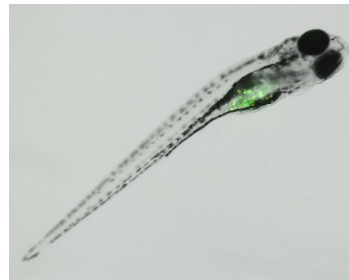


Xenograft de líneas celulares tumorales de páncreas en embriones de pez cebra y su respuesta a fármacos.

Xenograft de líneas celulares tumorales de páncreas en embriones de pez cebra e a súa resposta a fármacos.

Xenograft of human pancreas tumor cell lines in zebrafish embryos and their response to drugs.



Marina Lodeiro Aranda

Fecha de presentación: septiembre 2017

Dra. Ana María González Tizón Prof. Dra. Laura Elena Sánchez Piñón Dr. Jorge Guerra Varela

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen. <i>Abstract</i> | 1 |
| Abreviaturas | 2 |
| Introducción | 3 |
| 1. Cáncer | 3 |
| 1.1 Cáncer de páncreas | 4 |
| 1.2 Tratamientos actuales y problemática | 5 |
| 1.3 Interés de las células derivadas de paciente | 7 |
| 2. Pez cebra como modelo en biomedicina | 8 |
| 2.1 Ventajas del pez frente al modelo murino | 8 |
| 2.2 <i>Xenograft</i> . Modelos y limitaciones | 10 |
| Objetivos | 12 |
| Materiales y métodos | 13 |
| 1. Mantenimiento de pez cebra | 13 |
| 2. Condiciones de cultivo de células humanas | 13 |
| 3. <i>Xenograft</i> | 14 |
| 3.1 Preparación de las células para el trasplante | 14 |
| 3.2 Inyección de células | 14 |
| 4. Selección de embriones de pez cebra y obtención de imágenes | 16 |
| 5. Tratamiento con 5-FU | 16 |
| 6. Análisis de imagen | 17 |
| 7. Análisis estadístico | 18 |
| Resultados – Discusión | 19 |
| 1. Supervivencia de los embriones | 19 |
| 2. Proliferación celular | 21 |
| Conclusiones | 27 |
| Bibliografía | 28 |

RESUMEN. ABSTRACT

La incidencia actual del cáncer sobre la población general hace necesaria una investigación cada vez mayor con el fin de dotar de calidad de vida a las personas afectadas. En función del tipo, hay tratamientos más eficaces que otros, siendo por tanto de especial interés ahondar en la búsqueda de nuevos tratamientos en los casos en los que no son lo suficientemente eficaces o no actúan a tiempo. Debido a las múltiples ventajas frente al murino que presenta, el pez cebra se ha situado a la par del ratón en los últimos años en investigación biomédica, siendo un complemento excelente. El *xenograft* de células tumorales en embriones de pez cebra constituye una manera excepcional de generar un modelo animal para la enfermedad y testar la respuesta a fármacos. Además, el uso de células derivadas de paciente en lugar de líneas de cultivo comerciales permite no solo evaluar un comportamiento más cercano al real, sino también acercarse cada vez más a la terapia individual y personalizada. En este trabajo se ha conseguido establecer un modelo de cáncer de páncreas mediante *xenograft* de células tumorales derivadas de paciente en pez cebra. También se ha logrado comprobar los efectos positivos tanto en la supervivencia de los embriones como en la reducción de la proliferación celular de un fármaco antitumoral comercial, 5-Fluorouracilo sobre el modelo mencionado.

The incidence of cancer worldwide has forced us to further researching in order to improve the quality of people's lives suffering this group of diseases. Depending on the type, a wide variety of treatments with different effectiveness exists. For this reason it is important to keep on looking for new treatments when they are not enough effective or they act too late. Due to the several advantages zebrafish has in comparison to the murine model, it has become a leader model along the mouse in biochemical research these years, being a great partner. Xenograft of tumor cell lines in zebrafish embryos is an excellent manner of developing an animal model for this diseases, as well as drug screening. Moreover, using patient derived cells instead of commercial culture cell lines allows not only a deeper understanding of the real cell behavior, but also getting closer to a particular, personalized therapy. Here, it has been possible to establish a pancreatic patient-derived cancer cells xenograft model in zebrafish. Besides, the effects in embryo survival and cell proliferation of 5-Fluorouracil, a commercial anticancer drug, have been tested using the aforementioned model.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 5-FU. 5-Fluorouracilo | hpi. Horas post-inyección |
| CNV. Variación en el número de copias | hpt. Horas post-tratamiento |
| dATP. Desoxiadenosina trifosfato | PBS. Tampón fosfato salino |
| dCTP. Desoxicitosina trifosfato | PDX. <i>Patient derived Xenograft</i> |
| dGTP. Desoxiguanosina trifosfato. | PI. Índice de proliferación |
| dTMP. Desoxitimidilato | PTU. Feniltiourea |
| dUMP. Desoxiuridilato | PVP. Polivinilpirrolidona |
| EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético | RPMI (medio). Roswell Park Memorial |
| FBS. Suero Bovino Fetal | Institute (medio) |
| FdUMP. Fluorodesoxiuridinmonofosfato | SD. Desviación estándar |
| FUTP. Fluorouridintrifosfato | SNP. Polimorfismo de nucleótido único |
| FdUTP. Fluorodesoxiuridintrifosfato | SODs. Superóxido dismutasas |
| GFP. Proteína verde fluorescente | TS. Timidilato Sintasa |
| hpf. Horas post-fertilización | |

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Pese a que generalmente se piensa en el cáncer como en una enfermedad que se caracteriza por la presencia de masas de células proliferantes en los tejidos afectados, se trata de algo más complejo y menos pasivo. El tumor es un tejido propiamente dicho, formado por numerosos tipos celulares cuyas interacciones entre sí y con el tejido circundante son las responsables de su progresión [Hanahan y Weinberg, 2011].

La principal característica de las células cancerosas sí que radica en su capacidad de proliferación superior a la de las células normales, debida a una desregulación de las señales promotoras e inhibidoras del crecimiento que controlan el progreso del ciclo celular. Las células cancerosas consiguen esta desregulación mediante señalización paracrina entre células vecinas y normales que responden enviando distintos factores de crecimiento y autocrina para estimular su propia mitogénesis, así como sobreexpresando receptores de membrana o modificándolos para que la interacción con el ligando sea más fácil.

Por otro lado, la aparición de mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores y de ganancia en los protooncogenes, conducen a la activación (la proteína B-Raf, la vía de la PI3K- o MAP-quinasa, etc) o inactivación (la RAS GTPasa, la fosfatasa de PTEN, la mTOR-quinasa, etc) de múltiples cascadas de señalización en pro del crecimiento celular.

Otras características como evitar la aparición de síntomas de senescencia, la pérdida de la inhibición por contacto, la resistencia a la muerte celular, la prominencia de la necrosis frente a la apoptosis o autofagia, la inmortalización celular, inducción de la angiogénesis y la alta capacidad de metastatizar también influyen considerablemente en la capacidad de un conjunto de células tumorales de arraigar, formar la masa tumoral, invadir otros tejidos para formar nuevos tumores y continuar con el proceso que acaba agotando los recursos para los tejidos circundantes y provocando estragos a nivel del organismo [Hanahan y Weinberg, 2011].

En concreto, los tumores que cursan con metástasis tienen la tasa de supervivencia más reducida, siendo la enfermedad en estado avanzado incurable al tratarse de tumores más agresivos. El proceso de metástasis puede dividirse en dos etapas. La primera comprende el desprendimiento de una o varias células del tumor original o primario, la intravasación al sistema circulatorio o linfático y la diseminación mediante la extravasación desde los vasos al tejido o los tejidos de destino. La adaptación de estas células en el nuevo tejido, la formación

de nódulos (micrometástasis) que finalmente darán lugar al nuevo tumor (colonización) se corresponde con la segunda fase [Brown, Schiavone, Tazzyman, Heymann y Chico, 2017, Hanahan y Weinberg, 2011]. En función del tipo de tumor primario, este puede secretar factores que mantengan los tumores secundarios latentes. De este modo, en casos como el melanoma o el cáncer de mama, la extirpación del tumor original puede desembocar en la estimulación del crecimiento de pequeños tumores secundarios que permanecieron latentes mientras el primario secretaba los factores supresores correspondientes [Hanahan y Weinberg, 2011]. Por eso, la capacidad de migración y enraizamiento de las células en el nuevo tejido hace más difícil que un tratamiento quirúrgico sea efectivo, lo cual aumenta la necesidad de una mayor investigación en este campo.

En el año 2012 había más de 32 millones y medio de personas viviendo con cáncer, se detectaron unos 14 millones de casos nuevos y se registraron sobre los 8 millones de muertes derivadas a nivel mundial [Ferlay et al., 2013]. Debido a la alta incidencia de esta enfermedad sobre la población, la necesidad de seguir investigando se hace evidente.

En función del tejido afectado, se distinguen numerosos tipos de cáncer. En lo referente a este trabajo de fin de máster, se ha tratado el cáncer de páncreas, al cual se dedica la siguiente sección.

1.1 Cáncer de páncreas

Al igual que otros tipos de cáncer, el pancreático se desarrolla debido a la aparición de mutaciones en los genes supresores de tumores (como la familia de *BRCA*) y/o protooncogenes (como *KRAS*, en el 95% de los casos [Wilkes, Alexander & Cullen, 2017]). Estas mutaciones pueden ser heredadas o adquiridas; hay ciertos factores ambientales que pueden aumentar el riesgo de aparición de las mismas, como el consumo de algunos alimentos. Las mutaciones en los genes de la familia de *BRCA*, supresores de tumores implicados en la reparación de las roturas en la doble hélice del DNA, suelen heredarse de manera autosómica dominante [Luo et al., 2015]. Por otro lado, las mutaciones en el oncogen *KRAS* provocan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, que suele ser modulado por las SODs. No obstante, si estas sufren una pérdida de función, se desata una cascada de señales que conducen a la tumorogénesis [Wilkes, Alexander & Cullen, 2017].

Los pacientes a los que se les diagnostica un cáncer de páncreas suelen tener una

supervivencia media de cuatro meses y medio y menos de un 10% sobreviven 5 años. Pese a que el cáncer de páncreas solo supone un 3% de los nuevos diagnósticos, este constituye la cuarta causa más común de muerte relacionada con cáncer en Europa. De hecho, en 2008, un cuarto de los casos de adenocarcinoma se dieron en Europa aunque solamente comprenda un noveno de la población mundial [Carrato et al., 2015]. Los tratamientos disponibles para este tipo de cáncer son escasos. Si se detecta a tiempo, la cirugía es la única que ofrece una solución potencial. No obstante, dado que se suele diagnosticar en etapas avanzadas, solamente el 10-20% de los pacientes tiene un tumor que sea susceptible de ser operado.

1.2 Tratamientos actuales y problemática

Se pueden clasificar los agentes antitumorales en base a su función una vez en el organismo. Así, se distinguen los fármacos alquilantes, como el cisplatino y derivados; antimetabolitos, como el gemcitabine, el 5-Fluorouracilo y los antifolatos; antimicrotúbulos como el paclitaxel y el docetaxel; inhibidores de la topoisomerasa como el irinotecan o la doxorubicina y antibióticos citotóxicos como las antracinas y bleomicinas.

Dada la facilidad de las células tumorales de adquirir resistencia a los fármacos, se suelen administrar en terapia combinada, de manera que se ataca al tumor mediante varios mecanismos diferentes, aumentando las posibilidades de éxito del tratamiento.

Para la realización de este trabajo se ha prestado especial atención al 5-FU, el cual se lleva empleando desde los años 50 en el tratamiento del cáncer colorrectal, de mama y en el del tracto aerodigestivo tanto de manera independiente como en terapia combinada.

El 5-FU es un análogo del uracilo, con un átomo de flúor en el C-5. Se trata, al igual que el gemcitabine, de un antimetabolito, un tipo de fármaco que actúa impidiendo procesos biosintéticos esenciales como la síntesis de DNA y RNA. El metabolismo del uracilo es más rápido en las células tumorales que en las normales. El 5-FU se introduce en la célula mediante los mismos mecanismos que el uracilo. Una vez en el interior celular, el fármaco es metabolizado en varias formas activas (FdUMP, FUTP y FdUTP) que interrumpen la síntesis de RNA y la actividad de la timidilato sintasa (TS) [Figura 1]. La TS cataliza el paso de dUMP a dTMP. El FdUMP se une al sitio de unión para dUMP de la TS, impidiendo que la reacción de síntesis de dTMP tenga lugar. Entre las implicaciones de este suceso, tiene lugar un desequilibrio entre las proporciones de los demás desoxinucleósidos trifosfato (dATP,

dCTP y dGTP), lo cual tiene efectos perniciosos severos en los mecanismos de reparación y síntesis del DNA, derivando en daño letal. Por otro lado, debido a que el dUMP no se transforma a dTMP se acumula dUTP y tanto este último como el análogo conteniendo flúor, FdUTP, se pueden incorporar en el DNA generando roturas en la doble hélice. Los mecanismos de reparación no pueden reparar el daño en presencia de niveles altos de dUTP y FdUTP, conduciendo por tanto a la muerte celular. No obstante, la falta de timidilato se puede suplir mediante la fosforilación de la timidina por parte de la timidina kinasa, lo que puede constituir un mecanismo de defensa a 5-FU. Por otra parte, cuando el FUTP se incorpora al RNA se interrumpe el pre-procesamiento, las modificaciones post-trascricionales y el splicing, afectando el metabolismo celular en varios niveles y reduciendo la viabilidad. [Longley, Harkin y Johnston, 2003].

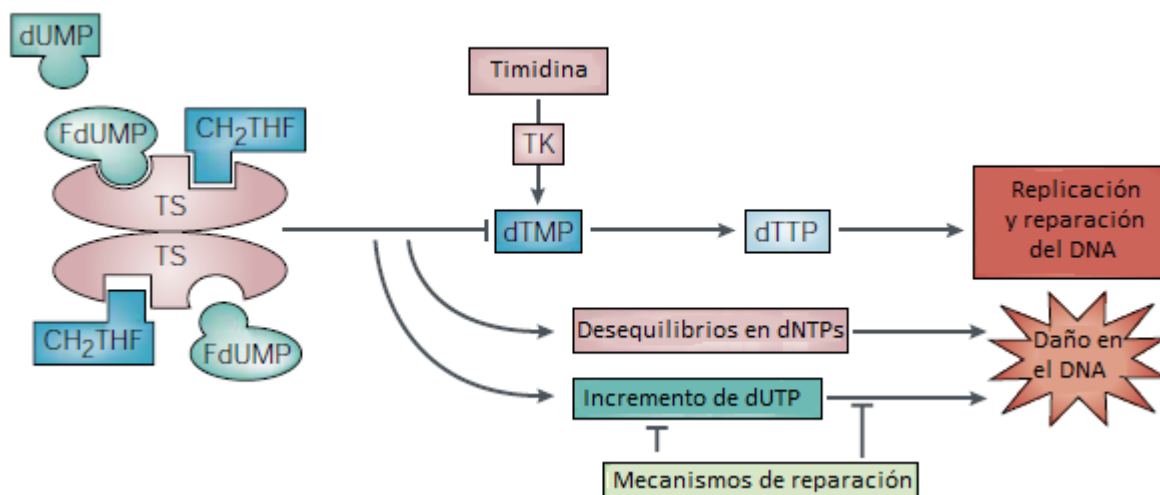


Figura 1. Mecanismo de acción del FdUMP, metabolito activo del 5-FU (CH₂THF: 10-metileno tetrahidrofolato, TS: timidilato sintasa). Extraída y modificada de Longley, Harkin y Johnston, 2003.

En cuanto al cáncer de páncreas, la quimioterapia tras la cirugía supone un ligero aumento en la tasa de supervivencia general. Actualmente, el tratamiento quimioterapéutico más efectivo para este tipo de cáncer es el gemcitabine [Miao, Koch, Straubinger y Jusko, 2015], aunque con una tasa de respuesta tumoral tan reducida que se ve necesaria la aplicación de varios fármacos en una sola terapia con el fin de atacar el tumor mediante

distintos mecanismos [Miao, Koch, Straubinger y Jusko, 2015]. Se ha aprobado en los Estados Unidos y en Europa el uso de gemcitabine y erlotinib en terapia combinada para tratar los casos de metástasis, así como el *nab*-paclitaxel [Carrato et al., 2015].

Dado que aún no se ha dado con un tratamiento para el cáncer de páncreas que sea eficaz, sobre todo si se trata del mal metastásico, es imperioso seguir investigando en busca de un tratamiento paliativo que, por lo menos, incremente las probabilidades de supervivencia de las personas afectadas por esta dolencia. Por ello, para la realización del presente trabajo, se consideró interesante probar los efectos del 5-FU, conocido por ser altamente eficaz contra otro tipo de tumores, sobre células tumorales de origen pancreático.

1.3 Interés de las células derivadas de paciente

Generalmente, las líneas celulares utilizadas en investigación biomédica son comerciales, es decir, hace mucho tiempo que se extrajeron de un paciente y se establecieron en cultivo en monocapa. Puesto que las células tumorales se caracterizan, entre otras cosas, por su alta tasa de mutación con respecto a células normales, las líneas establecidas no son tan representativas del tumor original puesto que, tras los pases sucesivos, van acumulando tal número de mutaciones que no se puede garantizar que los patrones de expresión génica sigan siendo los silvestres resultando en cambios significativos e irreversibles [Daniel et al., 2009]. De este modo, con el fin de que los ensayos llevados a cabo para la investigación del cáncer sean relevantes y aplicables a pacientes enfermos, ya sea en términos de prognosis o tratamiento, es necesario buscar alternativas al uso de este tipo de células. Aquí radica el atractivo de usar células extraídas de un tumor primario xenotrasplantadas en ratón, también conocidas como PDX (del inglés, *Patient Derived Xenograft*) [Siolas y Hannon, 2013]. Esta técnica consiste en el trasplante heterotópico u ortotópico de tumores de origen humano en ratones inmunodeficientes. La cepa de ratones empleada para estos fines carece de células Natural Killer (NOD-SCID), lo que impide que el sistema inmune del ratón rechace y ataque las células introducidas. En los modelos PDX, las células se mantienen pasando directamente de un ratón a otro cuando el tumor en el ratón original crece demasiado. Estas células, al desarrollarse en un entorno más similar al del tumor parental, conservan más similitudes con este que aquellas cultivadas en placa, incluyendo los patrones de expresión, SNPs y CNVs [Siolas y Hannon, 2013]. No obstante, cuanto mayor es el número de veces que se ha pasado

un tumor de un ratón a otro, mayor es el incremento en la cantidad de variaciones con respecto al tumor original que se producen. Es posible establecer una línea celular a partir de células extraídas de un modelo PDX, aunque a partir de este punto los cambios en los perfiles de expresión comienzan a acumularse [Daniel et al., 2009]. Las células pueden ser transfectadas o transducidas para expresar distintos marcadores, habitualmente fluorocromos.

2. Pez cebra como modelo en biomedicina.

Si bien es innegable que el ratón es el modelo animal en investigación por excelencia, en los últimos años, el pez cebra (*Danio rerio*) ha ido ganando importancia, situándose como complemento de la especie murina para la realización de estudios de enfermedades humanas y búsqueda de nuevos fármacos. Esto es debido a que posee una serie de características que lo convierten en una opción verdaderamente atractiva en cuanto a la realización de experimentos preliminares para investigaciones que se encuentren en estadios iniciales de desarrollo, complementando estudios posteriores en ratones [Veinotte, Dellaire y Berman, 2014].

2.1 Ventajas del pez frente al modelo murino

Las características ventajosas del pez cebra que lo sitúan en una posición privilegiada como modelo experimental incluyen aquellas meramente prácticas, como son su tamaño y coste de mantenimiento reducidos, su capacidad de engendrar una descendencia altamente prolífica a partir de un único cruzamiento y que la legislación vigente no afecte a los embriones de menos de 5 dpf (eleuteroembriones, 120 hpf) como animal, mientras no tengan alimentación autónoma – Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, el cual mantiene la definición de animal dada en el capítulo I, Artículo 3a) del Real Decreto 1201/2005 [Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado, 2017]. A nivel genético, aproximadamente un 70% de los genes humanos presentan ortólogos en el pez cebra, porcentaje que se considera bastante elevado [Howe et al., 2013], y un 80% de los que provocan enfermedades están presentes en el pez. No obstante, en ocasiones estos genes presentan más de un ortólogo en pez, por lo que es posible que haya varios productos proteicos para un gen con producto único en humanos [Brown, Schiavone, Tazzyman, Heymann y Chico, 2017]. Por otro lado, el hecho de que el desarrollo embrionario

sea externo y rápido posibilita que este animal sea utilizado como modelo para estudios de biología del desarrollo, permitiendo observar todo el proceso de embriogénesis directamente, sin necesidad de utilizar instrumentación avanzada. El embrión se desarrolla sin inconvenientes en agua de ósmosis, en placas de Petri o de 24 – 96 pocillos hasta los 5 dpf sin necesidad de proporcionar alimento, de ahí (entre otros aspectos) la sencillez y economía de manejo y mantenimiento [Veinotte, Dellaire y Berman, 2014], teniendo en cuenta asimismo que la alimentación puede suponer una fuente de variación entre réplicas y experimentos. Otra característica ventajosa es que tanto el corion como el embrión son altamente transparentes hasta transcurridas las 48 hpf cuando, ya fuera del corion, se empiezan a apreciar las pigmentaciones características del pez, momento hasta el cual se puede monitorizar de manera sencilla el desarrollo de los órganos y otros procesos *in vivo* [Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann y Schilling, 1995]. Con el fin de evitar la dificultad añadida de la aparición de los pigmentos típicos del pez cebra, los embriones se pueden criar en feniltiourea (PTU) para que no desarrollen pigmentación; también se pueden utilizar líneas mutantes transparentes y albinas (como *Casper* y *Nacre* [White et al., 2008]), así como líneas transgénicas que expresen algún gen testigo (por ejemplo el gen para la GFP) en el tejido/órgano de interés, como pudiera ser los vasos sanguíneos, células hepáticas o el cerebro. Por otro lado, dado que se trata de un organismo acuático, es posible testar distintos fármacos o candidatos, ya sean solubles en agua o en dimetil sulfóxido (DMSO) 1%, concentración inferior a la máxima que pueden soportar los peces (hasta 1,5 el día 3 de desarrollo y hasta 2 el resto [Maes et al., 2012]), en el caso de aquellos con una menor hidrosolubilidad. También, dado el pequeño tamaño de los embriones, el rango de concentraciones necesario para testar fármacos disminuye un orden de magnitud con respecto al uso de ratones (μM vs mM) [Haldi, Ton, Seng y McGrath, 2006]. Además, si bien el sistema inmune innato es funcional a partir de las 48 hpf, el sistema inmune adaptativo no se desarrolla completamente hasta que no han transcurrido 4 – 6 semanas desde fertilización, por lo que no es necesario trabajar con especímenes inmunosuprimidos, como sucede en el caso del ratón (DDD). Estas dos últimas características resultan muy interesantes para llevar a cabo experimentos de xenotrasplantes y evaluar la respuesta a fármacos (ver siguiente sección) [Veinotte, Dellaire y Berman, 2014] [Brown, Schiavone, Tazzyman, Heymann y Chico, 2017].

2.2 *Xenograft*. Modelos y limitaciones

El xenotrasplante consiste en la transferencia de una porción de órgano, tejido o células vivas de una especie a otra [Veinotte, Dellaire y Berman, 2014]. Se denomina *xenograft* o xenoinjerto a la porción de tejido o conjunto de células que son extraídas de la fuente y se van a injertar en el organismo destinatario. En función del tejido de origen y el destino final, se distinguen dos tipos de trasplantes, los ortotópicos y las heterotópicos. Si el tejido de destino es el mismo que el de origen, estamos hablando de un trasplante ortotópico. Mientras que si se habla de un trasplante heterotópico, el tejido trasplantado se reubica en una localización distinta de la original.

En el caso de la investigación biomédica en cáncer, se pueden introducir células tumorales de origen humano en animales de experimentación con el fin de crear un modelo en el que observar la proliferación y migración celulares, así como para realizar una búsqueda de fármacos. Para llevar a cabo experimentos de *xenograft* en ratón, es necesario usar una estirpe inmunosuprimida (Nu/Nu, SCID, NOD/SCID... [Cariati, Marlow & Dontu, 2011]) y la monitorización es complicada debido al desarrollo interno del embrión, mientras que en el caso de utilizar embriones de pez cebra, se evita este inconveniente (fertilización y desarrollo externos y sistema inmune adquirido de desarrollo tardío). Los primeros ensayos de *xenograft* llevados a cabo en pez cebra se realizaron en 2006 por parte de Haldi, Ton, Seng y McGrath, quienes introdujeron células de melanoma y fibroblastos normales, marcados con CM-DiI (fluoróforo lipofílico que se transmite vertical pero no horizontalmente entre las células), en el vitelo y el cerebro de embriones de 48 hpf. También se pueden usar otros fluoróforos para marcar las células y visualizar su evolución en el interior del pez (ver sección 1.3). Tras la inyección, mantuvieron los embriones a 35 °C y los examinaron diariamente durante siete días evaluando si estos tenían un desarrollo normal y la proliferación o circulación de las células. El *xenograft* en pez cebra se realiza mediante microinyección utilizando agujas obtenidas a partir de capilares de vidrio estirados para tener una longitud y diámetro adecuados con el fin de evitar que la perforación con la aguja genere secuelas posteriores (formación de edemas, pérdida de contenido vitelino...), además de cortar la punta formando un ligero bisel para una perforación más limpia. Llevar a cabo los ensayos de *xenograft* en pez cebra tiene numerosas ventajas frente a ratón [Veinotte, Dellaire y Berman, 2014].

Tabla 1: Comparación de las características de ratón y pez cebra como modelos para *xenograft*.

| Ratón | Pez cebra |
|---|--|
| ☹ Injerto lento (varios meses) | 😊 Injerto rápido (24 h o menos) |
| ☹ Necesario estirpes inmunocomprometidas | 😊 Sin sistema inmune adaptativo hasta los 28 dpf |
| 😊 Posible injertar líneas celulares y tumores primarios | 😊 Posible injertar líneas celulares y tumores primarios |
| | 😊 Necesarias pocas células |
| 😊 Posible trasplante ortotópico de un rango más amplio de tejidos | ☹ No se pueden realizar trasplantes ortotópicos de todos los tejidos (ej. mama, pulmón o próstata) |

Si bien las características anteriormente citadas del pez cebra (ver sección anterior) lo convierten en una opción verdaderamente atractiva para complementar los estudios con el modelo murino, la Tabla 1, extraída de Veinotte, Dellaire y Bermman (2014) muestra una comparativa entre las oportunidades y limitaciones en cuanto a *xenograft* que tienen ambos animales, los cuales hacen del pez cebra un modelo interesante para este tipo de ensayos, aunque no sustituye al ratón.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es generar un modelo para el cáncer de páncreas humano en pez cebra mediante el xenotrasplante de células y evaluar su respuesta a un fármaco con actividad antitumoral conocida.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Mantenimiento de pez cebra

Los peces se mantienen en el animalario a la temperatura óptima para su desarrollo, 27°C, en un sistema de circulación continua de agua osmotizada cuyos parámetros de conductividad, pH, dureza, concentración de oxígeno y cloro se ajustan a los determinados como óptimos para esta especie [Westerfield, 2000]. Se alimentan con escamas [TetraMin] por la mañana y por la tarde y con *Artemia spp.* a mediodía, obtenida en el laboratorio incubando los quistes en una disolución de NaCl 30 g/l durante 48 h en aireación constante a 27 °C.

Los individuos reproductores permanecen juntos en una proporción 1:2 a favor de las hembras con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 h de oscuridad. Los embriones utilizados para la realización de los experimentos se obtuvieron mediante el cruce de adultos silvestres, los cuales no pueden manifestar ningún síntoma de enfermedad ni haber sufrido un tratamiento farmacológico en los dos meses previos a la puesta. Para ello se colocan en el fondo de las peceras unas parideras consistentes en recipientes conteniendo canicas imitando el entorno natural e impidiendo que los adultos ingieran los huevos, dado que estos se depositan en el fondo. La puesta tiene lugar a primera hora del cambio del fotoperiodo de oscuridad al de luz. Tras la puesta, el contenido de las parideras se filtra y lava con agua de ósmosis para eliminar la presencia de restos de comida y detritos. Los embriones se conservan en el animalario en placas de Petri que contienen agua de ósmosis. Es importante retirar los embriones coagulados cada 12 h de desarrollo o cada 24 h si no es posible, con el fin de evitar la proliferación de hongos.

2. Condiciones de cultivo de células humanas

La línea celular utilizada para llevar a cabo los experimentos, 185 scd, proviene de un tumor de un paciente que fue xenotrasplantado en ratón (PDX) [Miranda-Lorenzo et al., 2014]. Fue transducida para que expresara la proteína verde fluorescente (GFP) con el fin de monitorizar su evolución y crecimiento tanto en placa como en el interior del pez. Fue proporcionada por el Dr Bruno Sáinz Jr, miembro del grupo de Células Madre y Cáncer, en el Centro Nacional de Investigación Oncológica (CNIO). Esta línea se mantuvo cultivada en monocapa en medio RPMI-1640, suplementado con FBS 10% [Sigma - Aldrich], L-glutamina

1% [ThermoFisher] y penicilina/streptomina 1% [ThermoFisher]. La temperatura de incubación fue de 37°C con un flujo de CO₂ del 5%. Se realizó un subcultivo con una dilución 1:4 cada 6 días. Para ello, se retiró el medio de cultivo por aspiración, se lavó con 2 ml de PBS [Sigma Aldrich] y se levantó del fondo de la placa incubando con 1 ml de tripsina-EDTA [0,25% con rojo fenol, ThermoFisher] durante 18 minutos. Este tiempo de tripsinización sufrió un proceso de optimización para este tipo celular, partiendo de un tiempo más estandarizado (5 min) hasta el tiempo que se consideró necesario para que la mayoría de las conexiones intercelulares y con el fondo de la placa se rompieran. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió 5 ml de RPMI-1640 completo fresco para neutralizar la tripsina, se resuspendió y se tomó un volumen de 1,5 ml para una placa nueva, conteniendo 6,5 ml de RPMI-1640. Puesto que la velocidad de crecimiento de estas células es bastante reducida, se realizó un cambio de medio 3 días después de cada subcultivo, con el fin de renovar los nutrientes presentes en la placa y favorecer el crecimiento celular.

3. Xenograft

3.1 Preparación de las células para el trasplante.

Se preparó un inóculo a partir de las células cultivadas en placa. Se dejaron crecer hasta que alcanzaron un 80% de confluencia en monocapa. El día de la inyección, se lavaron una vez con PBS y se levantaron con tripsina-EDTA del mismo modo que cuando se realiza un subcultivo. Una vez levantadas, se resuspendieron en medio nuevo y se filtraron usando un filtro de nylon de 40 µm [Falcon] con el fin de eliminar los posibles agregados de células que persistieran tras la tripsinización. Se usó una cámara de Neubauer para calcular el volumen de suspensión necesario para obtener 10⁶ células. Esta suspensión se centrifugó durante 5 min a 1300 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 µl del medio de inyección. Se usó PVP-40 [Sigma – Aldrich] al 2% en PBS como medio de inyección. El PVP es un polímero de pirrolidona entrecruzado con vinilo soluble en agua, cuyas características como fluido newtoniano y su capacidad de absorber hasta el 40% de su peso en agua lo hacen especialmente atractivo para ser usado como medio de inyección.

3.2 Inyección de células.

Dos días antes de la realización del experimento, se cruzaron machos y hembras de

genotipo silvestre con el fin de obtener embriones para inyectar. Se utilizaron embriones de 48 horas post-fertilización (hpf) [Haldi, Ton, Seng y McGrath, 2006], los cuales se decorionaron con ayuda de unas pinzas cuando fue preciso. Los embriones se anestesiaron con tricáína 0,02% [Sigma – Aldrich]. La suspensión celular se cargó en agujas estiradas con un *puller* vertical [PC-10, Narishige] a partir de capilares de borosilicato [1 x 0,78 mm, Harvard Apparatus]. Las condiciones de estiramiento fueron de 1 solo paso de calentamiento a 60 °C con un peso ligero de 25g y otro pesado de 100g. De este modo, se obtienen dos agujas a partir de un solo capilar cuyo diámetro terminal en el punto de ruptura ronda los 35 µm, según se pudo confirmar observando al microscopio. Para poder utilizarlas, es necesario abrirlas quebrando la punta (máximo 2 mm desde el final) con ayuda de unas pinzas, cuidando de que la fractura no sea perpendicular al eje de la aguja para crear un ligero bisel que favorezca la perforación. Antes de proceder a inyectar los embriones, se confirma que las células salen correctamente de la aguja (una cantidad homogénea, sin aglomeraciones), distribuyendo unas cuantas gotas en un portaobjetos y comprobando la presencia de aquellas al microscopio [Haldi, Ton, Seng y McGrath, 2006].



Figura 2. Embrión de 48 hpf. La flecha en rojo señala la aguja mediante la cual se lleva a cabo la inyección, en el vitelo.

Los embriones anestesiados se colocaron sobre una placa de agarosa al 1,5% para llevar a

cabo las inyecciones, ejerciendo de soporte amortiguado para evitar la ruptura de la aguja en caso de que se produjera algún impacto de esta contra la placa durante el proceso de inyección [Figura 2]. Las inyecciones se llevaron a cabo usando un microinyector eléctrico [IM-31, Narishige] con una presión de salida de 45 kPa. Se inyectó de manera manual en vitelo un volumen aproximado de ~800 células. Los embriones con pocas o ninguna célula en su interior, así como aquellos que no sobrevivieran debido a un mal manejo fueron descartados y excluidos de los experimentos posteriores.

Los embriones inyectados se mantuvieron a 35 °C en agua de ósmosis, ya que se vio que se trata de una temperatura óptima para equilibrar la supervivencia de las células y de los embriones [Haldi, Ton, Seng y McGrath, 2006, Cabezas-Sáinz, Guerra-Varela et al., enviado].

4. Selección de embriones de pez cebra y obtención de imágenes.

Se dejaron 24 h de recuperación, tras las cuales se seleccionaron solamente aquellos embriones que mantuvieran las células en su interior mediante su visualización en el microscopio de fluorescencia [AZ-100, Nikon], el cual tiene una cámara acoplada [DS-Ri1, Nikon]. Se tomaron fotografías a 24 hpi, previamente al tratamiento antitumoral, para evaluar los niveles iniciales de fluorescencia y normalizar los resultados posteriores. Para ello, se anestesiaron los embriones en triclaína 0,02%. Estas fotografías se realizaron en el canal blanco y negro y se superpusieron a las tomadas en el canal de fluorescencia verde para observar la evolución de las células dentro del pez. Se dispone de un filtro de banda estrecha para GFP [Nikon], el cual permite el paso únicamente de la longitud de onda de excitación de GFP (509 nm), minimizando la excitación de otras posibles fuentes. Para ello se usó el software NIS Elements BR [versión 4.13, Nikon]. Se tomaron imágenes cada 24 horas durante el transcurso del tratamiento siguiendo el mismo procedimiento.

5. Tratamiento con 5-FU

De los embriones seleccionados, se tomaron algunos como control de inyección, que se mantuvieron a 35°C en agua de ósmosis sin tratamiento antitumoral. El resto, se trataron con 5-fluorouracilo [50 mg/ml, Accord] en agua de ósmosis a dos distintas concentraciones, 500 µM [Cabezas-Sáinz, Guerra-Varela et al., enviado] y 750 µM. La primera concentración se utilizó en base a los criterios establecidos en el artículo citado (que el fármaco sea efectivo

frente a las células inyectadas y que tenga una baja mortalidad en los embriones inyectados), mientras que la segunda se escogió tratando de buscar un compromiso entre la concentración más permisiva en cuanto a supervivencia y otra con una mortalidad mayor de lo deseable (en el artículo citado, 1000 μ M). El tratamiento se llevó a cabo en placas de 24 pocillos, con un embrión en cada pocillo, de 2 ml de capacidad. Cada placa contaba con 4 controles de inyección y 20 individuos prueba. Las placas se cubrieron con una película adhesiva transparente con el fin de evitar la evaporación y el consiguiente cambio no homogéneo en la concentración del compuesto. El tratamiento se prolongó durante tres días. Una vez finalizado el mismo, se procedió a eutanasiar los embriones del experimento aplicando una sobredosis de tricaina tras anestésiar previamente con tricaina para evitar generar estrés en los embriones.

6. Análisis de imagen

Con el fin de estimar si hay diferencias significativas tras el experimento con respecto al momento inicial del mismo, se evaluó la variación de la fluorescencia entre 0 hpt y 48 hpt y entre 0 hpt y 72 hpt. Se considera que la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de células. Por ello, se midió el área de fluorescencia dentro del vitelo, en número de píxeles (nGFP) y la intensidad media de la misma (GMV). De este modo, multiplicando ambos valores y dividiendo el producto a tiempo final entre el tiempo inicial, se obtuvo el índice de proliferación (PI).

$$PI = \frac{nGFP_{final} \times GMV_{final}}{nGFP_{inicial} \times GMV_{inicial}}$$

Si el índice de proliferación es igual a 1, significa que no hay variación entre el número de células inicial y el final, es decir, se mantienen. Sin embargo, si es mayor a 1, tiene lugar una proliferación de células con respecto al momento inicial, mientras que si es menor a 1, se reduce la cantidad de células, presumiblemente debido a que se mueren. No obstante, debido a que en muchas ocasiones el saco vitelino de los peces cebra presenta niveles variables de autofluorescencia en función de su estado de desarrollo, fue necesario pre-procesar las imágenes para evitar esta fuente de error. Así, se tomó un valor de intensidad de fluorescencia umbral, a partir del cual se consideró que correspondía a GFP [Cabezas-Sáinz, Guerra-Varela

et al., enviado]. Se utilizaron el software Perl (versión 6.1.7601 para Windows) y MatLab (versión R2012a, 7.14.0.739). Los archivos de salida tras el análisis de imagen incluían ficheros en formato *.tif con el área fluorescente delimitada y hojas de cálculo con los valores de intensidad y área de fluorescencia para cada pez analizado.

7. Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico para encontrar diferencias significativas en los diferentes grupos de peces. Se utilizaron los programas Prism 7 (GraphPad) y Excel (Microsoft Office, Microsoft). Se distinguieron tres categorías: individuos control, con inyección de células pero sin tratamiento antitumoral, individuos inyectados y tratados con 500 μM de 5-FU e individuos inyectados y tratados con 750 μM de 5-FU. Partiendo de la hipótesis inicial de que en los peces del control se espera que las células se mantengan o proliferen y que disminuyan en los dos tratamientos, se analizaron los resultados obtenidos tras el análisis de imagen. Previamente al análisis de los datos, se identificaron los *outliers*, valores que distan mucho del resto (una posibilidad que sea debido a error experimental), y que se eliminan del conjunto de datos a analizar. Se siguió el método ROUT para la identificación y exclusión de los *outliers* [Motulsky y Brown, 2006]. Se comprobó la homocedasticidad de los datos con el fin de escoger un test paramétrico o no paramétrico mediante el test de Bartlett, comparando los tres grupos de datos entre sí. En el caso de que los datos sean no homocedásticos (su varianza no sea homogénea), este test tendrá un P-valor altamente significativo, muy reducido, pudiendo concluir por tanto que no siguen una distribución gaussiana y haciendo necesario llevar a cabo un análisis no paramétrico, como el test de Kruskal-Wallis, para comparar los tres grupos de datos entre sí simultáneamente. Se realizó también un análisis t – test siguiendo los algoritmos de Mann-Whitney, comparando los grupos de datos dos a dos (control vs tratados con 500 μM de 5 – FU, control vs tratados con 750 μM de 5 – FU y tratados con 500 μM vs tratados con 750 μM de 5 – FU). Se llevó a cabo un análisis por columnas aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov para cada grupo de datos, con el fin de confirmar el test de Bartlett.

RESULTADOS – DISCUSIÓN

1. Supervivencia de los embriones

Durante el transcurso de los días de tratamiento, se recogieron datos de mortalidad de los embriones con el fin de analizar la supervivencia de los mismos al finalizar los experimentos. A continuación, la figura 3 muestra las gráficas de supervivencia para cada experimento llevado a cabo. Para obtener las gráficas en tanto por uno, se normalizaron los datos dividiendo el número de individuos vivos a tiempo final entre el total de individuos al iniciar cada experimento, para cada grupo de individuos. En la figura 3A y 3C, se presentan los tratamientos 1 y 2 por separado (500 μM y 750 μM , respectivamente) con respecto al control. En el primer experimento se tenían 18 individuos control y 48 para el tratamiento 1. La supervivencia para el grupo control cae de un 89% al cabo de 24 h al 44% tras las 72 h, pasando por un 77% a las 48 h, mientras que para los peces tratados con 500 μM de 5-FU, la disminución en la tasa de supervivencia es más sutil. Apenas varía tras el primer día de tratamiento, con un 98%, ni tras el segundo, con un 92% terminando con menos de un 20% de mortalidad al rematar el experimento. El experimento 3 contaba con 12 individuos control y 60 para el tratamiento 2. En el grupo control, la supervivencia al cabo de 24 h es muy similar a la del experimento 1, un 83%, aunque a las 48 h esta desciende bruscamente a un 42%, terminando en un 33% a las 72 h. Los individuos tratados con 750 μM de 5-FU presentaron una mayor supervivencia, siendo del 92% al cabo de 24 h, 82% a las 48 h y un 73% al finalizar el experimento. Se puede apreciar en ambos experimentos que la mortalidad es mayor en el grupo control, lo cual coincide con lo esperado. La figura 3B y 3D muestra dos experimentos en los que se probó con ambas concentraciones de 5-FU. El experimento 2 tenía 18 individuos control, 34 para el tratamiento 1 y 36 para el tratamiento 2. Hasta las 48 h, la supervivencia en los tres grupos es muy similar, 88% para el control y el tratamiento 1 y 92% para el tratamiento 2 a las 24 h y 88%, 85% y 83% para el control, tratamiento 1 y tratamiento 2, respectivamente, al cabo de 48 h. No obstante, a tiempo final, la supervivencia en el control desciende al 50% mientras que se mantiene por encima del 60% para los tratamientos, un 65% y un 67% para los tratamientos 1 y 2, respectivamente. El experimento 4 tenía 16 embriones en el grupo control y 40 para cada tratamiento. En este caso, la supervivencia a las 24 h es mayor en el grupo control que en los tratamientos 1 y 2, siendo 94%, 93% y 85%, respectivamente, aunque a partir de ahí cae bruscamente para el control, pasando a un 50% a

las 48 h y a un 6% al finalizar, mientras que en los tratamientos se estabiliza en torno al 85% para el tratamiento 1 (88% a las 48 h y 85% a las 72 h) y alrededor del 80% para el tratamiento 2 (80% a las 48 h y 78% a las 72 h). En estos dos experimentos, se puede apreciar de nuevo que la supervivencia es mayor en los individuos tratados que en los que permanecieron en agua de ósmosis, lo que podría indicar que el 5-FU tiene un efecto en las células tumorales de páncreas inyectadas desembocando en una mejora en la supervivencia. Asimismo, también se puede ver que la supervivencia para el tratamiento 2 es ligeramente menor que para el tratamiento 1.

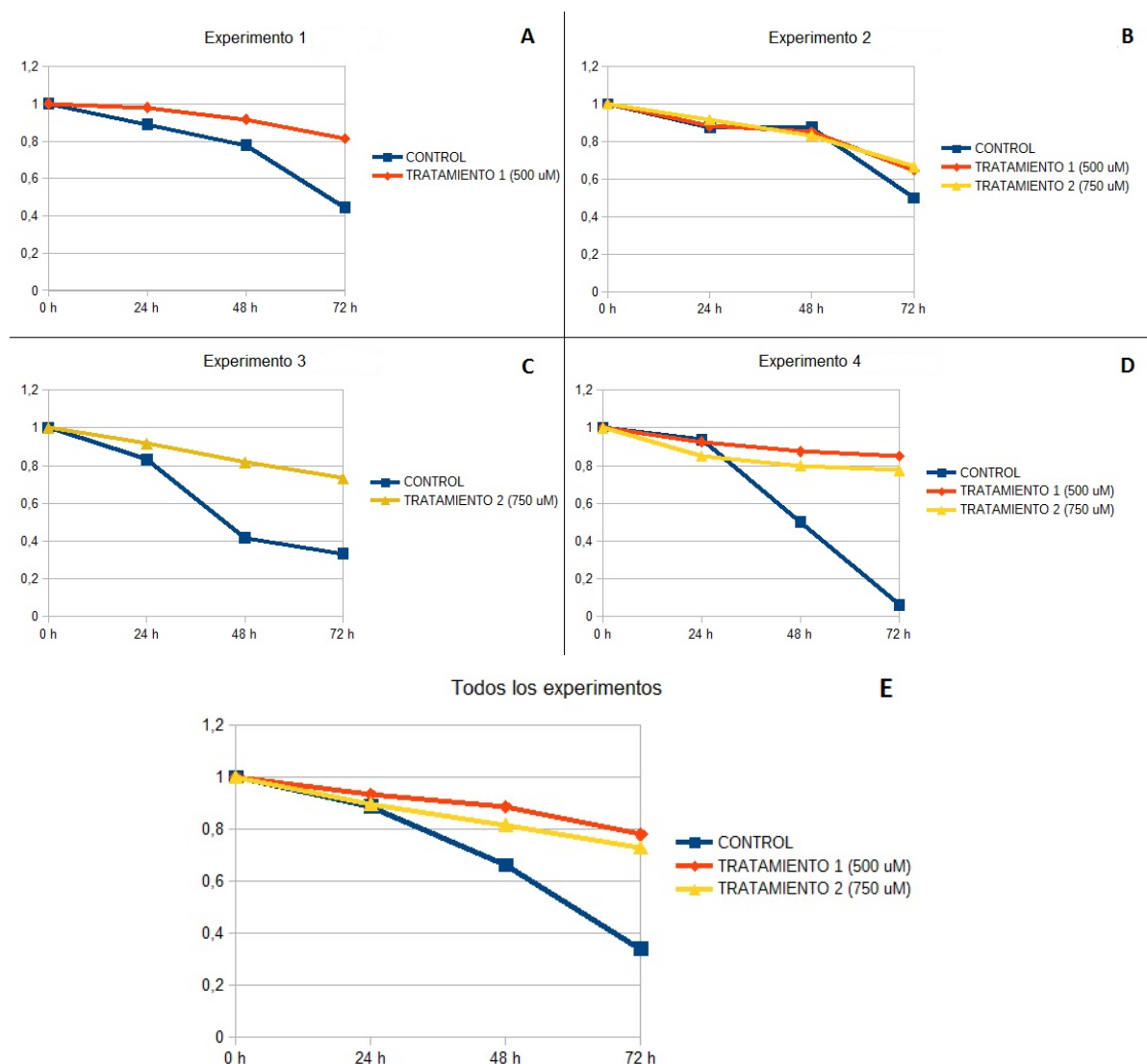


Figura 3. Gráficas de supervivencia embrionaria durante las 72 h de tratamiento. A, B, C y D para los 4 experimentos llevados a cabo y E integrándolos todos.

Con el fin de una mejor visualización global, en la figura 3E, se presenta el índice de supervivencia para todos los experimentos. Aquí, la supervivencia a las 24 h es de un 89% en el control, un 93% en el tratamiento 1 y un 90% en el tratamiento 2. Al trascurso de 48 h de tratamiento, la supervivencia en el control cae considerablemente al 66%, mientras que el descenso es menos acusado para los tratamientos, siendo la supervivencia de un 89% para el tratamiento 1 y un 82% para el tratamiento 2. Al finalizar el conjunto de experimentos, la supervivencia general del grupo control era menor al 40% (34%), mientras que se mantuvo por encima del 75% en el tratamiento 1 (78%) y por encima del 70% en el tratamiento 2 (73%). Mediante este gráfico, se puede apreciar que, efectivamente, en el grupo control hay una mayor mortalidad con respecto a los individuos tratados y que, entre los dos tratamientos, la supervivencia es ligeramente menor para el caso del tratamiento a mayor concentración, 750 μM . Esto podría deberse a la aparición de efectos tóxicos para el embrión, desembocando en la muerte del mismo. Cuando se escogieron las concentraciones para llevar a cabo los experimentos, se conocía que 500 μM era una concentración segura con una elevada supervivencia embrionaria [Cabezas-Sáinz, Guerra-Varela et al., enviado], pero a 750 μM la aparición de efectos tóxicos es más probable, dado que es más próxima a 1000 μM , concentración a la cual sí que se detecta una mortalidad apreciable por toxicidad.

2. Proliferación celular

Respecto a la técnica de *xenograft*, se confirma su validez mediante la toma de imágenes en el canal blanco y negro y de fluorescencia verde. En la figura 4A se muestra una imagen de un embrión al cabo de 24 h de ser xenotrasplantado. Se puede apreciar una sombra en el vitelo, la cual se corresponde a las células. No obstante, en la imagen de fluorescencia (figura 4B) se corrobora que se trata de las mismas, demostrando que es posible su cuantificación dentro del pez. Se lleva a cabo un seguimiento cada 24 h de la evolución de las células en el interior del embrión, para los tres grupos.

Una vez finalizada la parte experimental, se procedió al análisis de imagen para delimitar la región en la que se encuentran las células, para establecer el área ocupada por las mismas, así como la intensidad del color, directamente relacionada con la de fluorescencia. La figura 5 muestra una matriz de fotografías en las que se superponen ambos canales, tras el análisis con Matlab. En la columna A se muestran los embriones en el momento de iniciar el tratamiento

con el fármaco, en la B al cabo de 48 horas y la C al rematar el tratamiento, pasadas 72 horas. Puede apreciarse en las tres columnas que el área ocupada por células se halla rodeada (línea roja). Se obtiene la intensidad de fluorescencia de los píxeles del interior de la región delimitada. Dado que la fluorescencia inicial puede ser variable entre individuos, se normalizan los valores de fluorescencia respecto al momento inicial, minimizando de este modo los efectos de la variabilidad interindividual sobre la validez de los cálculos posteriores y obteniendo una medida sobre la intensidad y el área de fluorescencia de GFP para todos los individuos que forman parte del análisis.

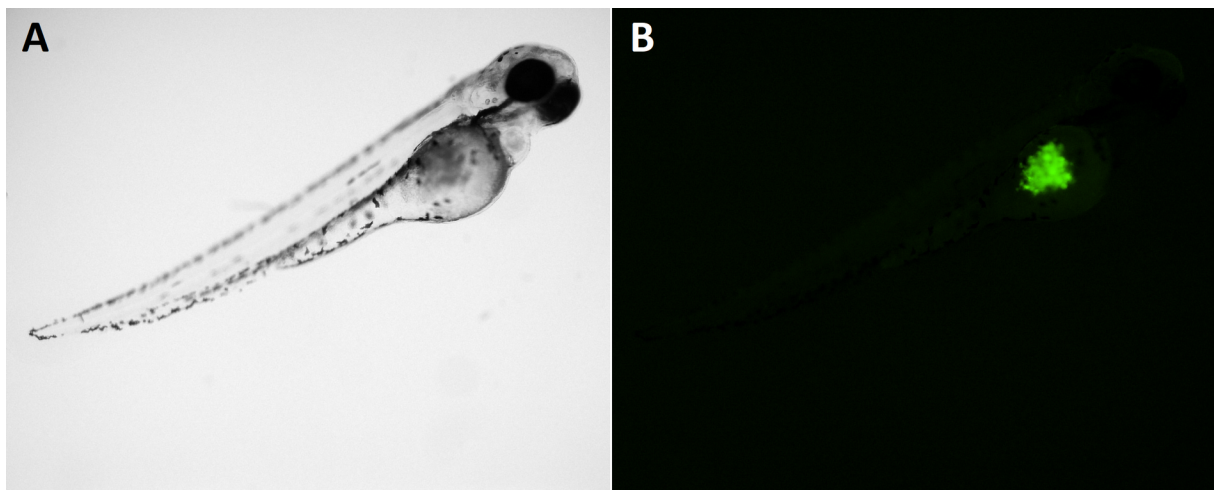


Figura 4. Imágenes tomadas a 0 hpt (72 hpf). A) Fotografía en el canal blanco y negro. B) Fotografía en el canal de fluorescencia para GFP, en la que se distinguen las células inyectadas.

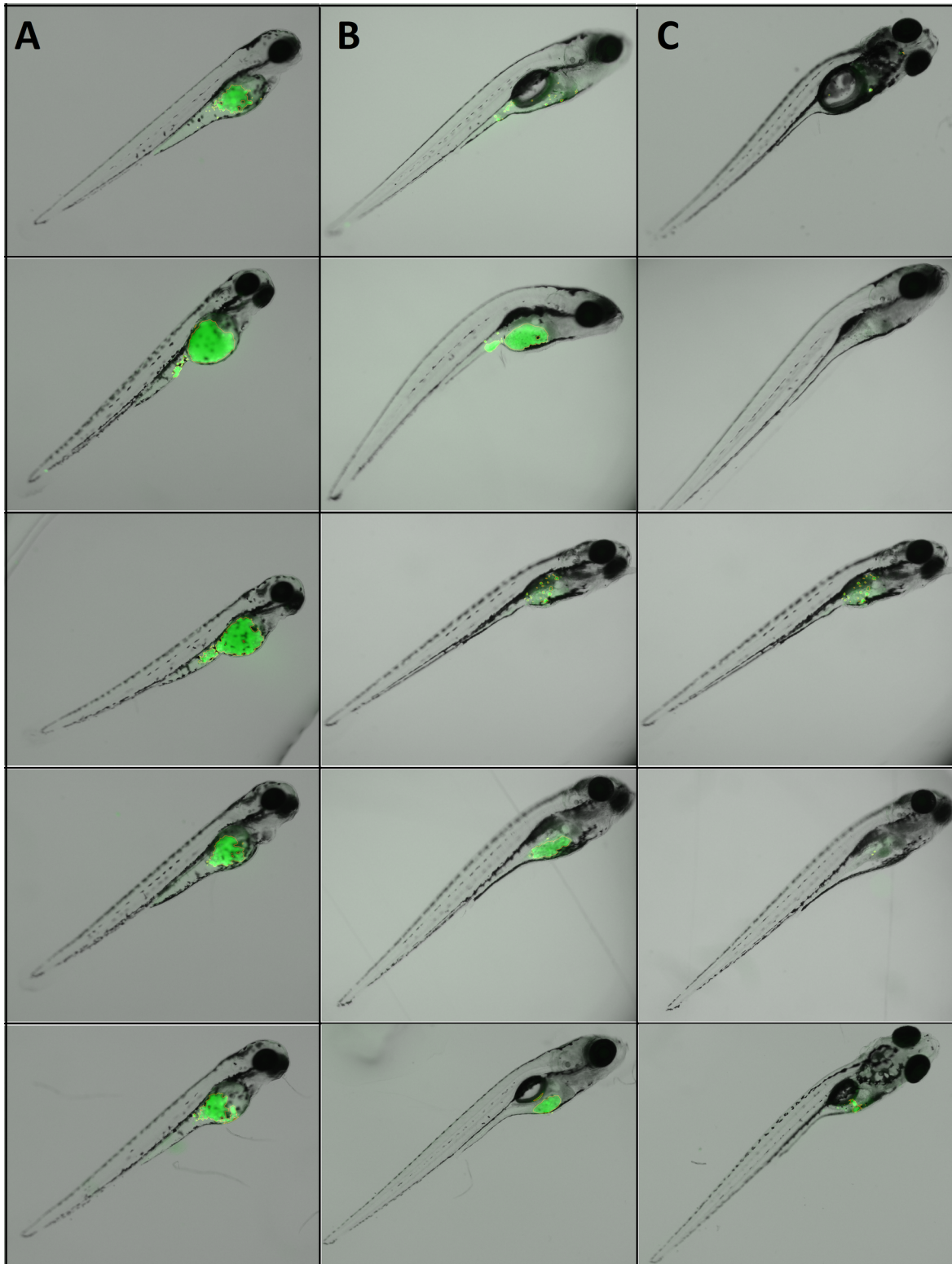


Figura 5. *Output* de Matlab tras el análisis de imagen, A) a 0 hpt (72 hpf), B) a 48 hpt (96 hpf) y C) a 72 hpt (144 hpf). Nótese la línea en rojo que rodea el perímetro celular.

Tras el análisis de imagen, se tomaron los PI para cada individuo y se obtuvo el promedio, para cada grupo de resultados, a 48 hpt y 72 hpt (figura 6). En la figura 6A se representan los PI tras 48 hpt con la desviación estándar (SD). Se puede apreciar que la cantidad de células presentes en el interior del embrión se reducen a un 67% en el control, un 72% en el tratamiento 1 y un 52% en el tratamiento 2. En la figura 6B, se muestran los PI al cabo del experimento, tras 72 hpt. En el control, la cantidad de células decrece del 67% al 8%; en el tratamiento 1 pasa del 72% al 10% y del 52% al 4% para el tratamiento 2. Los test de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov indican que no hay diferencias significativas entre los tres grupos de datos, a excepción de ambos tratamientos a 48 h (ver más abajo en esta sección). A diferencia de lo esperado, en el grupo control hay un gran descenso en la cantidad de células, mientras que se esperaba que, si no a proliferar, las células se iban a mantener durante el transcurso del experimento. Esto puede ser debido a que el entorno en el que las células se encuentran no es óptimo para su crecimiento. En primer lugar, se trata de células humanas, cuya temperatura de crecimiento ronda los 37,5 °C. Si bien numerosas publicaciones previas [Brown, Schiavone, Tazzyman, Heymann y Chico, 2017; Cabezas-Sáinz, Guerra-Varela et al., enviado; Haldi, Ton, Seng y McGrath, 2006; Veinotte, Dellaire y Berman, 2014] han probado que es posible llevar a cabo experimentos en los cuales la temperatura de incubación de las células desciende por debajo de su óptimo para aproximarse más a la temperatura de crecimiento del pez cebra, es posible que el haber mantenido los peces trasplantados a una temperatura de 35 °C haya jugado en contra de un desarrollo experimental más exitoso en cuanto a la supervivencia celular. Para la realización de este set de experimentos, se probó en primer lugar a mantener los peces inyectados a 36 °C en referencia a que ya se han obtenido unos resultados positivos a esta temperatura [Cabezas-Sáinz, Guerra-Varela et al., enviado]. No obstante, la temperatura óptima de desarrollo del pez cebra es de 28°C y la tasa de mortalidad de los embriones una vez llevado a cabo el *xenograft* aumenta con cada grado que se incrementa la temperatura, especialmente desde los 33 °C, mortalidad favorecida además por la manipulación que sufren los individuos. Las perforaciones generadas en el vitelo a la hora de inyectar las células provocan un estrés en el embrión que, sumadas al aumento en la temperatura de incubación suponen la muerte del individuo. Por ello, para la realización de este trabajo, se trató de encontrar una temperatura de compromiso entre la más apropiada para las células pero que permitiera una viabilidad

suficiente de los embriones. De este modo, cabe la posibilidad de que la disminución en el número de células incluso en los individuos del grupo control sea debida a una temperatura de incubación insuficientemente elevada. Por otro lado, en el grupo del tratamiento 1, el PI es mayor que para el control, lo que también se desvía de lo esperado. Se partía de la suposición previa de que, fuera cual fuera el PI en el grupo control, en los peces del grupo tratado con 500 μM de 5-FU, este último ejerciera su acción antitumoral provocando que el PI fuera menor. No obstante, esta desviación puede ser debida a que la presencia del fármaco ejerce cierta presión de selección que deriva en la supervivencia de aquellas células más resistentes y proliferantes. Así, tras la eliminación del grueso de células sensibles (el 90%), las restantes pueden aprovechar los recursos presentes en el vitelo de manera más eficiente y por tanto mantenerse incluso en presencia del 5-FU. En el caso del grupo tratado con 750 μM de 5-FU, se aprecia un mayor descenso en el PI con respecto al control y al tratamiento con la concentración menor. Por tanto, cabría pensar que a mayores concentraciones, el efecto positivo que se apreciaba a 500 μM desaparece.

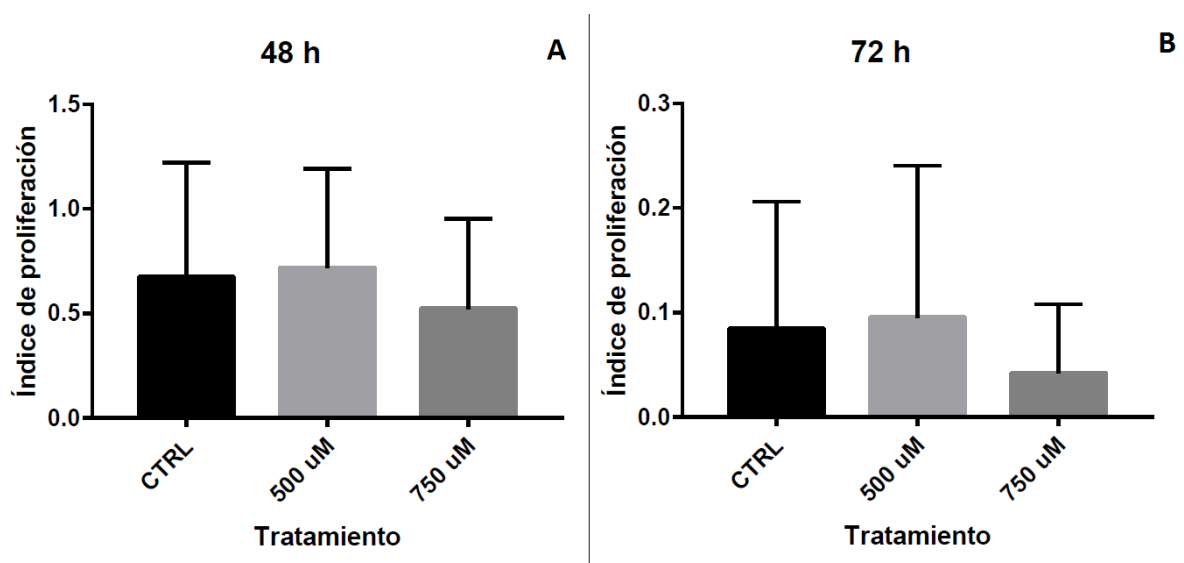


Figura 6. Índice de proliferación celular al cabo de 48 y 72 hpt (media + SD).

Por otro lado, tras observar las gráficas de proliferación celular, cabe una interpretación adicional de las gráficas de supervivencia embrionaria de la figura 5. Nótese que al cabo de 72 h de tratamiento la supervivencia ronda el 80% en los individuos tratados, lo que dobla la cifra del control. Lo más lógico sería pensar que el 5-FU tiene un efecto diferencial en los

embriones con respecto al control, presumiblemente debido a que provoca la muerte celular. No obstante, los resultados no se ajustan perfectamente a esta presunción, dado que, si se observa el PI del grupo control tras 72 h (8%), el cual no difiere significativamente del grupo tratado con 500 μM (10%) o con 750 μM (4%). Por tanto, no es la disminución en la cantidad de células presentes en el vitelo lo que supone una mayor supervivencia, pues incluso con un PI superior en un 1,5%, el grupo tratado con 500 μM experimenta una supervivencia de un 44% superior al control. Aunque no se trate de resultados estadísticamente relevantes, sí que se puede apreciar una tendencia del efecto positivo del fármaco en los embriones. Puesto que se conoce el mecanismo de acción del 5-FU en las células tumorales, se sabe que los efectos que tiene sobre la TS y sobre los procesos implicados en síntesis, maduración y reparación del RNA, si bien acaban por repercutir en la muerte celular, antes de llegar a este punto experimentan una disminución en su actividad metabólica, al no ser capaces de transcribir su material genético, no pueden sintetizar los productos proteicos que las caracterizan. De este modo, la presencia de las células no repercute de manera negativa en los embriones, permitiendo la supervivencia de estos.

CONCLUSIONES

- Los resultados indican que los peces tratados con 5-FU tienen una mayor supervivencia que los peces no tratados.
- El tratamiento a 750 μM de 5-FU ha sido más efectivo en la reducción de la proliferación de las células tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

Agencia Estatal. (2017). *Boletín Oficial del Estado*. Acceso por última vez el 1 de agosto de 2017, en <https://www.boe.es/aeboe/>

Brown, H., Schiavone, K., Tazzyman, S., Heymann, D., y Chico, T. (2017). Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. *Expert Opinion On Drug Discovery*, 12(4), 379-389.

Cabezas-Sainz, P., Guerra-Varela, J., Carreira M.J., Mariscal J., Roel M. y Rubiolo J.A., et al. (Enviado) Improving zebrafish embryo xenotransplantation conditions by increasing incubation temperature and establishing a proliferation index with Zftool

Cariati, M., Marlow, R., y Dontu, G. (2011). Xenotransplantation of Breast Cancers. *Methods In Molecular Biology*, 471-482.

Carrato, A., Falcone, A., Ducreux, M., Valle, J., Parnaby, A., y Djazouli, K. et al. (2015). A Systematic Review of the Burden of Pancreatic Cancer in Europe: Real-World Impact on Survival, Quality of Life and Costs. *Journal Of Gastrointestinal Cancer*, 46(3), 201-211.

Daniel, V., Marchionni, L., Hierman, J., Rhodes, J., Devereux, W., y Rudin, C. et al. (2009). A Primary Xenograft Model of Small-Cell Lung Cancer Reveals Irreversible Changes in Gene Expression Imposed by Culture In vitro. *Cancer Research*, 69(8), 3364-3373.

Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., y Mathers C., et al. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*.

Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., y Schilling, T. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310.

Haldi, M., Ton, C., Seng, W., y McGrath, P. (2006). Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, 9(3), 139-151.

Hanahan, D., y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Howe, K., Clark, M., Torroja, C., Torrance, J., Berthelot, C., y Muffato, M. et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.

Longley, D., Harkin, D., y Johnston, P. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330-338.

Luo, G., Lu, Y., Jin, K., Cheng, H., Guo, M., y Liu, Z. et al. (2015). Pancreatic cancer: BRCA mutation and personalized treatment. *Expert Review Of Anticancer Therapy*, 15(10), 1223-1231.

Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O., de Witte, P., Esguerra, C., y Crawford, A. (2012). Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *Plos ONE*, 7(10), e43850.

Miao, X., Koch, G., Straubinger, R., y Jusko, W. (2015). Pharmacodynamic modeling of combined chemotherapeutic effects predicts synergistic activity of gemcitabine and trabectedin in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, 77(1), 181-193.

Miranda-Lorenzo, I., Dorado, J., Lonardo, E., Alcala, S., Serrano, A., y Clausell-Tormos, J. et al. (2014). Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nature Methods*, 11(11), 1161-1169.

Motulsky, H., y Brown, R. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 123.

Peters, G., van der Wilt, C., van Moorsel, C., Kroep, J., Bergman, A., y Ackland, S. (2000). Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacology & Therapeutics*, 87(2-3), 227-253.

Siolas, D., y Hannon, G. (2013). Patient-Derived Tumor Xenografts: Transforming Clinical Samples into Mouse Models. *Cancer Research*, 73(17), 5315-5319.

Veinotte, C., Dellaire, G., y Berman, J. (2014). Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 745-754.

Westerfield M. (2000). *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. University of Oregon Press, Eugene.

White, R., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., y Ceol, C. et al. (2008). Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, 2(2), 183-189.

Wilkes, J., Alexander, M., y Cullen, J. (2017). Superoxide Dismutases in Pancreatic Cancer. *Antioxidants*, 6(3), 66.