

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

Maestría en Biología Experimental

“Generación de un modelo de xenotransplante en pez killi *Millerichthys robustus* (Miller y Hubbs, 1974) con células humanas de cáncer de mama”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Biol. Alejandra Olivera Ramírez

Comité Tutorial:

Codirector interno: M. en C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera

Codirector externo: Dra. Magali Espinosa Castilla

Asesor interno: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Septiembre 2018

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 426279

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Generación de un modelo de xenotransplante en pez killi *Millerichthys robustus* (Miller y Hubbs, 1974) con células humanas de cáncer de mama”, que presentó

Alejandra Olivera Ramírez

El día 17 de septiembre del año 2018

Sinodales:

Presidente: Dr. Benjamín Pérez Aguilar. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario: Dra. Gisela Ceballos Cancino. Instituto Nacional de Medicina Genómica

Vocal 1: Dra. María Cecilia Zampedri. Instituto Nacional de Medicina Genómica

Vocal 2: Dra. Ana Laura Esquivel Campos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Miembros del comité tutorial

Codirector interno: M. en C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Departamento El Hombre y su Ambiente.

Codirector externo: Dra. Magali Espinosa Castilla.

Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer.

Asesor interno: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Laboratorio de Fisiología Celular.

Agradecimientos

Agradezco desde el fondo de mi corazón y le dedico esta tesis a mis padres, me faltan palabras.

Mis padres, mi hermano y Augusto fueron el impulso principal para llegar hasta donde estoy, y para poder desenvolverme al máximo en cada paso de este proyecto.

Sin ellos esto no habría sido posible.

También agradezco a mis tutores por haberme enseñado tanto, por tenerme paciencia y guiarme a lo largo de este trabajo, además de ser fuente de inspiración y modelos a seguir en mi formación profesional.

Finalmente, doy gracias a todas las personas que me apoyaron y enseñaron en laboratorio en el cuidado de los peces y técnicas usadas para llevar a cabo esta tesis, Ceci, Andrés, y en general todos los compañeros de laboratorio que directa o indirectamente me ayudaron durante este proceso.

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, por ello se requiere estudiar la biología de este conjunto de padecimientos, y una herramienta útil para ello son los animales usados como modelos *in vivo*. Actualmente se cuenta con una gran variedad de especies usadas en esta área; sin embargo, la búsqueda de nuevos modelos que ofrezcan ventajas aún no exploradas como almacenamiento de material biológico, o la facilidad de transporte, es un área emergente de la biología que nos interesa explorar en este trabajo. Nosotros propusimos a *Millerichthys robustus* como modelo *in vivo* para estudiar el cáncer. Esta especie de pez killi anual es de fácil cuidado y se reproduce en condiciones de laboratorio, y presenta un desarrollo embrionario en diapausas, durante las cuales los huevos pueden ser almacenados en un sustrato semi-húmedo. La finalidad de esta investigación fue conocer si es posible realizar xenotransplantes con células humanas de cáncer de mama en embriones y alevines de pez killi *Millerichthys robustus* para determinar si funciona como modelo para la formación de tumores *in vivo*. Para ello se describió el desarrollo embrionario del pez, se microinyectaron diferentes cantidades de células provenientes de líneas celulares humanas de cáncer en el saco vitelino de embriones y cerca del orificio anal en alevines para observar la proliferación de las células y crecimiento tumoral. Concluimos que *Millerichthys robustus* es útil como modelo de xenotransplante. Es necesario continuar investigando esta especie para obtener mayor conocimiento de la misma y su utilidad en los diversos campos de la biología.

ABSTRACT

Cancer is a global health problem, so it is necessary to study the biology of this set of conditions, and a useful tool for this are the animals used as *in vivo* models. Currently, there is a great variety of species used in this area; however, the search for new models that offer advantages not yet explored as storage of biological material, or ease of transportation, is an emerging area of biology that we are interested in exploring in this work. In the present work we proposed to *Millerichthys robustus* as an *in vivo* model to study cancer. This species of annual killi fish is easy to care for and reproduces under laboratory conditions, and presents an embryonic development in diapauses, during which the eggs can be stored in a semi-moist substrate. The purpose of this investigation was to know if it is possible to perform xenotransplantation with human breast cancer cells in embryos and juvenile of killi fish *Millerichthys robustus* to determine if it works as a model for tumor formation *in vivo*. To do this, the embryonic development of the fish was described, different amounts of cells from human cancer cell lines were microinjected into the yolk sac of embryos and near the anal orifice in juvenile to observe cell proliferation and tumor growth. We conclude that *Millerichthys robustus* is useful as a model for xenotransplantation. It is necessary to continue investigating this species to obtain greater knowledge of it and its usefulness in the various fields of biology.

ÍNDICE

Contenido	Página
1. Introducción.....	1
1.1. Cáncer.....	2
1.2. Modelos animales.....	5
1.3. Xenotransplantes.....	6
1.4. Los peces anuales como modelo animal en biología	7
1.4.1. <i>Millerichthys robustus</i>	9
1.5. Peces killi y cáncer.....	11
2. Justificación.....	13
3. Objetivos.....	14
3.1. Objetivo general.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. Hipótesis.....	14
5. Material y métodos.....	15
5.1. Mantenimiento y reproducción de los peces.....	15
5.2. Descripción del desarrollo embrionario de <i>Millerichthys robustus</i> ...	16
5.3. Líneas celulares.....	16
5.3.1. Cultivo celular.....	17
5.4. Desgaste del corion.....	17
5.4.1. Desgaste manual.....	17
5.4.2. Desgaste enzimático.....	18

Contenido	Página
5.4.3. Desgaste físico automatizado y enzimático.....	18
5.5. Tratamiento de alevines con dexametasona.....	18
5.6. Microinyección.....	19
5.7. Fijación y tinción de cortes histológicos de los alevines.....	19
5.8. Tratamiento de imágenes.....	20
6. Resultados.....	21
6.1. Desarrollo embrionario de <i>Millerichthys robustus</i>	21
6.2. Aclimatación de embriones de <i>Millerichthys robustus</i>	21
6.2.1. Embriones en diapausa I.....	23
6.2.2. Embriones en diapausa II.....	23
6.2.3. Embriones en diapausa III.....	23
6.3. Microinyección en embriones de <i>Millerichthys robustus</i>	25
6.4. Desgaste del corion.....	27
6.4.1. Desgaste manual.....	27
6.5. Microinyección en embriones con desgaste manual del corion.....	29
6.6. Desgaste manual y enzimático.....	29
6.6.1. Desgaste físico automatizado y enzimático.....	30
6.7. Microinyección con desgaste físico automatizado.....	30
6.8. Microinyección en alevines de <i>Millerichthys robustus</i>	33
6.8.1. Supresión del sistema inmune en alevines.....	34

Contenido	Página
6.8.2. Microinyección en alevines inmunosuprimidos con dexametasona.....	35
7. Discusión.....	41
8. Conclusión.....	50
9. Literatura citada.....	51

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el National Cancer Institute, el cáncer es un grave problema de salud pública a nivel mundial, en 2012 se presentaron 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes fueron relacionadas con esta enfermedad. En ese mismo año la incidencia reportada en México fue de 131 personas por cada 100,000 habitantes (GLOBOCAN, 2012). De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), el porcentaje de letalidad por tumores malignos en nuestro país durante 2009 fue de 6.4, es decir, aproximadamente 6 de cada 100 personas hospitalizadas con estos padecimientos murieron (INFOCÁNCER, 2009). Por ello, es conveniente estudiar esta enfermedad a detalle y entender los mecanismos relacionados con su desarrollo, lo cual permitirá prevenirlo, hacer diagnósticos tempranos, encontrar tratamientos eficaces y prolongar la sobrevida global de los pacientes.

Los modelos animales son de gran utilidad para el estudio de diversas enfermedades. En el caso del cáncer se usan como modelos *in vivo* con células humanas para llevar a cabo xenotransplantes (Konantz *et al.*, 2012). Hasta hace algún tiempo se usaban mamíferos como modelo animal estándar. Sin embargo, en 2002 surge el pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) como nuevo modelo no mamífero exitoso (Amatruda *et al.*, 2002).

Una vez que se tiene conocimiento de que un modelo no murino puede ser usado para estudiar el cáncer, surge la posibilidad de explorar si existen otros modelos potenciales para el estudio de enfermedades como ésta. Especialmente es interesante investigar a los peces killi anuales, que tienen características como un corto tiempo de vida (Kim *et al.*, 2016), y su desarrollo embrionario en diapausas

(Wourms, 1972), que permite manipulación en diferentes estadios, posibilitando el almacenaje de los huevos y la disponibilidad de estos al momento de realizar un experimento. Estas características podrían hacer de los peces killi un modelo alternativo para el estudio del cáncer.

1.1. Cáncer

El cáncer se define como una hiperplasia patológica desencadenada por mutaciones en diferentes genes que presenta un crecimiento celular ilimitado, creando masas de tejido desordenado (tumores), con capacidad de hacer metástasis y destruir los tejidos normales (Mukherjee, 2016).

El desarrollo del tumor comienza cuando una célula dentro de una población normal sostiene una mutación genética que incrementa su propensión a proliferar, la célula alterada y sus descendientes continúan aparentemente normales, pero se reproducen en mayor cantidad; después de un tiempo, una de estas células sufre otra mutación que incrementa el descontrol del crecimiento celular, la descendencia de esta célula sigue proliferando excesivamente, y es anormal en forma y orientación; después aparece otra mutación que altera el comportamiento celular, las células afectadas se vuelven aún más anormales en crecimiento y apariencia, el tumor aún no ha atravesado barreras entre tejidos y puede permanecer contenido indefinidamente; sin embargo, eventualmente algunas células pueden adquirir mutaciones adicionales, que permiten al tumor invadir tejido circundante y liberar células a la sangre o linfa; estas células pueden ser capaces de establecer nuevos

tumores (metástasis) en todo el cuerpo, que son letales cuando afectan un órgano vital (Weinberg, 1996) (Figura 1).

En este conjunto de enfermedades las células cancerosas pierden el control en la proliferación y siguen su propio esquema de reproducción acelerada, debido a mutaciones en oncogenes (que inducen una multiplicación excesiva) y genes supresores de tumores (que favorecen el crecimiento tumoral cuando son inactivados). Otra característica importante es la propiedad de ciertas células cancerosas de migrar desde el tejido en que comienzan y formar masas en sitios distantes del cuerpo (Weinberg, 1996); a esto se le denomina metástasis. La metástasis es un proceso complejo llevado a cabo a través de una serie de pasos que incluyen la invasión a tejidos adyacentes, intravasación, transporte a través del sistema circulatorio, arresto en un sitio secundario, extravasación y crecimiento en un órgano secundario (Mehlen y Puisieux, 2006).

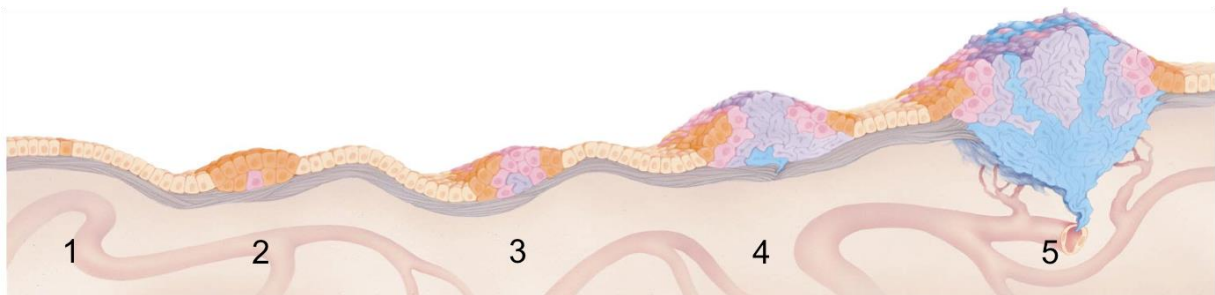


Figura 1. Etapas en el desarrollo de un carcinoma (cáncer epitelial). La masa observada es el resultado de mutaciones en cuatro genes, pero el número de genes involucrados en los tumores reales puede variar. 1) Célula genéticamente alterada. 2) Hiperplasia. 3) Displasia. 4) Cáncer in situ. 5) Cáncer invasivo. [Imagen tomada y modificada de Weinberg, 1996].

Para fines clínicos, es útil una clasificación del cáncer que comprenda los atributos del tumor que definen su comportamiento. La clasificación más comúnmente usada

para tumores sólidos fue desarrollada por el Comité Americano Mixto sobre el Cáncer (AJCC), sistema basado en que los tumores de un mismo sitio anatómico e histología comparten patrones de crecimiento y resultados similares. Existen tres eventos clave en el desarrollo del cáncer a través del tiempo: extensión en cuanto a tamaño del tumor primario (T), expansión a nódulos linfáticos regionales (N), y metástasis (M); éstos son usados en la clínica a medida que aparecen para indicar la extensión anatómica del cáncer, y así poder definir qué tratamiento implementar. Los subgrupos numéricos de los componentes TNM indican la progresión extensiva de la enfermedad maligna: T0-T4, N0-N3, M0-M1 (Green *et al.*, 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación TNM (tamaño del tumor, número de nódulos, metástasis). Modificada de Green *et al.*, 2002.

Tumor primario (T)	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1, T2, T3, T4	Incremento en talla y/o extensión local del tumor primario
Nódulos linfáticos regionales (N)	
NX	Los nódulos linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis en los nódulos linfáticos regionales
N1, N2, N3	Participación creciente de nódulos linfáticos regionales
Metástasis distante (M)	
MX	No puede ser evaluada la metástasis distante
M0	No hay metástasis distante
M1	Hay metástasis distante

1.2. Modelos animales

Dado que el cáncer es un problema de salud a nivel mundial, se requieren ciertas herramientas para su estudio, como son las líneas celulares y los modelos animales, antes de llevar los estudios a la clínica. Dentro de los modelos animales, el estándar dorado usado como modelo animal en cáncer desde hace varios años son los ratones. Sin embargo, presentan algunas desventajas, como un mantenimiento costoso, requieren de un área libre de patógenos y gente entrenada como patólogos o veterinarios, la poca cantidad de individuos que pueden ser usados por experimento, además de que el tiempo de formación de un tumor puede durar meses (Konantz *et al.*, 2012).

Por otro lado, hace aproximadamente 15 años se comenzaron a realizar xenotrasplantes de células humanas de cáncer en pez cebra, convirtiéndolo en un nuevo y exitoso modelo animal para el estudio del cáncer. El pez cebra constituye hoy en día un modelo ideal para el estudio de aspectos como tumorigénesis, migración, y potencial metastásico debido a las ventajas experimentales que este organismo ofrece, como son: su pequeño tamaño, lo que permite tener un gran número de individuos en un espacio reducido; gran disponibilidad de material biológico debido a que cada pareja tiene alrededor de 200 embriones por semana, lo que permite realizar un gran número de experimentos en un corto tiempo; la transparencia de sus embriones, lo que posibilita la visualización del tumor a simple vista; el sistema inmune es inmaduro hasta los 11 días post-fertilización, lo que permite el análisis de los resultados por alrededor de 1 semana sin la necesidad del uso de inhibidores del sistema inmune como la dexametasona (Konantz *et al.*, 2012).

Este modelo ya ha sido usado para diversos estudios, como en melanoma, cáncer de mama y células madre cancerígenas (Eguiara *et al.*, 2011).

1.3. Xenotransplantes

El ensayo más adecuado para inducir la generación de un tumor en modelos animales son los xenotransplantes (White *et al.*, 2013). Un xenotransplante es el trasplante, implantación o perfusión, en un organismo receptor, de células, tejidos u órganos xenogénicos vivos de un organismo distinto (OMS, 2005).

En diversos estudios se han llevado a cabo xenotransplantes en pez cebra *D. rerio* con distintas líneas celulares de cáncer de mama de manera exitosa. En uno de ellos se usó la línea de adenocarcinoma mamario MDA-MB-435, microinyectando hasta 300 células a los 30 días post-fertilización en la cavidad peritoneal (Stoletov *et al.*, 2007). En otro estudio usando la misma línea celular, inyectaron de 1,000 a 2,000 células en matrigel a las 48 horas postfertilización en el vitelo, cerca del ducto de cuvier (Nicoli *et al.*, 2007); también se ha usado la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, inyectando hasta 100 células en la cavidad perivitelina a las 48 horas post-fertilización (Lee *et al.*, 2009); por otro lado, en un estudio con la misma línea celular, se inyectaron 500 células en matrigel en el vitelo a las 48 horas postfertilización (Harfouche *et al.*, 2009). Los estudios anteriores evaluaron exitosamente aspectos como hipoxia, progresión tumoral, invasión de tejidos, angiogénesis y metástasis, y los tumores generados fueron visibles a partir de 3 a 6 días post-inyección.

Tomando en cuenta que un modelo no murino es exitoso para el estudio del cáncer, lo expuesto lleva a pensar que pueden existir otros peces que son potenciales modelos biológicos para esta área de investigación.

1.4. Los peces anuales como modelo animal en biología

Entre los peces, algunas especies de teleósteos (Figura 2) han surgido como modelos para estudios en el campo de la genética, la biología evolutiva y el desarrollo, entre otros, debido a su fácil mantenimiento y reproducción en laboratorio. Entre los teleósteos, los peces anuales (originarios de África y América del Sur) han sido usados debido a su peculiar ciclo de vida. Estos habitan cuerpos de agua con ambientes muy variables, tienen un tiempo de vida corto dentro de los vertebrados, de menos de un año. Durante la temporada de lluvias, cuando las charcas están inundadas existe un complejo cortejo de apareamiento entre los adultos, que consiste en excavar en el sustrato, aparearse y liberar huevos por parte de la hembra, posteriormente hay fecundación externa. En la temporada de sequía las charcas desaparecen y los adultos mueren; sin embargo, los embriones en desarrollo permanecen dentro del sustrato, ya que son resistentes a la desecación. Cuando comienza nuevamente la temporada de lluvias y las charcas se abastecen de agua los huevos enterrados son estimulados para eclosionar (Berois *et al.*, 2016).

Una de las estrategias que facilitan la sobrevivencia de estas especies son las diapausas embrionarias como arrestos reversibles. Las diapausas son periodos de actividad metabólica baja en los que el desarrollo embrionario se ve disminuido debido a condiciones ambientales adversas, como son las temporadas de sequía

(Montagne, 2013), y son importantes para la sincronización del desove con la disponibilidad temporal de alimento y/o hábitat. La diapausa embrionaria se ha encontrado en diversas familias de peces, la mayor diversidad de especies que exhiben diapausa embrionaria son los peces killi anuales (Podrabsky *et al.*, 2010).

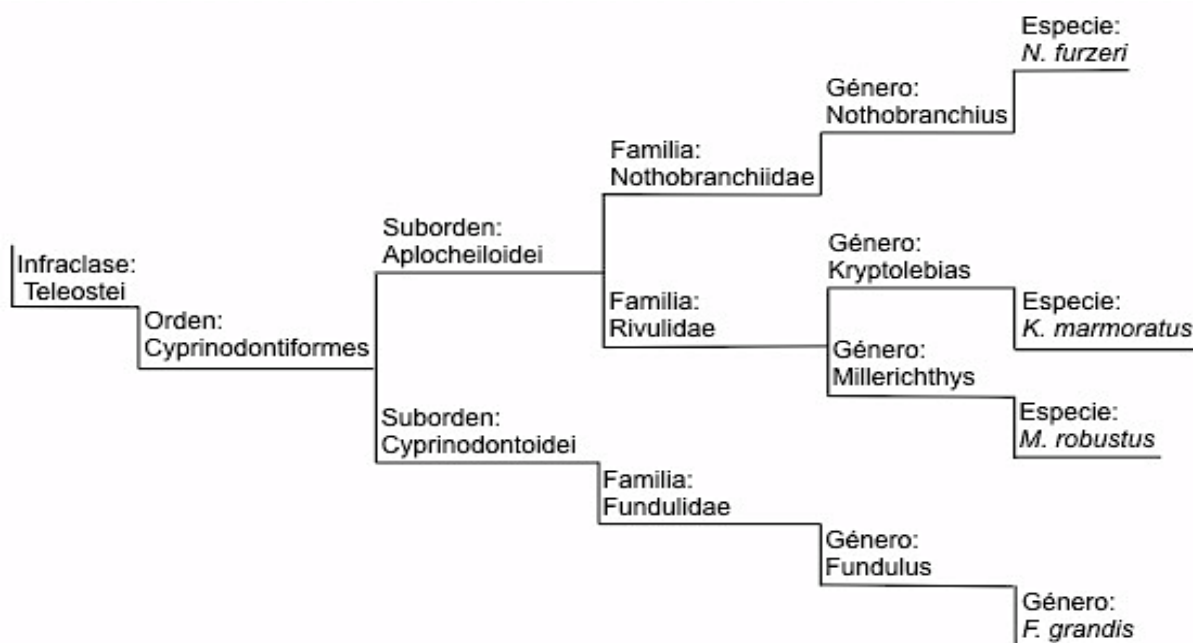


Figura 2. Clasificación taxonómica de algunas especies relevantes de peces killi.

Dentro de los peces killi anuales, existen algunas especies de importancia en diferentes campos dentro de la biología, como es *Nothobranchius furzeri* (Jubb, 1971) cuyo genoma ya ha sido secuenciado, debido a que es útil en el estudio de la evolución y genética de la longevidad, ya que tiene un periodo de vida de 6 a 8 meses, por lo cual son considerados la especie de vertebrados criada en cautiverio de vida más corta (Valenzano *et al.*, 2015). A pesar de su corto tiempo de vida, este

pez recapitula fenotipos estereotípicos dependientes de la edad y patologías como el cáncer (Harel y Brunet, 2015).

Entre los peces killi se encuentra la familia Rivulidae, cuya distribución ocurre entre Florida y el noreste de Argentina. Una parte de estos son peces anuales. En México, existen 3 rivúlidos: *Cynodonichthys tenuis*, *Kryptolebias marmoratus* y *Millerichthys robustus*.

La especie *Kryptolebias marmoratus* ha sido útil como modelo para varias disciplinas biológicas. Esta especie presenta características como su capacidad de autofertilización, fácil reproducción y mantenimiento en laboratorio bajo las condiciones adecuadas, alta resiliencia en cuanto a cambios de salinidad y temperatura.

Se han realizado estudios con esta especie. Los embriones se han observado bajo microscopía de luz y de fluorescencia, para microscopio estereoscópico y compuesto. Además se ha demostrado su utilidad en ensayos de microinyección de ADN o ARN (Mourabit y Kudoh, 2012). En otro estudio con esta misma especie, se inyectó una sonda fluorescente para detectar el inicio de la formación de la capa sincitial del vitelo (Mourabit *et al.*, 2011). Por lo anterior, se considera que *K. marmoratus* es un buen modelo para la investigación en el campo de la biología del desarrollo, usando técnicas de imagen y micromanipulación.

1.4.1. *Millerichthys robustus*

M. robustus es una especie mexicana considerada “en peligro de extinción” en la NOM-059-Ecol-2001 (D.O.F., 2010) debido a factores como pérdida de hábitat e

introducción de especies exóticas invasoras. Esta especie presenta un ciclo de vida anual (Figura 3) y habita en estanques, humedales y pantanos estacionales generalmente menores a un metro de profundidad en la cuenca de Río Papaloapan y el Río Coatzacoalcos (Miller, 2009). En esta especie generalmente se obtienen hasta 90 huevos por pareja en cada cruce. En el medio natural estos organismos viven aproximadamente 27 semanas, y alcanzan la madurez sexual a partir de las 3 o 4 semanas después de la eclosión (Domínguez-Castanedo *et al.*, 2017). En condiciones de laboratorio los peces pueden comenzar a reproducirse a partir de los 2 o 3 meses y viven alrededor de 2 años.

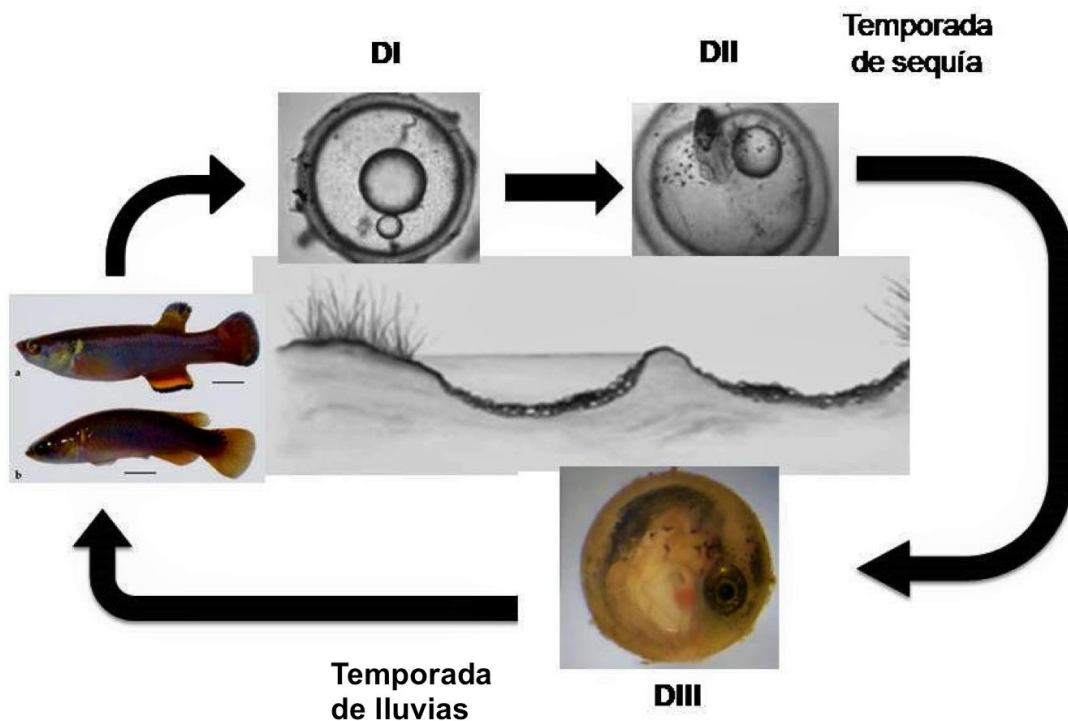


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *Millerichthys robustus*. Los organismos adultos se encuentran en las charcas desde noviembre hasta finales de febrero, tiempo durante el cual se pueden reproducir; en marzo las charcas se comienzan a secar y los adultos mueren, pero los embriones que fueron fertilizados permanecen en diapausa I (DI) un breve periodo, después de eso pasan a diapausa II (DII) mientras las condiciones de sequía continúen, por aproximadamente 3 meses, para posteriormente retomar el desarrollo cuando comienza a llover y llegan a diapausa III (DIII) a mediados de

septiembre, cuando las charcas están totalmente llenas y se estimula la eclosión de los alevines, iniciando nuevamente el ciclo.

Su capacidad de sobrevivencia durante la temporada de sequías se debe al corion duro resistente a la desecación y a un complejo desarrollo embrionario que incluye diapausas (Domínguez-Castanedo *et al.*, 2013). Sin embargo, bajo condiciones controladas en laboratorio esta especie puede escapar de las diapausas y tener un desarrollo embrionario directo, eclosionando en un tiempo promedio de 15 días.

1.5. Peces killi y cáncer

Existen estudios en donde se han usado especies de peces killi como modelo para el estudio del cáncer. Una especie usada como modelo de toxicidad por carcinógenos es *Kryptolebias marmoratus*, en donde mediante el uso de N-metil-N'-Nitrosoguanidina (MNNG) los peces generaron tumores de tiroides, a partir de los cuales se llevaron a cabo transplantes a otros organismos de la misma especie y los tumores proliferaron en ellos (Park *et al.*, 1993).

Otra especie de killi que se destaca es el pez killi del golfo *Fundulus grandis*. La especie fue usada como modelo para evaluar toxicidad microinyectando cuatro carcinógenos (dietilnitrosamina, MNNG, aflatoxina B1 y tricloroetileno) en embriones. Los autores evaluaron carcinógenos químicos, especialmente los que son insolubles en agua, afirmando la utilidad de la técnica de microinyección, ya que asegura la exposición de los huevos a los carcinógenos, además de que se usa muy poca cantidad de químico. Por otro lado, los huevos de esta especie pueden ser fácilmente obtenidos en cualquier temporada del año, y desarrolla neoplasias después de la

exposición a carcinógenos. La lesión más importante fue hallada en un pez killi inyectado con MNNG, formando un carcinoma pancreático de células acinares (Grizzle y Putnam, 1987).

Hasta la fecha no se tienen reportes sobre estudios enfocados a xenotransplantes con células humanas en peces killi. Consideramos importante incursionar en este campo proponiendo a *M. robustus* para ser usado como modelo *in vivo* alternativo para el estudio del cáncer, debido a características antes mencionadas, que podrían conferir ventajas a este organismo para su uso en investigación.

2. JUSTIFICACIÓN

Los modelos animales han resultado de gran utilidad para el estudio *in vivo* de diversas enfermedades, ya que recrean un ambiente mucho más parecido a las condiciones dadas en las enfermedades en humanos que los cultivos celulares *in vitro*. Por ello, surge la necesidad de buscar animales que tengan cualidades favorables para tales fines, y en este caso se propone a la especie mexicana *M. robustus*. Estos son peces de fácil mantenimiento y reproducción en laboratorio, que presentan un desarrollo embrionario en diapausas, tiempo durante el cual existe resistencia a la desecación debido a su corion y los huevos pueden ser almacenados durante meses en sustrato semi-húmedo. Esto puede ser aprovechado para facilitar el transporte de los huevos, y a su vez genera una mayor disponibilidad de organismos para experimentación. Por lo anterior, esta especie podría ser aprovechada como potencial modelo alternativo *in vivo* para el estudio del cáncer y otras áreas de la biología.

3. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Generar un modelo de xenotransplante con líneas celulares de cáncer de mama en el pez killi *Millerichthys robustus*.

2.2. Objetivos específicos

-Identificar el desarrollo embrionario de *Millerichthys robustus* y conocer los estadios que presenta (diapausa I, II y III).

-Conocer en qué etapas del ciclo de vida de *Millerichthys robustus* se pueden generar tumores mediante xenotransplantes de células cancerígenas humanas.

-Establecer el número mínimo de células cancerígenas humanas y el tiempo necesario para generar un tumor en *Millerichthys robustus*.

-Confirmar la presencia de tumores y su crecimiento en *Millerichthys robustus*.

4. HIPÓTESIS

Los embriones y alevines de pez killi *Millerichthys robustus* generan tumores mediante la microinyección de células humanas de cáncer de mama.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Mantenimiento y reproducción de los peces

Los peces de *Millerichthys robustus* fueron proporcionados por el M. en C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera, del Departamento el Hombre y su Ambiente, de la UAM-Xochimilco; El mantenimiento de los peces se realizó en peceras de 38L con agua en oxigenación, a una temperatura de 30°C, con un filtro biológico y un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Estos eran alimentados con tubifex.

Los peces sexualmente maduros se reprodujeron mediante la cruce de un macho con dos hembras, estimulando la reproducción con turba (peat moss) para simular el sustrato en el cual los peces depositaron los huevos. Dos semanas después los huevos encontrados en la turba se guardaron en bolsas tipo ziploc con turba semi-húmeda para ser almacenados.

Para la eclosión, los huevos en diapausa III se colocaron en una bolsa tipo ziploc con turba semi-húmeda por 5 días a 30°C, posteriormente se vació la turba con los huevos en un recipiente con 800ml de agua. A las 24 horas los alevines eclosionados se pasaron a un recipiente con agua limpia y se alimentaron con nauplio de *Artemia* sp.

En los experimentos se usaron nidos recientes y nidos almacenados. Los nidos recientes fueron usados inmediatamente después del desove. El corion de los huevos no pasaba por deshidratación y se inducía un desarrollo embrionario directo (sin diapausas). Los nidos almacenados se mantuvieron en turba semi-húmeda por 1 a 4 meses, por lo que el corion se vitrificó.

5.2. Descripción del desarrollo embrionario de *Millerichthys robustus*

La descripción del desarrollo embrionario se realizó con 24 huevos. El primer día del desove, los huevos se retiraron de la turba y se incubaron con solución Yamamoto (NaCl, 0.75%, KCl, 0.02%, CaCl₂, 0.02%; Berois *et al.*, 2016) durante 15 días a 30°C. Los embriones se observaron cada 24 horas, para lo cual se usó un microscopio estereoscópico (Motic) y un microscopio compuesto (Nikon). Para determinar la diapausa de cada embrión se tomaron en cuenta la cantidad y el tamaño de las gotas de aceite, la localización de los blastómeros, la somitogénesis, la pigmentación de los melanóforos, la formación de cuencas oculares, la presencia de un protocorazón o corazón, la formación del sistema circulatorio y la coloración de los ojos del embrión.

5.3. Líneas celulares

MCF7: Células de adenocarcinoma de glándula mamaria de humano, provienen de una efusión pleural de una paciente con cáncer de mama metastásico. Son células adherentes con morfología epitelial.

HeLa: Proveniente de adenocarcinoma de cérvix. Células adherentes con morfología epitelial. Contienen secuencias del virus del papiloma humano 18 (VPH-18).

CFPAC-1: Línea celular tumorigénica humana proveniente de adenocarcinoma ductal de páncreas (de tejido derivado de metástasis en hígado). Células adherentes de morfología epitelial. Genes mutados: KRAS, SMAD4 y TP53.

HeLa m-Cherry: Línea celular HeLa transfectada establemente con el vector pcDNA 3.1 m-Cherry.

MDA-MB-468 GFP: Células humanas tumorigénicas de adenocarcinoma de glándula mamaria, provienen de una efusión pleural de una paciente con cáncer de mama metastásico. Células adherentes con morfología epitelial. Genes mutados: PTEN, RB1, SMAD4, TP53. Línea celular transfectada establemente con el vector LifeActGFP.

MCF7 m-Cherry: Línea celular MCF7 transfectada establemente con el vector pcDNA 3.1 m-Cherry.

5.3.1. Cultivo celular

Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂, con medio suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células CFPAC se cultivaron con medio IMDM; las células HeLa y MDA-MB-468 se cultivaron con medio DMEM, y las células MCF7 se cultivaron con RPMI-1640.

5.4. Desgaste del corion

5.4.1. Desgaste manual

Se usó papel lija (tamaño de grano 2000 a prueba de agua) sobre el cual se colocó una gota de solución Yamamoto. Los embriones se frotaron en círculos manualmente uno a uno durante el tiempo determinado, finalmente se lavaron con la misma solución y se incubaron a 30°C (Porazinski *et al.*, 2010).

5.4.2. Desgaste enzimático

En este método se usó pronasa (Roche). Los huevos se incubaron con diferentes diluciones (desde 2 a 8 mg/ml de pronasa) en solución Yamamoto (Porazinski *et al.*, 2010), a 34°C por una hora. Posteriormente se lavaron 5 veces con solución Yamamoto.

5.4.3. Desgaste físico automatizado y enzimático

Los huevos fueron colocados en una placa de 24 pozos que contenía papel lija en el fondo de cada pozo, con un máximo de 5 huevos por pozo. Los pozos contenían diferentes diluciones de pronasa en solución Yamamoto, para ejercer presión se colocó un cubreobjetos redondo y se mantuvieron en agitación moderada de 30-45 minutos, posteriormente los huevos se lavaron con solución Yamamoto.

5.5. Tratamiento de alevines con dexametasona

Para inhibir el sistema inmune en alevines recién eclosionados se usaron distintas concentraciones de dexametasona (0.01- 6 $\mu\text{g/ml}$), se hicieron curvas de supervivencia para evaluar efectos de toxicidad en los alevines.

El tratamiento fue de 8 días, y se cambió el agua/dexametasona diariamente. La concentración usada en los experimentos de microinyección fue de 1 $\mu\text{g/ml}$ de DEX. Los peces se trataron dos días previos a la inyección y hasta finalizar el experimento (Stoletov *et al.*, 2007).

5.6. Microinyección

Para la microinyección se usaron capilares de vidrio de borosilicato (Sutter) pulidos con un puller vertical (Stoelting Co.) con un setting de 3.55 volts y 0.850 amperes. El biselado de la punta se realizó con forceps (Rosen *et al.*, 2009). Los embriones y alevines se anestesiaron con triclaína al 0.02% un minuto previo a la inyección. Después se colocaron en una cama de agarosa al 1% con surcos para mantenerlos fijos y se observaron en un microscopio estereoscópico (Motic) para inyectar la suspensión celular (70-2000 células cancerígenas suspendidas en 20 nL de medio de cultivo) en el vitelo. El grupo control era inyectado únicamente con 20 nL de medio de cultivo. Se utilizó el microinyector modelo PLI-100A (Warner Instruments).

Posterior a la microinyección, los embriones se mantuvieron a 34°C en solución Yamamoto, mientras que los alevines se colocaron en agua de acuario (con o sin dexametasona, a 34°C). El seguimiento de las líneas celulares microinyectadas se hizo en el microscopio Axiovert40 CFL, mientras que para localizar las células fluorescentes microinyectadas se usó un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio y el software Axio Vision.

5.7. Fijación y tinción de cortes histológicos de los alevines

Los alevines microinyectados con células cancerígenas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se enviaron a la Unidad de Histología del INMEGEN, donde se embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 2 μm . Posteriormente se tiñieron con hematoxilina y eosina.

5.8. Tratamiento de imágenes

Las imágenes de fluorescencia se editaron mediante el programa FIJI ImageJ.

6. RESULTADOS

6.1 Desarrollo embrionario de *Millerichthys robustus*

Millerichthys robustus es una especie que aún no ha sido completamente descrita. Por lo tanto, como primera parte del proyecto se mostró el desarrollo embrionario de esta especie en el laboratorio.

El desarrollo embrionario de *Millerichthys robustus* se observó durante 15 días a partir del desove. En la diapausa I el embrión mostró un corion (la capa más externa que protege al huevo) y dentro se observó el vitelo, rodeando a una o varias gotas de aceite, con dispersión de los blastómeros. En los embriones en diapausa II se observó somitogénesis, formación de la quilla neural, la cabeza era más ensanchada, se formaron las cuencas oculares, se hizo evidente la pigmentación de los melanóforos y se observó un protocorazón cuyo ritmo era de 20 a 24 latidos por minuto (bpm o beats per minute, en inglés). Durante la diapausa III se completó la organogénesis, el corazón ahora completamente formado presentó de 60-68 bpm, los melanóforos se observaron bien pigmentados y apareció un anillo dorado en los ojos del embrión (Figura 4).

Bajo condiciones controladas se pudo inducir un desarrollo embrionario directo que duró 15 días en promedio, manteniendo los huevos en solución salina de Yamamoto a 30°C desde su fertilización.

6.2. Aclimatación de embriones de *Millerichthys robustus*

Las líneas celulares de cáncer se mantienen en cultivo a 37 °C para permitir su proliferación y los embriones de *Millerichthys robustus* a 30°C. Debido a esto fue

necesario aclimatar los embriones hasta 34°C, temperatura a la cual tanto los embriones como las líneas celulares fueron viables.

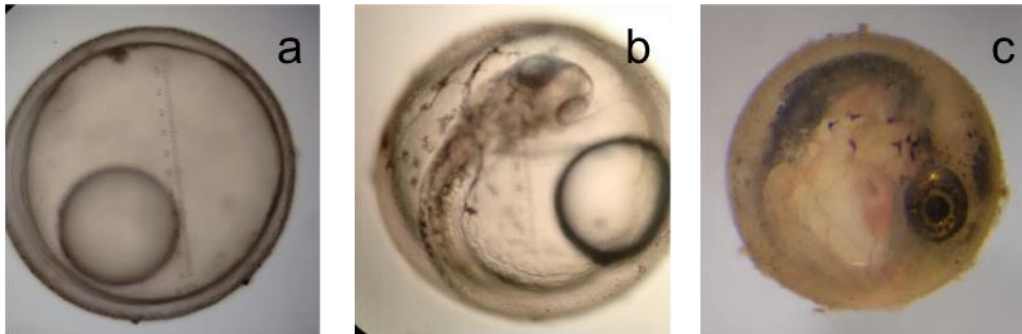


Figura 4. Diapausas en el desarrollo embrionario de *Millerichthys robustus*. a) embrión en diapausa I; b) embrión en diapausa II; c) embrión en diapausa III.

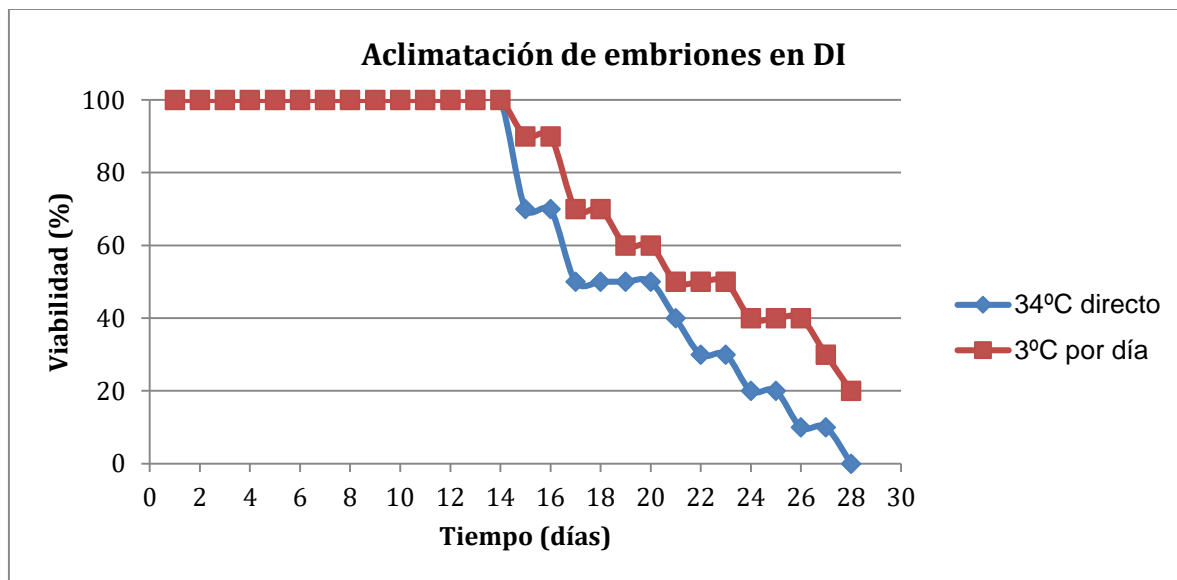


Figura 5. Curva de viabilidad aclimatando embriones de *M. robustus*. Aumento de temperatura 3°C al día hasta llegar a 34°C (barra azul), y aclimatación directa a 34°C (barra roja).

6.2.1. Embriones en diapausa I

Se formaron dos grupos de embriones en diapausa I. El primer grupo se incubó directamente a 34°C y el segundo grupo inició con una temperatura de 25°C aumentando 3 grados por día hasta llegar a 35°C.

En ninguno de los dos experimentos se mantuvieron viables los embriones. El desarrollo se ralentizó y los embriones nunca llegaron a término (Figura 5).

Con las condiciones adecuadas de mantenimiento un embrión no tarda más de 2 o 3 días en pasar de la DI a la DII. Dado que los embriones atemperados a 34°C y subiendo 3°C por día fueron inviables debido al cambio brusco de temperatura, no se pudieron usar embriones en DI para microinyectar.

6.2.2. Embriones en diapausa II

Se utilizaron embriones en DII temprana, incubándolos a 25°C y aumentando 2°C por día. Los embriones llegaron viables a 35°C avanzando en su desarrollo y manteniéndose en DII (Figura 6). Debido a esto se seleccionó esta diapausa para inyectar.

6.2.3. Embriones en diapausa III

Para obtener huevos en DIII, se cosecharon embriones recientes y para no detener el desarrollo en DII se incubaron a 25°C. Posteriormente, se aumentó gradualmente la temperatura 2°C por día (Figura 7). Los embriones fueron viables en DIII hasta el final del experimento. Esta diapausa también se seleccionó para microinyectar.

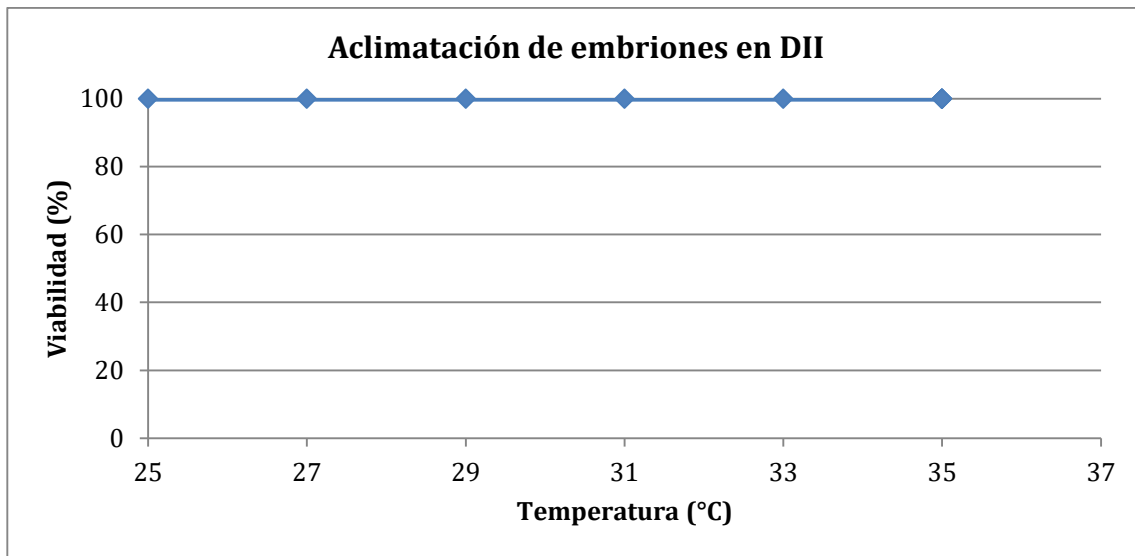


Figura 6. Curva de viabilidad aclimatando embriones de *M. robustus*. Aumento de 2°C por día en embriones en DII temprana cosechados recientemente.

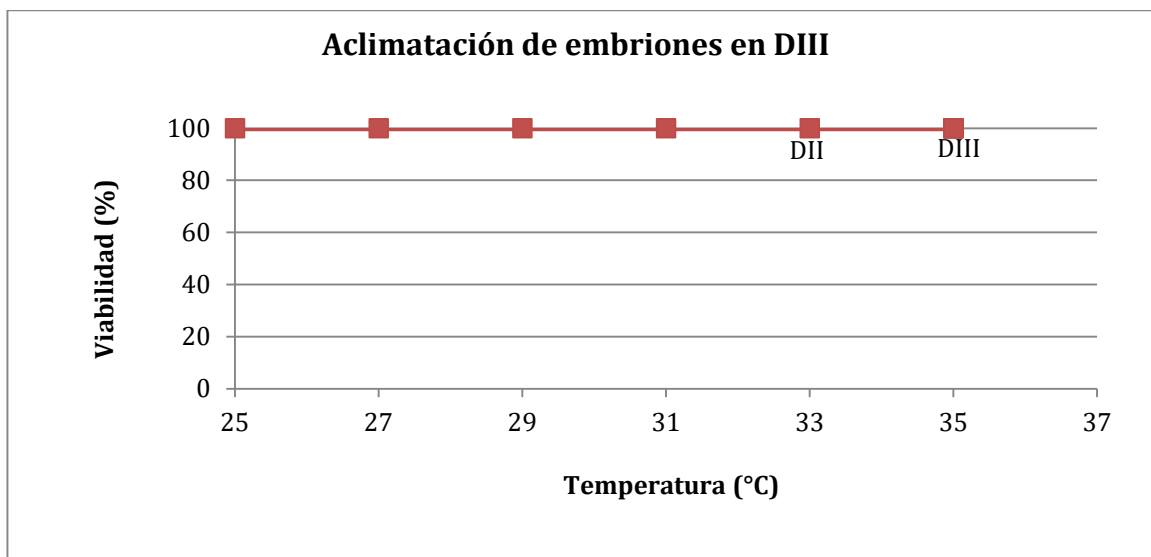


Figura 7. Curva de viabilidad aclimatando embriones de *M. robustus*. Aclimatación de embriones en DII recién cosechados de sus nidos elevando la temperatura 2°C por día.

Se descartó el uso de embriones en DI, debido a que no pueden mantenerse en esa diapausa a 34°C, y se eligieron las diapausas DII y DIII para la microinyección de las células humanas, que soportan la aclimatación si se sube la temperatura 2°C por día.

6.3. Microinyección en embriones de *Millerichthys robustus*

Una vez estandarizada la aclimatación de los embriones, se inició a microinyectar con las líneas celulares de cáncer.

En un primer experimento se usaron embriones en DII inyectados con 400 células de la línea celular MCF7 (cáncer de mama). Transcurridas 24 horas se observó que ningún embrión inyectado con células sobrevivió. El grupo control, al día 5 tenía el 100% de viabilidad; sin embargo, ningún embrión eclosionó.

Pensando en que el número de células inyectadas hubiera afectado la viabilidad de los embriones, se disminuyó la cantidad celular. Se usaron embriones del mismo nido y se microinyectaron 50 células de la misma línea. Al siguiente día, ningún embrión inyectado con células sobrevivió.

En el siguiente experimento, se usaron embriones de un nido más reciente, para evitar que el corion se endureciera mucho debido a la deshidratación y que esto afectara a la microinyección. Se inyectaron 100 células MCF-7, lamentablemente, al segundo día solamente sobrevivió un embrión inyectado con células. Este embrión fue puesto a eclosionar junto con los controles; sin embargo, ningún alevín eclosionó.

Pensando que los embriones de DIII serían más resistentes y podrían soportar mejor el daño físico causado por la microinyección, se emplearon embriones en esta diapausa, a pesar de esto y aunque sobrevivieron algunos embriones a la inyección, ningún alevín eclosionó.

Finalmente, se decidió utilizar un grupo de embriones recién cosechados y con desarrollo directo de DII a DIII. Se cambió la línea celular, debido a que se observó que la línea celular HeLa (cáncer cervicouterino) era más fácil de disgregar que la de

MCF7, así que se inyectaron 200 células HeLa. A diferencia de los experimentos anteriores, la viabilidad de los embriones inyectados fue del 100%, pero en el momento de la eclosión, ninguno de los dos grupos eclosionó. En la Tabla 2 se presenta un resumen de las características de los experimentos realizados.

Tabla 2. Experimentos de microinyección en embriones.

Diapausa	Grupo	No. embriones	No. células inyectadas	Viabilidad (%)	Eclosión (%)
DII	Control	3	Medio	100	0
DII	Células	7	400 MCF7	0	0
DII	Control	4	Medio	72	0
DII	Células	15	50 MCF7	0	0
DII	Control	5	Medio	100	0
DII	Células	19	100 MCF7	5.26	0
DIII	Control	12	Medio	41.67	0
DIII	Células	33	200 MCF7	15.15	0
DII	Control	3	Medio	100	0
DII	Células	12	200 HeLa	100	0

Pensando en que lo más probable era que la penetración del corion afectara la viabilidad y la eclosión de los embriones, se decidió desgastar el corion, para que la entrada de los capilares no causara tanto daño físico.

6.4. Desgaste del corion

Los embriones de los peces killi están protegidos del medio externo por el corion, el cual forma una barrera impermeable a la mayoría de los solutos y esto les permite mantener su presión osmótica constante (Kucera *et al.*, 2002). El endurecimiento del corion ocurre debido a cambios en la presión osmótica del espacio perivitelino, con lo cual las fibras elásticas del corion se expanden y pierden elasticidad, y el corion se endurece (McMillan, 2007).

Para evitar daños al corion debido a la dureza del mismo, se buscaron alternativas para desgastar el corion antes de microinyectar los embriones.

6.4.1. Desgaste manual

Se realizó un desgaste del corion en embriones en diapausa II, lijándolos manualmente por diferentes tiempos. Cuando el corion es lijado por un minuto, los embriones sobrevivieron por 4 días manteniéndose viables. Cuando los embriones fueron lijados por más tiempo se volvieron inviables, ya sea al momento de terminar de lijarse, o dos días después (Figura 8). Cabe mencionar que los embriones en este experimento no fueron puestos a eclosionar.

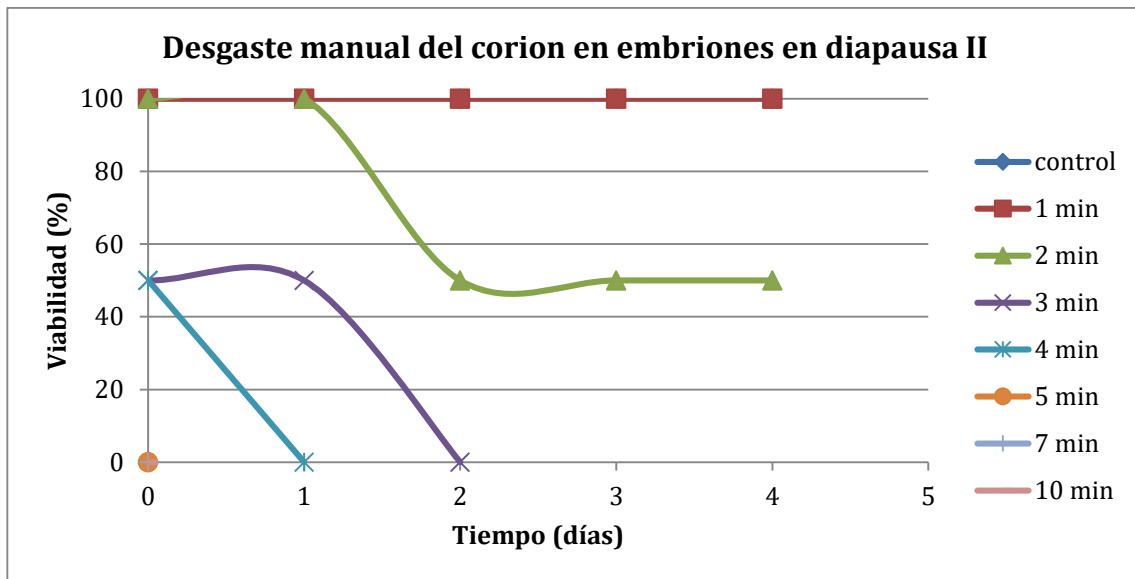


Figura 8. Curva de viabilidad de embriones en DII con desgaste manual del corion. Se lijaron manualmente embriones durante 1 a 5 minutos, 7 y 10 minutos.

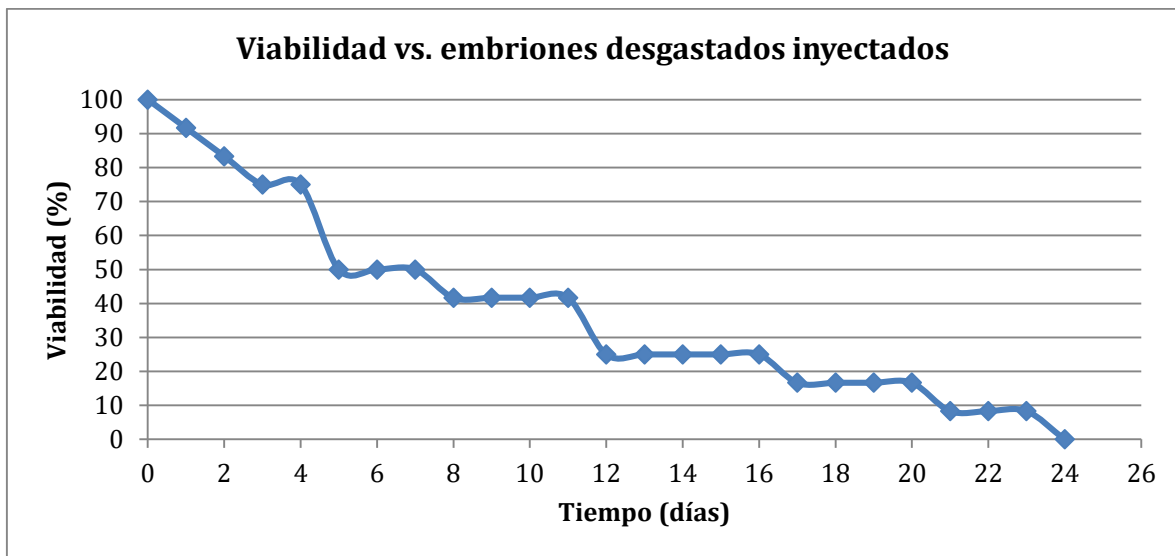


Figura 9. Curva de viabilidad de embriones de *M. robustus* en DII con desgaste manual del corion microinyectados con 70 células cancerígenas humanas de la línea CFPAC-1.

6.5. Microinyección en embriones con desgaste manual del corion

Se realizó un experimento desgastando el corion por un minuto manualmente y microinyectando células posteriormente. Los embriones inyectados con 70 células de la línea CFPAC-1 se observaron diariamente (12 huevos en diapausa II). Sin embargo, no llegaron a DIII y después de 20 días se volvieron inviables (Figura 9).

6.6. Desgaste manual y enzimático

El hecho de que los embriones se hayan vuelto inviables en el último experimento se adjudicó a que el corion no era suficientemente blando y el capilar siguió causando daño físico. Por ello en el siguiente ensayo se combinó el desgaste manual con la exposición a la pronasa. La pronasa es un conjunto de enzimas proteolíticas que ha sido usada en otros estudios para digerir por completo el corion en otras especies de peces en cantidades que fueron de 1 a 20 mg/ml. Se utilizaron huevos en DII lijados y no lijados, con diferentes concentraciones de pronasa (4, 6 y 8 mg/ml).

Los embriones que se mantuvieron viables durante más tiempo fueron los que no estaban lijados. Sin embargo, el capilar no penetró el corion porque no era suficientemente blando. Por el contrario, los embriones lijados y expuestos a la pronasa (1 minuto de exposición) tuvieron menor viabilidad porque el corion era completamente digerido en un lapso corto (máximo 3 días). No se encontró una concentración de pronasa en la que hubiera resultados positivos (Figura 10). Por otro lado, los embriones al final del experimento se volvieron inviables para eclosionar.

6.6.1. Desgaste físico automatizado y enzimático

Debido a que el desgaste manual no era estandarizado, se utilizó un agitador orbital como técnica de desgaste físico. Los embriones en DII se lijaron en el agitador y se expusieron a diferentes concentraciones de pronasa por 30 y 45 minutos. La mayor viabilidad (60%) se observó en los embriones que se lijaron en agitador por 45 minutos, sin pronasa (Figura 11).

6.7. Microinyección con desgaste físico automatizado y enzimático

Para probar la técnica estandarizada del desgaste físico del corion se utilizó un agitador orbital. Se lijaron 30 embriones en DIII en el agitador durante 30 minutos con solución Yamamoto, luego de lo cual se inyectaron 22 embriones con 200 células HeLa, y 8 embriones control sólo con medio DMEM. Los embriones fueron monitoreados durante 5 días (Figura 12), se indujo la eclosión y 5 de los 11 embriones inyectados eclosionaron. Estos alevines se observaron al microscopio estereoscópico y en tres de ellos se observó una masa grisácea en el área abdominal, presuntamente producto de las células inyectadas, por ello los embriones fueron fijados en PFA al 4% y enviados a la Unidad de Histología. Una vez obtenidos los cortes de los alevines, estos fueron teñidos con hematoxilina y eosina y se observaron al microscopio, pero no se pudieron observar cúmulos anormales de células.

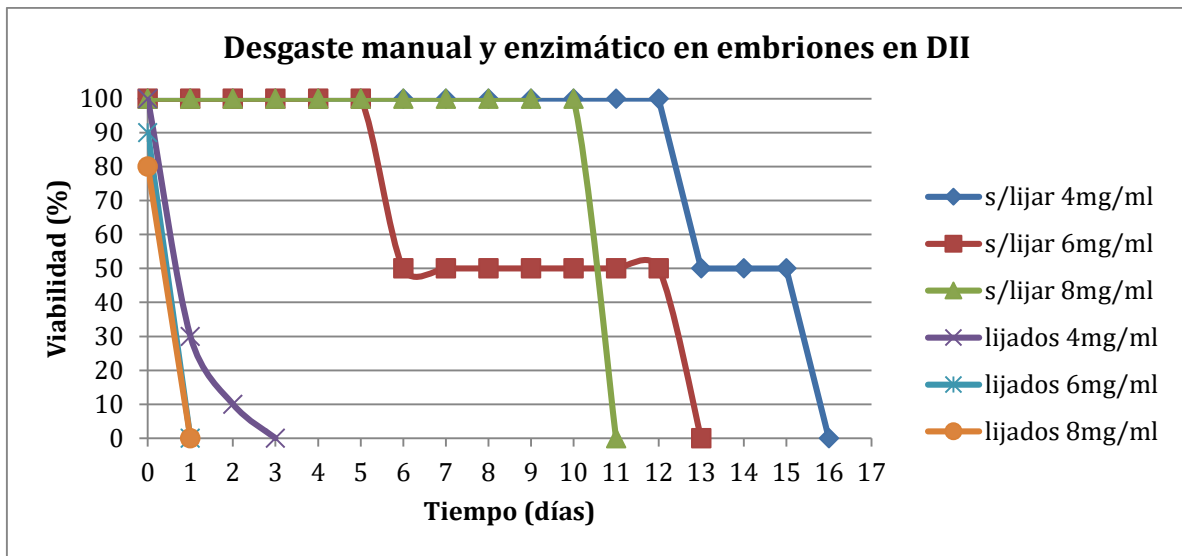


Figura 10. Curva de viabilidad de los embriones de *M. robustus* en DII con desgaste manual y enzimático del corion. Se usaron 3 grupos no lijados, con concentraciones de 4, 6 y 8 mg/ml de pronasa; los otros 3 grupos fueron lijados manualmente durante un minuto, y se expusieron a concentraciones de 4, 6 y 8 mg/ml de pronasa.

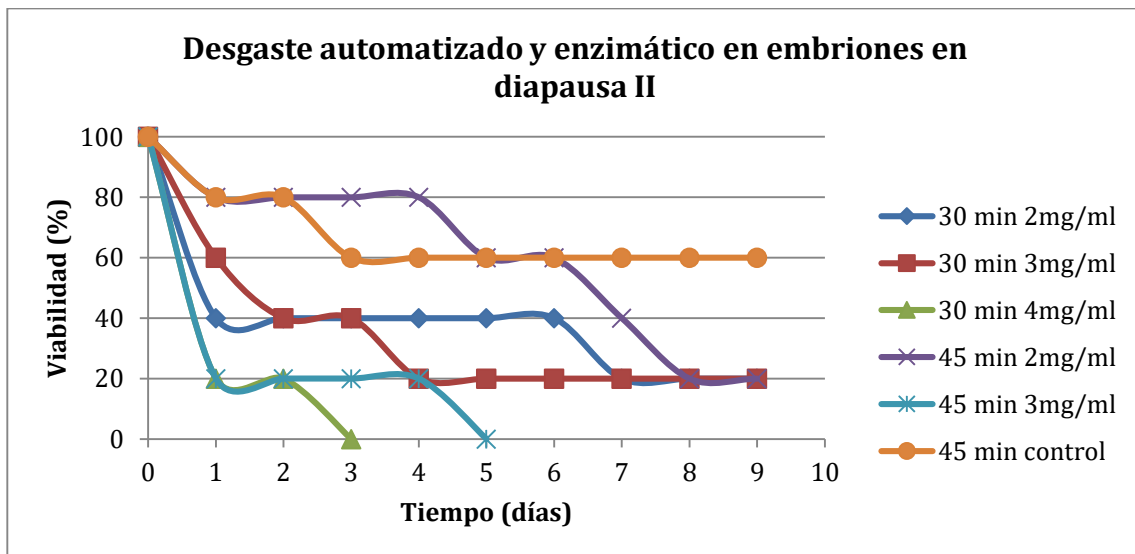


Figura 11. Curva de viabilidad de embriones de *M. robustus* con desgaste del corion automatizado y enzimático. Se hicieron 3 grupos con embriones desgastados durante 30 minutos en agitador orbital, con 2, 3 y 4 mg/ml de pronasa; otros 3 grupos fueron lijados por 45 minutos en un agitador orbital, usando 2, 3 mg/ml de pronasa, y uno sin pronasa.

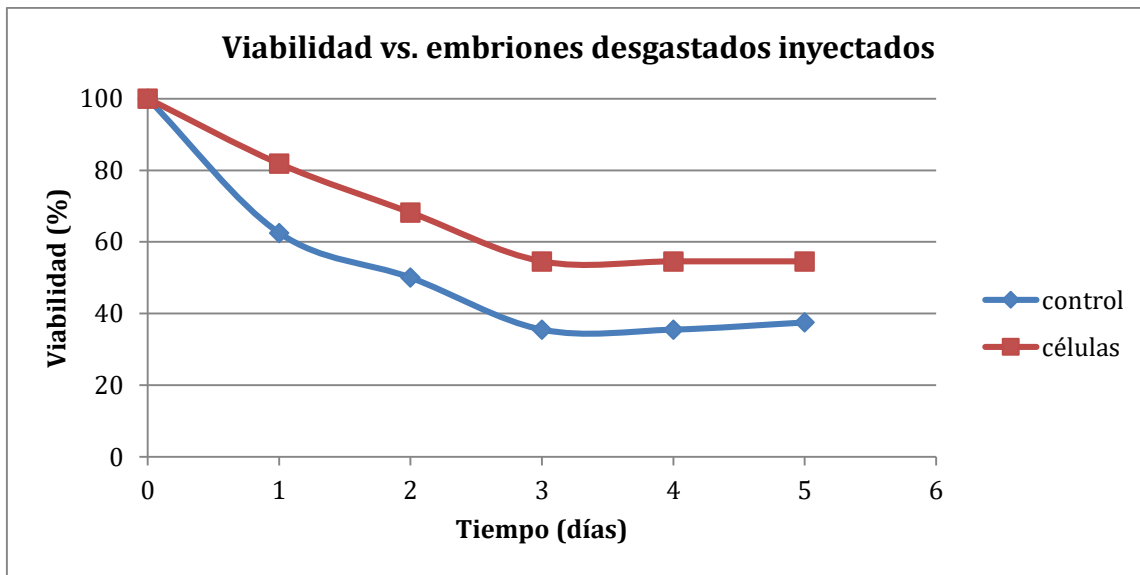


Figura 12. Curva de viabilidad de embriones de *M. robustus* en DIII con desgaste automatizado del corion microinyectados con 200 células cancerígenas humanas de la línea HeLa.

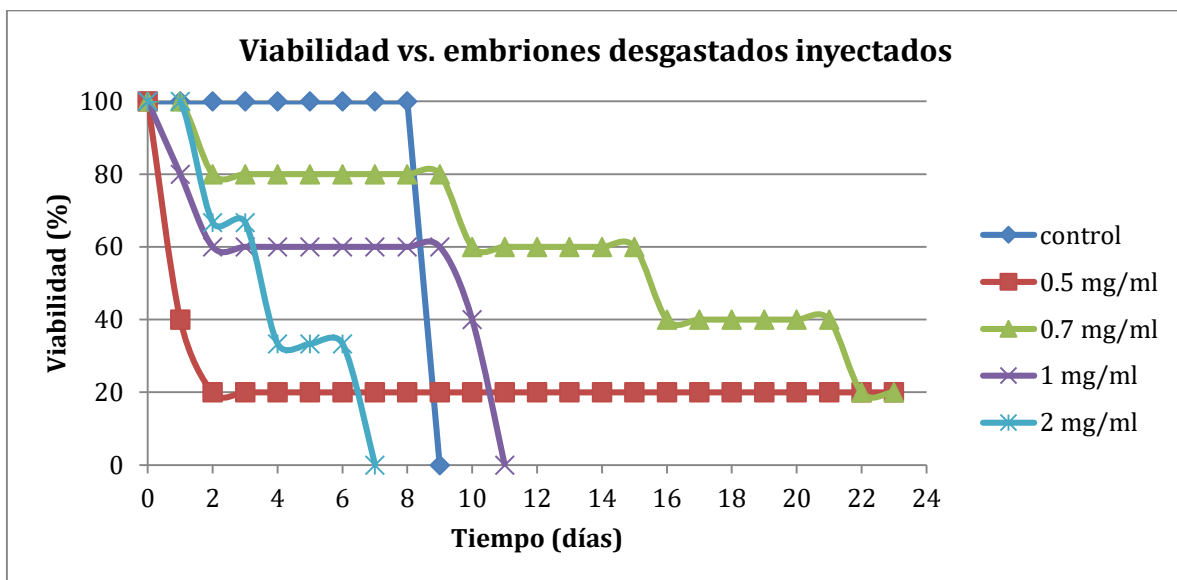


Figura 13. Curva de viabilidad de embriones de *M. robustus* en DII con desgaste automatizado y enzimático del corion microinyectados con 100 células cancerígenas humanas de la línea HeLa.

En otro experimento se combinó la técnica de desgaste físico y el uso de pronasa, 21 embriones fueron lijados en agitador orbital durante 30 minutos, 3 controles tenían

solución Yamamoto, y el resto se trataron con pronasa, 5 con 0.5 mg/ml, 5 con 0.7 mg/ml, 5 con 1 mg/ml y 3 con 2 mg/ml. Se inyectaron 100 células HeLa a cada embrión. Al final del experimento ningún embrión terminó el desarrollo embrionario y no eclosionaron. Los embriones lijados y con pronasa no terminaron el desarrollo embrionario y no eclosionaron (Figura 13).

La técnica con la cual los embriones microinyectados pudieron terminar su desarrollo fue el desgaste físico con agitador orbital, sin embargo, en ninguna ocasión se observó proliferación de las células inyectadas.

Sobre el número mínimo necesario de células para generar un tumor en embriones de *M. robustus*, se usaron desde 70 hasta 400 células de tres líneas celulares distintas, y en ningún experimento se pudieron obtener tumores.

6.8. Microinyección en alevines de *Millerichthys robustus*

Debido a la dificultad que representó eclosionar embriones previamente microinyectados, otra etapa de la vida de *M. robustus* en la que se experimentó la microinyección fue en los alevines recién eclosionados. En un experimento se inyectaron 8 alevines recién eclosionados con 250 células HeLa en la cavidad abdominal, en el saco vitelino, y 3 controles con medio DMEM, y se mantuvieron vivos por 5 días, para después fijarlos y enviarlos a Histología. Comparando las tinciones de los controles con los inyectados con células, no había células o tejidos anormales, por lo que se dedujo que las células inyectadas no proliferaron (Figura 14).

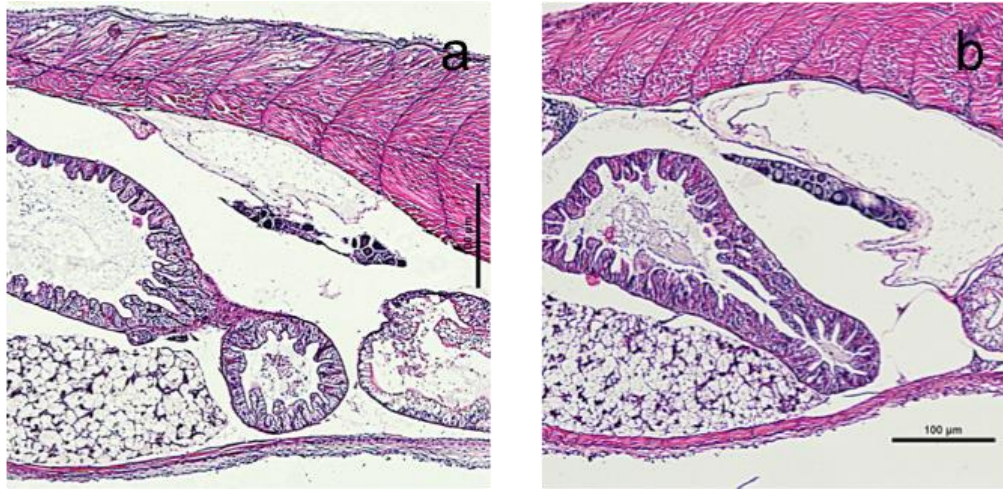


Figura 14. Cortes histológicos de alevines de *M. robustus* microinyectados con células cancerígenas humanas teñidos con hematoxilina y eosina. Se observa la cavidad abdominal. a) Alevín control, inyectado solo con medio DMEM; b) alevín microinyectado con 250 células HeLa. La escala representa 100 μm .

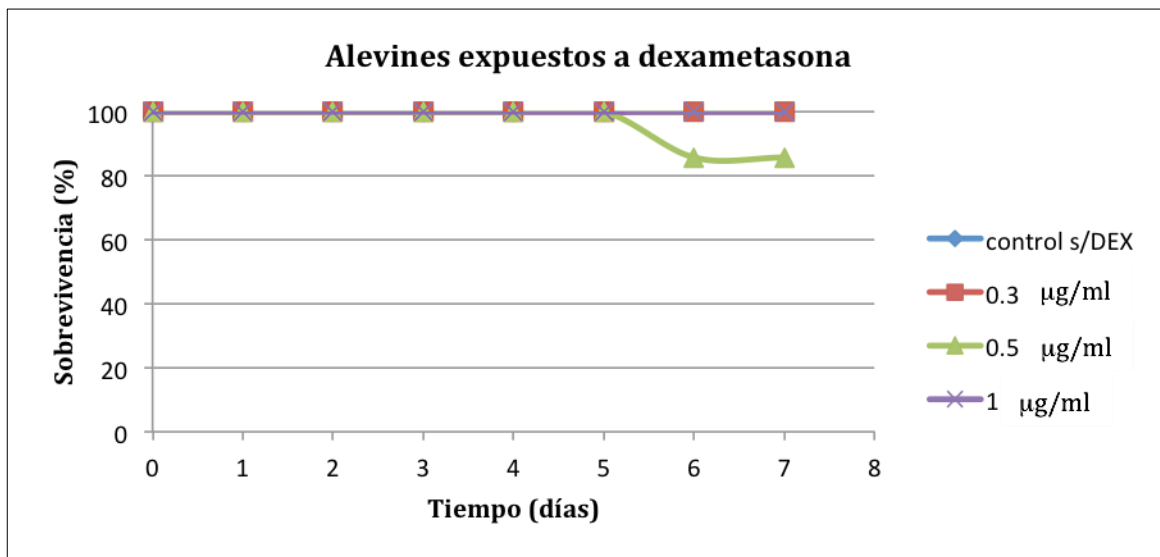


Figura 15. Curva de supervivencia de alevines de *M. robustus* con diferentes concentraciones de dexametasona para inhibir el sistema inmune.

6.8.1. Supresión del sistema inmune en alevines

Al experimentar la microinyección de células cancerígenas humanas en alevines no se observó proliferación celular, por lo que se decidió inhibir el sistema inmune con

dexametasona (DEX), evitando así una posible respuesta de rechazo a las células inyectadas por parte de los alevines.

Para conocer la concentración necesaria de dexametasona para inhibir el sistema inmune de los alevines sin provocar toxicidad, se aplicó DEX a los alevines y la viabilidad fue registrada por 7 días. Se hicieron 3 grupos con diferentes concentraciones de dexametasona (0.3, 0.5, 1 $\mu\text{g/ml}$).

Incluso con la concentración máxima (1 $\mu\text{g/ml}$) sobrevivieron todos los alevines durante todo el experimento, por ello, se determinó esta última como la concentración óptima para tratar a los alevines e inhibir su sistema inmune sin causar su mortalidad debido a la toxicidad (Figura 15).

6.8.2. Microinyección en alevines inmunosuprimidos con dexametasona

Se realizó la microinyección de alevines inmunosuprimidos con dexametasona, con lo siguientes grupos: control sin DEX y sin células, células HeLa m-Cherry (600) sin DEX, células HeLa m-Cherry (600) con DEX (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y células HeLa m-Cherry (600) con DEX (1 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 16). Al segundo día post-inyección murieron todos los alevines del grupo de 1 $\mu\text{g/ml}$, al séptimo dpi se revisó un alevín de cada grupo de los restantes al microscopio de fluorescencia. No se halló evidencia contundente de un conglomerado de células inyectadas (Figura 17). Los alevines fueron sacrificados.

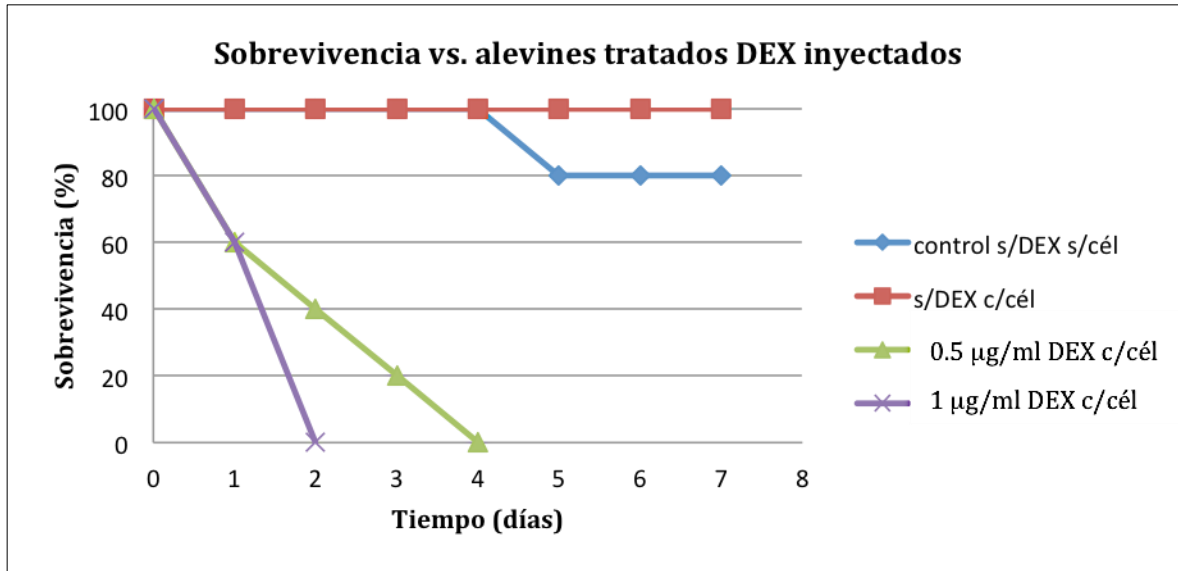


Figura 16. Curva de sobrevivencia de alevines de *M. robustus* tratados con diferentes concentraciones de DEX microinyectados con 600 células cancerígenas humanas de la línea HeLa transfectadas con m-Cherry.

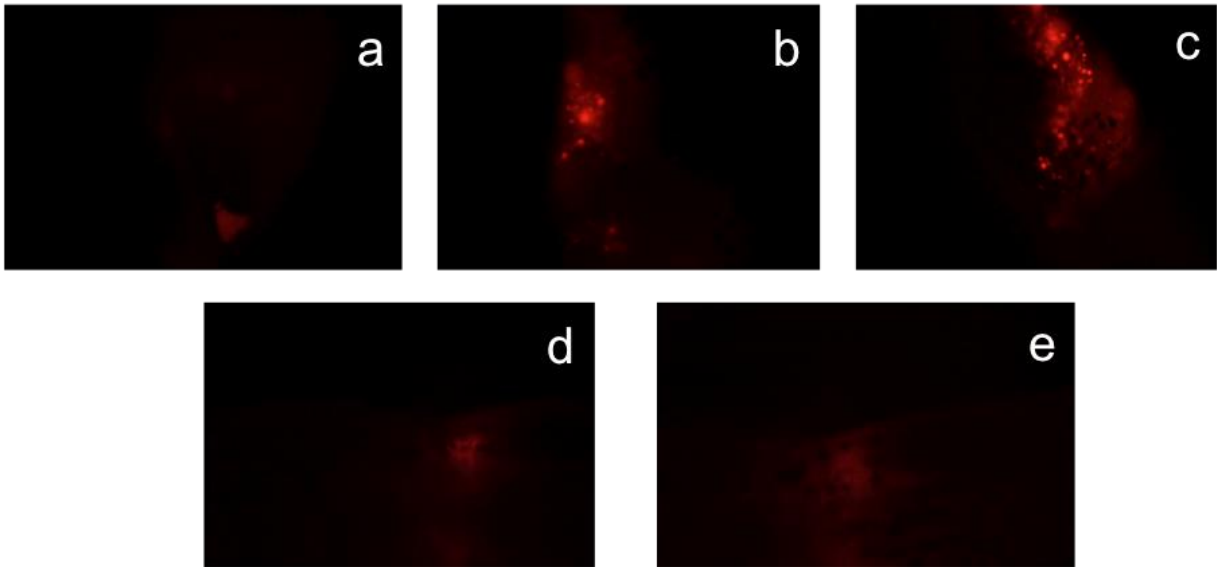


Figura 17. Alevines con tratamiento de DEX microinyectados con células HeLa transfectadas con m-Cherry. 2 dpi (días post-inyección). a) alevín control sin células, sin DEX; b) alevín con 600 células HeLa, sin DEX; c) alevín con 0.5 µg/ml DEX inyectado con 600 células HeLa. 7 dpi. d) Alevín control sin células sin DEX. e) alevín sin DEX con 600 células HeLa.

Se realizó un nuevo experimento, inyectando 1200 células MDA-MB-468 transfectadas con GFP. La concentración de DEX utilizada fue de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 18). Los alevines se observaron al microscopio el segundo y sexto día post-inyección (Figura 19). Al sexto dpi los alevines se sobreexpusieron en el microscopio de fluorescencia, ya que no se observó fluorescencia con los parámetros normales de exposición (no había tumores visibles), por lo que al día siguiente todos los alevines de este grupo murieron.

Debido a que no se habían generado tumores inyectando en vitelo, los lugares de microinyección cambiaron para saber si había formación de tumores en otros tejidos, y para no correr riesgo de dañar la vejiga natatoria y matar los alevines. En este experimento se usaron alevines tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DEX, anestesiados con triclaína. Los peces se dividieron en 5 grupos: 1 grupo con 4 alevines inyectados con 500 células MCF7 m-Cherry en la parte dorsal, 1 grupo con 4 alevines inyectados con 500 células MCF7 m-Cherry en la parte ventral cerca del vitelo, 1 grupo de 5 alevines pinchados sin células en la parte dorsal, 1 grupo de 5 alevines pinchados sin células en la parte ventral cerca del vitelo, y 1 grupo de 5 alevines control que solo se trataron con DEX y también con triclaína. La sobrevivencia se documentó a lo largo de 5 días post-inyección (Figura 20).

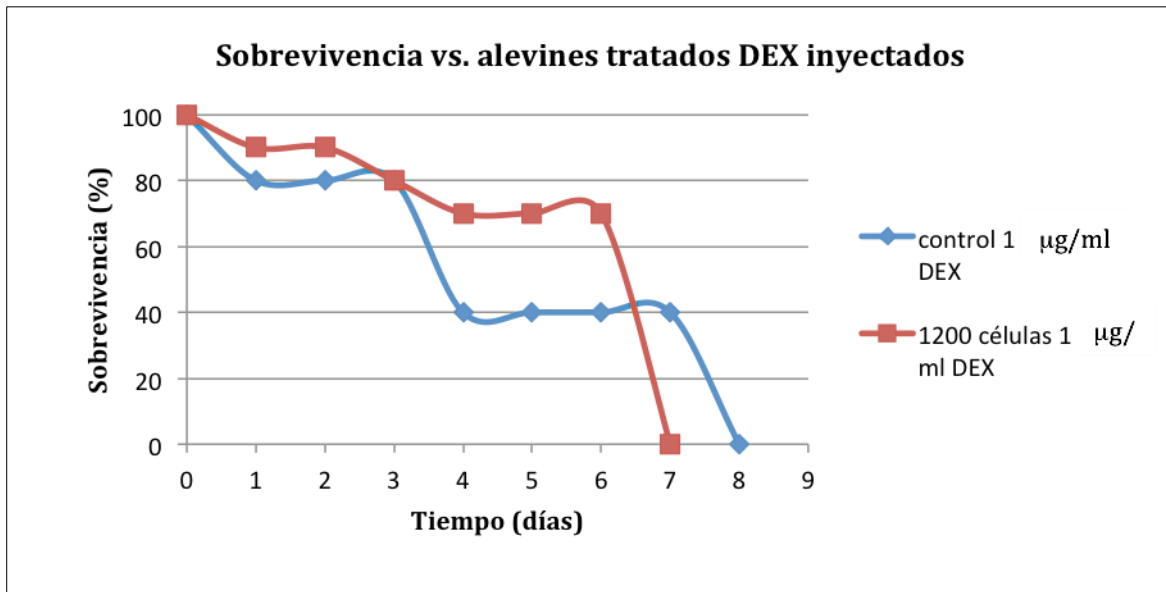


Figura 18. Curva de sobrevivencia de alevines de *M. robustus* tratados con 1 µg/ml de DEX microinyectados con 1200 células cancerígenas humanas de la línea MDA-MB-468 transfectadas con GFP.

La microinyección de 500 células MCF7 m-Cherry en la parte ventral cerca del vitelo en un alevín tratado con 1 µg/ml de DEX indujo la generación de pequeñas masas de células fluorescentes en la región urogenital, y en la aleta anal, sugiriendo crecimiento tumoral y migración de las células inyectadas. Mediante microscopía de campo claro se pudieron observar pequeñas tumoraciones en las aletas, que están ausentes en el alevín control (Figura 21).

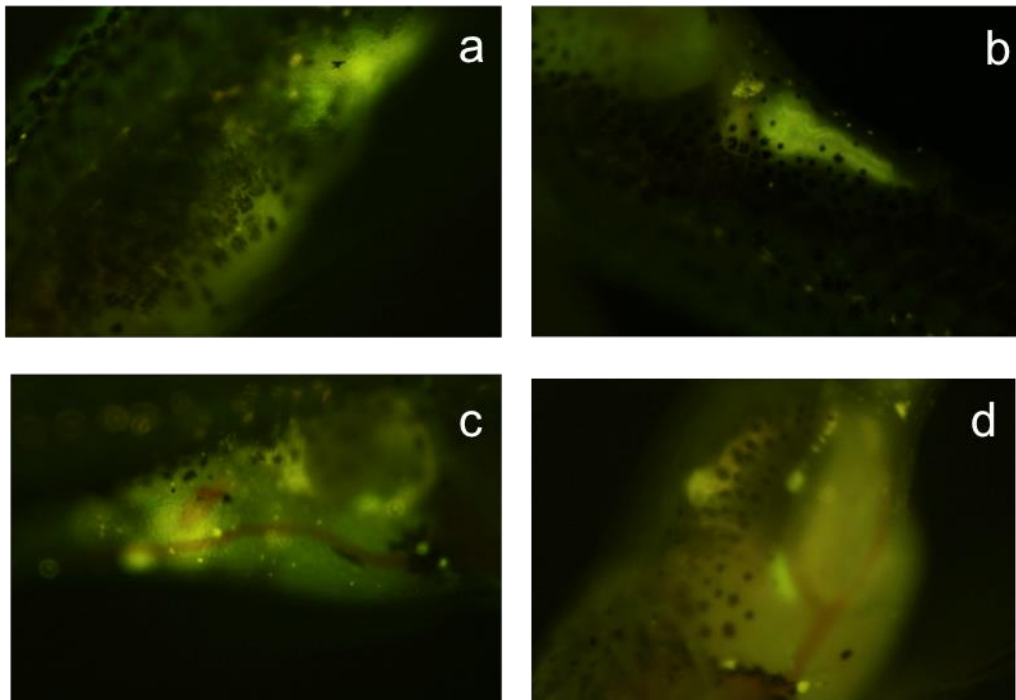


Figura 19. Micrografía de alevines de *M. robustus* con tratamiento de DEX microinyectados con células MDA-MB-468 transfectadas con GFP. Se muestra el área abdominal. a) alevín control 2 dpi; b) alevín control 6 dpi; c) Alevín inyectado con 1200 células MDA-MB-468 transfectadas con GFP 2 dpi. d) Alevín inyectado con 1200 células MDA-MB-468 transfectadas con GFP 6 dpi.

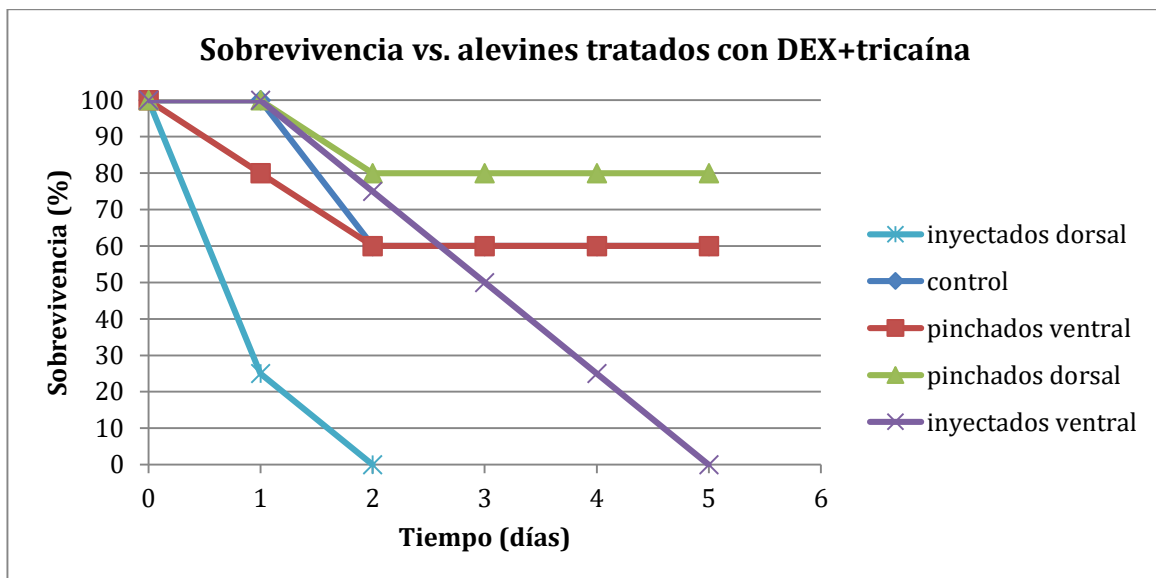


Figura 20. Gráfica de sobrevivencia de alevines tratados con DEX para inhibir el sistema inmune y tricaína para anestresarlos antes de la microinyección. En los alevines microinyectados se usaron 500 células de la línea MCF7 transfectadas con m-Cherry.

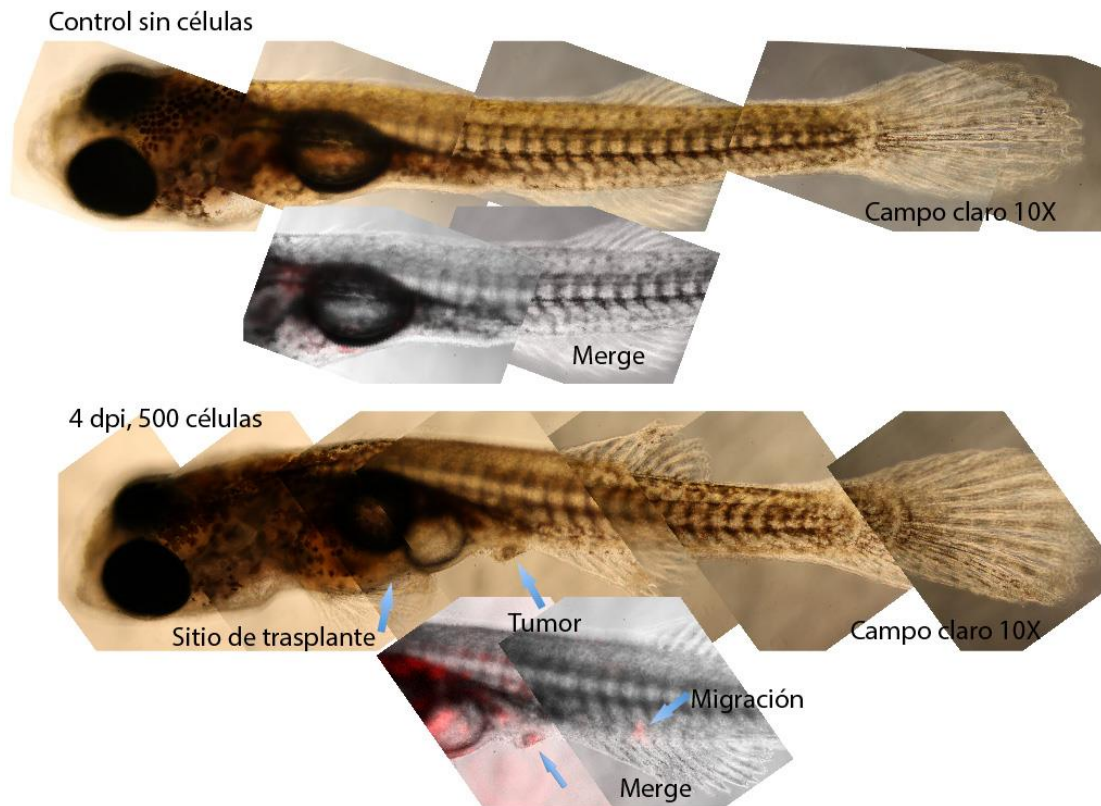


Figura 21. Proliferación de células MCF7-Cherry en zona urogenital y aleta anal de alevín de 5 días post-eclosión. Arriba: alevín control, no muestra ninguna alteración visible. Abajo: alevín inyectado con 500 células de la línea MCF7 transfectadas con m-Cherry, se observa un crecimiento anormal que presenta fluorescencia cerca del orificio urogenital, y también se señala una posible migración de las células hacia la aleta anal.

7. DISCUSIÓN

En el 2012 se reportaron 8.2 millones de muertes alrededor del mundo relacionadas con los diversos tipos de cáncer existentes, por ello, la comunidad científica se ha esforzado en buscar herramientas para su estudio, y un enfoque es a través de la experimentación en animales, entre los cuales se han utilizado ratones, aves y peces.

El pez *Millerichthys robustus* es una especie endémica de la cuenca del Río Papaloapan en México, con un característico desarrollo embrionario en diapausas, que le permite sobrevivir por meses en ausencia de agua, por lo que en condiciones controladas los huevos pueden ser almacenados en sustrato semi-húmedo, además de que en laboratorio es una especie de fácil mantenimiento y reproducción.

En este proyecto mi objetivo fue generar un modelo de xenotransplante con líneas celulares de cáncer de mama en el pez *Millerichthys robustus*. Además se usó una línea celular de cáncer de cérvix y una de cáncer de páncreas.

En primer lugar se establecieron las condiciones adecuadas para el mantenimiento de *M. robustus* y su reproducción. Los peces de esta especie llegan a ser maduros sexualmente a los 2 o 3 meses de edad, a partir de entonces se pueden comenzar a reproducir. El tiempo necesario para la reproducción de esta especie es de 4 semanas. Este tiempo se divide en: 1 semana para reproducción de los adultos y desove de los huevos, 2 semanas para completar el desarrollo embrionario y 1 semana para la estimulación de la eclosión. La cantidad de huevos obtenida fue aproximadamente de 80 a 90 huevos por pecera con 2 hembras y 4 machos, obteniendo de 40 a 60 alevines eclosionados, con un porcentaje de sobrevivencia del

80%. Este porcentaje, observé que depende del almacenaje y de la edad de los reproductores. En condiciones naturales, estos peces se reproducen solo durante un lapso corto, ya que los peces adultos solo viven en temporada de lluvias mientras las charcas estén llenas. En cambio, en condiciones de laboratorio, los peces adultos se pueden reproducir por un lapso más largo, porque se mantiene constante el suministro de agua independientemente de la época. Sin embargo, con el paso del tiempo, las gónadas en las hembras se atrofian, probablemente debido a procesos relacionados con el envejecimiento. Por otro lado, también puede ser debido a que los peces que se mantuvieron en reproducción estaban emparentados, y la endogamia pudo provocar problemas relacionados con la capacidad reproductiva (fecundidad o eclosión) (Kincaid, 1983).

Una vez obtenidos los huevos, pude observar que mientras más tiempo se mantengan almacenados los huevos en los nidos, la eficiencia al momento de la eclosión es baja, en ocasiones sólo eclosiona el 50% de los huevos, esto puede deberse a una condición anómala conocida como “corion duro” reportada para especies como *Salmo salar*, en donde el corion se vuelve una barrera difícil de romper o de degradar por parte de las enzimas de eclosión, e impide que los embriones eclosionen, por lo cual mueren (Jaramillo *et al.*, 2012).

Esta especie de killi presenta tres diapausas en su desarrollo embrionario debido a las condiciones desfavorables del ambiente en que viven, ya que en temporada de sequía sus charcas se secan; sin embargo los embriones sobreviven a la deshidratación mediante esta estrategia de desarrollo.

Como primer objetivo particular determiné las tres diapausas que presenta *M. robustus* en su desarrollo embrionario. La descripción fue consistente con lo reportado por el Dr. Miguel Mosqueda en el 2013 (Domínguez-Castanedo *et al.*, 2013).

Cuando se utilizan peces como modelos *in vivo* usando células humanas, un problema frecuente es la compatibilidad en la temperatura entre especies. El hábitat natural de *M. robustus* varía en un rango de 18°C hasta 34°C. Otras especies de killi, en África y Sudamérica, soportan temperaturas que van desde 10°C hasta 42°C (Podrabsky *et al.*, 2010). En condiciones de laboratorio se determinó que los embriones en diapausa II de *Nothobranchius guentheri* pueden sobrevivir a largo plazo sin anomalías en un rango de temperatura de 3.4°C a 32.7°C (Matias y Markofsky, 1978). En el caso de *M. robustus*, esta especie en cautiverio es mantenida a una temperatura cercana a los 25-30°C (Domínguez-Castanedo *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta estos datos, se aclimató a los embriones realizando varias pruebas (Figuras 5, 6 y 7). La mejor opción fue aclimatarlos cambiando 2°C por día hasta llegar a 34°C, temperatura a la cual las líneas celulares de cáncer son viables (Konantz *et al.*, 2012) y la viabilidad de los embriones en DII y DIII fue del 100%.

Una vez estandarizadas las condiciones previas necesarias, procedí a hacer experimentos de microinyección. En los primeros experimentos de microinyección en embriones pude observar que la penetración del capilar se dificultaba, debido a la dureza del corion. Ésto tuvo como resultado una viabilidad baja por el daño físico causado por los capilares al penetrar el corion duro.

Algunos de los embriones usados en la investigación estaban en DII, por lo que no estaban cerca de la eclosión, y el corion permanecía duro aún, por ello se usaron también embriones en DIII, esperando que el corion ya estuviera comenzando a ser degradado por las propias enzimas de eclosión; sin embargo, aunque el uso de embriones en DIII aumentó la viabilidad en los experimentos de microinyección, tampoco hubo resultados positivos, ya que aun así, los embriones finalmente no eclosionaron.

En teleósteos el corion está formado a partir de la proteína coriogenina (Darie *et al.*, 2005). El endurecimiento del corion ocurre debido a cambios en la presión osmótica del espacio perivitelino, con lo cual las fibras elásticas del corion se expanden y pierden elasticidad, por lo tanto, el corion se endurece (McMillan, 2007). Cuando el alevín va a eclosionar, la enzima coriolisina inicia la degradación de la pared interna del corion y se adelgaza progresivamente esta envoltura, facilitando la ruptura y subsecuente salida de los alevines (Jaramillo *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, se buscaron opciones que pudieran suplir el papel de la coriolisina y desgastar el corion. Los estudios que utilizan técnicas para descorionar implican una remoción completa del corion, por lo que las técnicas mencionadas en los artículos fueron modificadas para únicamente adelgazarlo y facilitar la microinyección. En un estudio sobre *Nothobranchius furzeri* se usaron varias técnicas de descorionación; tripsina, pronasa y descorionación con forceps (Hartmann y Englert, 2012).

Inicialmente se probaron estrategias usadas para decorionación de pez medaka *Oryzias latipes* (Porazinski *et al.*, 2010) y *Kryptolebias marmoratus* (Mourabit *et al.*,

2011), en donde se utiliza el lijado manual durante diferentes tiempos. Debido a que el lijado por ser manual, puede variar de persona a persona, se buscó otra alternativa.

Otra técnica de desgaste físico del corion se menciona en un estudio con pez cebra, donde se propone una remoción del corion automatizada utilizando un agitador orbital (Mandrell *et al.*, 2012), y en este proyecto se probó combinando esta técnica con el uso de la pronasa.

La pronasa es una mezcla de al menos 10 enzimas proteasas con actividad caseinolítica y aminopeptidasa (Jurásek *et al.*, 1971). Hay 5 proteasas tipo serina, 2 zinc endopeptidasas, 2 zinc leucina aminopeptidasas y 1 zinc carboxipeptidasa. La digestión protéica con pronasa ha sido de utilidad cuando se requiere una degradación de proteínas extensiva o completa (Burrell, 1993) y ha demostrado ser mucho más efectiva que la tripsina, quimiotripsina y otras proteasas (Nomoto *et al.*, 1960).

Tomando en cuenta protocolos de decorionación para pez medaka (Porazinski *et al.*, 2010) y pez cebra (Huang, 2009), se usaron concentraciones de 0.5 a 8 mg/ml de pronasa con los huevos de *M. robustus*. En nuestros resultados, observamos que los embriones tuvieron baja viabilidad cuando fueron sometidos a la pronasa, ya que el corion fue digerido fácilmente. Con ello se concluye que solo se debe adelgazar el corion mediante desgaste físico automatizado con agitador orbital durante 30 a 45 minutos.

Otra opción, que no realizamos en este proyecto, es el uso de una microforja y biselador para el corte de la punta de los capilares y penetrar lastimando lo menos

posible el corion y el vitelo, en lugar de usar fórceps. Aunque ésto elevaría el costo del proyecto, ya que los aparatos son muy caros.

La microinyección en embriones sin desgaste del corion no fue exitosa en el presente trabajo, debido a que en ningún experimento eclosionaron alevines y no se pudo observar si había proliferación de las células cancerígenas inyectadas y formación de tumores. En los embriones con el corion desgastado y microinyectados con células cancerígenas tampoco se tuvo éxito, ya que solo en un experimento pudieron eclosionar alevines, pero tampoco se observó proliferación de las células. Por ello, se determinó que la microinyección en embriones no era viable con los parámetros usados.

La microinyección de células en embriones no dio resultado, por lo que se realizaron los siguientes experimentos con alevines. En comparación con embriones, los alevines inyectados con células cancerígenas humanas tuvieron un mayor índice de sobrevivencia (de hasta 100%) a largo plazo (7 días). Sin embargo, probablemente cuando el organismo eclosiona su sistema inmune ya se encuentra activo, aunque no podemos estar seguros de ello, ya que no hay bibliografía al respecto del sistema inmune en esta especie.

Los peces son organismos de vida libre desde estadios tempranos de la embriogénesis en el ambiente acuático, por ello, durante un largo periodo de tiempo dependen de su sistema inmune innato (Uribe *et al.*, 2011), que incluye las barreras físicas como las superficies mucosas y la piel, pero también una variedad de leucocitos (monocitos, macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas) (Fernández *et al.*, 2002). La segunda línea de defensa es la inmunidad adquirida,

que depende en gran medida de linfocitos T y B (Ruiz *et al.*, 2003). Existen evidencias de aparición de células de defensa entre los 5-28 días post-eclosión en varias especies de teleósteos, pero se cree que no son inmunológicamente competentes hasta varias semanas después de la eclosión (Penagos *et al.*, 2008).

Para evitar que el sistema inmune interfiriera con la proliferación de las células cancerígenas se utilizó dexametasona (DEX), que es un corticoide que inhibe la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, e inhibe la acumulación de macrófagos y leucocitos en las zonas de inflamación. El mecanismo de acción inmunosupresor implica la reducción de la concentración de linfocitos T, monocitos y eosinófilos. También disminuye la unión de las inmunoglobulinas a los receptores celulares de superficie e inhibe la síntesis y liberación de las interleucinas, reduciendo la importancia de la respuesta inmune primaria (CIMA, 2018).

El tratamiento con dexametasona se ajustó de acuerdo a dosis usadas para pez cebra de un mes de edad (Stoletov *et al.*, 2007), que mide aproximadamente 10mm en ese momento (Westerfield, 2000). El pez *M. robustus* mide aproximadamente 6mm al eclosionar. Los experimentos de curva de sobrevivencia sólo con DEX indicaron que una dosis de 1µg/ml de DEX mantuvo viables durante 7 días a los alevines (Figura 15).

Para analizar la presencia o ausencia de células inyectadas en *M. robustus*, se pensó que podían ser de utilidad los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina. Sin embargo, las imágenes no eran tan claras al mostrar diferencias entre los peces inyectados con células y los peces control. Además, hasta la fecha se

desconoce la histología sobre esta especie, por lo cual fue difícil definir entre tejido normal y anormal en las tinciones.

Debido a lo anterior, se optó por la técnica de fluorescencia. Se usaron células transfectadas con las proteínas fluorescentes m-Cherry y GFP. Esto permitió observar a las células inyectadas en los organismos vivos y permitió evaluarlos desde el primer día y durante todo el experimento.

Los embriones se transplantaron con células de la línea MCF7, HeLa y CFPAC-1, sin embargo no generaron tumores. En los experimentos con alevines se microinyectaron células HeLa, MDA-MB-468 y MCF7. En los experimentos con las primeras dos líneas celulares mencionadas no se observó formación de tumores; en el último experimento, llevado a cabo con células MCF7 se observó un cúmulo de células fluorescentes en el área cercana a la microinyección (Figura 21).

En distintos estudios, en embriones y alevines de pez cebra se han inyectado (en zonas como el vitelo, el espacio perivitelino, la cavidad peritoneal, el ducto de cuvier) desde 1 hasta 2000 células de diferentes líneas celulares humanas de cáncer de mama, piel, ovario, páncreas, entre otros, logrando en muchos casos generar tumores en los peces (Konantz *et al.*, 2012).

En este proyecto se inyectaron desde 50 hasta 2000 células en embriones y alevines de *M. robustus*. El lugar elegido para la microinyección inicialmente fue el vitelo de los embriones y alevines; sin embargo, en ninguno de los experimentos se tuvo evidencia clara que respalde la generación de los tumores. Cuando se inyectaron 500 células MCF7 cerca del vitelo, se logró la proliferación de las mismas cerca del orificio urogenital, por lo que se estableció este como el número mínimo necesario de

células para la generación de tumores, en un lapso de 4 días. Aunque es necesario probar nuevas cantidades de células inyectando en este sitio.

La viabilidad en la mayoría de experimentos fue afectada por diferentes variables antes de llegar a los 5 días postinyección, en donde por experimentos en pez cebra, creyó que ya se podría observar con claridad la proliferación de las células cancerígenas. En diferentes experimentos incluso los embriones control no eclosionaban, esto podría suceder debido a factores mencionados anteriormente, como el fenómeno de “corion duro” observado en otras especies, y también el tiempo de almacenaje de los huevos en los nidos, o el envejecimiento de los padres. Estos últimos dos factores también pueden influir en que los alevines ya eclosionados no hayan podido sobrevivir a lo largo de los experimentos. En futuros experimentos estas variables deberían ser tomadas en cuenta.

8. CONCLUSIÓN

Millerichthys robustus es una especie de fácil reproducción y mantenimiento en laboratorio, presenta un desarrollo embrionario mediado por tres diapausas, durante el cual los huevos resisten a la desecación y pueden ser almacenados en diapausa II y III en turba semi-húmeda por meses, para ser utilizados en el momento que se requieran. En condiciones controladas (humedad y temperatura) en laboratorio se puede llevar a cabo un desarrollo embrionario directo, sin detenerse en diapausas, que después de la fertilización dura aproximadamente 15 días en alcanzar el desarrollo completo.

En este trabajo la microinyección en embriones no generó tumores en ningún caso; sin embargo, para futuros experimentos de microinyección se propone que la DIII es una etapa que posiblemente permitiría desarrollar tumores exitosamente, desgastando el corion con lijado automatizado con agitador orbital por 45 minutos previo a la microinyección, o usando embriones recién cosechados (en los que no es necesario el desgaste del corion), y estableciendo las condiciones óptimas de los capilares con el uso de microforja y biselador, y de eclosión de los alevines.

La microinyección de 500 células de la línea de cáncer de mama MCF-7 en los alevines recién eclosionados fue favorable para la proliferación de células cancerígenas y formación de un tumor a lo largo de 5 días, inhibiendo previamente el sistema inmune de los mismos con dexametasona.

Comparando la facilidad de manipulación entre embriones y alevines, proponemos que un modelo más fácil sería el uso de alevines, ya que se requiere menos tiempo para la preparación del organismo para microinyectarlo (se evita el desgaste del

corion y cuidados previos a la eclosión); además una vez inyectados, es más fácil, bajo las condiciones adecuadas, mantener vivos a los alevines que a los embriones.

Se concluye que *Millerichthys robustus* es un potencial modelo alternativo *in vivo* para realizar xenotransplantes; sin embargo, hacen falta repetir experimentos para tener evidencia contundente de que sea un modelo exitoso.

A futuro proponemos analizar en primera instancia si el sistema inmune efectivamente está activo ya en esta etapa de la vida del pez, ya que eso aclararía si es necesario o no el uso de dexametasona. También se propone realizar nuevos experimentos con un grupo mayor de organismos, para poder establecer a *Millerichthys robustus* como un modelo de xenotransplante.

9. LITERATURA CITADA

- Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M. y Zon, L. I. 2002. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*. 1(3):229-231.
- Berois, N., García, G, y de Sá, R. 2016. Annual fishes, life history strategy, diversity and evolution. CRC Press.
- Boidot, R., Vegran, F., Jacob, D., Chevrier, S., Gangneux, N., Taboureau, J., Oudin, C., Rainville, V., Marcier, L. y Lizard- Nacol, S. 2008. The expression of BIRC5 is correlated with loss of specific chromosomal regions in breast carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 47:299-308.
- Burrell, M. M. 1993. *Enzymes of Molecular Biology*. Totowa, Nueva Jersey. Humana Press Inc.
- CIMA. Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS. España. Ficha técnica dexametasona Kern pharma 4 mg/ml solución inyectable EFG [en línea]. [Fecha de consulta: 20 de febrero del 2018]. Disponible en <https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67455/FT_67455.html#5-propiedades-farmacologicas>.
- Darie, C. C., Biniossek, M. L., Gawinowicz, M. A., Milgrom, Y., Thumafart, J. O., Jovine, L., Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. 2005. Mass spectrometric evidence that proteolytic processing of rainbow trout egg vitelline envelope proteins takes place on the egg. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:37585-37598.
- Diario Oficial de la Federación. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-

SEMARNAT-2010, Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010.

- Domínguez-Castanedo, O., Mosqueda-Cabrera, M. A. y Valdesalici, S. 2013. First observations of annualism in *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 24(1):15-20.
- Domínguez-Castanedo, O., Valdesalici, S. y Rosales-Torres, A. M. 2017. Developmental ecology of annual killifish *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cinolebiidae). *Developmental Dynamics*. 246:802-806.
- Eguiara, A., Holgado, O., Beloqui, I., Abalde, L., Sánchez, Y., Callol, C y Martín, A. G. 2011. Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification. *Cell Cycle*. 10(21):3751-3757.
- Fernández, A. B., Ruiz, I. y de Blas, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. *AquaTIC*. 17:1-9.
- GLOBOCAN 2012 (IARC). Francia. Simple maps. Incidence ASR [en línea]. [Fecha de consulta: 5 de marzo del 2016]. Disponible en: <<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#>>.
- Green, F. L., Page, D. L., Fleming, I. D., Fritz, A. G., Balch, C. M., Haller, D. G. y Morrow, M. 2002. Cancer Staging Manual. USA: Sexta edición. American Joint Committee on Cancer. Springer.

- Grizzle, J. M. y Putnam, M. R. 1987. Microinjection of fish embryos as a laboratory assay for chemical carcinogens. *Environmental Protection Agency*. 1-4.
- Harel, I. y Brunet, A. 2015. The African Turquoise Killifish: A model for exploring vertebrate aging and diseases in the fast lane. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LXXX*. 1-6.
- Harfouche, R., Basu, S., Soni, S., Hentschel, D. M., Mashelkar, R. A. y Sengupta, S. 2009. Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis. *Angiogenesis*. 12:325-338.
- Hartmann, N. y Englert, C. 2012. A microinjection protocol for the generation of transgenic killifish (species: *Nothobranchius furzeri*). *Developmental Dynamics*. 241(6):1133-1141.
- Huang, C. H. 2009. A study of pronephric-glomerular morphogenesis in zebrafish. The University of Edimburgh. Escocia, Reino Unido. 243pp.
- INFOCÁNCER. México. Cáncer en cifras. Estadísticas 2009. Mortalidad [en línea]. [Fecha de consulta: 7 de marzo de 2016]. Disponible en <<http://www.infocancer.org.mx/mortalidad-con502i0.html>>.
- Jaramillo, R., Goicoechea, O., Garrido, O. y Molinari, E. 2012. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal y del corion duro de *Salmo salar*. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44:59-65.

- Jurásek, L., Johnson, P., Olafson, R. W. y Smillie, L. B. 1971. An improved fractionation system for pronase on CM-Sephadex. *Canadian Journal of Biochemistry*. 49:1195-1201.
- Kim, Y., Nam, H. G. y Valenzano, D. R. 2016. The short-lived African turquoise killifish: an emerging experimental model for aging. *Disease Models & Mechanisms*. 9:115-129.
- Kincaid, H. L. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*. 33:215-227.
- Konantz, M., Balci, T. B., Hartwig, U. F., Dellaire, G., André, M. C., Berman, J. N., y Lengerke, C. 2012. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1266(2012):124–137.
- Kucera, C. J., Faulk, C. K. y Holt, G. J. 2002. The effect of spawning salinity on eggs of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*, Cuvier) from two bays with historically different salinity regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 272(2):147-158.
- Lee, S. L. C., Rouhi, P., Jensen, L. D., Zhang, D., Ji, H., Hauptmann, G., Ingham, P. y Cao, Y. 2009. Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(46):19485-19490.

- Mandrell, D., Truong, L., Jephson, C., Sarker, M. R., Moore, A., Lang, C., Simonich, M. T. y Tanguay, R. L. 2012. Automated zebrafish corion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens. *Journal of Laboratory Automation*. 17(1):66-74.
- Matias, J. R. y Markofsky, J. 1978. The survival of embryos of the annual killifish *Nothobranchius guentheri* exposed to temperature extremes and the subsequent effects on embryonic diapause. *Journal of Experimental Zoology*. 204:219-228.
- McMillan, D. B. 2007. Fish histology, female reproductive systems. Springer-Verlag Publishers. The Netherlands.
- Mehlen, P. y Puisieux, A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*. 6:449-458.
- Miller, R. R. 2009. Peces dulceacuícolas de México. CONABIO, Sociedad Ictiológica Mexicana, El Colegio de la Frontera Sur y el Consejo de Peces del Desierto, México–Estados Unidos. Ciudad de México, México, 559 pp.
- Montagne, J. 2013. Reproducción en peces anuales endémicos del género *Austrolebias*: histología gonadal y ultraestructura de las superficies gaméticas. Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay. 31pp.
- Mourabit, S., Edenbrow, M., Croft, D. P. y Kudoh, T. 2011. Embryonic development of the self-fertilizing mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Developmental Dynamics*. 240:1694-1704.

- Mourabit, S. y Kudoh, T. 2012. Manipulation and imaging of *Kryptolebias marmoratus* embryos. *Integrative and comparative Biology*. 52(6):761-768.
- Mukherjee, S. 2016. El emperador de todos los males. Una biografía del cáncer. México: Primera edición. Penguin Random House Grupo Editorial.
- Nicoli, S., Ribatti, D., Cotelli, F. y Presta, M. 2007. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Research*. 67(7): 2927-2931.
- Nomoto, M., Narahashi, Y. y Murakami, M. 1960. A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*: VI. Hydrolysis of protein by *Streptomyces griseus* protease. *The Journal of Biochemistry*. 48(4):593-602.
- Organización Mundial de la Salud. 2005. Declaración de la reunión consultiva de asesoramiento en materia de xenotransplante [en línea]. [Fecha de consulta: 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <<http://www.who.int/transplantation/XenoSpanish.pdf?ua=1>>
- Park, E. H., Chang, H. H., Lee, K. C., Kweon, H. S., Heo, O. S. y Ha, K. W. 1993. High frequency of thyroid tumor induction by N-methyl-N'-Nitrosoguanidine in the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Japanese Journal of Cancer Research*. 84:608-615.
- Penagos, G., Barato, P. e Iregui, C. 2008. Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica Colombiana*. 14(1):1-24.

- Podrabsky, J. E., Tingaud-Sequeira, A. y Cerdà, J. 2010. Metabolic dormancy and responses to environmental desiccation in fish embryos. *Topics in Current Genetics*. 21:203-226.
- Porazinski, S. R., Wang, H. y Furutani-Seiki, M. 2010. Dechoriation of medaka embryos and cell transplantation for the generation of chimeras. *Journal of Visualized Experiments*. 46:1-4.
- Rosen, J. N., Sweeney, M. F. y Mably, J. D. 2009. Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function. *Journal of Visualized Experiments*. 25:1-5.
- Ruiz, I., Fernández, A. B. y de Blas, I. 2003. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *AquaTIC*. 18:33-38.
- Stoletov, K., Montel, V., Lester, R. D., Gonias, S. L. y Klemke, R. 2007. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell-vascular interface in transparent zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(44):17406-17411.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. y Morgan, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*. 56(10):486-503.
- Valenzano, D. R., Benayoun, B. A., Shingh, P. P., Zhang E., Etter, P. D., Chi-Kuo Hu, C., Clément-Ziza, M., Willemsen, D., Cui, R., Harel, I., Machado, B. E., Yee, M., Sharp, S. C., Bustamante, C. D., Beyer, A., Johnson, E. A. y Brunet, A. 2015. The african turquoise killifish genome provides insights into evolution and genetic architecture of lifespan. *Cell*. 163:1539-1554.
- Weinberg, R. A. 1996. How cancer arises. *Scientific American*. 275:62-70.

- Westerfield, M. 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4ta ed., University of Oregon Press, Eugene.
- White, R., Rose, K. y Zon, L. 2013. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nature*. 13:624-636.
- Wourms, J. P. 1972. Developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 182:389-414.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frías, C. y Cortés, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20:126-136.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00197

Matricula: 2153803879

Generación de un modelo de xenotransplante en pez killi *Millerichthys robustus* (Miller y Hubbs, 1974) con células humanas de cáncer de mama

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 17 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR
- DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS
- DRA. MARIA CECILIA ZAMPEDRI
- DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

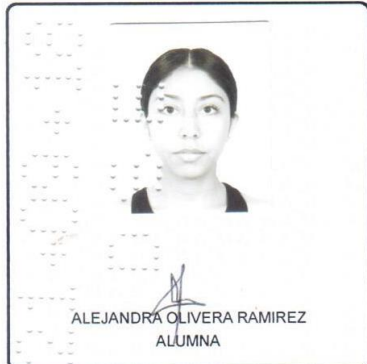
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ALEJANDRA OLIVERA RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

VOCAL

DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS

VOCAL

DRA. MARIA CECILIA ZAMPEDRI

SECRETARIA

DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO