemia franciscana*; así como en el nivel de microorganismos desarrollados en el agua de cultivo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con la intensificación de los sistemas de cultivo, ha ido tomando una mayor relevancia la calidad y la cantidad del alimento suministrado. Por esta y otras razones, las investigaciones sobre el tema se han enfocado hacia la optimización de los métodos de alimentación y hacia la búsqueda de nuevas fuentes que sean amigables con el medio ambiente y que cubran los requerimientos nutricionales de las especies en cultivo.

Con este fin, han sido evaluadas harinas provenientes de fuentes tan diversas como: la soya (Webster *et al.*, 1992; Álvarez *et al.*, 1996 a,b; Sheen y Huang, 1998; Davis y Arnold, 2000), los crustáceos (Jaime y García, 1992; Sudaryono *et al.*, 1995), los anélidos (Alfonso y Núñez, 1984; García y Jaime, 1990; García *et al.*, 1999), los nemátodos (Fernández, 1987), la hepatopancreatina (Forrellat *et al.*, 1998), los subproductos del cítrico (Sotolongo, 1988), los desechos de la industria alimenticia (Wildman, 2001) y los microorganismos. Muchos de estos compuestos han sido empleados como aditivos en las dietas de disímiles especies. Los aditivos alimentarios son aquellas sustancias que se adicionan intencionalmente a los alimentos para realizar una o varias funciones específicas (Carrillo *et al.*, 2000). Este término incluye a compuestos de diferente naturaleza como: antibióticos, probióticos, nutrientes, pigmentos, enzimas, preservantes, antioxidantes, atractantes y estimuladores del apetito. Entre otros, resultan particularmente importantes aquellos que influyan directa o indirectamente en la velocidad de crecimiento, lo cual se refleja en el aumento de la talla y el peso corporal de los organismos en cultivo.

El uso de microorganismos como aditivos en las dietas requiere especial atención por las numerosas ventajas que ofrecen como productores de nutrientes, debido a la versatilidad de substratos donde se desarrollan, los altos niveles proteicos que poseen y el corto tiempo de generación (Tacon, 1989). Dentro de este grupo se encuentran determinadas algas, bacterias, hongos y levaduras.

Las levaduras

Las levaduras son células eucarióticas que poseen una organización interna compleja. Una de las definiciones más aceptada es: “aquellos hongos, basidiomicetos o ascomicetos cuyo estado vegetativo es unicelular, que se multiplican por gemación o fisión, que pueden producir o no esporas durante su etapa sexual y que no han sido clasificados como otro tipo de hongos” (Spencer y Spencer, 1997a).

La composición bioquímica de las levaduras es variable. Numerosos investigadores coinciden en que el mayor porcentaje está representado por las proteínas, aunque difieren en el espectro de valores; Tacon (1989) informó que ellas contenían entre un 15% y un 30% de proteínas mientras que Otero (1999) significaba entre 40-60% y Brown *et al.* (1996) entre 25-37%. Estas proteínas están localizadas en su mayoría en el citoplasma celular y otra porción está integrada a los ribosomas, al núcleo, a la membrana y a la pared celular (Otero, 1999).

El segundo componente mayoritario son los carbohidratos, los cuales según Brown *et al.* (1996) oscilan entre el 21% del peso seco en *Debaromyces hansenii* hasta el 39% en *Saccharomyces cerevisiae*. Específicamente, estas células son ricas en beta-glucanos, los cuales, según Otero (1999), pueden conformar hasta el 4% del peso seco de las mismas. Los porcentajes lipídicos son bajos, entre un 4-6% del peso seco (Brown *et al.*, 1996; Otero, 1999) y se acumulan básicamente en las estructuras membranosas. Los valores de los ácidos nucleicos para ARN oscilan entre 4-7% del peso seco y para ADN entre 0.05-0.32% (Brown *et al.*, 1996).

Desde hace cientos de años, las levaduras han sido utilizadas para la elaboración de pan y para la obtención de alcoholes a partir de la fermentación de disímiles substratos (Joshi y Sandhu, 1996; Ogonna *et al.*, 1996). En la actualidad, el espectro de utilización de estas se ha ampliado enormemente debido a todas las

potencialidades que este grupo posee y que sólo han podido ser conocidas gracias al avance científico y tecnológico alcanzado por la humanidad.

Pero el empleo de las levaduras no sólo se restringe a su uso como biofábricas capaces de transformar un substrato dado para crear un producto de interés para el hombre, sino que ellas han sido utilizadas directamente como fuente de alimento por su alto valor proteico. Un ejemplo de esto es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual ha sido probada en grupos como rotíferos (Nagata y Whyte, 1992; Walford y Lam, 1992; Vallejo *et al.*, 1995), *Artemia* sp. (Chien *et al.*, 1991), *Daphnia* sp. (Vigano, 1993), camarones (Roques y Dussert, 1991; Mura *et al.*, 1997) y peces (Robertsen *et al.*, 1990).

Esta es la especie de levadura más conocida dentro de las aproximadamente 500 especies reportadas por Kreger-Van Rij (1984) por su uso en las industrias panadera y cervecera. La versatilidad de productos de esta especie se debe a las características ligeramente diferentes de las cepas: aquellas cepas que posean una tolerancia mayor que lo normal al etanol son usadas en la elaboración de cerveza y las que toleren las altas concentraciones de azúcares son empleadas en la producción de panes (Pomper y Passwater, 2002). Sin embargo, esta especie ha sido aislada del intestino de varias especies de peces marinos (Andlid *et al.*, 1998,1999; Tovar *et al.*, 2000) siendo esto una muestra de la diversidad de hábitat que poseen.

Dentro de las características generales de la especie vale señalar la complejidad de la pared celular, la cual está compuesta por tres capas: una exterior amorfa de mananos; una intermedia de beta-glucanos alcalo-solubles y una interna rígida de beta-glucanos alcalo-insolubles. Esta última brinda la rigidez y la configuración de la célula que generalmente es redondeada (Spencer y Spencer, 1997b)

Modelos biológicos experimentales

Un modelo de este tipo es aquel que permita estudiar determinados procesos biológicos o el efecto que pueda ejercer algún factor externo sobre dicho sistema. Estos modelos deben ser de fácil manipulación y buena disponibilidad para los investigadores, resistentes, exportables y prolíficos.

Los modelos biológicos experimentales por excelencia para investigaciones moleculares y del metabolismo han sido los celulares. El cultivo de tejidos surgió a principios del siglo pasado como un método para el estudio del comportamiento de células animales bajo el estrés de un experimento y libres de las variaciones sistémicas que ocurren durante la homeostasis normal. En la literatura este término es usado genéricamente e incluye al cultivo de órganos, al cultivo primario y al celular. El primero implica un cultivo tridimensional de un tejido no desagregado que mantiene las características e interacciones del tejido *in vivo*; el segundo se refiere al cultivo de un fragmento de tejido cuya migración es promovida en el plano del sustrato sólido; y el tercero conlleva al cultivo de células dispersas que fueron tomadas del tejido original, de un cultivo primario o de una línea celular mediante la desagregación enzimática, mecánica o química (Freshney, 2000).

Sin embargo, debido al fenómeno conocido como senescencia, las células normales pueden dividirse solamente un número limitado de veces; por lo que las líneas celulares derivadas de tejido normal mueren después de un número de subcultivos de la población. Las excepciones son aquellas células con mecanismos capaces de extender su lapso de vida como son las células transformadas y las tumorales. Esta transformación de células en cultivo implica un cambio hereditable, espontáneo o inducido, en el ADN y en la expresión de los genes. Una de las transformaciones existentes es la inmortalización celular. Este es un proceso que involucra la inactivación de un número de genes reguladores del ciclo celular con el objetivo de lograr la adquisición de un ciclo de vida infinito (Freshney, 2000).

La creación y mantenimiento de líneas celulares representó un avance extraordinario para los estudios biológicos. Su existencia promovió el desarrollo acelerado que ha tenido la toxicología, la carcinogénesis y la genética. Además, su utilización como modelo de prueba de sustancias, así como su uso para estudios del metabolismo celular *in vitro* y para el diagnóstico de enfermedades, avalan el marcado auge mundial que estos sistemas han tenido.

La mayoría de los cultivos celulares provienen de vertebrados, principalmente de mamíferos, por la importancia en estudios relacionados con la salud humana. Durante muchos años los vertebrados menores y los invertebrados fueron ignorados y los aspectos únicos de su desarrollo como la regeneración de tejidos y la metamorfosis, hicieron a estos grupos atractivos para el estudio de las bases moleculares del desarrollo. Además, las necesidades de la agricultura y el control de pesticidas actualmente han motivado estudios toxicológicos y virológicos en insectos, siendo este el grupo cuyas líneas celulares tienen un amplio uso (Marks, 1983; Hatt *et al.*, 1997; Rodríguez, 1999).

Para las especies acuícolas de cultivo, el establecimiento de líneas celulares ha tenido como objetivo principal su uso en investigaciones de enfermedades (Tong *et al.*, 1998). Un gran número de estos sistemas se han definido para los peces, grupo a la vanguardia en este sentido. Desde la primera línea celular de peces reportada en la literatura en 1962, Fryer y Lannan (1994) resumían la creación de al menos 157, la mayoría derivada de especies de agua dulce o anádromas. Esa cifra se ha incrementado destacándose las líneas obtenidas de *Sparus aurata* L. por Bejar *et al.*(1997); la de Tong *et al.* (1997) con *Paralichthys olivaceus* y la reciente obtenida por Chang *et al.*(2001) para *Lates calcerifer* con células epiteliales.

Con relación a los invertebrados acuáticos la situación no es tan ventajosa, pues aunque Burns y Friedman (2002) lograron establecer una línea celular de moluscos, el cultivo de tejidos de crustáceos se encuentra en una etapa temprana donde muy

pocos sistemas han sido desarrollados para los diferentes tejidos de estos organismos.

Chen *et al.* (1986) lograron el crecimiento observable de células gonadales de *Penaeus monodon*, pero el subcultivo alcanzó solamente tres generaciones. Frerichs (1996) expuso: “no se encuentra todavía disponible una línea celular permanente derivada de tejidos de crustáceos”. Por esta razón, él intentó establecer una de *Macrobrachium rosenbergii* con tejido embrionario, lo cual fue un fracaso a causa de la pérdida de adherencia de las células en cultivo y del cese de la multiplicación celular. Este autor concluyó que aunque pudiera ser desarrollada una metodología para el establecimiento de líneas celulares de crustáceos, la tasa de crecimiento de las células en cultivo es tan baja que no satisface los requerimientos de una rutina virológica. Shimizu *et al.* (2001) plantearon que todavía hasta esa fecha no había sido establecida una línea celular continua de crustáceos marinos.

Lo que hasta ahora ha sido posible es el cultivo primario de determinados tejidos para estudios de efectos a corto plazo. Así se pueden señalar las investigaciones de Luedeman y Lightner (1992) con cultivo de células ováricas de camarones; la de Ghosh *et al.* (1995) quienes cultivaron hepatocitos de camarón durante diez días; las de Tong y Miao (1996) con *P. chinensis*; las de Purushothaman *et al.* (1998) quienes desarrollaron cultivo primario celular de tres especies de crustáceos sin poder establecer líneas celulares; las de Sano (1998) con hemolinfa de camarón y las de Walton y Smith (1999) quienes mantuvieron un cultivo primario de hemocitos de decápodos marinos por un mínimo de 14 días.

La mayor dificultad para el cultivo de células de invertebrados marinos radica, según Cancre *et al.* (1995), en el limitado conocimiento que se tiene de los factores de crecimiento específicos necesarios para el establecimiento de un adecuado medio de cultivo. El paso más cercano hacia el establecimiento de una línea celular de crustáceos reflejado en la literatura hasta el momento es el dado por Lang *et al.* (2002). Ellos estudiaron el proceso de división celular en cultivos primarios de células

linfoides y ováricas de camarón, aspecto este importante para la transformación celular que es imprescindible hacer para lograr una línea celular continua.

Todas estas son las razones por lo que se emplean líneas celulares ya definidas, aunque sean de mamíferos, para estudios de este tipo. Además, el uso de líneas tumorales como vehículo de prueba de cualquier compuesto novedoso es un aporte más a la incesante búsqueda de terapias contra el cáncer. Dentro de las líneas tumorales existentes, la MB16-F10 (proveniente de melanoma murino) tiene por características principales su rápido crecimiento adherido a un substrato y su fácil manipulación.

Sin embargo, el uso de los modelos experimentales celulares, independientemente de las ventajas que ofrecen, tienen como principal limitante la falta de variaciones y regulaciones sistémicas que tiene lugar a nivel de organismo. Es por eso que los modelos animales ocupan un lugar importante en las investigaciones no sólo biológicas.

El empleo de artemias con estos fines ha sido ampliamente avalado. Es su ciclo de vida corto, su rápido crecimiento fácilmente cuantificable, la facilidad de su manejo y mantenimiento así como la obtención de lotes bien establecidos y reconocidos, lo que hacen de este grupo un excelente modelo de experimentación en áreas como la genética (Maiorano *et al.*, 1997), la biología molecular, la ecología y la toxicología (Rodríguez, 1998). Pero también los estudios relacionados con la nutrición no han quedado al margen de la utilización de estos crustáceos (Panal, 2001), pues independientemente de su gran valor como alimento en la acuicultura, las similitudes con los camarones comerciales, tanto filogenéticas como anato-fisiológicas y de desarrollo, permiten su uso como modelo para extrapolar los resultados obtenidos hacia las especies de interés económico.

Las artemias son una fuente de alimento común tanto para los estadios larvales y adultos de peces (Sulem, 1987; Sorgeloos *et al.*, 2001), camarones (Kumlu y Jones, 1995) y cefalópodos (Villanueva *et al.*, 2002). Además, la posibilidad de incrementar

su valor nutricional como alimento mediante el enriquecimiento de sus dietas, ha catalizado su uso internacionalmente (Ako *et al.*, 1994).

El ciclo de vida, el cual puede variar en dependencia de las condiciones ecológicas en las que se desarrollan, comprende los estadios de quiste, nauplio, juvenil, pre-adulto y adulto. Los quistes pueden permanecer latentes por muchos años mientras se encuentren secos, pues una vez puestos en contacto con el agua se rehidratan y los embriones, que hasta ese momento eran metabólicamente inactivos, continúan su desarrollo. Apéndices lobulados pares van apareciendo en la región del tórax y se diferencian en toracópodos. Estos presentan tres partes funcionales: endopoditos y telopoditos con función locomotora y filtradora, y exopoditos membranosos que funcionan como branquias. A ambos lados del ojo naupliar se van desarrollando los ojos complejos laterales y el segundo par de antenas con el tiempo pierden su función locomotora y sufren diferenciaciones sexuales: en los machos se diferencian en ganchos aferradores para la cópula (clasper) y en las hembras degeneran en apéndices sensoriales. No obstante, las hembras pueden ser reconocidas por su útero visible situado justo debajo del último par de toracópodos (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Son organismos capaces de incrementar 20 veces su talla y 500 veces su biomasa desde el estado naupliar hasta el estado adulto a través de 15 mudas. Este último se alcanza entre los 8-12 días, encontrándose el intervalo de tallas entre 8-20 mm (Greco *et al.*, 2000). La temperatura y salinidad óptimas para su desarrollo oscilan entre 25-30°C y 30-35 ppm respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y caracterización de fracciones de levadura

La levadura panadera seca activa *Saccharomyces cerevisiae* (LEFERSA, Cuba) obtenida a partir de las mieles finales de la caña de azúcar fue fraccionada en el Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) siguiendo la metodología de Otero *et al.* (1996). Como resultado, a partir de un homogeneizado inicial de *S. cerevisiae*, se obtuvo la levadura desintegrada (LD) y tres fracciones celulares: complejo pared-membrana (FP), núcleo-proteínas (FN) y citoplasma (FC) (Fig. 1). Posteriormente cada derivado fue congelado a -20°C hasta su liofilización.

Se realizó el análisis bromatológico según las técnicas convencionales (AOAC, 1990): materia seca en un horno a 105°C hasta peso constante, ceniza por incineración en una mufla a 500°C por 12 horas, proteína (N x 6.25) por el método Kjeldahl y grasas siguiendo el método de extracción Soxhlet.

Experimentos en cultivo celular

Se empleó la línea celular de melanoma murino MB16-F10 donada por el Centro de Inmunología Molecular, la cual fue mantenida en frascos de 25 y 75 cm² (Corning) a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂, utilizando medio RPMI 1640 (GIBCO BRL) conteniendo suero fetal bovino al 10%. Por las características que esta línea presenta de crecer adherida, se procedió a remover el medio realizándose un lavado posterior con PBS 1X con el objetivo de eliminar las células muertas y los catabolitos residuales. Para despegar las células de interés se añadió 1mL de tripsina-EDTA 1X (Trip. 0.25%, EDTA-4Na 1mM (Gibco)) y se incubaba a 37°C por 2 minutos. Posteriormente se añadieron 10mL de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino transfiriéndose la suspensión celular a un tubo para ser centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos con el objetivo de desechar los restos de este producto y evitar

daños celulares. El sobrenadante se aspiró y el pellet fue resuspendido nuevamente para una segunda centrifugación. Posterior a este proceso, el aglomerado celular era disuelto en un volumen conocido de medio RPMI al 1% de suero fetal bovino y se realizaban los conteos en hematocitómetro de Neubauer. Con este resultado se ajustó el volumen en el que se encontraban las células con el fin de obtener una concentración tal que permitiera tener 5×10^4 células por cada 950 μL tomados de dicha suspensión.

Finalmente, para cada experimento (diseño completamente aleatorizado), se sembraba esta cantidad en placas de 24 pozos (Costar). El volumen restante para completar el mililitro de capacidad de cada pozo, era cubierto con las diferentes diluciones de las fracciones de levadura y en el caso del control con el propio medio en el que se encontraban las células. Las placas fueron incubadas por 48 y 72 horas (con 2 y 3 réplicas para cada tratamiento respectivamente) bajo las condiciones descritas anteriormente.

Sobre esta línea fueron probadas diferentes concentraciones de las fracciones de levadura. Para esto, primeramente fueron disueltas en PBS 1X logrando en todas la concentración de 5 mg/mL de peso seco. Posteriormente eran centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos con el objetivo de decantar la parte insoluble de cada fracción. Al sobrenadante, el cual sería el que se utilizaría en el cultivo, se le determinó la concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Pierce). El pellet se mantuvo en los tubos de centrifugación (los cuales fueron previamente pesados) y se colocaron en la estufa a 60°C hasta alcanzar peso constante. Esto permitió calcular el porcentaje de solubilidad de cada una de las fracciones empleadas en los experimentos.

Sobre la base de estos resultados, se realizaron diferentes diluciones para obtener una gama de concentraciones de 0.5, 1, 2, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteína soluble en medio RPMI al 1%, adicionándose el valor de 25 $\mu\text{g/mL}$ para las fracciones LD y FC.

Esto se realizó con el fin de estandarizar todos los experimentos basados en iguales concentraciones de proteína soluble. Todas las sustancias a probar eran previamente esterilizadas (filtro de 0.2 μm).

Una vez transcurridos los tiempos de incubación, se recolectaba el medio de cultivo con las células que estuvieran en suspensión y se desechaba. A las que quedaban adheridas se le adicionaba 100 μL de tripsina en cada pozo y se incubaba a 37°C por 2 minutos. Posteriormente se añadía 300 μL de medio al 10% resuspendiendo las células para una centrifugación posterior bajo las condiciones anteriormente descritas. El pellet formado era utilizado para la determinación de la proliferación celular, la vitalidad y los porcentajes de las fases del ciclo celular.

Para las dos primeras estimaciones, el aglomerado celular era disuelto en un volumen conocido de PBS 1X tomándose dos muestras de cada réplica para la realización de conteos en hematocitómetro de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico (Leitz), utilizando la técnica de tinción con tripán azul para diferenciar las células vivas de las muertas (las cuales se tiñen con el colorante).

Para la determinación de los porcentajes de cada fase del ciclo celular en el que se encontraban las células, era necesaria la previa permeabilización de las mismas con el propósito de que el fluorógeno accediera al material nuclear (Fig. 2). Posteriormente se realizaba el marcaje con yoduro de propidio [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] añadiendo 250 μl al pellet celular de cada muestra. Luego de una incubación de 45 minutos a 4°C se realizaba la lectura en el citómetro de flujo FACS (Becton Dickinson) mediante la adquisición de mil eventos por muestra. La distribución porcentual de las células en las diferentes fases del ciclo celular fue calculada con ModFit LT, versión 2.0 para Macintosh (Becton Dickinson).

Experimentos en crustáceos

Para evaluar la levadura panadera como aditivo alimentario, se utilizó *Artemia franciscana*, cuya ubicación taxonómica según Ruppert y Barnes (1999) es:

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Clase Branchiopoda

Subclase Sarcostraca

Orden Anostraca

Género *Artemia*, Leach 1819

Especie *Artemia franciscana*, Kellogg, 1906

Los quistes (INVE, USA) fueron incubados durante 24 horas con una iluminación continua proporcionada por dos lámparas fluorescentes de 40 watts. Se les suministró una vigorosa aireación desde el fondo mediante pipetas Pasteur, manteniéndose a temperatura ambiente y con salinidad de 35‰.

Componentes de la dieta

Se utilizó como dieta base al alga *Nannochloropsis oculata* obtenida del cepario del Centro de Investigaciones Marinas (CIM). Estas fueron logradas en cultivos monoalgales mediante aumento progresivo de volumen, empleando el medio Guillard "f/2" (Guillard, 1975), llegando a un volumen máximo de cinco litros. Las condiciones de cultivo fueron las mismas mencionadas para la incubación de los quistes.

En los bioensayos, para mantener la concentración de alimento vivo ajustada a 2×10^5 cel/mL diariamente se realizaban conteos matutinos para la determinación de la concentración del residuo de este alimento en cada uno de los tratamientos así como del cultivo monoalgal. Dichos conteos se realizaban empleando un hematocitómetro de Neubauer y un microscopio biológico (OLYMPUS).

Finalmente se aplicaba la fórmula citada por Alfonso *et al.* (1988) de ajuste de alimento vivo:

$$VAa = V_r (C_d - C_r) / (CAa - C_d)$$

donde: VAa: Volumen de alimento a añadir.

V_r: Volumen de agua del recipiente.

C_d: Concentración deseada.

C_r: Concentración de residuo.

CAa: Concentración de alimento a añadir (concentración del inóculo).

Se probaron como aditivo la levadura desintegrada y las tres fracciones celulares, las cuales antes de ser suministrados fueron maceradas, pesadas (Balanza SARTORIUS, ±0.001g) y diluidas en agua de mar hasta la máxima homogeneización posible.

Diseño experimental

Se llevaron a cabo dos experimentos utilizando en ambos un diseño completamente aleatorizado. Se empleó agua de mar hervida con salinidad ajustada a 35‰. Los recipientes de experimentación (cilindro-cónicos y plásticos) estaban aforados a un litro y capacitados con pipetas Pasteur mediante las cuales se les suministró una aireación constante y moderada desde el fondo. Dichos envases fueron tapados con nylon con pequeñas perforaciones con el fin de evitar la evaporación excesiva del agua y la caída de partículas extrañas pero sin obstaculizar el intercambio gaseoso con el medio.

El alimento fue suministrado siempre una vez al día en horas de la mañana y cada intercambio de agua fue de un 50% del volumen total del recipiente para mantener la calidad de la misma. En ambos experimentos se mantuvo foto-período normal (12 horas de luz -12 horas de oscuridad).

Experimento A: Evaluación en nauplios de *Artemia*

Un gramo de quistes (con eficiencia de eclosión de 86%) fue incubado en cada uno de los 15 frascos de un litro de capacidad bajo las condiciones anteriormente descritas. Los nauplios recién cosechados fueron trasladados a igual cantidad de recipientes de experimentación.

El experimento tuvo una duración de 48 horas, realizándose un recambio de agua al cabo de las 24 horas. Se emplearon cinco tratamientos con tres réplicas cada uno (Tabla 1)

Experimento B: Evaluación en juveniles de *Artemia*.

Fueron incubados 0.5 g de quistes en un litro de agua, bajo las condiciones antes mencionadas. Después de la cosecha, los nauplios se mantuvieron tres días en un recipiente de cinco litros de capacidad. Cada día se intercambiaba agua y se alimentó sólo con microalgas (2×10^5 cel/mL). Al tercer día de eclosionados se sembraron (mediante conteo directo) 200 nauplios en cada uno de los 27 frascos experimentales. El bioensayo tuvo una duración de cinco días realizándose recambio de agua cada 48 horas. Se aplicaron 9 tratamientos con tres réplicas cada uno (Tabla 1) y no se evaluaron concentraciones menores pues Mauri (2003) no encontró diferencias significativas con relación al control al emplear 2 mg/mL de cada fracción.

Parámetros evaluados

➤ **Abióticos**

La temperatura del agua fue medida mediante un termómetro de mercurio (+/- 0.1°C) y la salinidad con un refractómetro óptico ATAGO (+/-1‰). Ambos parámetros se midieron dos veces al día en cada bioensayo. Al inicio y al final de cada experimento se tomaron muestras de agua de cada tratamiento para determinar pH (pHmetro OAKTON; $\pm 0.01U$) y amonio. Este último fue medido de acuerdo con el método de indofenol azul (Parsons *et al.*, 1982).

➤ **Bióticos**

Crecimiento y desarrollo. Al finalizar los experimentos se cosecharon al azar muestras de ejemplares de cada tratamiento. Estos fueron fijados en formalina al 3% en solución salina fisiológica al 0.9%. Posteriormente, el crecimiento de los organismos se determinó a partir de la medición al azar del largo total (tl) de 30 ejemplares por recipiente en los dos bioensayos. Con ayuda de un microscopio biológico (CARLZEISS) equipado con un micrómetro ocular calibrado, los ejemplares fueron medidos desde el extremo del rostrum hasta el inicio de la furca (Fig. 3).

En el experimento B se establecieron cuatro estadios de acuerdo con el avance en el desarrollo observado en los ejemplares:

- I -Escaso desarrollo del animal, semejante a la fase naupliar.
- II -Toracópodos poco desarrollados y ausencia de espinas en la furca.
- III -Toracópodos de mediano desarrollo y presencia de espinas en la furca.
- IV -Toracópodos bien desarrollados e inicio del dimorfismo sexual.

Supervivencia. Al finalizar el experimento B se determinó el total de ejemplares de cada tratamiento por conteo directo.

Biomasa seca y nivel proteico corporal. Al finalizar el experimento A, se cosecharon los ejemplares de cada tratamiento usando una malla de fitoplancton. Cada cosecha se almacenó en cápsulas Petri previamente rotuladas y pesadas, y se colocaron en la estufa a 75°C hasta alcanzar peso constante. Para la determinación del nivel proteico corporal de las artemias se pesaron 0.025g de artemia seca y se homogeneizaron en 1mL de agua destilada mediante el empleo de un micromacerador manual. Posteriormente se centrifugó a 10 620 X g durante 5 minutos y se tomó el sobrenadante para esta determinación mediante el método de Biuret (Bioquant Protein Merck)

Análisis microbiológico. La determinación cuantitativa del nivel de microorganismos aerobios en el agua se realizó mediante el empleo de placas Petrifilm™ (Aerobic Count Plates, 3M Microbiology Products). Estas se incubaron en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 72 horas; transcurrido este tiempo se contaban las colonias con ayuda de un microscopio estereoscópico (CARLZEISS). Las muestras se tomaron al inicio y al final del experimento B.

Análisis estadísticos

Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (para el estudio microbiológico se empleó un análisis de covarianza (ANCOVA)) seguido por el test de Newman Keuls para la comparación múltiple de medias con nivel de significación de 0.05. Previamente fue chequeada la homogeneidad de varianza (Test Bartlett) realizándose las transformaciones $(x+0.5)^{1/2}$ para los conteos y $(\arcsen p^{1/2})$ para los valores porcentuales, aunque los datos sin transformar son los que se muestran en tablas y figuras. Estos procesamientos se realizaron empleando el programa STATISTICA (Edición 98').

RESULTADOS

Los valores obtenidos del análisis bromatológico realizado a cada una de las fracciones de la levadura a evaluar aparecen en la tabla 2. El mayor porcentaje proteico se detectó en la fracción de núcleo-proteínas (FN) (72.18%) y la fracción citoplasmática (FC) presentó los menores valores proteicos, de grasas y de humedad y el mayor valor de cenizas (24.82%).

Para la utilización de estas fracciones en cultivos de células fue necesario determinar la concentración de proteína soluble en PBS 1X, cuyos valores aparecen reflejados en la Tabla 3. En esta tabla también se muestra el porcentaje de solubilidad de cada una de las fracciones. Como se observa, la fracción más soluble de todas es FC con un 96% de solubilidad, lo que indica una pérdida mínima en el pellet insoluble.

Efecto de las fracciones de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo celular

Se examinó el efecto de la parte soluble de las diferentes fracciones de levadura en la proliferación, vitalidad y ciclo celular en células de la línea de melanoma murino MB16-F10, evaluándose el tiempo y la dosis dependencia.

Con la levadura desintegrada, a las 48 horas el único incremento significativo en el número de células vivas se aprecia con la concentración intermedia (5 µg/mL) y el menor valor de células no viables para 1 µg/mL (Fig. 4a). A las 72 horas (Fig. 4b) se observa una disminución general y marcada del número de células viables, sin encontrarse diferencias entre los tratamientos. Con relación al ciclo celular, los resultados se muestran en la Tabla 4, donde no se encontraron diferencias significativas a las 48 horas y a las 72 horas se destaca el incremento en la fase G₂-M de los tratamientos con 1 y 2 µg/mL de LD.

Con relación a la fracción pared-membrana, el efecto significativo sobre la proliferación y la vitalidad celular sólo se observa a la 48 horas (Fig. 5a). En este tiempo, se obtiene la peor vitalidad (29.5%) con la máxima concentración (menor número de células vivas y el mayor número de células muertas), encontrándose el mayor porcentaje de sus células en fase S (Tabla 4). En el experimento más prolongado (Fig. 5b) se observa un incremento general en el número de células vivas y se destaca el despegue de la concentración 5 µg/mL. La mortalidad celular se mantiene baja y estable ($2-5 \times 10^4$ células) y no se presentan diferencias en el ciclo celular (Tabla 4).

En las Figs. 6a y 6b se muestran los resultados de los experimentos con la fracción de núcleo-proteínas a las 48 y 72 horas respectivamente. Con esta fracción se evidencian diferencias en la proliferación celular en ambos tiempos. A las 48 horas se presentan valores celulares menores de todos los tratamientos con relación al control, sin embargo, a las 72 horas, este retardo se ve superado y se presentan valores celulares de casi el doble con relación al control, para 0.5 y 1 µg/mL. A este tiempo la vitalidad es buena, oscilando los valores entre 86-94%. No se encontraron diferencias significativas en el ciclo celular para ambos experimentos (Tabla 4).

Con la FC, en el primer tiempo probado (Fig. 7a) la única diferencia significativa encontrada con respecto al control, es con el tratamiento de 2 µg/mL, mostrando valores muy bajos de células viables, incluso inferiores al valor de siembra. A las 72 horas (Fig. 7b) el efecto que ejercen las concentraciones de 0.5 a 2 µg/mL de FC se hace significativo y muy marcado, pues los valores de células viables son extremadamente bajos (por debajo de la cantidad sembrada inicialmente). Sin embargo las células muertas se mantienen en niveles estables y con las menores cifras promedios con relación a lo obtenido con el resto de las fracciones (valores entre 1.5 y 2.3×10^4 células). En el ciclo celular (Tabla 4) aparecen diferencias significativas a las 72 horas, donde las tres concentraciones mencionadas anteriormente presentan el mayor porcentaje de sus células en fase G_0-G_1 difiriendo

del resto de los tratamientos de forma significativa. Al analizar las concentraciones mayores, se observa un comportamiento semejante de la proliferación y la vitalidad con respecto al control, aunque sí existen diferencias en cuanto al ciclo celular, pues tienen porcentajes significativamente menores en fase G_0 - G_1 y mayores en fase S.

Evaluación de las fracciones de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivos en la alimentación de artemias

La Tabla 5 resume los resultados de los análisis físicos y químicos realizados al agua de cultivo en ambos experimentos. Todos los parámetros se mantuvieron dentro de los intervalos recomendados por Sorgeloos *et al.* (1986) para el cultivo de este crustáceo.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos tanto al inicio como al final de ambos experimentos con relación al pH y al amonio; las diferencias mostradas en la tabla son las halladas entre el inicio y el final de la experimentación dentro de cada tratamiento. Con respecto al comportamiento del pH, se destaca un incremento significativo en el Control y en FC en el Experimento A y un comportamiento contrario en casi todos los tratamientos (excepto $FN_{6mg/L}$ y $FC_{10mg/L}$) del otro experimento. En la cuantificación de los niveles de amonio, se observa que en la mayoría este parámetro se incrementa hacia el final de cada experimento. Las excepciones son los tratamientos con LD y FC en el Experimento A, siendo estos los únicos que muestran diferencias significativas entre los niveles más altos del inicio con respecto al final. De forma general, todos los parámetros abióticos medidos se comportaron similarmente en ambos experimentos, con excepción del amonio, pues estos fueron más elevados en los ensayos con nauplios de artemias.

Experimento A

En la evaluación de la levadura desintegrada y sus fracciones celulares en nauplios de artemia, se lograron alcanzar las mayores biomásas secas alimentando a estos organismos con LD, obteniéndose como promedio 313 mg de artemia seca por gramo de quiste incubado, siendo este valor el único que difiere significativamente del resto (Fig. 8a). El menor valor de biomasa seca se corresponde con el control (294.5 mg).

En cuanto a la composición por largos (Fig. 8a), las mayores tallas (y significativamente diferentes del control) fueron alcanzadas con los aditivos LD y FP (0.70 mm). El control presentó el menor valor promedio de longitudes (0.67mm) aunque este fue el de mayor porcentaje de proteína corporal (24.2 %), difiriendo de forma significativa únicamente con FC (menor porcentaje encontrado, 18.5 %) (Fig. 8b).

Experimento B

A los ocho días de eclosionados los quistes y después de cinco días de tratamiento con los diferentes aditivos, se encontraron las mejores supervivencias en los juveniles alimentados con los aditivos LD (75.8%) y FP (72.5%) a la máxima concentración ensayada, siendo estos los únicos que difieren de forma significativa del control, el cual presentó, junto con FN_{6 mg/L}, el más bajo porcentaje (Fig. 9a)

Al analizarse el comportamiento de las longitudes medias, se aprecia (Fig. 9b) que en todos los tratamientos con aditivos, las tallas promedios son significativamente mayores con relación al control. Dentro de los aditivos a evaluar, la fracción citoplasmática fue la que menos estimuló el crecimiento y las longitudes más elevadas se encontraron con LD y FP a una concentración de 10 mg/L (2.53 y 2.49 mm respectivamente). También se hace evidente que a medida que se incrementa

en la dieta la concentración de los aditivos se produce un aumento tanto en los largos (Fig. 9b) como en la supervivencia (Fig. 9a).

En la tabla 6 se pueden apreciar las variaciones de los diferentes estadios del desarrollo en los tratamientos ensayados. Como se observa, solamente tres tratamientos presentan organismos en fase I de desarrollo, encontrándose el mayor porcentaje en fase II para el control y en fase III para el resto. En el estadio de desarrollo más avanzado (IV) se pueden señalar con valores más elevados a los tratamientos con LD_{10mg/L}, donde el 24.4% de los individuos muestreados se encontraban en esta fase, seguido por FP (a igual concentración) con el 20%, lo cual es más del doble de lo obtenido en el resto de los tratamientos.

Al cuantificar las colonias de microorganismos que cohabitan en el agua de cultivo de las artemias, se encontró el mayor número de las mismas con el aditivo FC_{10mg/L} (39.8×10^4 colonias/mL), siendo este el único valor que difiere significativamente del resto (Fig. 9c).

DISCUSIÓN

La evaluación del efecto que determinados compuestos pueden ejercer sobre niveles tan diferentes (como es el celular y el de organismo) entraña una complejidad tanto experimental como de análisis de los resultados obtenidos. Si a esto se le suma la escasez de trabajos científicos previos y la complejidad *per se* del compuesto a evaluar, como en este caso, entonces se obtiene una matriz de información complicada que conlleva al surgimiento de nuevas líneas de investigación. Como es conocido, en este estudio se trabajó con la levadura panadera *S. cerevisiae*, tomándose primeramente de forma desintegrada, o sea, con todos sus componentes pero con la pared celular quebrada y realizándose posteriormente un proceso de fraccionamiento que resultó en los otros tres elementos a evaluar (pared celular, núcleo-proteínas y citoplasma). Por lo tanto, cada uno de estos cuatro agregados presenta una composición bioquímica compleja, lo cual dificulta aun más el análisis de los posibles efectores de las respuestas derivadas en tales sistemas.

La primera fracción celular obtenida (FP) presenta una complejidad estructural marcada, pues en ella se condensa mayoritariamente las paredes y membranas celulares presentes en las levaduras. Sobre esta línea murina la parte soluble de esta fracción no muestra (con las concentraciones estudiadas) diferencias significativas positivas en cuanto a la proliferación celular. Sin embargo, en los experimentos con artemias se alcanzaron resultados favorables con FP_{10mg/L} para la longitud corporal, porcentaje proteico, supervivencia y niveles de desarrollo para ambos estadios. Resultarían paradójicos estos resultados después de haber expuesto exhaustivamente que la pared celular de estos organismos es la principal desventaja de su uso para la alimentación de especies cultivables marinas. Sin embargo, el proceso de fraccionamiento permite la ruptura de la misma en fragmentos y la exposición de las capas más internas compuestas principalmente por β -glucanos. Estos glucanos han sido utilizados como inmunoestimulantes en diferentes especies de mamíferos (Hunter *et al.*, 2002; Kataoka *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002) y de peces (Brattgjerd *et al.*, 1994; Couso *et al.*, 2003; Li y Gatlin, 2003)

mediante la estimulación de macrófagos; así como de camarones (Song *et al.*, 1997; Huang y Song, 1999; Supphantharika *et al.*, 2003), mediante la activación de las funciones defensivas celulares como la fagocitosis, la melanización, la encapsulación y la coagulación (Batistella *et al.*, 1996; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Esto tiene efectos positivos en la resistencia a enfermedades (Scholz *et al.*, 1999; Lavens y Sorgeloos, 2000) siendo esta la principal garantía para su uso como probióticos en la acuicultura (Andlid *et al.*, 1994; Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000).

La segunda fracción celular de levadura evaluada (FN) muestra un efecto positivo en la proliferación celular a las 72 horas, especialmente para las menores concentraciones (0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$). Aunque esta fracción es la que mayor porcentaje proteico muestra en el análisis bromatológico, no se le puede atribuir a esto el efecto estimulante encontrado, pues para el análisis en cultivo celular las concentraciones para las cuatro fracciones se estandarizaron tomando en cuenta la concentración de proteínas soluble en medio RPMI al 1%. Sin embargo, como no se realizó la incubación propuesta en la metodología de fraccionamiento (Otero *et al.*, 1996), en esta fracción persisten los ácidos nucleicos, por lo que puede existir algún elemento de esta naturaleza que de alguna forma ejerza una influencia positiva en la proliferación celular.

A pesar del alto porcentaje proteico que tiene esta fracción, los valores en casi todos los parámetros evaluados en artemias (crecimiento, biomasa, supervivencia) permanecen intermedios y sin diferenciarse significativamente del control. Como en esta fracción persisten los ácidos nucleicos (AN) resulta interesante destacar que el contenido de los mismos en los microorganismos, como consecuencia de su elevada velocidad de crecimiento, alcanzan niveles no permisibles para una ingestión continuada de estas proteínas en el ser humano y otras especies. Una vez ingeridos, los AN son degradados y llevados a unidades monoméricas; las bases purínicas (guanina y adenina) son metabolizadas a ácido úrico, compuesto muy poco soluble que se deposita en tejidos blandos y articulaciones provocando trastornos de salud

(Otero, 1985). Becker (1986) sugirió que los altos niveles de AN en levaduras y bacterias (8-12% y más de 20% respectivamente) podían limitar su uso como fuente de alimento para humanos y algunos animales superiores, quienes carecen de uricasa, una enzima que cataliza la conversión del ácido úrico en alantoina, compuesto soluble y fácilmente excretable por la orina. Sin embargo, esta enzima se encuentra en moluscos bivalvos (Brown *et al.*, 1996), crustáceos (Claybrook, 1983) y peces (De la Huiguera *et al.*, 1981; Rumsey *et al.*, 1991a), por lo que un alto nivel de AN en alimentos con bacterias y levaduras en estos animales no tiene efecto tóxico.

Aunque los peces parecen estar preparados para lidiar con altos contenidos de AN, algunos autores consideran que estos altos niveles pueden tener un efecto deletéreo (Tacon y Cooke, 1980; Davies y Wareham, 1988). El ARN y las bases purinas fueron reportadas como potentes depresores en la ingestión de alimento de animales de cultivo cuando estos eran adicionados entre un 25-50% a la dieta (Atack y May, 1979; Tacon y Cooke, 1980; Rumsey *et al.*, 1991a). Sin embargo, los resultados alcanzados en estudios realizados con truchas (Rumsey *et al.*, 1992) muestran un efecto positivo en el crecimiento y en la retención de nitrógeno con el incremento en los niveles de AN provenientes de levadura sin observarse efectos negativos en la ingestión de alimento. Devresse (2000) exponía las bondades del uso de nucleótidos en dietas para peces, pues resultaba en un incremento en la tasa de crecimiento, el peso y la resistencia a infecciones virales y bacterianas. Aunque los estudios en crustáceos son escasos, Newman (2002) reportó que la inclusión de estos a dietas para camarones, tenían un impacto positivo en la habilidad de resistir el estrés y las enfermedades infecciosas, así como en la tasa de crecimiento de los mismos. Como se observa, existen numerosos criterios contradictorios con relación a esta temática, por lo que se hace necesaria la profundización en el estudio del efecto de los AN en dietas para especies acuícolas y en especial para crustáceos.

Contrario al comportamiento del resto de las fracciones, es evidente el efecto negativo que sobre la proliferación celular se observa en los tratamientos con concentraciones de 0.5 a 2 $\mu\text{g/mL}$ de FC a las 72 horas. Este bajo número de células

vivas encontrado, incluso con cifras inferiores al valor inicial de siembra, no puede deberse a una inhibición por contacto, pues el número de células desde las 48 horas es pequeño; ni a alteraciones en la vitalidad celular, pues el número de células teñidas con el colorante vital permanece en niveles ínfimos y semejante al resto de los tratamientos. Sin embargo, sí se puede inferir un efecto inhibitorio del crecimiento por parte de esta fracción citoplasmática cuando se analiza el ciclo celular. Las células bajo estos tratamientos se han acumulado en fase G_0-G_1 , lo cual descarta el posible efecto tardío que dichas concentraciones pudieran ejercer y apoya la hipótesis de inhibición celular. Este efecto antitumoral evidente encontrado sobre esta línea celular fue corroborado en un segundo experimento repetido para las 72 horas.

Pudieran ser numerosos los elementos que provocan este comportamiento si se tiene en cuenta que esta es la fracción más compleja de todas, pues en ella queda el resto de los compuestos celulares (principalmente solubles) como: vitaminas, cofactores, aminoácidos libres, proteínas con peso molecular inferior a 15 mil Da, sales, entre otros; así como pueden persistir elementos de las otras fracciones, como son carbohidratos (fracciones de β glucanos) y nucleótidos (M. A. Otero, comun. pers.).

Como posibles responsables de un efecto antitumoral (específicamente en esta línea) aparecen en la literatura sustancias como: los polifenoles, isoprenoides, nucleótidos, vitaminas, poliaminas, metales, etc.

Recientemente han aparecido reportes sobre el efecto inhibitorio que poseen los polifenoles en líneas tumorales a concentraciones de 10-100 μ M (Delmas *et al.*,2002; Cascante *et al.*,2003). Estos elementos se extraen de determinadas semillas y frutos, sin embargo, según Otero (en prensa) en las levaduras no ha sido reportada la presencia de este compuesto, pues a pesar de poderse encontrar en el medio de cultivo de la misma o en los restos de cebada, en el proceso de clarificación son decantados en un 65%, pues este compuesto presenta una marcada actividad

inhibitoria para el propio crecimiento de las levaduras cuando los niveles son elevados. Lo que puede perdurar en los siropes y mieles finales es depurado mediante el proceso de lavado que sufre la levadura para fines comerciales, por lo que los niveles de este compuesto al final del proceso son ínfimos.

Algo parecido se presenta con el isoprenoide (terpeno derivado del isopreno, también extraído de frutas, vegetales y cereales). Este también ha sido usado en la línea MB16 (He *et al.*, 1997; Mo y Elson, 1999) con acción supresora en la proliferación celular y pudiera estar presente en FC, pero como el porcentaje graso en esta fracción es tan bajo, se reducen las posibilidades de que sea esta la causa de la acumulación en fase G_0 - G_1 de las células tumorales.

Sin embargo, el resto de las sustancias señaladas pueden integrar la lista de los posibles efectores de la inhibición encontrada en el presente estudio. Por ejemplo, ha sido reportado que la timidina dinucleótido pTpT no es tóxica a las células de melanoma y no induce apoptosis en estas células, pero sí provoca parada del ciclo celular en fase S y una disminución en la tasa de proliferación celular (Pedeux *et al.*, 1998). Resultados semejantes se han obtenido evaluando oligonucleótidos en diferentes líneas tumorales (Hatse *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2002; Fluiter *et al.*, 2003). En esta fracción de levadura, a pesar de no haberse realizado el proceso de incubación, pueden haber quedado fracciones nucleotídicas que no precipitaron en la FN, por lo que esta pudiera ser una posible vía de explicación de este comportamiento.

Como se conoce, esta fracción posee un alto porcentaje de cenizas donde se incluyen las sales solubles. Si se tiene en cuenta que las levaduras tienen por capacidad absorber determinados elementos del medio en la que se encuentran, entonces pudiera señalarse la posible absorción de metales presentes en las mieles finales como son Fe, Al, Cu, Na, Mn y Zn así como varios elementos en concentraciones de trazas como Ag, As, Cd, Co y Mo entre otros (Otero, en prensa). Los niveles de estos cationes en las mieles no son determinados de forma rutinaria,

pues en la comercialización de las mieles a escala internacional sólo se valora el color, los azúcares, los sólidos en suspensión y el nivel de sulfito (M. A. Otero, comun. pers.). Por lo tanto no es posible conocer con seguridad la composición de las mieles donde proliferó esta cepa de levadura, pudiendo ser alguno de estos elementos metálicos el responsable del comportamiento mostrado para las concentraciones de 0.5 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ha sido publicado el efecto de algunas sustancias (en cuya composición aparece algún elemento metálico) sobre determinados sistemas tumorales como por ejemplo el estudio de Hale (2002), quien encontró que el zinc α -2-glicoproteína inhibía la producción de melanina por células de melanoma B16. Como este compuesto es normalmente producido por células epiteliales pero se sobre expresa en tumores, la autora indicaba la importancia de los estudios sobre este compuesto por el papel que juegan en la regulación normal de la producción de melanina *in vivo*.

Como ya fue mencionado, las levaduras son ricas en vitaminas, especialmente del complejo B y en el proceso de fraccionamiento realizado en el presente estudio, estas vitaminas quedaron mayoritariamente en la FC. Desde la década del ochenta se conoce el efecto que ejerce altas dosis de vitamina B₆ (2.5-5 mmol/l) como supresor en el crecimiento de líneas tumorales (Di Sorbo y Litwack, 1982; Di Sorbo y Nathanson, 1983; Di Sorbo *et al.*, 1985). Sin embargo el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno permanece aun desconocido. Matsubara *et al.* (2001) reportó por primera vez el efecto antiangiogénico *in vivo* de esta vitamina a concentraciones inferiores (25 $\mu\text{mol}/\text{L}$) sin dilucidar tampoco el mecanismo de acción y el propio autor años más tarde reconocía el efecto preventivo del uso de la B₆ contra el cáncer de colon (Matsubara *et al.*, 2003). Pudiera ser la acción de estas vitaminas otra de las posibles presunciones del comportamiento inhibitorio en la proliferación celular.

Por otra parte, existen las poliaminas como las espermidinas y esperminas y su precursor las putrecinas, las cuales pueden ser sintetizadas y secretadas por algunas cepas de levadura (Buts *et al.*, 1993). La mayoría de las poliaminas juegan un papel muy importante en el metabolismo celular y en la proliferación por estimulación del

ARN, ADN y la síntesis de proteínas (Tabor y Tabor, 1984; Bardócz *et al.*, 1993). Tovar *et al.* (2002) demostraron que *Debaryomyces hansenii* y *S. cerevisiae* producían poliaminas y que como ambas cepas eran capaces de colonizar el intestino de larvas de peces se incrementaba la secreción de este compuesto en esta región. Anteriormente, Peres *et al.* (1997) habían evidenciado el rol que jugaban las poliaminas en la maduración del tracto intestinal de estas larvas. Sin embargo, Tovar *et al.* (2002). concluyeron que la incorporación de *S. cerevisiae* X2180 a la dieta no aceleraba la maduración intestinal y proponían por hipótesis: 1) "que los niveles de secreción de poliaminas de esta cepa eran tan bajos que no disparaban la maduración en estas larvas" o 2) "que esta cepa producía otro(s) compuesto(s) que contrarrestaba el efecto en la maduración intestinal". Ray *et al.* (1999) al trabajar con células IEC-6 reportaron que el agotamiento de poliaminas producía una inhibición del crecimiento, parada del ciclo celular en la fase G₁ y regulación hacia arriba de inhibidores del ciclo celular. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, con las concentraciones más bajas de FC es que se obtuvo un comportamiento muy semejante al obtenido por estos autores; pudiera ser entonces algún compuesto de esta naturaleza que ejerza su efecto inhibitorio a estas concentraciones.

Lo que sí es concluyente, es que existe algún elemento en esa fracción que a las concentraciones más bajas ensayadas provoca la acumulación de estas células en la fase G₀-G₁. Es esta la fase en la cual la célula, acabada de salir de la división celular, incrementa su suplemento proteico y el número de organelos así como el crecimiento y la preparación de los cromosomas para la replicación, la cual ocurre en la fase S. Esta primera etapa está regulada por los complejos ciclinas-CDK (a su vez reguladas por familias inhibitoras de CDK) las cuales tiene como función principal fosforilar a la proteína retinoblastoma (pRB) para que de esta forma sea liberado E2F (familia de factores de transcripción) el cual interviene de forma directa en la transcripción de genes requeridos para la síntesis de ADN en la fase S (Stewart *et al.*, 2003). Como se aprecia, son numerosos y complejos los pasos que se siguen en el ciclo celular para salir de la fase G₁, por lo que ese detenimiento encontrado se debe al fallo en

alguno de estos puntos como consecuencia de la acción de algún elemento presente en FC a muy bajas concentraciones. El mecanismo por el cual se induce la parada en la fase G_0 - G_1 de las células sometidas a concentraciones de 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de FC no ha sido dilucidado, por lo que se impone una profundización en estos estudios por la importancia que tiene cualquier tipo de investigación que se integre a los esfuerzos mundiales de lucha contra el cáncer.

Con relación a los resultados obtenidos con artemias, vuelve a ser FC la fracción que muestra un comportamiento atípico con relación al resto de las fracciones ensayadas, pues de forma general, con este aditivo se obtienen los peores resultados. Además de ser este el que posee menor porcentaje proteico, es el aditivo con mejor solubilidad. Según Coutteau *et al.* (1990b), la ruptura de la pared celular de las levaduras hace que se pierdan los nutrientes (debido a la disolución de los mismos) y se afecte también la calidad del agua, lo cual impide una eficaz asimilación por parte de las artemias. García *et al.* (1997) reflejaron un detrimento en todos los parámetros evaluados en postlarvas de camarón con las dietas con 1.5 y 3% de inclusión de la fracción proteica menor (<10 000 Da) de la levadura torula. Pudiera ser entonces la gran solubilidad de esta fracción la causa de estos resultados; sin embargo, Lavens y Sorgeloos (1991) aseguraron que la artemia puede ingerir micronutrientes en forma soluble, si su concentración en el medio es alta.

Por otra parte, esta es la fracción donde en el Experimento B se alcanzó con la máxima concentración el nivel más elevado (y significativamente diferente al resto) de microorganismos presentes en el agua. Es precisamente la composición de FC la que garantiza la proliferación de los mismos, pues al presentar una alta solubilidad, todos los elementos que componen esta fracción son más asequibles a ser tomados por estos microorganismos, como son las vitaminas, minerales, carbohidratos y proteínas solubles.

Los microorganismos que proliferan en un sistema de cultivo pueden tener un efecto tanto positivo, como perjudicial. Se ha señalado las consecuencias negativas que determinadas bacterias y levaduras pueden traer en un sistema de cultivo (Moore y Strom, 2003); sin embargo, según los resultados obtenidos en esta experimentación, no se le puede adjudicar a esta fracción la proliferación de bacterias patógenas, pues aunque los valores de supervivencia de la artemia alimentada con este aditivo no fueron los más altos, si sobrepasaron a lo obtenido en el control.

El uso de probióticos en la acuicultura ha tenido una aceleración en los últimos años por las bondades que estos ofrecen como promotores de crecimiento (Azad *et al.*, 2002; Lara-Flores *et al.*, 2003) y como estimuladores de salud (Orozco-Medina *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el suministro de levadura al medio de cultivo induce el desarrollo de una microflora que puede jugar un papel esencial no sólo en las propiedades nutricionales de la dieta ofrecida a los animales mediante la ingestión directa (Douillet, 1987; Gatesoupe, 2002); sino que también puede contribuir a la digestión de las algas (Intriago y Jones, 1993). Además, Lavens y Sorgeloos (1991) consideraron que las bacterias y protozoos que se desarrollan fácilmente en el medio de cultivo de las artemias, eran capaces de sintetizar nutrientes usando como sustrato el alimento destinado a los crustáceos, lo que pudiera compensar una posible deficiencia en la composición de la dieta. Por otra parte, Makridis y Vadstein (1999) demostraron que metanauplios de *A. franciscana* podían filtrar bacterias y que esta ingestión podía constituir un importante aporte a la microflora de esta especie. Sin embargo, este efecto beneficioso reportado por estos microorganismos no fue evidente en el presente estudio.

En un sistema de cultivo, el recambio de agua persigue como objetivos principales el mantenimiento de la calidad de la misma y la disminución de la abundancia de bacterias patógenas. No obstante, esto también disminuye las cantidades de microorganismos responsables del reciclado de los nutrientes con el consiguiente deterioro de la calidad del agua acarreado la implementación de tratamientos y manipulaciones intensivas (Maeda, 1994). Es por eso que Thompson *et al.* (1999)

para evaluar el uso de microorganismos como fuente de alimento para larvas de camarón no realizó cambio de agua, garantizando solamente una constante aireación en los tanques. Pudiera ser esta la causa de la falta de aprovechamiento de esta población microbiana (ya sea directo o indirecto) por parte de las artemias en este bioensayo, pues este recambio disminuye cíclicamente los niveles poblacionales y produce una constante pérdida de los posibles elementos sintetizados por los mismos.

Dentro de los cuatro agregados probados en las experimentaciones tanto celulares como con nauplios y juveniles de artemia, los mejores resultados generales se obtuvieron con la levadura desintegrada (LD). La parte soluble de este compuesto estimuló la proliferación de las células de la línea MB16-F10 desde las 48 horas, sin embargo, este efecto no se evidenció en el segundo tiempo ensayado. Aunque los experimentos a 48 y 72 horas son independientes, vale discutir la disminución marcada en el número de células a las 72 horas. Teniendo en cuenta que el tiempo necesario para llevar a cabo el ciclo celular de estas células es de 16-18 horas (García-Higuera *et al.*, 2001), se observa un comportamiento normal a las 48 horas pero no así en el segundo tiempo, donde los valores celulares están muy deprimidos. Esta disminución puede atribuirse principalmente a: una inhibición por contacto, una acumulación de metabolitos o un efecto inhibitorio del compuesto probado. De las tres, se considera como más probable la inhibición por contacto, pues como desde las 48 horas se presenta una estimulación en la proliferación, disminuye el área del pozo posible a ocupar por las células y el exceso de las mismas puede provocar este tipo de inhibición y por lo tanto una disminución en el número de células vivas. Un posible efecto citotóxico a este tiempo se reduce por el hecho de encontrarse porcentajes elevados de células en fase G₂-M, especialmente para las concentraciones 1 y 2 µg/mL, lo cual indica que las células están preparadas para una división celular, la cual no pudiera llevarse a efecto de encontrarse condiciones adversas.

Con relación al cultivo de artemia, se puede catalogar a LD como el aditivo más balanceado desde el punto de vista nutricional, pues conserva de una manera más íntegra todos los componentes de la célula original a los cuales tienen acceso las enzimas digestivas de las artemias después de haber sido eliminada la principal barrera obstaculizadora: la pared celular; favoreciéndose la disolución de los nutrientes. Anteriormente había sido publicado por Rumsey *et al.* (1990, 1991b) que la inaccesibilidad a los elementos intracelulares de las levaduras producía un menor desarrollo en truchas y que la digestibilidad era significativamente menor con células intactas de levadura que con células desintegradas. Desde el punto de vista económico, la aplicación de este resultado en los sistemas de cultivo resulta interesante, pues no sería necesaria la ejecución de todo el proceso de fraccionamiento, con el consiguiente ahorro en tiempo y recursos, confirmando la factibilidad de su introducción.

Ha sido señalado por Cuzón (1996) que las levaduras pueden clasificarse como sustancias con efecto promotor de crecimiento, lo cual indica que al ser incorporados a la dieta en pequeñas cantidades, sin variar considerablemente su composición, puede lograr una aceleración en el crecimiento de los individuos. Los resultados alcanzados con LD inducen a considerar que son importantes los efectos sinérgicos o cooperativos entre los distintos componentes de la levadura, pues el proceso de fraccionamiento realizado no permitió encontrar una fracción celular que en particular ejerciera actividad estimuladora del crecimiento tanto en la línea celular como en los dos estadios de artemias utilizados para la presente investigación.

Este constituye el primer reporte donde se evalúan fracciones de levadura panadera *S. cerevisiae* sobre la línea celular MB16-F10 y como aditivo para dietas de *A. franciscana*. Los resultados obtenidos muestran las potencialidades que en particular tienen algunas de estas fracciones como alimento de uso en la acuicultura y como inhibidor de crecimiento tumoral.

CONCLUSIONES

1. La utilización del complejo pared-membrana (FP) como aditivo para dietas mostró efectos favorables en el crecimiento y la supervivencia de las artemias y con su fracción soluble no se evidenciaron efectos importantes ni en la proliferación ni en la vitalidad de las células de cultivo en los tiempos evaluados.
2. El empleo de FN como aditivo no mostró diferencias significativas con relación al control en la mayoría de los aspectos evaluados aunque su parte soluble estimuló la proliferación celular a las 72 horas.
3. Con la fracción citoplasmática (FC) se obtuvo el más bajo porcentaje proteico corporal en artemias y los mayores niveles de microorganismos en el agua de cultivo, ejerciendo su parte soluble un marcado efecto inhibitorio en la proliferación de las células de melanoma con las menores concentraciones evaluadas, induciendo acumulación de las células en la fase G_0-G_1 ,
4. Con la levadura desintegrada (LD) se obtuvieron los mejores resultados en crecimiento, supervivencia, desarrollo y biomasa seca en *Artemia franciscana* y su parte soluble tuvo un efecto estimulante en la proliferación celular de la línea MB16-F10 lo que induce a considerar que son importantes los efectos sinérgicos o cooperativos entre los componentes celulares de la levadura.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar en la composición bioquímica de las fracciones de levadura evaluadas en el presente estudio.
2. Evaluar sobre esta misma línea celular tiempos más prolongados y concentraciones inferiores de las fracciones, ampliando las experimentaciones a otras líneas no tumorales y de cultivo primario.
3. Efectuar bioensayos en otros grupos de cultivo (peces y camarones) empleando en su dieta las diferentes fracciones de levadura como aditivos.
4. Lograr la realización de experimentaciones donde se utilice a la artemia enriquecida con las diferentes fracciones de levadura como dieta para otras especies de maricultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, S. (1996): Evaluation of various diets for the optimum growth and survival of larvae of the penaeid prawn *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture nutrition*, 2 (3): 151-155.
- Aguirre, G., D. Ricque y L.E. Cruz (2002): Survival of agglomerated *Saccharomyces cerevisiae* in pellet shrimp feed. *Aquaculture*, 208: 125-135.
- Ako, H., C. S. Tamaru, P. Bass y C. Lee (1994): Enhancing the resistance to physical stress in larvae of *Mugil cephalus* by the feeding of enriched *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 122: 81-90.
- Alfonso E. y C. Núñez (1984): Efecto de la harina de lombriz de tierra sobre el crecimiento y desarrollo de protozoos de camarón en cultivo. *Rev. Invest. Mar.*, 5(3): 99-105.
- Alfonso, E., L. Martínez, R. Gelabert y S. Leal (1988): Alimentación de larvas de *Penaeus schmitti*; diatomeas y flagelados. *Rev. Invest. Mar.*, 9(1): 47-58.
- Álvarez, J. S. (1997): "Ingredientes alternativos en dietas de engorde del camarón blanco *Penaeus schmitti*", tesis de maestría, CIP, La Habana.
- Álvarez J. S., J. Galindo y B. Jaime (1996a): Evaluación de la harina de soya como ingrediente proteico principal en el engorde del camarón *Penaeus schmitti* en condiciones semi-intensivas de cultivo. *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, 20(2): 3-6.
- Álvarez J. S., J. Galindo, B. Jaime, B. Anderes y E. Pelegrín (1996b): Empleo de diferentes niveles de proteína en dietas para el engorde del camarón *Penaeus schmitti* en estanques de tierra. *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, 20(2): 35-39.
- Andlid T., R. Vazquez y L. Gustafsson (1994): The use of yeast in aquaculture. En: *3^{er} international marine biotechnology conference*, Tromsø (Tromsø University, Tromsø), 115 pp.
- ----- (1998): Yeast isolated from the intestine of rainbow trout adheres to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7(2): 115-126.
- Andlid T., L. Blomberg, L. Gustafsson y A. Blomberg (1999): Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7764 isolated from rainbow trout intestine. *Systematic and applied microbiology*, 22(1):145-155.

- AOAC (1990): *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry, Washington D.C., 1094 pp.
- Atack, T. y A. J. May (1979): The evaluation of some single-cell proteins in the diets of rainbow trout: II. The determination of net protein utilization, biological values and true digestibility. En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (J. E. Halver y K. Tiews, eds.), Heenemann, Berlin, pp. 261-273. [citado por Oliva y Gonçalves, 2001].
- Azad, S. A., V. C. Chong y S. Vikineswary (2002): Phototrophic bacteria as feed supplement for rearing *Penaeus monodon* larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(2): 158-168.
- Bardócz, S., G. Grant, D. S. Brown, A. Ralph y A. Pusztai (1993): Polyamines in food-implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, 4: 66-71. [citado por Tovar *et al.*, 2002].
- Batistella, S., P. Bonivento y G. A. Amirante (1996): Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Ital. J. Zool.*, 63: 337-343.
- Becker, E. W. (1986): Nutritional properties of micro algae: Potential and constrains. En: *Handbook of micro algal mass culture* (A. Richmond, ed.), CRC Press, Boca Raton FL, pp. 339-420.
- Bejar, J., J. J. Borrego y M. C. Álvarez (1997): A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 150(1-2): 143-153.
- Brattgjerd, S., O. Evensen y A. Lauve (1994): Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. *Immunology*, 83(2): 288-294.
- Brown, M. R., S. M. Barrett, J. K. Volkman, S. P. Nearhos, J. A. Nell, *et al.* (1996): Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 143(3-4): 341-360.
- Burns, J. C. y C. Friedman (2002): Creation of a molluscan cell line. www.csqc.ucsd.edu
- Buts, J. P., N. De Keiser, J. Kolanowski, E. Sokal y F. Van Hoof (1993): Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Role of dietary polyamines. *Dig. Dis. Sci.*, 38: 1091-1098. [citado por Tovar *et al.*, 2002].

- Cancre, I., A. Van-Wormhoudt y Y. Le Gal (1995): Effects of cellular growth factors on crustacean hepatopancreas cell suspensions. *Journal of Marine Biotechnology*, 2: 83-87.
- Carrillo, O., F. Vega-Villasante, H. Nolasco y N. Gallardo (2000): Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento en camarón. En: *Avances en Nutrición Acuícola V*, Mérida, 2000, *Memorias*, pp. 90-98.
- Cascante, M., C. Matito, C. Lozano, J. J. Centelles y J. L. Torres (2003): Biomedical research and added value. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(1): 34-38.
- Chang, S. F., G. H. Ngoh, L. F. Kuch, Q. W. Qin, C. L. Chen, *et al.* (2001): Development of a tropical marine fish cell line from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, 192(2-4): 133-145.
- Chen, S. N., S. C. Chi, G. H. Kou y I. C Liao (1986): Cell culture from tissues of grass prawn *Penaeus monodon*. *Fish Pathol.*, 21(3): 161-166.
- Chien, Y-H., H-H. Liao y C-C. Wang (1991): Coloration and growth of artemia under various diets. *J. Fish. Soc. Taiwán*, 18(4): 295-299.
- Civera, R., H. Villareal, E. Goytortúa, S. Rocha, F. Vega, *et al.* (1999): Uso de la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína en dietas experimentales para camarón. En: *Avances en nutrición acuícola III*, Monterrey, 1996 (Univ. Autónoma de Nuevo León, Monterrey), *Memorias*, pp. 325-347.
- Claybrook, D. L. (1983): Nitrogen metabolism. En: *The Biology of Crustacea* Vol. 5 (L. Mantel, ed), Academic Press, New York, pp. 163-213.
- Couso, N., R. Castro, B. Magariños, A. Obach y J. Lamas (2003): Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead sea bream to pasteurellosis. *Aquaculture*, 219(1-4): 99-109.
- Coutteau, P., P. Lavens, P. Leger y P. Sorgeloos (1990a): Manipulated yeast diets as a partial algal substitute for rearing bivalve mollusks: laboratory trials with *Tapes semicecussata*. *Med. Fac. Landbouwn. Rijksuniv. Gent.*, 55/4: 1597-1599.
- Coutteau, P., P. Lavens y P. Sorgeloos (1990b): Baker's Yeast as a Potential Substitute for Live Algae in Aquaculture Diets: *Artemia* as a Case Study. *J. World. Aquacult. Soc.*, 21(1): 1-9.

- Coutteau, P., L. Brendonck, P. Lavens y P. Sorgeloos (1992): The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. *Hydrobiology*, 234: 25-32.
- Coutteau, P., M. Dravers, P. Dravers, P. Léger y P. Sorgeloos (1993): Manipulated yeast diets and dried algae as a partial substitute for live algae in the juvenile rearing of the Manila clam *Tapes philippinarum* and the pacific oyster *Crassostrea gigas*. En: *Production, environment and quality* (G. Barnabé y P. Kestemont, eds.), Europea Aquaculture Society, Ghent, (18): 523-531.
- Coutteau, P., N. H. Hadley, J. J. Manzi y P. Sorgeloos (1994): Effect of algal ration and substitution of algae by manipulated yeast diets on the growth of juvenile *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 120(1-2): 135-150.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos (1997): Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biology*, 38: 501-512.
- Cuzon, G. (1996): Utilización de levaduras camarones peneidos. En: *Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Monterrey, 1994 (Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey) pp. 303-310.
- Davies, S.J. y H. Wareham (1988): A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). *Aquaculture*, 73(1-4): 189-199.
- Davis, D.A. y C.R. Arnold (2000): Replacement of fishmeal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 185(3-4): 291-298.
- De la Huiguera, M., F. J. Sanchez, F. J. Mataix y G. Varela (1981): Nitrogen utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed on the yeast *Hansenula anomala*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69A: 583-586.
- Delmas D., P. Passilly, B. Jannin, M. Cherkaouimalki y N. Latruffe (2002): Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW 480 colorectal tumor cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 10: 193-199.
- Devresse, B. (2000): Un nuevo nutriente para el sistema inmunológico de los camarones: los nucleótidos. *Panorama Acuícola*, 5(2):35-37.
- Di Sorbo D.M. y G. Litwack (1982): Vitamin B₆ kills hepatoma cells in culture. *Nutr. Cancer*, 3(4): 216-222.

- Di Sorbo D.M. y L. Nathanson (1983): High-dose pyridoxal supplemented culture medium inhibits the growth of a human malignant melanoma cell line. *Nutr. Cancer*, 5: 10-15. [citado por Matsubara *et al.*, 2001].
- Di Sorbo D.M., R. Wagner y L. Nathanson (1985): *In vivo* and *in vitro* inhibition of B16 melanoma growth by vitamin B₆. *Nutr. Cancer*, 7(1-2): 43-52.
- Douillet, P. (1987): Effect of bacteria on the nutrition of the brine shrimp *Artemia* fed on dried diets. En: *Artemia research and its application*. Vol 3. (P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Decler y E. Jaspers, eds.), Universal Press, Wetteren, pp. 295 – 308.
- Fernández, L. (1987): "Cultivo de nemátodos como alimento vivo para larvas de camarones", tesis de Diploma, CIM, La Habana.
- Fluiter, K., L. M. Anneloor, T. Asbroek, M. de Wissel, M.E. Jakobs *et al.* (2003): *In vivo* tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 31(3): 953-962.
- Forrellat, A., R. González y O. Carrillo (1988): Evaluación de la calidad proteica de alimentos para camarones. *Rev. Invest. Mar.*, 9(1): 71-79.
- Forrellat, A., S. Blake y O. Carrillo (1998): Utilización de hepatopancreatina como aditivo alimentario en dietas para postlarvas de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 19(2-3): 137-141.
- Fraga, I., J. Galindo, R. Reyes, S Álvarez, N. Gallardo *et al.* (1996): Evaluación de diferentes fuentes proteicas para la alimentación del camarón blanco *Penaeus schmitti*. *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, 20(1): 6-9.
- Frerichs, G. N. (1996): *In vitro* culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 143(3-4): 227-232.
- Freshney, R. I. (2000): *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. Wiley-liss, New York, 577 pp.
- Fryer, J. L. y G. N. Lannan (1994): Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines. *J. Tissue Cult. Methods*, 16(2): 87-94.
- Gajardo, G., N. Colihueque, M. Parraquez y P. Sorgeloos (1998): International study on *Artemia* LV III. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *International Journal of Salt Lake Research*, 7: 133-151.

- García, T. y B. Jaime (1990): Utilización de la lombriz de tierra (*Eudrilus eugeniae*) en la alimentación de postlarvas del camarón blanco *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.*, 11 (2): 147-155.
- García, T., B. Jaime y V. García (1992): Crecimiento de postlarvas de camarón blanco, *Penaeus schmitti*, utilizando diferentes aglutinantes en las dietas. *Rev. Invest. Mar.*, 13(1): 87-91.
- García, T., G. Márquez, O. Carillo, R. Gelabert, L. Vidal y U. Bécquer (1997): Evaluación de la levadura torula seca en dietas artificiales para la alimentación de larvas y postlarvas del camarón blanco *Penaeus schmitti*. En: *IV Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Guayaquil, *Memorias*, pp. 32-33
- García, T., E. Alfonso y B. Jaime (1999): Evaluación de la lombriz de tierra (*Eudrilus eugeniae*) en la alimentación de camarones peneidos. En: *Avances en nutrición acuícola III*, Monterrey, 1996 (Univ. Autónoma de Nuevo León, Monterrey), *Memorias*, pp. 349-361.
- García-Higuera, M., N. Alvarado, S. Alcázar, M. Meneses, E. Cerón, et al. (2001): Efectos de la desoxirribonucleasa I sobre células del melanoma murino B16-F10. *Rev. Inst. Na. Enf. Resp. Mex.*, 14(2): 79-84.
- Gatesoupe, F. J. (1999): The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2): 147-165.
- ----- (2002): Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212(1-4): 347-360.
- Gelabert, R. (1988): Alimentación de larvas del camarón *Penaeus schmitti* con alimento artificial. *Rev. Invest. Mar.*, 9(2): 95–103.
- Gelabert, R., E. Alfonso, O. Hernández y S. Leal (1988): Experiencias de alimentación de larvas del camarón *Penaeus schmitti* con levaduras obtenidas industrialmente. *Rev. Invest. Mar.*, 9(1): 59 – 69.
- Ghosh, D., A. K. Dasmahapatra y A. K. Ray (1995): Primary culture of prawn hepatocytes in serum free media. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 31(11): 811-813.
- Goddard, S. y A. M. Martín (1993): Production and evaluation of a yeast biomass, *Candida utilis*, as an ingredient for salmonid feeds. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada*, 93-4: 51-52.
- Gómez-Gil, B., A. Roque y J. F. Turnbull (2000): The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191(1-3): 259-270.

- Greco, F. M., M. P. Fitzpatrick, W. S. Graffam, E. S. Dierenfeld y D. A. Thoney [2000]: Preliminary evaluation of selected nutrient composition of two life stages of *Artemia salina* before and after feeding an enriched torula yeast product. www.brineshrimpdirect.com
- Guillard, R. R. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. En: *Culture of Marine Invertebrates Animals* (W.L. Smith y M.H. Chanley, eds.) pp: 29-60.
- Hale, L. P. (2002): Zinc α -2-glycoprotein regulates melanin production by normal and malignant melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(2): 464-470.
- Hatse, S., D. Schols, E. De Clercq y J. Balzarini (1999): 9- (2-Phosphonylmethoxyethyl) adenine induces tumor cell differentiation or cell death by blocking cell cycle progression through the S phase. *Cell growth and differentiation* 10(6): 435-446.
- Hatt, P. J., C. Liebon, M. Moriniere, H. Oberlander, y P. Porcheron (1997): Activity of insulin growth factors and shrimp neurosecretory organ extracts on a lepidopteran cell line. *Archives of insect biochemistry and Physiology*, 34: 313-328.
- He L., H. Mo, S. Hadisusito, A. Qureshi y C. Elson (1997): Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nutrition*, 127: 668-674.
- Huang, C. C. y Y. L. Song (1999): Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Developmental and Comparative Immunology*, 23(7-8): 545-552.
- Hunter, K. W., R. A. Gault y M. D. Berner (2002): Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Let. Appl. Microbiol.*, 35(4): 267-271.
- Intriago, P. y D. A. Jones (1993): Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture*, 113: 115 -127.
- Jaime, B. y T. García (1992): Niveles de inclusión de harina de cefalotórax de langosta en dietas para postlarvas de camarón. *Rev. Invest. Mar.*, 13(2): 142-146.
- Jones, D. A., K. Kurmaly y A. Arshard (1987): Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64(2): 133-146.

- Joshi, V. K., y D. K. Sandhu (1996): Composition of the distillates from the solid-state fermentation of apple pomace by different yeasts. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 19(11-12): 219-224.
- Kataoka, K., T. Muta, S. Yamazaki y K. Takeshigo (2002): Activation of macrophages by linear (1-3)- β -D-glucans. *J. Biol. Chem.*, 277(39): 36825-36831.
- Kreger-van-Rij, N. J. (1984): *The Yeast: A Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam, 345pp. [citado por Otero, 1999].
- Kumlu, M., y D. A. Jones (1995): The effect of live and artificial diets on growth, survival and trypsin activity in larvae of *Penaeus indicus*. *J. World Aquac. Soc.*, 26(4): 406-415.
- Lang, G., N. Nomura y M. Matsumara (2002): Growth by cell division in shrimp (*Penaeus japonicus*) cell culture. *Aquaculture*, 213:73-83.
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán y W. López (2003): Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1-4): 193-201.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos (1991): Production of *Artemia* in culture tanks. En: *Artemia Biology* (R. Browne, P. Sorgeloos y C. Trotman, eds.), CRC Press, Boston, pp. 318-347.
- ----- (2000): Experiences on importance of diets for shrimp post-larval quality. *Aquaculture*, 191(1-3): 169-176.
- Lee, D. Y., I. Ji, H. Chang y C. Kim (2002): High-level TNF-alpha secretion and macrophage activity with soluble beta-glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(2): 233-238.
- Li, P. y D. Gatlin (2003): Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 219(1-4): 681-692.
- Luedeman, R. A., y D. V. Lightner (1992): Development of an *in vitro* primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 101(3-4): 205-211.
- Maeda, M. (1994): Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 1: 71-74. [citado por Thompson *et al.*, 1999].

- Mahnken, C., J. Spinelli y F. W. Waknitz (1980): Evaluation of an alkane yeast (*Candida* sp.) as a substitute for fishmeal in oregon moist pellet: feeding trials with coho salmon (*Oncorhynchus kesutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 20(1): 41-56.
- Maiorano, D., R. Cece y G. Badaracco (1997): Satellite DNA from the brine shrimp *Artemia* affects the expression of a flanking gene in yeast. *Gene*, 189(1): 13-18.
- Makridis, P. y O. Vadstein (1999): Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three developmental stages. *Journal of Plankton Research*, 21(11): 2191-2220.
- Marks, E. P. (1983): Tissue culture systems: Tools for the insect endocrinology. En: *Endocrinology of insects* (R. Downer y H. Laufer, eds.), Alam R. Liss, New York, pp. 234-245.
- Martínez, C. A., M. C. Chávez, M. A. Olvera y M. I. Abdo (1999): Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. En: *Avances en nutrición acuícola III*, Monterrey, 1996 (Univ. Autónoma de Nuevo León, Monterrey), *Memorias*, pp. 279-323.
- Matsubara, K., M. Mori, Y. Matsuura y N. Kato (2001): Pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxal inhibit angiogenesis in serum-free rat aortic ring assay. *International Journal of Molecular Medicine*, 8: 505-508.
- Matsubara, K., S. Komatsu, T. Oka y N. Kato (2003): Vitamin B₆-mediated suppression of colon tumor genesis, cell proliferation and angiogenesis (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(5): 246-250.
- Matty, A. J. y P. Smith (1978): Evaluation of a yeast, a bacterium and an alga as a protein source for rainbow trout. I. Effect of protein level on growth, gross conversion efficiency and protein conversion efficiency. *Aquaculture*, 14(3): 235-246.
- Mauri, Y. (2003): " Empleo de la levadura panadera *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo alimentario en el cultivo de *Artemia franciscana*", tesis de diploma, CIM, La Habana.
- Mo, H. y C. Elson (1999): Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are indicated by isoprenoids. *Journal of Nutrition*, 129: 804-813.

- Moore, M. M. y M. S. Strom (2003): Infection and mortality by yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture*, 220(1-4): 43-57.
- Mura, G., F. Ferrara, M. Delise, F. Fabietti y A. Bocca (1997): Evaluation of the fatty acid profiles on two fairy shrimp species, *Branchipus pasai* Cottarelli, 1969 and *Chirocephalus kerkynensis* Pesta, 1936 (Crustacea, Anostraca) fed different diets. *Hidrobiología*, 359 (1-3): 229-235.
- Nagata, W. y J. Whyte (1992): Effects of yeast and algal diets on the growth and biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Mueller) in culture. *Aquacult. Fish. Manage.*, 23(1): 13-21.
- Nell, J. A., J. A. Diemer y M. P. Heasman (1996): Food value of live yeasts and dry yeast based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. *Aquaculture*, 145(1-4): 235-243.
- Newman, S. (2002): Nucleotides: a critical nutrient for aquaculture? *Panorama Acuicola*, 7(3): 38-39.
- Ogbonna, J. C., S. Tomiyama y H. Tanaka (1996): Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Process. Biochem.*, 31(8): 737-744.
- Oliva, A. y P. Gonçalves (2001): Partial replacement of fish meal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202: 269-278.
- Orozco-Medina, C., A. Maeda y A. López (2002): Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture*, 213(1-4): 15-29.
- Otero, M. A. (1985): *Proteína unicelular para consumo humano*. Científico-Técnica, La Habana, 111pp.
- ----- (1999): "Procedimientos para el incremento del valor agregado de la biomasa de levadura para el consumo humano", tesis de doctorado, Universidad de La Habana, La Habana.
- Otero, M. A., M. C. Vasallo, O. Verdecia, V. Fernández, y D. Betancourt (1996): A process for the complete fractionation of Baker's yeast. *J. Chem._Tech. Biotechnol.*, 67: 67-71.
- Otero, M. A. [en prensa]: "Las mieles finales de caña. Composición, propiedades y usos", ICIDCA, La Habana.

- Panal, J. (2001): "Efecto del extracto total de langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en el crecimiento y supervivencia de *Artemia salina*", tesis de diploma, Universidad de La Habana, La Habana.
- Parsons, T. R., Y. Maita y C. M. Lalli (1982): *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pargamon, Londres, 247pp.
- Pedeux, R., N. Al-Irani, C. Marteau, F. Pellicier, R. Branche, *et al.* (1998): Thymidine dinucleotides induce S phase cell cycle arrest in addition to increased melanogenesis in human melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(3): 472-477.
- Peres, A., C. L. Cahu y J. L. Zambonino (1997): Dietary spermine supplementation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish. Physiol. Biochem.*, 16: 479-485.
- Pomper, S. y R. Passwater (2002): Nutritional yeast and yeastphobia. www.nutritionfocus.com
- Purushothaman, V., K. Sankaranarayanan, M. Ravikumar y P. Ramasamy (1998): Development of *in vitro* cell culture system from penaeid shrimp, *Penaeus indicus*, *P. monodon* and a sand crab *Emerita asiatica*. *Indian J. Anim. Sci.*, 68(10): 1097-1099.
- Ramos, L. y T. García (1992): Maduración y reproducción de *Penaeus schmitti* utilizando como complemento de la alimentación diferentes dietas pelletizadas. *Rev. Invest. Mar.*, 13(2): 159 -166.
- Ray, R. M., B. Zimmerman, S. Mc Cormack, T. Patel y L. Johnson (1999): Polyamide depletion arrest cell cycle and induces inhibitors p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, and p53 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 276(3): C684-C691.
- Robertsen, B., G. Roerstad, R. Engstad y J. Raa (1990): Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish. Dis.*, 13(5): 391-400.
- Rodríguez, R. O. (1998): "El uso de nauplios de *Artemia franciscana* en pruebas de toxicidad", tesis de diploma, Universidad de La Habana, La Habana.
- Rodríguez G. M. (1999): "Secreción de la proteína β -trace humana por las células de insecto High FiveTM y Sf₂₁ utilizando el sistema baculovirus de expresión (Ac MNPV)", tesis de maestría, CIM, La Habana.

- Roques, C. y L. Dussert (1991): The interest of live yeast supplementation in aquaculture and its improving effect on feed conversion. *Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc.*, (14): 280-281.
- Rumsey G., S. Hughes y J. Kinsella (1990): Use of dietary yeast *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen by lake trout. *J. World Aquacult. Soc.*, 21(3): 205-209.
- Rumsey, G. L., J. E. Kinsella, K. J. Shetty y S. G. Hughes (1991a): Effect of high dietary concentrations of brewer's yeast on growth performance and liver uricase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 33: 177-183. [citado por Oliva A. y P. Gonçalves, 2001].
- Rumsey, G. L., S. G. Hughes, R. R. Smith, J. E. Kinsella, K. J. Shetty (1991b): Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast feed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 33: 185-193. [citado por Oliva A. y P. Gonçalves, 2001].
- Rumsey, G., R. Winfree y S. Hughes (1992): Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 108(1-2): 97-110.
- Ruppert, E. y R. Barnes (1999): *Zoología de los Invertebrados*. Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F., 793pp.
- Sano, T. (1998): A novel tissue organized in the primary hemolymph culture of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 164(1-4): 289-296.
- Scholz, U., G. García, D. Ricque, L. Cruz, F. Vargas, *et al.* (1999): Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176: 271-283.
- Sheen, S. S., y H. T. Huang (1998): The effects of different protein sources on the survival of grass shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) larvae from zoea to postlarva (Decapoda, Natantia). *Crustaceana*, 71(8): 909-924.
- Shimizu, C., H. Shike, K. Klempel y J. Burns (2001): Haemolymph analysis and evaluation of newly formulated medium for culture of shrimp cells (*Penaeus stylirostris*). *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 37: 322-329.
- Siwicki, A. K., D. P. Anderson y G. L. Rumsey (1994): Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affect non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41(1-2): 125-139.

- Song, Y., J. Liu, L. Chan y H. Sung (1997): Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Biol. Stand.*, 90: 413-421.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Leger, W. Tackaert y D. Versichele (1986): *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*. Fac. of Agriculture, Ghent, 319pp.
- Sorgeloos, P., P. Ohert y P. Candreva (2001): Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1-2): 147-159.
- Sotolongo, L. (1988): "Los subproductos de la industria del cítrico en la formulación de dietas para camarón", tesis de diploma, Universidad de la Habana, La Habana.
- Soundarapadian, P., T. Kannupandi y M. Samuel (1998): Effect of unilateral eyestalk ablation and diets on the growth of cultured, juvenile, freshwater prawn (*Macrobrachium malcolmsonii* H. Milne Edwards). *Rev. Invest. Mar.*, 19 (1): 63-70.
- Southgate, P., A. Beer, P. Duncan y R. Tamburri (1998): Assessment of the nutritional value of three species of tropical micro algae, dried *Tetraselmis* and a yeast-based diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L). *Aquaculture*, 162: 247-257.
- Spencer, J. F. y D. M. Spencer (1997a): Taxonomy: The names of the yeast. En: *Yeast in Natural and Artificial Habitats* (J. F. Spencer y D. M. Spencer, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 11-32pp.
- ----- (1997b): Outside and inside: The morphology and cytology of the yeast cell. En: *Yeast in Natural and Artificial Habitats* (J. F. Spencer y D. M. Spencer, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 80-94pp.
- Steffens, W., H. Richter, S. Golbs, H. Bents, S. Martin, *et al.* (1992): Use of alkane yeast and methanol-grown bacterial biomass as protein sources in the diet of rainbow trout. *Aquaculture*, 100(1-3): 235-245.
- Stewart, Z., M. Westfall y J. Pletenpol (2003): Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(3): 139-145.
- Stewart, D. A., X. Xu, S. D. Thomas y D. M. Miller (2002): Acridine-modified, clamp-forming antisense oligonucleotides synergize with cisplatin to inhibit c-Myc expression and B16-F10 tumor progression. *Nucleic Acids Research* 30(11): 2565-2574.

- Sudaryono, A., M. J. Hoxey, S. G. Kailis y L. H. Evans (1995): Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 134(3-4): 313-324.
- Sulem, Y. (1987): "Alternative fish feeds: The use of industrial wastes and by-products for the culture of the African catfish *Claria gariepinus* (Burchell, 1822)", tesis de maestría, Universidad Católica de Leuven, Bruselas.
- Suphantharika, M., P. Khumrae, P. Thanardkit y C. Verdayn (2003): Preparation of spent brewer's yeast beta-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresour. Technol.*, 88(1): 55-60.
- Tabor, C. W. y H. Tabor (1984): Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 749-790. [citado por Tovar *et al.*, 2002].
- Tacon, A. (1989): *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados, Manual de capacitación. Programa cooperativo gubernamental. Proyecto Aguila II (GCP/RLA/102/ITA)*, FAO, Brasilia, pp.264-273.
- Tacon, A. y D. J. Cooke (1980): Nutritional value of dietary nucleic acids to trout. *Nutr. Reports Int.*, 22: 631-640. [citado por Oliva A. y P. Gonçalves, 2001].
- Thompson, F. L., P. C. Abreu y R. Cavalli (1999): The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, 174(1-2): 139-153.
- Tong, S. y H-Z. Miao (1996): Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues. *Aquaculture*, 147(3-4): 151-157.
- Tong, S., H. Li y H-Z. Miao (1997): The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 156(3-4): 331-337.
- Tong, S., H-Z. Miao y H. Li (1998): Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and the red bream (*Pagrosomus major*). *Aquaculture*, 169(1-2): 143-151.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. Gatesoupe y R. Vázquez (2000): Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. En: *Avances en nutrición acuícola V*, Monterrey, 1996 (Univ. Autónoma de Nuevo León, Monterrey), *Memorias*, pp. 33-46.

- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez, *et al.* (2002): Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204(1-2): 113-123.
- Vallejo, A., M. Criales y F. Newmark (1995): Determination of the optimal algae density and efficiency of diet in the production of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. *Bol. Ecotrop. Ecosyst. Trop.*, 28: 33-39.
- Vargas-Albores, F. y G. Yepiz-Plascencia (2000): Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191(1-3): 13-21.
- Vigano, L. (1993): Reproductive strategy of *Daphnia magna* and toxicity of organic compounds. *Water Res.*, 27(5): 903-909.
- Villanueva, R., N. Koueta, J. Riba, y E. Boucaud-Camou (2002): Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture*, 205(3-4): 269-286.
- Walford, J. y T. J. Lam (1992): High density of rotifer (*Brachionus plicatilis*) using baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and their n-3 highly unsaturated fatty acid content. *J. Aquacult. Trop.*, 7(2): 287-300.
- Walton, A. y V. J. Smith (1999): Primary culture of the hyaline haemocytes from marine decapods. *Fish and Shellfish Immunology*, 9(3): 181-194.
- Webster, C. D., J. H. Tichuell, L. S. Goodgame, D. H. Yancey y L. Mackey (1992): Use of soybean meal and distillers grains with soluble as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 106(3-4): 301-309.
- Wildman, R. (2001): Aquaculture in the National Sea Grant Program. www.lib.noaa.gov.

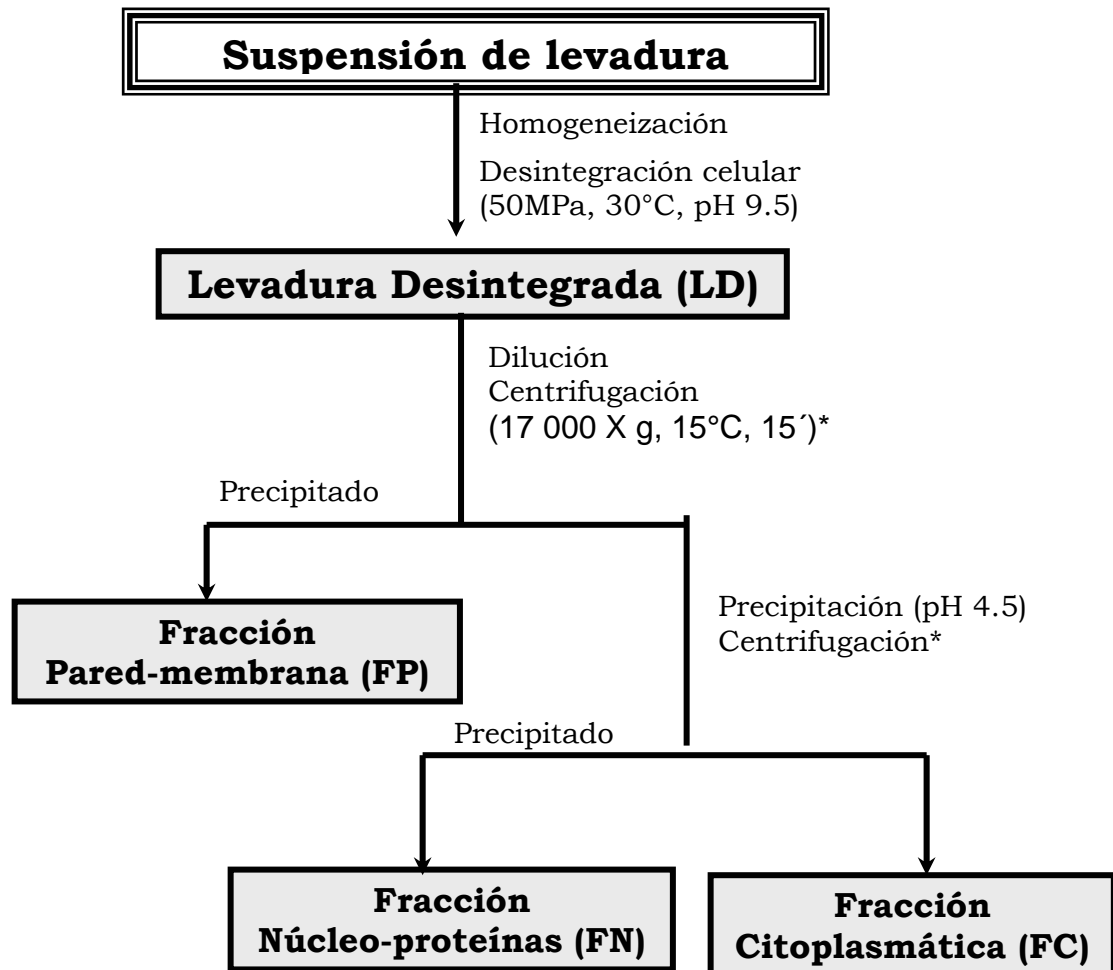


Figura 1. Proceso de fraccionamiento de la levadura panadera *Saccharomyces cerevisiae* por método mecánico (Otero *et al.*(1996), modificado).

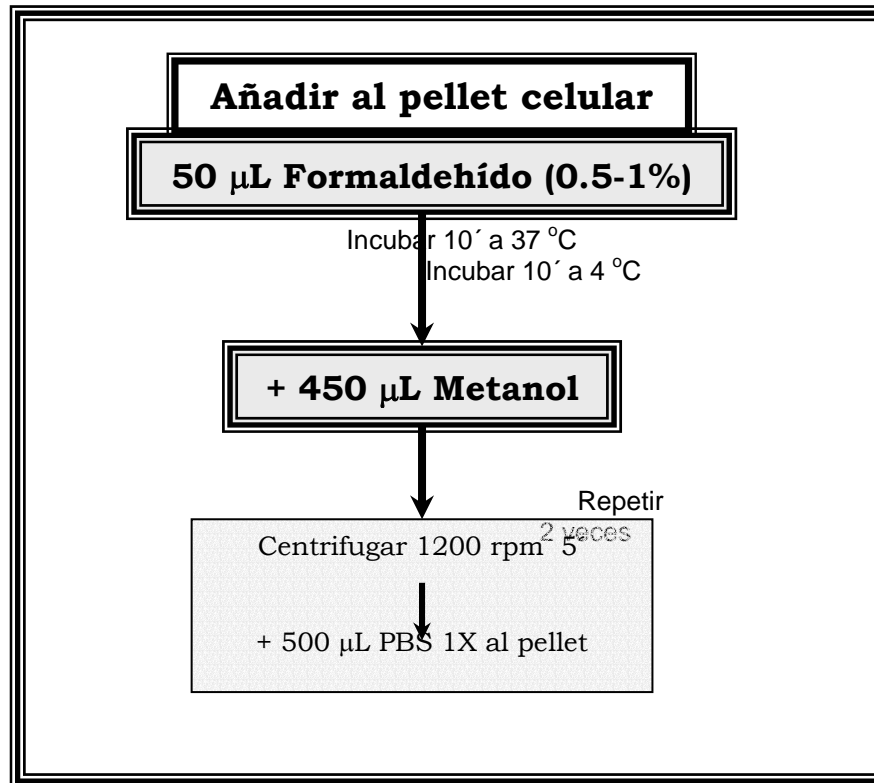


Figura 2. Proceso de permeabilización celular por el método Formaldehído-Metanol.

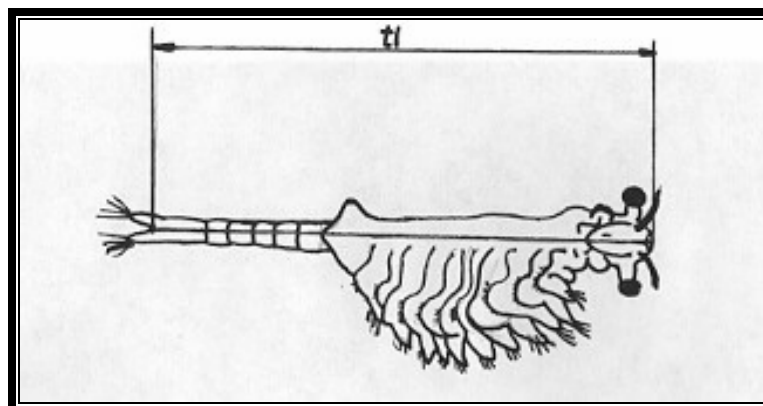


Figura 3. Medidas del largo total en *Artemia* (tomado de Gajardo *et al.*, 1998)

Tabla 1. Diseño de los dos experimentos (LD - levadura desintegrada, FP - fracción pared-membrana, FN - fracción nucleoproteínas y FC - fracción citoplasmática)

EXPERIMENTO A				
1	2	3	4	5
<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL)	<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) + LD (10mg/L)	<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) + FP (10mg/L)	<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) + FN (10mg/L)	<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) + FC (10mg/L)

EXPERIMENTO B								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL)	<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) +		<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) +		<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) +		<i>N. oculata</i> (2x10 ⁵ cel/mL) +	
	LD 6 mg/L	LD 10 mg/L	FP 6 mg/L	FP 10 mg/L	FN 6 mg/L	FN 10 mg/L	FC 6 mg/L	FC 10 mg/L

Tabla 2: Análisis bromatológico de las fracciones de levadura a evaluar expresados en porcentajes.

Fracción	Proteínas (N X 6.25)	Grasas	Humedad	Cenizas
LD	47.01	8.09	4.22	8.11
FP	45.92	9.48	5.24	5.76
FN	72.18	5.17	1.28	5.92
FC	40.95	0.33	0.13	24.82

Tabla 3: Concentraciones de proteína soluble en PBS 1X y porcentajes de solubilidad de las diferentes fracciones de levadura.

Fracciones	Concentración de proteína (µg/mL)	Solubilidad (%)
LD	590	36
FP	240	60
FN	303	42
FC	635	96

Tabla 4: Distribución de las fases del ciclo celular de células MB16-F10 (expresado en porcentajes) después de 48 o 72 horas de exposición a las diferentes fracciones de levadura. Los valores se expresan media \pm DE, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) ($n=2$ para 48hr; $n=3$ para 72hr).

FRACCIÓN (LD)						
<i>Tiempo</i>	48 h			72 h		
Fases del ciclo celular (%)	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Control	55.7 \pm 14.6	25.2 \pm 0.2	19.1 \pm 14.4	44.1 \pm 2.6	53.5 ^a \pm 3.4	2.4 ^b \pm 2.6
LD – 1 ug/mL	68.6 \pm 4.3	19.6 \pm 6.6	12.1 \pm 2.6	54.9 \pm 18.3	9.1 ^b \pm 6.5	36.1 ^a \pm 24.7
LD – 2 ug/mL	68.0 \pm 2.6	19.2 \pm 2.4	12.8 \pm 0.2	57.4 \pm 5.1	2.1 ^c \pm 3.6	40.5 ^a \pm 7.9
LD – 5 ug/mL	60.7 \pm 5.1	28.6 \pm 3.4	10.6 \pm 1.7	55.3 \pm 8.0	40.8 ^a \pm 12.1	4.0 ^b \pm 4.2
LD – 10 ug/mL	63.6 \pm 3.0	27.1 \pm 7.5	9.3 \pm 4.5	38.1 \pm 13.1	44.3 ^a \pm 1.7	17.7 ^{ab} \pm 14.7
LD - 25 ug/mL	66.3 \pm 2.8	22.4 \pm 3.2	11.4 \pm 0.4	45.4 \pm 4.1	43.0 ^a \pm 15.6	11.6 ^{ab} \pm 11.5

FRACCIÓN (FP)						
<i>Tiempo</i>	48 h			72 h		
Fases del ciclo celular (%)	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Control	52.8 ^{ab} \pm 2.3	42.6 \pm 0.4	4.6 \pm 1.9	64.7 \pm 2.0	32.1 \pm 5.7	3.3 \pm 3.7
FP - 0.5 ug/mL	45.4 ^{bc} \pm 0.5	50.1 \pm 6.9	4.5 \pm 6.4	63.5 \pm 9.4	34.1 \pm 7.3	2.5 \pm 3.7
FP – 1 ug/mL	53.8 ^a \pm 1.1	44.0 \pm 4.2	2.2 \pm 3.1	63.9 \pm 0.8	32.9 \pm 3.3	3.2 \pm 3.7
FP – 2 ug/mL	45.5 ^{bc} \pm 2.0	53.9 \pm 1.6	0.7 \pm 0.4	66.5 \pm 2.4	27.5 \pm 3.1	6.1 \pm 4.8
FP – 5 ug/mL	49.9 ^{abc} \pm 3.5	50.1 \pm 3.6	0.1 \pm 0.1	67.0 \pm 0.1	31.1 \pm 2.8	1.9 \pm 2.8
FP – 10 ug/mL	43.1 ^c \pm 3.4	54.9 \pm 6.2	2.0 \pm 2.8	71.2 \pm 6.1	21.7 \pm 8.7	7.2 \pm 4.7

FRACCIÓN (FN)						
Tiempo	48 h			72 h		
Fases del ciclo celular (%)	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Control	41.0 ± 4.5	33.3 ± 17.5	25.8 ± 22.0	60.4 ± 4.7	34.6 ± 4.4	5.0 ± 0.4
FN - 0.5 ug/mL	29.6 ± 41.9	24.4 ± 1.2	45.9 ± 44.0	55.4 ± 4.3	40.5 ± 5.5	4.1 ± 2.8
FN - 1 ug/mL	53.0 ± 6.4	43.8 ± 10.9	3.2 ± 4.5	52.9 ± 3.5	41.3 ± 2.3	5.8 ± 1.6
FN - 2 ug/mL	51.0 ± 1.2	41.0 ± 2.1	8.0 ± 3.3	55.6 ± 1.4	35.2 ± 1.6	9.2 ± 0.4
FN - 5 ug/mL	51.0 ± 3.7	46.7 ± 5.7	2.4 ± 2.0	57.1 ± 3.4	36.1 ± 3.2	6.9 ± 1.6
FN - 10 ug/mL	51.1 ± 0.6	43.0 ± 0.9	5.9 ± 1.5	59.0 ± 5.6	32.7 ± 3.3	8.3 ± 2.3

FRACCIÓN (FC)						
Tiempo	48 h			72 h		
Fases del ciclo celular (%)	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Control	45.7 ± 0.2	41.6 ± 0.4	11.7 ± 1.6	57.4 ^b ± 8.6	25.7 ^b ± 20.9	16.9 ± 12.6
FC - 0.5 ug/mL	51.5 ± 5.8	41.2 ± 1.5	7.2 ± 4.3	66.9 ^a ± 2.2	29.7 ^b ± 3.2	3.4 ± 4.0
FC - 1 ug/mL	48.1 ± 2.1	42.2 ± 4.2	9.7 ± 2.0	70.9 ^a ± 2.5	13.7 ^b ± 15.4	15.5 ± 13.1
FC - 2 ug/mL	50.3 ± 1.8	40.8 ± 5.2	8.9 ± 3.4	69.3 ^a ± 6.2	19.2 ^b ± 9.5	11.6 ± 4.5
FC - 5 ug/mL	48.0 ± 1.2	48.1 ± 0.7	3.9 ± 1.8	47.9 ^c ± 3.6	46.8 ^a ± 5.3	5.3 ± 2.9
FC - 10 ug/mL	49.9 ± 2.4	40.5 ± 0.1	9.6 ± 2.6	48.9 ^c ± 3.8	46.2 ^a ± 5.0	5.0 ± 2.3
FC - 25 ug/mL	43.6 ± 11.5	49.2 ± 13.1	7.6 ± 1.1	48.4 ^c ± 2.0	45.9 ^a ± 5.8	5.7 ± 4.8

Tabla 5: Valores de temperatura, salinidad, pH y amonio en cada tratamiento de los dos experimentos (media \pm DE). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el inicio y el final de las experimentaciones dentro de cada tratamiento.

Parámetros		Experimento A					Experimento B								
		C	LD	FP	FN	FC	C	LD		FP		FN		FC	
								6 mg	10 mg	6 mg	10 mg	6 mg	10 mg	6 mg	10 mg
pH	Inicio	7.38 ^b ± 0.17	7.40 ± 0.20	7.49 ± 0.02	7.53 ± 0.10	7.43 ^b ± 0.22	8.25 ^a ± 0.03	8.17 ^a ± 0.01	8.23 ^a ± 0.04	8.21 ^a ± 0.06	8.24 ^a ± 0.06	8.19 ± 0.07	8.22 ^a ± 0.03	8.20 ^a ± 0.04	8.15 ± 0.02
	Final	7.66 ^a ± 0.03	7.72 ± 0.05	7.69 ± 0.13	7.74 ± 0.11	7.83 ^a ± 0.04	8.02 ^b ± 0.04	8.04 ^b ± 0.06	8.02 ^b ± 0.04	8.00 ^b ± 0.02	8.02 ^b ± 0.06	8.09 ± 0.04	8.02 ^b ± 0.10	8.01 ^b ± 0.04	8.04 ± 0.07
NH ⁴⁺ (ug/L)	Inicio	4.83 ± 0.42	5.60 ^a ± 0.21	5.51 ± 0.72	5.75 ± 0.87	6.43 ^a ± 0.41	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.06	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.05	0.17 ± 0.28	0.03 ± 0.04
	Final	5.04 ± 2.65	3.10 ^b ± 0.55	5.79 ± 1.07	6.16 ± 1.23	4.05 ^b ± 0.87	2.75 ± 2.50	0.06 ± 0.05	0.51 ± 0.79	2.91 ± 2.62	1.08 ± 1.77	0.12 ± 0.05	0.53 ± 0.72	1.31 ± 2.05	0.06 ± 0.03
Temperatura (°C)		28.1 \pm 0.9					27.3 \pm 0.9								
Salinidad (‰)		35 \pm 0.6					35 \pm 0.5								

Tabla 6: Porcentajes de las fases del desarrollo de *Artemia franciscana* en el Experimento B (medias±DE) (n=90). Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05)

Tratamientos	FASES DE DESARROLLO (%)			
	I	II	III	IV
Control	8.9 ± 8.4^a	62.2 ± 19.0^a	28.9 ± 10.7^d	0 ± 0^b
LD ₆ mg/L	0 ± 0^b	0.0 ± 12.0^{cde}	75.6 ± 10.7^{ab}	4.4 ± 1.9^{ab}
LD ₁₀ mg/L	0 ± 0^b	4.4 ± 19.3^e	61.1 ± 7.7^c	24.4 ± 16.8^a
FP ₆ mg/L	0 ± 0^b	3.3 ± 10.0^{bc}	72.2 ± 9.6^{bc}	4.4 ± 5.1^{ab}
FP ₁₀ mg/L	0 ± 0^b	5.6 ± 21.2^e	64.4 ± 13.9^{bc}	20.0 ± 21.9^{ab}
FN ₆ mg/L	0 ± 0^b	2.2 ± 41.7^{bcd}	55.6 ± 39.5^{ab}	2.2 ± 3.9^{ab}
FN ₁₀ mg/L	1.1 ± 1.9^b	7.8 ± 8.4^{bcd}	72.2 ± 5.1^{abc}	8.9 ± 6.9^{ab}
FC ₆ mg/L	0 ± 0^b	6.7 ± 5.8^b	63.3 ± 5.8^{bc}	0 ± 0^b
FC ₁₀ mg/L	2.2 ± 1.9^{ab}	0.0 ± 20.3^{de}	75.6 ± 19.5^a	2.2 ± 3.9^{ab}