

Mejora en las condiciones técnicas de xenotrasplantes en pez cebra: temperatura e índice de proliferación

Cabezas-Sainz, P.¹; Guerra-Varela, J.¹; Mariscal, J.³; Carreira-Nouche, M.J.²; Abal, M.³; López-López, R.³; Sánchez, L.¹

¹ Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

² Centro de Investigación en Tecnologías de la Información (CITIUS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago, España.

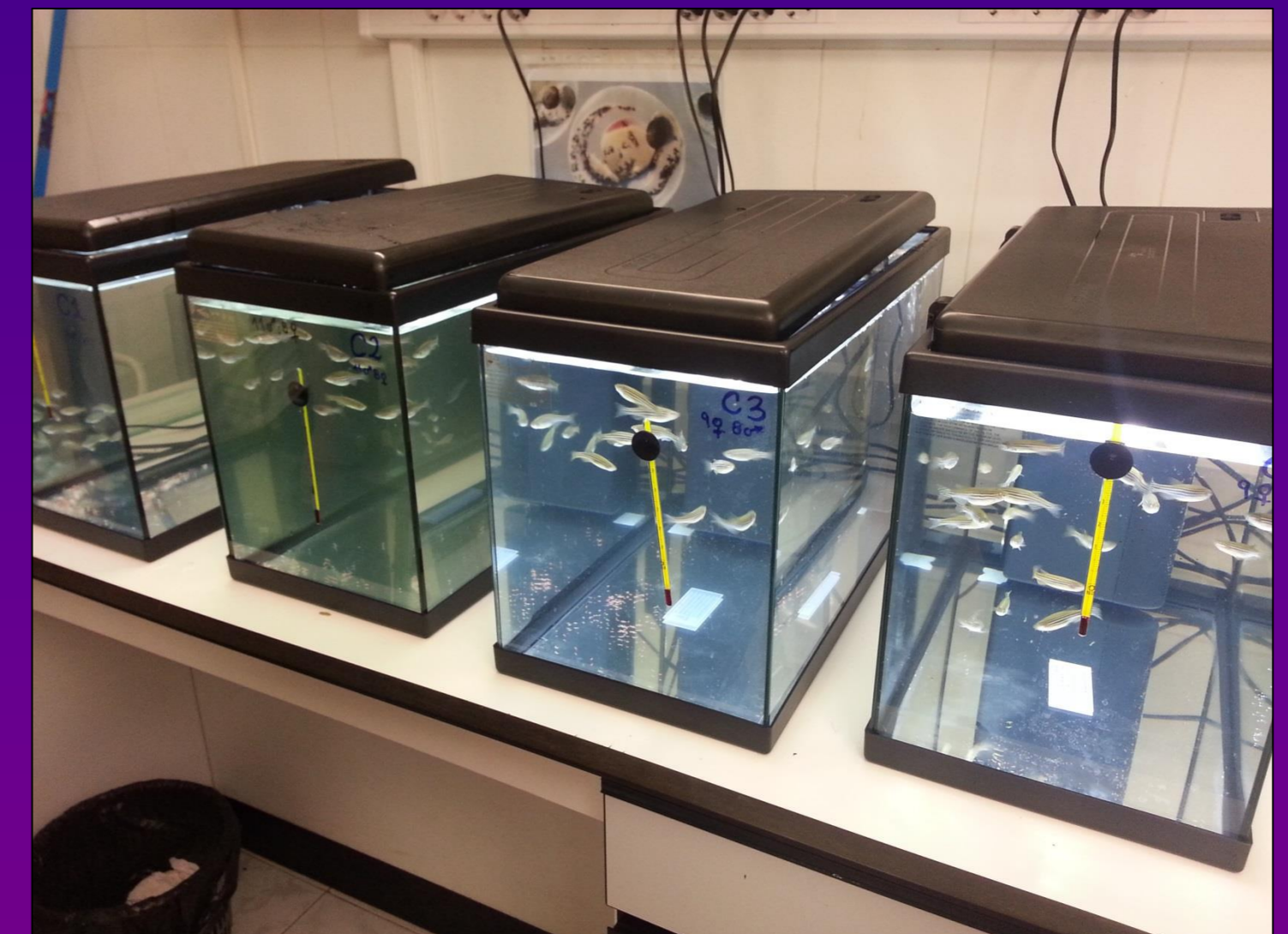
³ Laboratorio Translacional, Departamento de Medicina Oncológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela/SERGAS, Santiago de Compostela, España.

INTRODUCCIÓN

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo animal que ha surgido como herramienta para el estudio de diversas enfermedades humanas, entre ellas, el cáncer. Se utiliza como modelo para xenotrasplantes de células tumorales y para estudios de toxicidad de diferentes compuestos quimioterápicos *in vivo*. El conjunto hace que tenga ventajas frente al modelo murino tales como rapidez, high throughput screening y bajo costo de mantenimiento; dando una terapia personalizada y eficiente.

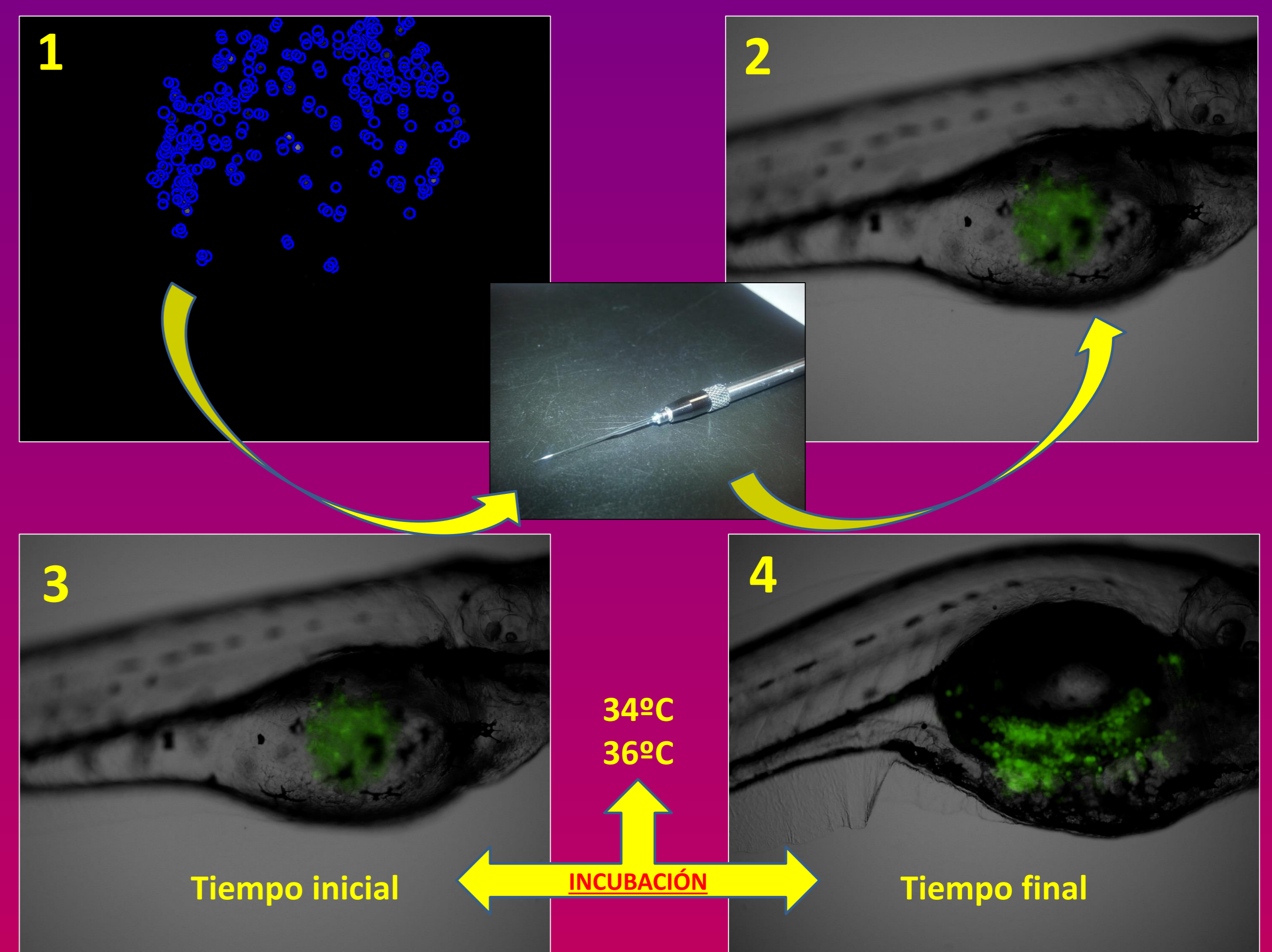
Los xenotrasplantes en este modelo animal está en auge para la caracterización tanto de la proliferación de líneas, como para visualizar la capacidad metastásica de las mismas en el interior del embrión. Por esto mismo, se intenta cada vez ser más preciso en la manera en la que se cuantifican estos parámetros, y a la vez, intentar llegar a unas condiciones lo más parecidas posibles a las naturales para estas células, es decir, en el interior del cuerpo humano.

Por ello, en este estudio se mejoran las características de estas condiciones en lo que a la temperatura e índice de proliferación se refiere, con el objetivo de establecer unas condiciones en las cuales el comportamiento celular sea lo más similar al que ocurriría dentro del cuerpo humano y poder determinar de manera precisa mediante un índice proliferativo cuánto se han dividido esas células.



MÉTODOS

1. El contenido de una inyección de la línea de cáncer colorrectal HCT116, transfectada con GFP, se deja caer sobre un portaobjetos para cuantificar mediante software el número de células de las inyecciones posteriores, dando lugar a una cantidad determinada de células.
2. Posteriormente la línea celular se inyecta en el saco vitelino de embriones de 48 horas post fecundación (hpf) mediante un sistema de microinyección. En este momento, con 0 horas post inyección (hpi) se realiza una foto por cada embrión en campo claro y fluorescente, para detectar las células que portan en el interior y su futura comparación con el tiempo final.
3. La incubación de los embriones se realiza a dos temperaturas diferentes: 34°C y 36°C. De esta manera se pueden comparar la proliferación de las dos temperaturas sobre las células, tanto sin fármaco, como con un antitumoral disuelto en el agua desde las 24hpi hasta las 72hpi en el caso de 36°C.
4. Finalmente a las 72hpi (3 días) los peces se vuelven a fotografiar para poder establecer la comparación entre tiempo inicial y tiempo final mediante análisis con software, y de esta manera comprobar la proliferación a las diferentes temperaturas mediante un ratio establecido por el programa.



RESULTADOS

Al realizar un análisis de las imágenes comparando tiempo 0 hpi y 72hpi, el software ajusta automáticamente un umbral de intensidad, de manera que se elimina la autofluorescencia que pudiese tener el pez a estos tiempos, y se asegura que se limita al área ocupada por las células. De esta manera se obtienen unos resultados tanto del nGFP (número de píxeles con GFP, área) como de VMG (Valor medio de grises, intensidad) y con estos datos se elabora un 'ratio de proliferación' (Figura 1-3). Mediante la interpretación de estos ratios (disminución <1 < proliferación), podemos concluir que los resultados obtenidos muestran que la proliferación *in vivo* de las células de cáncer colorrectal HCT116 es mayor a 36°C, la cual se acerca más a la temperatura del cuerpo humano, que a 34°C.

Por otra parte el tratamiento con 5-Fluorouracil (5-FU) ha sido satisfactorio, pudiendo ver en la Figura 3 que la reducción es importante cuándo este fármaco es aplicado en el agua durante la incubación de los peces (ratio=0,033).

Como última consideración, la mortalidad de los embriones ha sido suficientemente baja como para realizar los experimentos a 36°C, como se puede ver en la Figura 4 la diferencia entre la mortalidad a 34°C y 36°C cuándo los peces han sido inyectados tanto como los blancos (no inyectados), no es muy diferente.

Figura 1. Experimento 34°C

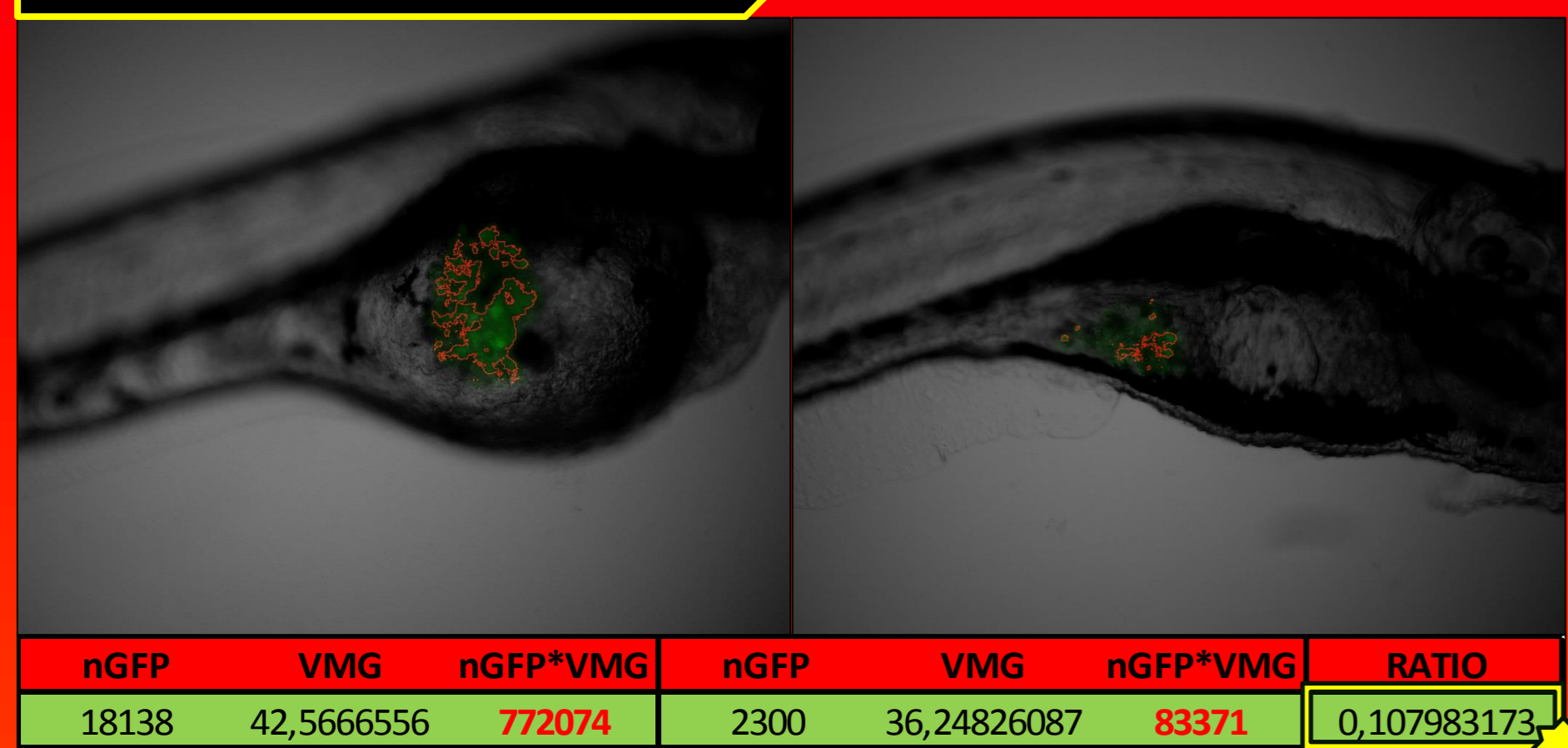


Figura 2. Experimento 36°C

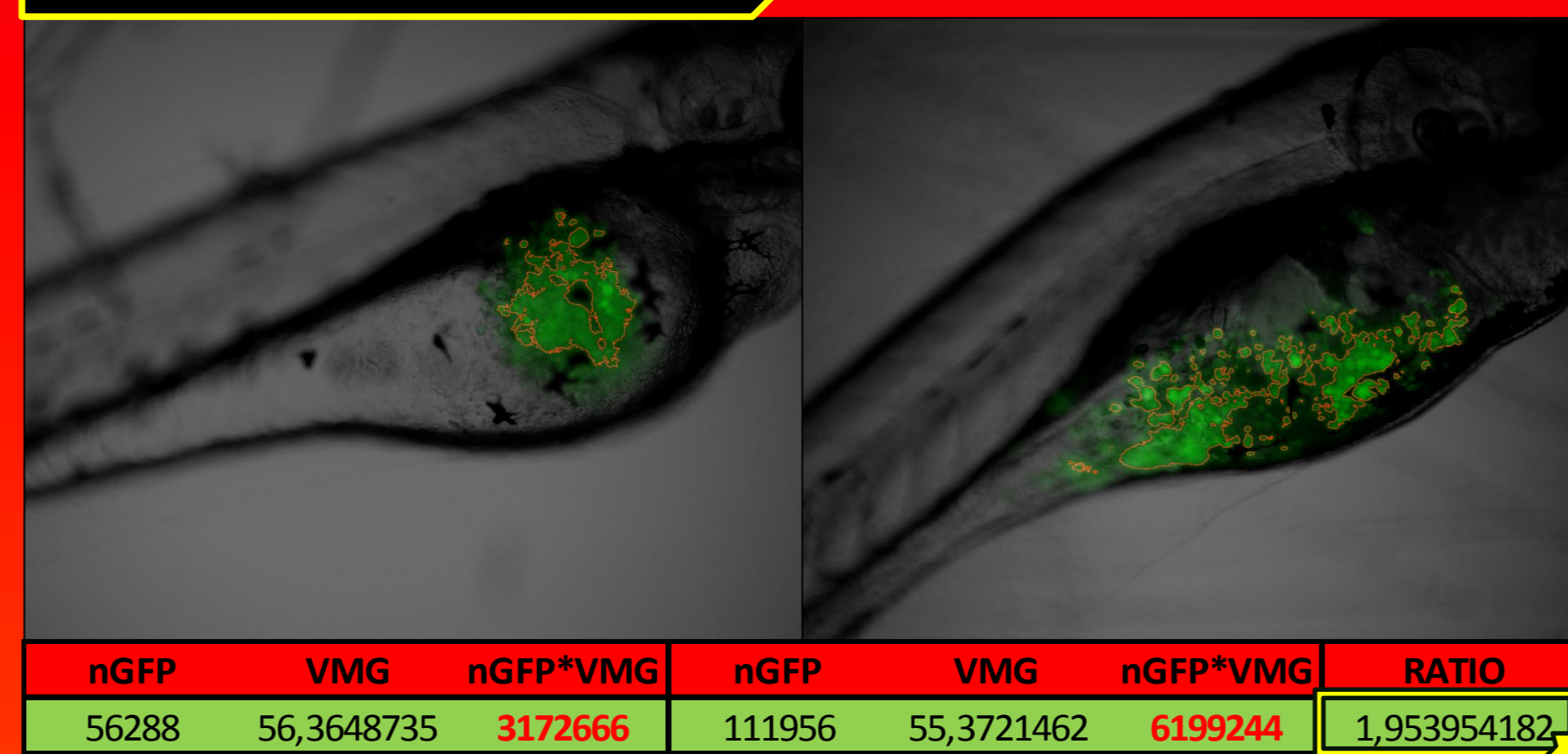


Figura 3. Experimento 5-FU 36°C

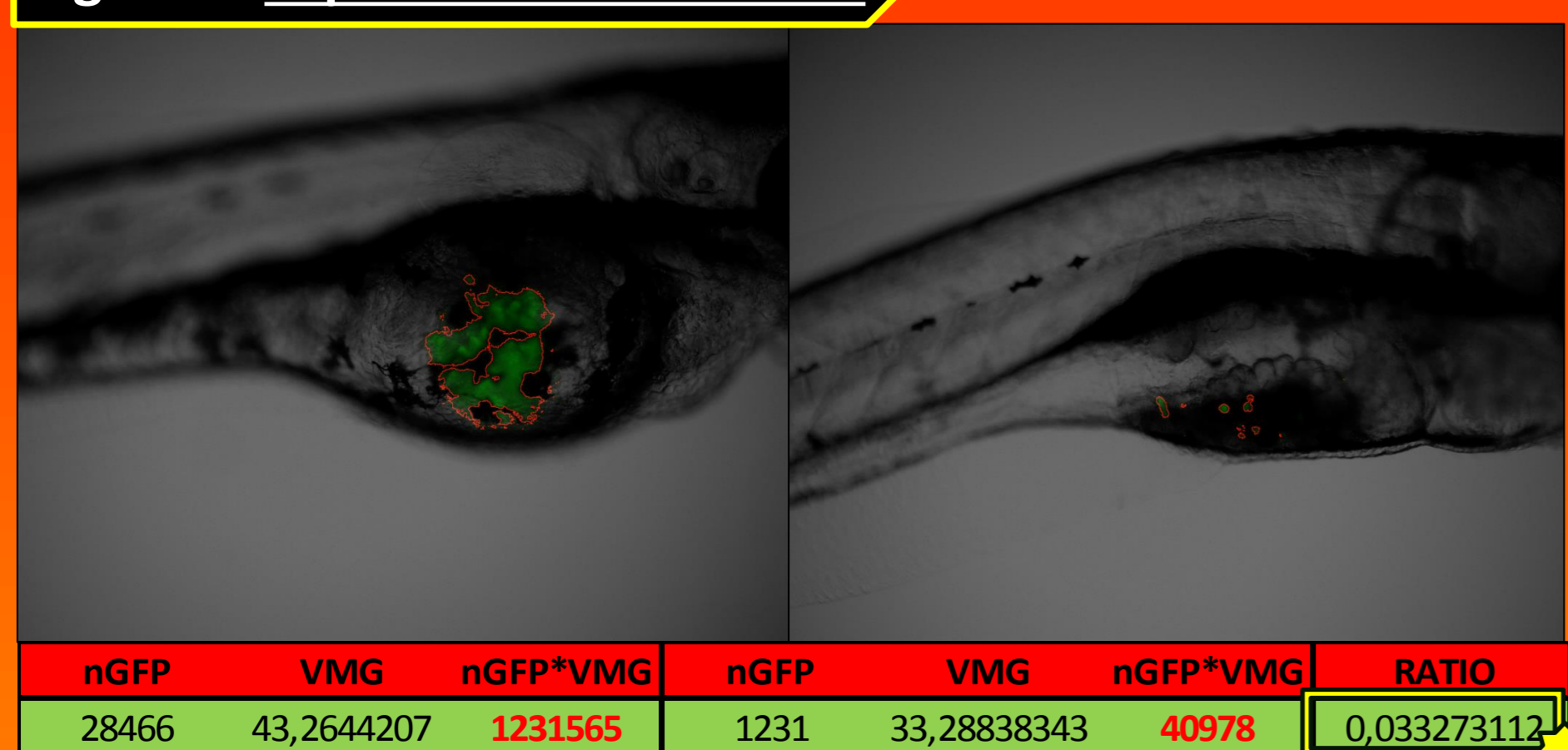
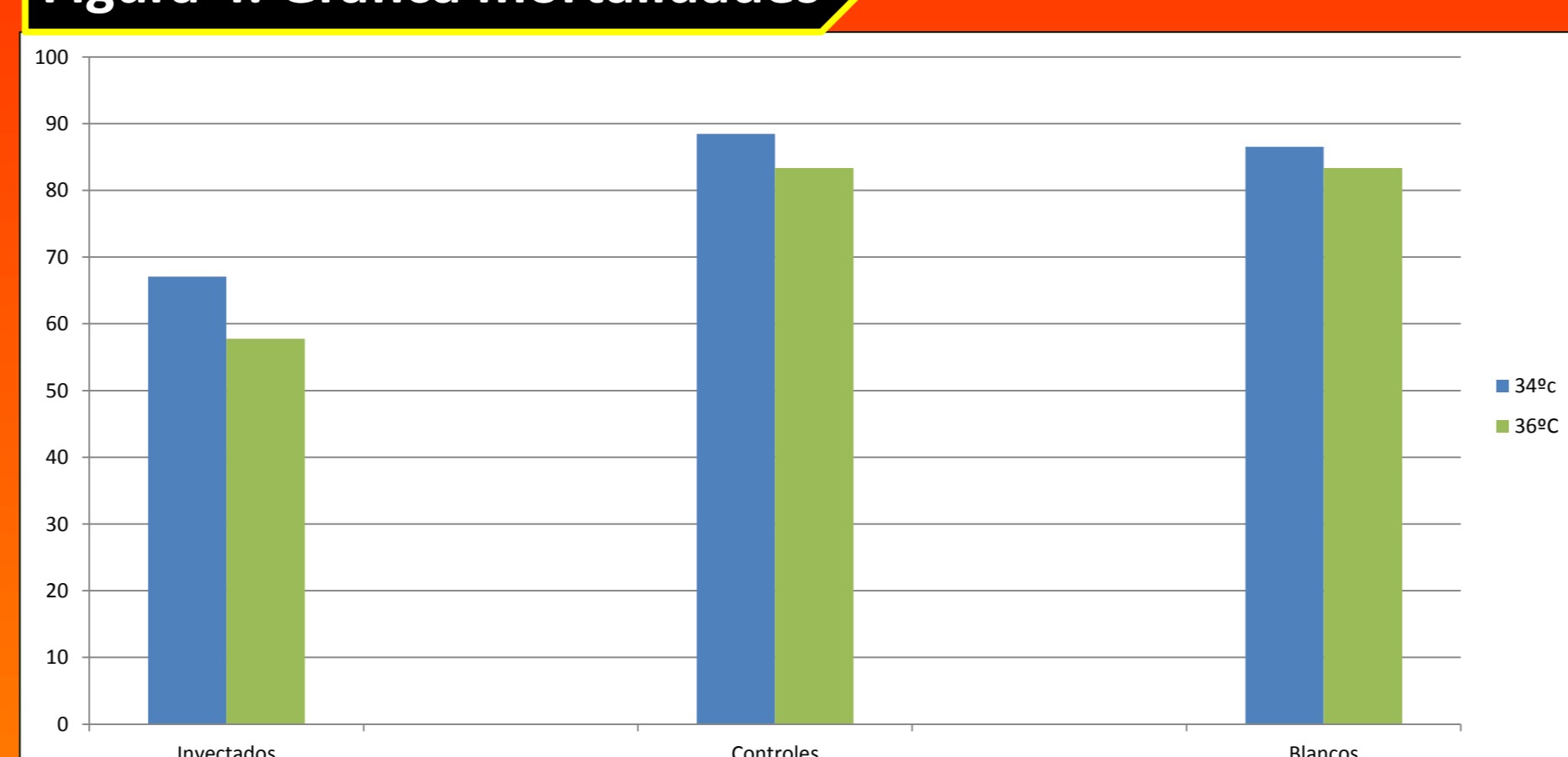


Figura 4. Gráfica mortalidades



DISCUSIÓN

El desarrollo normal de los embriones de pez cebra se ha establecido de 32°C a 35°C¹. A pesar de esto, algunos autores han recalcado la importancia de realizar estudios a mayor temperatura, cercana a la corporal para comprobar el comportamiento celular en estas nuevas condiciones². Los resultados obtenidos sugieren un cambio importante en la proliferación de esta línea en concreto sin ver afectada la mortalidad de los embriones, como sugieren algunos autores.

REFERENCIAS

1. Nicoli, S., & Presta, M. (2007). 'The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay' Nat.Protoc., 2, 2918-2923.
2. Marques, I.J. et al. (2009). 'Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model' BMC Cancer, 9, 128-2407-9-128.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido avalado por el proyecto FIS (PI13/01388). A los autores les gustaría agradecer el gran trabajo de Vanessa Pérez Cedrón en el mantenimiento de las instalaciones de pez cebra.