



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

Emprego do peixe cebra (*Danio rerio*) coma modelo de estudo de neoplasias

Empleo del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de estudio de neoplasias

Using of zebrafish (*Danio rerio*) as a model to study neoplasias

María de Nicolás Martín

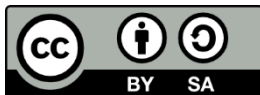
**Grado en Veterinaria**

Año 2018/2019

Modalidad del Trabajo: Revisión bibliográfica

# Licencia

Esta obra pertenece a María de Nicolás Martín, y está sujeta a la licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



## **Resumo**

Durante as últimas décadas o peixe cebra converteuse nun organismo modelo importante na investigación biomédica. Os avances técnicos permitiron xerar modelos de cancro en diferentes órganos do peixe cebra, mantendo unha gran semellanza coas características de malignidade en humanos, tanto histolóxica como xenéticamente. Este modelo revelou datos únicos sobre a patoxénese e progresión do cancro que, a través de experimentos tradicionais, non se obtiveron.

Peixe cebra, Cancro, carcinoxénese, Investigación biomédica, xenotrasplante y transxénese

## **Resumen**

Durante las últimas décadas el pez cebra se ha convertido en un organismo modelo importante en la investigación biomédica. Los avances técnicos han permitido generar modelos de cáncer en diferentes órganos del pez cebra, manteniendo una gran similitud con las características de malignidad en los humanos, tanto histológicamente como genéticamente. Este modelo ha revelado datos únicos acerca de la patogenia y progresión del cáncer que, mediante experimentos tradicionales, no se habrían obtenido.

Pez cebra, cáncer, carcinogénesis, investigación biomédica, xenotrasplante y transgénesis

## **Abstract**

Throughout the last few decades, the zebra fish has become an important model organism for biomedical research. Technological advancements have allowed cancer models to be created in different organs of the zebrafish, maintaining a high similarity with the malignancy features in humans, histologically and genetically. This model has reveals unique data regarding pathogeny and cancer progression, which through traditional experiments could not have been obtained.

Zebrafish, cancer, carcinogenesis, biomedical research, xenotransplant y transgenesis

# Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Objetivos .....  | 5  |
| 2. Pez cebra: .....   | 6  |
| 2.1 Biología: .....   | 6  |
| 2.1.1 Origen: .....   | 6  |
| 2.1.2 Filogenia:.....   | 6  |
| 2.1.3 Morfología: .....   | 7  |
| 2.1.4 Ciclo de vida:.....   | 8  |
| 2.2 Pez cebra como organismo modelo.....  | 9  |
| 2.2.1 Condiciones de laboratorio óptimas para la reproducción del pez<br>cebra..... | 9  |
| 2.2.2 Genoma.....   | 15 |
| 3. Pez cebra y cáncer .....   | 16 |
| 3.1 Factores genéticos: .....   | 17 |
| 3.2 Factores epigenéticos:.....   | 17 |
| 3.3 Proceso de la carcinogénesis: .....   | 18 |
| 3.4 Células tumorales:.....   | 18 |
| 3.5 Técnicas de inducción de tumores en el pez cebra .....                          | 19 |
| 3.5.1 Xenotrasplante .....  | 19 |
| 3.5.2 Mutagénesis y transgénesis .....  | 20 |
| 3.6 Estudios relevantes: .....  | 23 |
| 3.6.1 Proteína 53 (p53).....  | 23 |
| 3.6.2 Carcinoma hepatocelular .....   | 25 |
| 3.6.3 Melanoma.....   | 27 |
| 3.6.4 Leucemia.....   | 29 |
| 3.6.5 Cáncer pancreático .....  | 31 |
| 3.6.6 Rabdomiosarcoma .....   | 33 |
| 3.6.7 Glioma.....   | 35 |
| 4. Conclusiones .....   | 37 |
| 5. Bibliografía .....   | 38 |
| 6. Abreviaturas .....   | 50 |

# 1. Objetivos

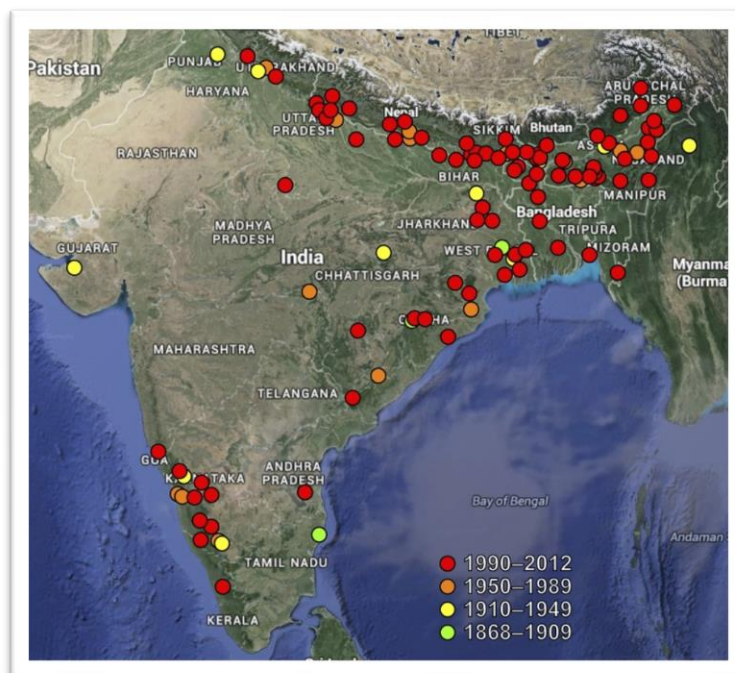
Los objetivos de este trabajo están dirigidos a recopilar el conocimiento existente acerca del uso del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para el estudio del cáncer. Se presentan las características biológicas principales de la especie y las claves de mantenimiento en laboratorio, junto con otros aspectos relacionados con su éxito como organismo modelo. Por otra parte, se pretende profundizar en los avances técnicos para la inducción de neoplasias en el pez cebra y presentar los principales estudios en los que el uso del pez cebra ha permitido progresar en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer.

## 2. Pez cebra:

### 2.1 Biología:

#### 2.1.1 Origen:

El pez cebra es un pez de pequeño tamaño y de agua dulce originario del sur asiático. Se distribuye por los ríos del centro y sur de Asia, incluyendo las cuencas del Ganges y Brahmaputra y regiones como India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután y el norte de Myanmar (Ilustración 1).



**Ilustración 1.** Distribución del pez cebra en su hábitat natural desde 1868 hasta 2012 (Parichy, 2015).

#### 2.1.2 Filogenia:

Es un pez teleósteo de clase actinopterio perteneciente a la familia más rica en especies, la de los ciprínidos (Tabla 1).

Los linajes de los ciprínidos y los mamíferos se dividen hace aproximadamente 450 millones de años, y con otras especies de teleósteos como el pez globo (*Tetraodon nigroviridis*) hace 100 millones de años (Nusslein-Volhard y Dahm, 2002).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del pez cebra.

| Reino    | Filo     | Clase          | Orden         | Familia    | Género       | Especie         |
|----------|----------|----------------|---------------|------------|--------------|-----------------|
| Animalia | Chordata | Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Danio</i> | <i>D. rerio</i> |

### 2.1.3 Morfología:

Se trata de un animal de pequeño tamaño, oscilando entre los 3 y los 5 centímetros de largo estándar (desde la punta del hocico hasta el límite posterior de la última vértebra o porción medio lateral de la lámina hipural) y 1 centímetro de ancho, fusiformes y aplanados latero-lateralmente.

Tienen la cabeza pequeña y ovalada con la boca dirigida oblicuamente hacia arriba ya que, de forma natural, se alimentan de insectos de la superficie del agua. Presentan prognatismo inferior y ojos centrales con pupila circular no visibles dorsalmente. El color aceitunado está representado por tres tipos de células, melanóforos azul oscuro, xántoforos dorados e iridóforos iridiscentes (Praveenraj *et al.*, 2017).

Tienen una línea lateral incompleta que llega hasta la base de la aleta pélvica. Además, poseen dos pares de barbillas y líneas longitudinales de color azul, que le dan nombre a esta especie de pez, y que varían en número de cinco a siete extendiéndose desde detrás del opérculo hasta la aleta caudal (Ilustración 2).

En cuanto a las aletas, las anales y caudales poseen rayas parecidas, sin embargo la dorsal tiene un color amarillento con bordeado blanco o un borde superior azul.



**Ilustración 2.** Pez cebra con las líneas longitudinales características (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).

Existe dimorfismo sexual, los machos son de menor tamaño que las hembras, con aletas anales más grandes y amarillas y con una papila genital poco evidente. Las hembras, además de ser de mayor tamaño, tienen un vientre convexo y abultado, y una papila genital frente al origen de la aleta anal. (Spence *et al.*, 2007).

## 2.1.4 Ciclo de vida:

Es un animal ovíparo con reproducción externa, es decir, la puesta de huevos se realiza sobre un substrato, al igual que el esperma. Las hembras suelen poner entre 100-200 huevos por semana, aunque pueden llegar a producir miles de huevos. Su tasa de fecundidad es alta, de aproximadamente el 90% (Kimmel *et al.*, 1995; Vargas-vargas, 2017).

Al encontrarse en un clima monzónico se creía que la reproducción dependía de la llegada de lluvias. Pero al observar óvulos maduros en hembras en estaciones secas, se especuló que la reproducción podría estar influenciada, en mayor medida, por la disponibilidad de alimento y la iluminación (Spence *et al.*, 2007).

El óvulo fecundado es visible a simple vista a través del corión y a partir de él, se produce un embrión rápidamente (Ilustración 3). Un día después de la fecundación ya se evidencia un corazón latiendo y un sistema nervioso en funcionamiento. A los 2 dpf (días post fecundación) el embrión empieza a pigmentarse y su sistema inmunitario innato es funcional, aunque el sistema inmune adquirido se desarrolla al rededor de 4-6 semanas tras la fecundación (Brown *et al.*, 2017).



**Ilustración 3.** Imágenes del ciclo de vida del pez cebra desde las 0 hpf (horas post fecundación) hasta las 72 hpf (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).

Los huevos eclosionan entre los 4 y 7 dpf liberando larvas con movilidad. Con un mes se les considera juveniles y con tres meses ya pueden reproducirse de manera continuada llegando a vivir 5 años en condiciones óptimas de laboratorio (Spence *et al.*, 2007).



## **2.2 Pez cebra como organismo modelo**

El pez cebra es un animal ornamental de acuarios domésticos que en los últimos años se ha convertido en un organismo modelo en la investigación médica. George Streisinger fue el primer científico que defendió la posibilidad de investigación génica con este modelo (Streisinger *et al.*, 1981).

Desde entonces su uso se ha incrementado de manera exponencial debido a las ventajas que presenta en comparación con otros modelos utilizados como el de los roedores. *Danio rerio* es de menor tamaño, su fecundidad es alta, la fertilización es extrauterina, su embrión es transparente y su sistema inmune adaptativo no se desarrolla hasta las 4-6 semanas, sobreviviendo hasta entonces únicamente con el sistema inmune innato. Además, su manipulación y mantenimiento en cautividad es sencillo (Berghmans *et al.*, 2005; Liu y Leach, 2011; Novoa y Figueras, 2011).

Además comparte la mayoría de la organización anatómica y celular con los mamíferos y se ha demostrado que el 70% de genes humanos tienen por lo menos un gen ortólogo en esta especie. Por otro lado, el porcentaje aumenta hasta un 82% si hablamos de genes ortólogos a los genes relacionados con enfermedades humanas (Howe *et al.*, 2013).

### **2.2.1 Condiciones de laboratorio óptimas para la reproducción del pez cebra**

El pez cebra presenta una amplia tolerancia a condiciones ambientales. Pero para asegurar una cría eficiente, es importante mantener un correcto protocolo de mantenimiento. De esta manera la energía irá destinada en mayor proporción al crecimiento, producción de gametos y función inmunológica, en lugar de a la homeostasis (Lawrence, 2007).

#### ***Temperatura***

*Danio rerio* puede vivir en un amplio rango de temperatura a pesar de ser un animal poiquilotermo, carente de mecanismos reguladores de la temperatura. La temperatura puede influir en la mayoría de los procesos biológicos y químicos, por lo que es un factor abiótico de gran importancia.

Un estudio mostró que un pez cebra aclimatado, tanto salvaje como transgénico RFP (Transgen de la proteína roja), presentan una temperatura máxima similar, de aproximadamente 40°C y una mínima de 6°C (Cortemeglia y Beitinger, 2005). Sin embargo, el rango en el que se han observado

mejores resultados reproductivos ha sido de 22-30°C (Lawrence, 2007) y con una temperatura de 28.5°C se produce una óptima incubación y crecimiento (Kimmel *et al.*, 1995).

### ***pH***

El pH es un coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa y es otro factor importante a tener en cuenta, ya que también influye en procesos biológicos y en la formación de las biopelículas microbianas necesarias para la supervivencia del pez cebra. En los sistemas de recirculación cerrada el rango óptimo es 7-8 (Masser *et al.*, 1999).

En un estudio de Zahangir *et al.* (2015) se comprobó que, con un rango de pH de 6.8-7.4 el pez cebra pone una media de 20 huevos más por día que con un pH ácido y 42 huevos más que con un pH básico. Por lo que para tener unas elevadas tasas de descendencia será necesario un correcto control de este parámetro en el acuario.

### ***Iluminación***

En los peces cebra se ha observado un patrón de comportamiento diurno con tres picos de actividad. Uno justo después de la iluminación, otro al comienzo de la tarde y el último al final del ciclo de luz.

Es recomendable contar con sistemas de iluminación para que haya ciclos de luz y de oscuridad de aproximadamente 12 horas (Vargas-vargas, 2017) ya que el mayor volumen de desove y la reproducción se producen al principio del día (Blanco-Vives y Sánchez-Vázquez, 2009).

### ***Dureza***

La dureza es la concentración de minerales en una determinada cantidad de agua, especialmente de calcio y magnesio (Lerga y O' Sullivan, 2008). Los peces necesitan estos iones, en especial el calcio, ya que es necesario para la osificación, la coagulación de la sangre y como sustancia de señalización (Koolman y Röhm, 2012). Además, puede influir en el sistema regulador del pH y producir patologías por déficit o exceso.

En el caso de utilizar, en acuarios de sistema cerrado, métodos amortiguadores de pH como bicarbonato de sodio (sin adición de sales de calcio o magnesio) o formas cristalinas de carbonato cálcico se deberá prestar atención a la variación de la dureza, aumentando o disminuyendo según lo que se haya adicionado. El origen del agua será otro factor a tener en cuenta, pues dependiendo de la naturaleza geológica del suelo y del área estos valores varían (Ministerio de medio ambiente, 2000). En el caso de utilizar agua destilada se deberán adicionar sales de magnesio y calcio para obtener los valores recomendados de 50-100 mg/ L (Avdesh *et al.*, 2012).

### ***Salinidad***

La salinidad es la medida de la concentración total de todos los iones disueltos en el agua. Para una correcta actividad celular y desarrollo de procesos fisiológicos es necesaria una homeostasis osmótica. En los vertebrados terrestres los mecanismos reguladores son principalmente los riñones, sin embargo, en los vertebrados acuáticos, las branquias son el órgano principal extrarrenal en la homeostasis iónica/osmótica.

Estos dos órganos presentan analogías. Los ionocitos de las branquias (responsables del transporte de varios iones) son similares a las células transportadoras del riñón de los mamíferos (Hwang y Chou, 2013).

El pez cebra al vivir en agua dulce es hiperosmótico con el medio, lo que significa que tiene una concentración de sales mayor en el interior celular que en el exterior, tendiendo a ganar agua y perder sales por difusión a través de la piel y las branquias. Gracias a los mecanismos osmorreguladores excretan orina diluida a la vez que transporta iones a la sangre a través de las branquias (Evans *et al.*, 2005; Lawrence, 2007).

Este proceso supone un costo energético reducible si se expone a su nivel óptimo de salinidad, 0.5-1 g/L. Una manera eficiente de monitorizar el total de sólidos disueltos en agua es valorando la conductividad electrolítica de la solución, suponiendo un rango de referencia de 300-1500  $\mu$ S (Avdesh *et al.*, 2012) y un valor óptimo, el más cercano a 500  $\mu$ S (Varga, 2011).

### ***Oxígeno disuelto***

El medio de los peces cebra debe contener una cantidad mínima de oxígeno para que el intercambio gaseoso con la sangre se pueda producir de modo adecuado. La cantidad demandada será dependiente del tamaño, actividad, temperatura y alimentación del pez cebra entre otros factores. Además, las condiciones de agua también afectarán a la cantidad de oxígeno, de modo que a mayor temperatura o a mayor cantidad de sales disueltas, disminuye la proporción de oxígeno disuelto disponible

Una cantidad mayor de 6.0 mg/L se considera óptima para un buen desarrollo vital (Avdesh *et al.*, 2012), aunque lo más conveniente es mantener los niveles de oxígeno próximos a la saturación (Lawrence, 2007).

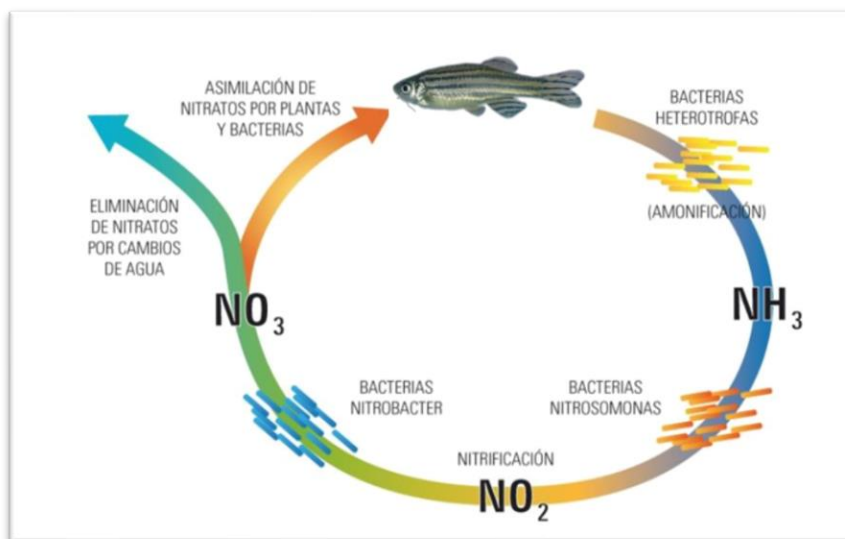
### *Nitratos, nitritos y amonio*

*Danio rerio* excreta amoníaco fundamentalmente a través de las branquias y, en menor medida, a través de los riñones y heces en forma de urea (Wilkie, 2002; Bucking *et al.*, 2013). Este compuesto también puede ser producido por descomposición de alimento no consumido o peces muertos. En la naturaleza, teniendo en cuenta el volumen de agua por pez y su disolución, el amoniaco no representa un problema, sin embargo, en los acuarios su presencia debe ser controlada, ya que puede causar lesiones en mucosas y epitelios, llegando a ser letal en casos graves (Varga *et al.*, 2011).

Para eliminar el amoníaco en sistemas de recirculación cerrada se utilizan dos géneros de bacterias: las *Nitrosomonas* y las *Nitrobacter*. Las *Nitrosomonas*, por la reacción química de oxidación, producen nitritos ( $\text{NO}_2$ ) a partir de amoniaco. Este compuesto sigue siendo tóxico, ya que no se ve influido por el pH del acuario y produce la transformación de hemoglobina en metahemoglobina dando como resultado metahemoglobinemia e hipoxia (Evans *et al.*, 2005; Revsbech *et al.*, 2006).

Las bacterias *Nitrobacter* oxidan el nitrito a nitrato ( $\text{NO}_3$ ). El nitrato es el menos tóxico de los compuestos nombrados y se eliminará por cambios de agua, aunque una parte lo asimilan plantas y bacterias. Otro paso que puede darse es la desnitrificación anaeróbica en el filtro o en el sustrato, produciendo gases tóxicos que deberían evitarse (Ilustración 4) (Roberts y Palmeiro, 2008; Revsbech *et al.*, 2006).

En conclusión, el agua de los acuarios de sistema cerrado deberá ser renovada periódicamente manteniendo bajos los niveles de amoniaco, amonio, nitrito y nitrato (Andrews *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2005; Varga, 2011).



**Ilustración 4.** Ciclo del Nitrógeno (<https://acuariosleuka.es/blog/?p=45>).

### **Densidad**

La densidad es un factor importante en la acuicultura. El hacinamiento puede causar estrés crónico, disminución de la tasa de crecimiento, cambios en la alimentación, comportamiento social y función inmunológica y, por lo tanto, repercutir negativamente en la salud del animal (Wilkie, 2002).

El pez cebra presenta gran diversidad en su comportamiento social dependiendo de la zona geográfica, variando su agresividad y preferencia de número de individuos (Ruhl *et al.*, 2009).

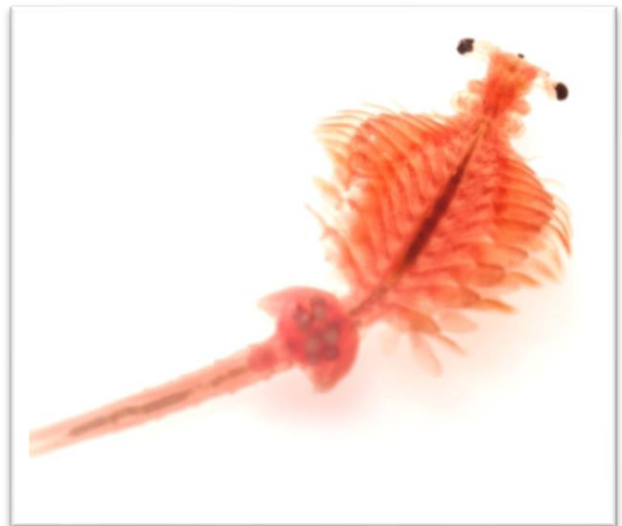
Pavlidis *et al.* (2013) relacionaron el cortisol en agua con el estrés y expusieron al pez cebra a diferentes situaciones estresantes. Los niveles de cortisol frente al hacinamiento aumentaron de 13 a 21 veces en comparación con los controles. Además, valoraron las preferencias que mostraban por los fondos del acuario. Se concluyó que el pez cebra adulto, en laboratorio, presenta menor estrés con fondos transparentes o negros y una densidad de 10 individuos por 2 litros de volumen de agua.

Otro dato relevante a tener en cuenta es que los peces expuestos a situaciones estresantes durante breves periodos de tiempo pueden mostrar valores elevados de cortisol de manera crónica, por lo que es importante evitar los factores estresantes lo máximo posible (Pavlidis *et al.*, 2013).

### **Alimentación**

*Danio rerio* es una especie a la que le gusta cazar, pues en libertad son depredadores. Se ha demostrado, analizando el intestino de 120 peces al mes durante 12 meses, que su dieta se basa en crustáceos bentónicos y planctónicos, gusanos, dípteros, hemípteros, himenópteros, coleópteros, larvas y huevos. Además, se encontraron filamentos de algas y fitoplancton (Spence *et al.*, 2007).

Se pueden alimentar con comida viva o comida industrial procesada. La comida procesada consiste en mezcla de materiales biológicos como pescado, subproductos del pescado, extracto de proteínas vegetales o cereales. La viva, sin embargo, la componen algunas especies de zooplancton, como *Artemia* (Ilustración 5).



**Ilustración 5.** Individuo de *Artemia* (<https://www.kobo.com/at/es/ebook/artemia-salina>).

*Artemia* es un género de crustáceos branquiópodos que viven en medios hipersalinos. Los huevos pueden transformarse en quistes cuando las condiciones no son favorables. Estos quistes son lo que se explotan para su comercialización, ya que al adicionarlos al medio se rehidratan, y junto con la iluminación y oxigenación eclosionan en 24 horas.

Es importante no sobrealimentar a los peces, así como desalar el alimento que se haya conservado en salmuera, como los camarones, para evitar un aumento de nitratos en el agua que pueda perjudicar la reproducción e incluso la viabilidad de los animales (Spence *et al.*, 2007; Avdesh, *et al.*, 2012).

Además de la dieta, en la optimización de la alimentación, también influyen parámetros como la frecuencia y la cantidad. Estos parámetros pueden tener gran repercusión en su aprovechamiento e influir en las tasas de crecimiento y producción de gametos (Lee *et al.*, 2005).

Por ello, es importante tener un buen protocolo, tanto si se alimentan hasta la saciedad como en función a su peso corporal.

Teniendo en cuenta los parámetros citados se podrá obtener una buena cría para los estudios de investigación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Condiciones óptimas del agua para el pez cebra (Adaptado Avdesh *et al.*, 2012).

| <b>Parámetro</b>            | <b>Rango óptimo</b>           |
|-----------------------------|-------------------------------|
| Alcalinidad                 | 50-150 mg/L CaCO <sub>3</sub> |
| pH                          | 7.3-7.5                       |
| Temperatura                 | 26-28.5°C                     |
| Dureza                      | 50-100 mg/L CaCO <sub>3</sub> |
| Amoniacó no ionizado        | <0.02 mg/L                    |
| Nitrato (NO <sub>3</sub> -) | <50 mg/L                      |
| Nitrito (NO <sub>2</sub> -) | <0.1 mg/L                     |
| Oxígeno disuelto            | >6.0 mg/L                     |
| Salinidad                   | 0.5-1 g/L                     |
| Conductividad               | 300-1500 µS                   |

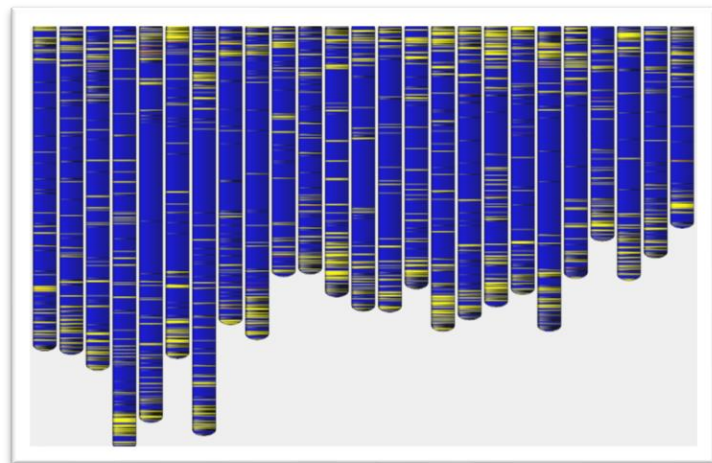
## 2.2.2 Genoma

Para el estudio de enfermedades genéticas humanas en el pez cebra ha sido necesario conocer y comprender su genoma. Gracias a la secuenciación de 26.000 genes se ha podido comparar y calcular que el 70% de genes humanos tienen por lo menos un gen ortólogo en esta especie y aumenta a un 82% si hablamos de genes ortólogos relacionados a enfermedades (Collins *et al.*, 2012; Howe *et al.*, 2013).

El proyecto de secuenciación genómica se inició en el año 2001 por Wellcome Trust Sanger Institute de Cambridge y en 2002 se publicó el primer borrador. Se inspiraron en la técnica “clon por clon”, utilizada en el genoma del ratón y del humano. El ensamblaje Zv9, de 1.412 gigabases (Gb), se ha originado a partir de la mezcla de técnicas de secuencia de clon terminada de alta calidad (83%) y secuencia escopeta de genoma completo (WGS)(17%). La primera consiste en fragmentar el genoma en grandes porciones y secuenciarlo a partir de pequeños clones superpuestos para posteriormente ordenarlos. Por otro lado, la WGS consiste en fragmentar aleatoriamente el ácido desoxirribonucleico (ADN), clonarlo y almacenarlo según su tamaño para su posterior secuenciación y ordenamiento mediante el mapa meiótico SATmap (Kasahara *et al.*, 2007; Howe *et al.*, 2013).

Finalmente, en este proyecto, estudiaron los genes codificantes de proteínas para obtener una descripción más completa. Utilizaron diferentes técnicas como la secuenciación de ADN complementaria de lectura corta de alto rendimiento o la generación de genes Ensembl (Vilella *et al.*, 2009; Howe *et al.*, 2013).

Actualmente en la secuencia GRCz11 (Genome Reference Consortium Zebrafish Build 11), realizada por Genome Reference Consortium (GRC) (Ilustración 6), se han incluido 1000 secuencias de clones terminadas y han resuelto más de 400 problemas de genoma. Por ello se le reconoce como el genoma de referencia del pez cebra, y se puede acceder gratuitamente mediante diversas plataformas como el National Center Biotechnology Information (NCIB) (Genome Reference Consortium, 2017).



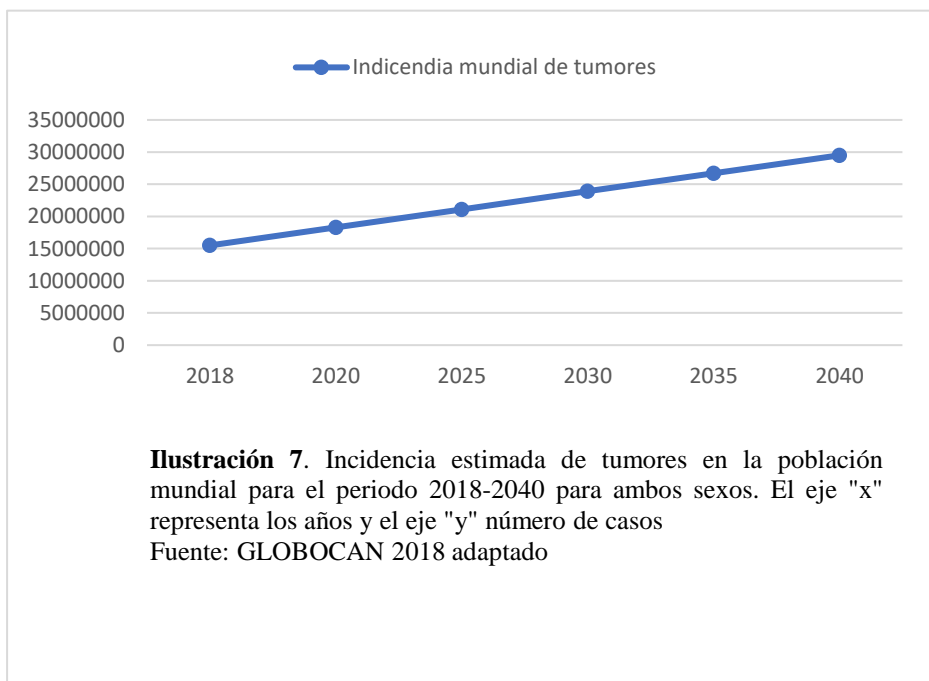
**Ilustración 6.** Figura que simula los 25 cromosomas del pez cebra, donde en azul se representa la secuencia terminada, en amarillo la secuencia escopeta y en negro los scaffolds (<https://www.sanger.ac.uk/science/data/zebrafish-genome-project>).

### 3. Pez cebra y cáncer

El término “cáncer” abarca una variedad de condiciones que tienen en común el crecimiento incontrolado y la proliferación de células huésped, frecuentemente en detrimento del hospedador. Se relaciona con desórdenes en los mecanismos genéticos que controlan el crecimiento o división y diferenciación celular. Por lo tanto, se puede considerar el cáncer como una enfermedad genética de células somáticas (Dobson y Duncan, 2014).

La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) sostiene que el cáncer constituye una de las causas principales de morbilidad y mortalidad del mundo. La incidencia, conforme a los datos obtenidos por el proyecto Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), está aumentando. En el 2012 se estimaron 14 millones de casos y en el 2018 está cifra se ha incrementado hasta 18.1 millones. En las próximas dos décadas se prevé, que estos valores sigan aumentando, llegando en 2040 a 29.5 millones (Ilustración 7) (SEOM, 2018).

Es por ello por lo que muchas investigaciones enfocan sus estudios hacia el conocimiento y tratamiento del cáncer.



Existen diferentes factores que determinan la aparición de una neoplasia como los factores genéticos y epigenéticos.



### **3.1 Factores genéticos:**

Los cambios producidos en las células tumorales son consecuencia de la disfunción de ciertos grupos génicos: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN. La combinación de estos tres grupos de genes se encarga de controlar los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Wogan *et al.*, 2004; Dobson y Duncan, 2014).

Los oncogenes promueven la proliferación y se activan en las etapas tempranas del desarrollo embrionario, pero su función se va atenuando a medida que el individuo se desarrolla. Si se alteran en estructura o expresión darán lugar a una activación sostenida independiente de estímulos de progresión del ciclo celular, aumentando la tasa de proliferación y manteniéndose en las células hijas. Solo es necesaria una mutación para que un oncogén pueda contribuir al desarrollo del tumor (Land *et al.*, 1983).

Los genes supresores de tumores realizan un control negativo sobre la proliferación de las células, deteniendo el ciclo celular o activando vías que den lugar a la muerte celular programada. Es necesario que se inactiven ambas copias, una por cada alelo, para que pueda desencadenar un tumor (Ferreira y Milán, 2015).

Los genes de reparación se encargan de reparar los daños que se puedan producir en el ADN como mutaciones puntuales, translocaciones, deleciones, amplificaciones o inversiones. De esta manera se mantiene la estructura y la integridad del ADN, y se verifica que se transmita en esas condiciones a la siguiente generación. Cuando esas alteraciones no puedan ser reconocidas o reparadas por los genes de reparación, las células tenderán a acumularlas y se transmitirán a la siguiente generación. Es necesario que los genes presenten dos mutaciones para que se induzca una neoplasia, como en el caso de los genes supresores de tumores (Herrera y Granados, 2013).

### **3.2 Factores epigenéticos:**

El proceso epigenético consiste en la modificación heredable del ADN o de las proteínas que afectan a la expresión de los genes o a la estructura de la cromatina sin afectar a la secuencia del ADN.

Estos cambios provocarán un aumento o una disminución de la expresión génica al facilitar o dificultar la unión de las proteínas encargadas de transcribir el gen. Tres ejemplos de estos factores podrían ser la metilación del ADN (grupo metilo unido a la citosina), modificación de las histonas o de la actividad de los micro-ARN (ácido ribonucleico). Estos cambios, a diferencia de las

mutaciones, sí pueden ser revertidos para restaurar la función de las vías de control de células malignas o premalignas. Además, el conocimiento de estos cambios del ADN supone una fuente de información para la detección, diagnóstico y pronóstico del cáncer (Jones y Baylin, 2002; Sapienza e Issa, 2016).

### **3.3 Proceso de la carcinogénesis:**

El proceso de carcinogénesis puede dividirse en iniciación, promoción y progresión. La iniciación consistiría en un cambio permanente y heredable del ADN. La promoción es un proceso reversible en el que se acumulan otras alteraciones y finalmente la progresión es cuando las células alteradas genéticamente crecen y proliferan invadiendo tejidos adyacentes y pudiendo desembocar en metástasis (Jones y Baylin, 2002).

### **3.4 Células tumorales:**

Las células tumorales presentan ciertas características comunes: capacidad ilimitada de proliferación, independencia de factores de crecimiento extracelulares, insensibilidad a señales que producirían la apoptosis, angiogénesis, capacidad de invasión, capacidad de evadir el sistema inmunitario y cambios metabólicos con preferencia por la glucólisis (Tabla 3).

**Tabla 3.** Capacidades adquiridas de células cancerígenas (Adaptado Dobson y Duncan., 2014).

| Aptitudes adquiridas                         | Ejemplo del mecanismo  |
|--|--|
| Autosuficiencia en señales de crecimiento    | Genes <i>ras</i> transmiten señales de estímulo desde receptores de crecimiento; proteínas ras hiperactivas mutantes se observan en el 25% de los cánceres humanos   |
| Insensibilidad a señales de anti crecimiento | Evasión de acciones de factor beta de transformación del crecimiento (TGF- $\beta$ ). Una sustancia que puede parar el crecimiento de células a través de la inactivación de receptores de superficie celulares o pérdida del gen <i>p15</i> |

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Potencial ilimitado de replicación | La activación de la enzima telomerasa confiere un fenotipo inmortal a las células cancerígenas |
| Angiogénesis sostenida             | Producción o inducción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)                 |
| Invasión de tejidos y metástasis   | Alteración de las moléculas de adhesión celular como las cadherinas e integrinas               |

### **3.5 Técnicas de inducción de tumores en el pez cebra**

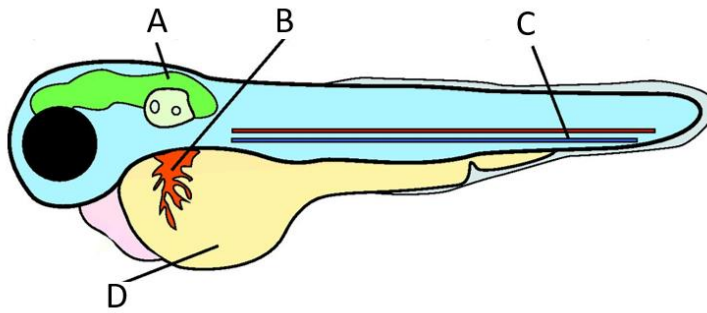
En los últimos años, ha habido un gran desarrollo en las técnicas para la inducción de tumores en pez cebra y gracias a ello, este modelo nos puede ayudar a entender las bases genéticas de la patogénesis del cáncer (Liu y Leach, 2011). Entre ellas se encuentran el xenotrasplante y técnicas de mutagénesis y transgénesis.

#### **3.5.1 Xenotrasplante**

Se define como el trasplante de células, tejidos u órganos de una especie a otra. El pez cebra se está utilizando como modelo para xenotrasplantes de células tumorales, proporcionando grandes oportunidades de estudio biológico y ensayos de tratamientos de neoplasias. Hay que tener en cuenta las limitaciones de esta especie, ya que al ser un animal poiquiloterma las líneas de cáncer humano pueden verse afectadas por la diferencia de temperatura (Brown *et al.*, 2017).

Realizar esta técnica en el pez cebra resulta sencilla. Al día pueden inyectarse cientos de embriones y gracias a su transparencia en etapas tempranas es posible observar la progresión *in vivo*.

Los lugares elegidos de aplicación del xenotrasplante para que pueda entrar en circulación, en embriones de 2-3 dpf, son los grandes conductos de Cuvier o mediante inyecciones pericárdicas e intracardiacas. Otros lugares de elección incluyen el saco vitelino al encontrarse cerca de vasos principales, la vena caudal o los ventrículos cerebrales (Ilustración 8). Los xenotrasplantes en peces adultos suponen un desafío mayor ya que el sistema inmune está desarrollado y puede rechazarlo, aunque mediante técnicas inmunosupresoras (líneas o tratamientos) pueden ser factibles (He *et al.*, 2012; Mizgirev *et al.*, 2018).



**Ilustración 8.** Lugares de aplicación de xenotrasplante más frecuentes: ventrículo cerebral (A), conducto de Cuvier (B), vena caudal (C) y saco vitelino (D) (Veinotte *et al.*, 2014)

Esta técnica se ha utilizado en estudios sobre el melanoma, donde mediante xenoinyección en el pez cebra de melanocitos metastásicos se ha evaluado la supervivencia, proliferación y migración (Lee *et al.*, 2005). Por otro lado, en tumores de próstata, mama, páncreas, colón y sarcomas se ha demostrado la correlación entre la capacidad de invasión de las células *in vitro* con el potencial metastásico de las células tumorales en el pez cebra vivo (Teng *et al.*, 2013).

### 3.5.2 Mutagénesis y transgénesis

La mutagénesis consiste en la producción de mutaciones, entendiendo “mutación” como la modificación en la secuencia de nucleótidos del ADN. Sin embargo, la transgénesis, se conoce como el proceso de transferir ADN extraño o también denominado transgen (Feitsma y Cuppen, 2008; Gong *et al.*, 2010).

#### 3.5.2.1 Aleatorias

Se trata de cambios aleatorios en la secuencia genética de un gen previamente clonado. De esta manera se obtienen variantes del gen que codifican secuencias de aminoácidos diferentes. Posteriormente se podrá seleccionar aquellos que contengan las variantes que se deseen para el estudio biomédico.

#### ***Mutagénesis por químicos:***

El mutágeno más utilizado en el pez cebra ha sido N-etil-N nitrosourea (ENU). Gracias a él se han identificado miles de mutantes por sus fenotipos en el desarrollo embrionario (Driever *et al.*, 1996). Los genes mutados pueden identificarse mediante diferentes técnicas como la

secuenciación del genoma completo de baja cobertura, secuenciación de mapeo rápido de la secuenciación del genoma completo, por medio del análisis del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), análisis basado en segregantes en masa y mapeo de homocigosidad (Varshney y Burgess, 2013).

Además, se han realizado la mutagénesis inversa con ENU, es decir, se han producido mutaciones en un sitio conocido para posteriormente valorar los fenotipos producidos. Entre las técnicas utilizadas para identificar estas mutaciones se encuentra TILLING (*targeting induced local lesions in genomes*, traducible a inducción dirigida de lesiones locales en el genoma) (Bruijn *et al.*, 2009).

### ***Transgénesis retroviral:***

La transgénesis retroviral se creó como una alternativa a los productos químicos. Esta técnica se basa en la inserción de plásmidos de ADN lineal o circular o cromosomas artificiales en huevos fertilizados, pudiendo producir una pérdida de función. Para crear una línea hay que tener en cuenta que la transmisión a la primera generación es baja y este ADN, a veces, se vuelve susceptible a la metilación y silenciamiento (Stuart *et al.*, 1988; Culp *et al.*, 1991).

### ***Transgénesis mediada por transposón***

Se denomina transposón a una secuencia de ADN que puede moverse a diferentes partes del genoma. El transposón Tol2 se identificó por primera vez en el pez *Orizias latipes* y se comprobó que se encontraba activo (Kawakami *et al.*, 2004, Kawakami, 2007).

En experimentos anteriores al descubrimiento del transposón Tol2, por ejemplo, el de Amsterdam *et al.* (1995), al inyectar una secuencia de ADN en huevos fertilizados del pez cebra se observó que el ADN no se integraba en el genoma y quedaba como ADN cromosómico extra.

Por el contrario, Fisher *et al.* (2006) comprobaron la eficacia del transposón Tol2 por medio de la expresión de GFP (proteína verde fluorescente), dando como resultado una expresión de GFP en todo el cuerpo del pez cebra (Fisher *et al.*, 2006) y demostrando su integración en el ADN.

Por lo tanto, el Tol2 se ha convertido en una de las principales herramientas genéticas para la transgénesis en el pez cebra dada la facilidad con la que se integra en el genoma a través de la transposición abriendo muchas posibilidades de transgénesis (Ni *et al.*, 2016).

### 3.5.2.2 Con objetivo

Son cambios en lugares concretos del ADN que se desea estudiar.

#### *Nucleasas con dedos de zinc (ZFN, del inglés zinc-finger nucleases)*

Las ZFN son enzimas de restricción artificiales que, como su nombre indica, se componen de dedos de zinc y de nucleasas.

Los dedos de zinc son pequeños péptidos que contienen iones de zinc unidos a algunos aminoácidos. Sus funciones son: la estabilización o activación (mediante el plegamiento) de las proteínas y la interacción específica con el ADN y el ARN. Y las enzimas utilizadas son endonucleasas de restricción, capaces de reconocer y cortar el ADN en un punto concreto. La más utilizada es la endonucleasa FokI, procedente de la bacteria *Flavobacterium okeanoikoites* (Gaj *et al.*, 2013).

Como resultado las ZFN son una herramienta génica capaz de reconocer específicamente regiones del ADN y de cortarlo mediante la nucleasa (Hansen *et al.*, 2012).

Actualmente, se le considera una técnica costosa y lenta en comparación con otras (Ata *et al.*, 2016).

#### *TALEN (transcription activator-like effector nuclease, traducible a “nucleasa de actividad similar a activador de transcripción”)*

TALEN se compone de un dominio de unión al ADN o “TAL” y de un dominio de corte.

Los efectores TAL son proteínas que forman unidades capaces de reconocer los sitios diana de ADN. Presentan 33-34 aminoácidos donde los puestos 12 y 13 son variables. Esa variabilidad determina el nucleótido específico al que se unirán. A esta proteína se le fusiona un dominio catalítico como la enzima FokI.

Esta combinación puede dirigirse a prácticamente cualquier secuencia de genoma y supone un gran avance en la genética (Boch *et al.*, 2011).

#### *CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, traducible a “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas.”) /Cas (CRISPR associated system traducible a “sistema asociado a CRISPR”)*

El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo adaptativo de las bacterias y arqueas que les confiere resistencia hacia virus y plásmidos invasores. CRISPR son loci de ADN bacteriano (con

repeticiones cortas de secuencias de bases) y segmentos de ADN espaciador (provenientes de virus), y Cas son genes que se encuentran asociados a esas regiones y codifican para proteínas endonucleasas y helicasas (Ata *et al.*, 2016).

Ante la presencia de un ADN viral son capaces de incorporar fragmentos en los loci CRISPR. Y mediante el ARN CRISPR guían la degradación de posibles secuencias homólogas mediante las proteínas Cas (Hwang *et al.*, 2013).

Recientemente se ha demostrado que este sistema de CRISPR/Cas de bacterias y arqueas se puede usar como una herramienta de edición de genoma ya que agrega, interrumpe o cambia secuencias de genes específicos (Weinberger y Gilmore, 2012).

### **3.6 Estudios relevantes:**

Los modelos de cáncer en el pez cebra han demostrado la conservación de los mecanismos involucrados tanto en la iniciación como en la progresión de tumores. Además ha permitido experimentar posibles tratamientos individualizados (Patton *et al.*, 2005).

Su uso como modelo se ha extendido enormemente en los últimos años, encontrándose en multitud de estudios, por lo que a continuación se han recopilado las investigaciones sobre la proteína 53 (estrechamente relacionada con la carcinogénesis) y las neoplasias más relevantes por éxito de su reproducción en el pez cebra y número de estudios realizados. Estos estudios constituyen ejemplos emblemáticos del potencial que está demostrando este organismo para avanzar en el conocimiento de distintos tipos de cáncer y evaluar posibles tratamientos.

#### **3.6.1 Proteína 53 (p53)**

La p53 es una proteína codificada por el gen *p53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Contiene 393 aminoácidos, con una masa de 53 kiloDalton, y tiene 4 dominios estructurales y funcionales. El extremo NH<sub>2</sub>-terminal participa en los mecanismos de activación de la transcripción, el extremo COOH-terminal participa en el proceso de tetramerización de la p53, el dominio central en la unión del ADN y un último dominio es regulador (Marchal *et al.*, 2006).

Esta proteína es un importante factor de transcripción que se localiza en el núcleo de las células y regula alrededor de 500 genes dianas controlando, por lo tanto, numerosos procesos celulares

como: la detención del ciclo celular, la senescencia de las células, la reparación del ADN, la adaptación metabólica y la muerte celular (Espinosa *et al.*, 2005; Aubrey *et al.*, 2017).

Mediante la inducción de la muerte celular, p53 evita la acumulación y permanencia de lesiones en el ADN que pueden derivar en una transformación neoplásica (Aubrey *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que el 50% de los tumores humanos presentan mutaciones en el gen *p53*. Estas neoplasias se asocian con una progresión rápida y resistencia a los tratamientos anticancerígenos. Por esta razón, se están estudiando terapias génicas con el fin de introducir el gen *p53* en células cancerosas o restaurar la estructura o función de la proteína con quimioterapia (Malkin, 2011; Ignatius *et al.*, 2018). La *p53* humana presenta un gran parecido con la del pez cebra, compartiendo el 48% de la secuencia de aminoácidos (Cheng *et al.*, 1997).

A pesar de que la acción supresora de tumores de *p53* es evidente, todavía no se ha definido el mecanismo concreto. Se ha demostrado que peces cebra sin efectores de la apoptosis, detención del ciclo y senescencia inducida por *p53* no desarrollan tumores espontáneamente. Y peces cebra con una delección completa del gen *p53* sí desarrollan tumores de forma espontánea. Por lo que, a pesar de la importancia de estos tres mecanismos, no resultan determinantes en la supresión de tumores (Issaeva, 2019).

Su función proapoptótica en pez cebra fue demostrada observando que la muerte celular en peces expuestos a estímulos que dañan el ADN era mucho mayor en los ejemplares en los que la *p53* había sido silenciada mediante oligonucleótidos antisentido, conocidos como morfolidos. Estas moléculas están diseñadas artificialmente para unirse al ARN y bloquear la traducción. También se demostró su papel conservado en el ciclo celular y su función como supresor de tumores (Berghmans *et al.*, 2005).

Numerosos investigadores han enfocado sus estudios en comprender la relación de la *p53* con el desarrollo de ciertas neoplasias utilizando el pez cebra.

En concreto Patton *et al.* (2005) demostraron que las mutaciones en el gen *BRAF* y las mutaciones en las vías *p53* participan en la formación de los melanomas. En el caso del rhabdomyosarcoma también se ha evidenciado que ante valores elevados de inhibidores de la vía *p53*, diversos mutantes presentan mayor incidencia de desarrollo de cáncer, al igual que en humanos (Langenau *et al.*, 2007).

Por otro lado, el crecimiento espontáneo de ciertos tumores, ante la delección de *p53*, ha abierto un abanico de oportunidades para su estudio. Incluso de algunos que hasta ahora no presentaban



modelo de estudio vivo como: tumores de vaina del nervio periférico o schwannomas, angiosarcomas, tumores de células germinales y leucemia.

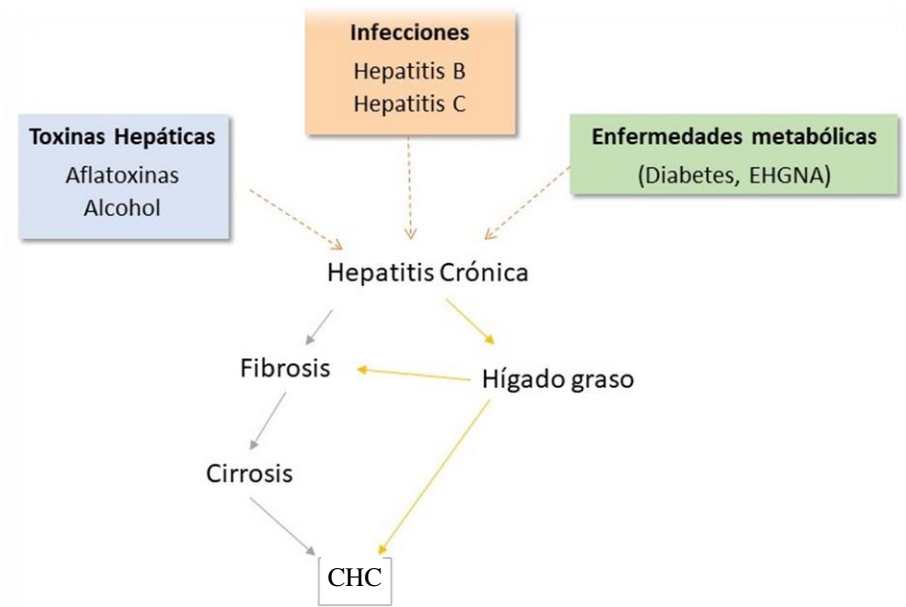
En futuros estudios es probable que se estudie en el pez cebra la relación de la progresión metastásica con esta proteína, además de las vías de autorrenovación de células madre del cáncer y la expresión de genes de diferentes tumores. Todo ello debido a las facilidades que muestra el pez cebra en la realización de técnicas, la visualización y la posibilidad de cuantificación *in vivo* (Ignatius *et al.*, 2018).

### 3.6.2 Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un tumor epitelial maligno que se origina a partir de los hepatocitos.

Estas células sufren una transformación tumoral en varias etapas. La primera etapa suele ser una agresión de los hepatocitos causada por: el alcohol, virus de la hepatitis B y C, una esteatohepatitis o la hemocromatosis (Ilustración 9).

Estas agresiones producen fibrosis o cirrosis y pueden desencadenar en un fenómeno de carcinogénesis debido a: inflamación, ciclos repetidos de necrosis, apoptosis y proliferación compensatoria (Farazi y Depinho, 2006).



**Ilustración 9.** Resumen con los factores de riesgo más importantes de CHC.

Esta relación es evidente ya que en el 80-90% de autopsias de personas con CHC, éstas presentan también cirrosis (Herrera y Granados, 2013)

En los pacientes sin cirrosis, los principales factores de riesgo serán un historial familiar de CHC, exposición a la Aflatoxina B1 o tabaco, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, adenomas y virus (Martínez *et al.*, 2016).

El diagnóstico se realiza mediante pruebas de imagen como la resonancia magnética (RM), tomografía computarizada (TC) o por biopsia. La biopsia dirigida con aguja se asocia a alto riesgo de sangrado y siembras de células cancerígenas en otros lugares, por lo que ante unas imágenes concluyentes la biopsia preoperatoria se evita y se realizará una biopsia dirigida por ultrasonografía en caso de cirugía (Herrera y Granados, 2013)

La clasificación del CHC más utilizada actualmente es la propuesta por el equipo multidisciplinar del Hospital Clínico de Barcelona “*Barcelona Clinic Liver Cancer*” (*BCLC*). Anteriormente las clasificaciones se basaban en el tamaño o número de tumores, compromiso ganglionar y metástasis, pero la *BCLC* incluye factores tumorales como la función hepática basal y la capacidad funcional del paciente. Posteriormente se elegirá un tratamiento acorde a cada presentación (Martínez *et al.*, 2016).

Las opciones de tratamiento son: la resección quirúrgica, trasplante de hígado, ablación por radiofrecuencia, embolización arterial hepática para disminuir el aporte sanguíneo, radioterapia, quimioembolización arterial, tratamiento sistémico o inhibidores orales multicinasa como Sorafenib o Regorafenib (Armengol *et al.*, 2018).

Según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) la incidencia de CHC varía dependiendo de la región geográfica. Extremo oriente y África subsahariana presentan mayor incidencia que los países del área mediterránea ya que son áreas con una prevalencia alta del virus de la hepatitis B y C. En países de occidente nos encontramos una menor prevalencia, relacionada principalmente con esteatopatías, donde España tiene una incidencia aproximada de 3000 casos anuales (AECC, 2018a).

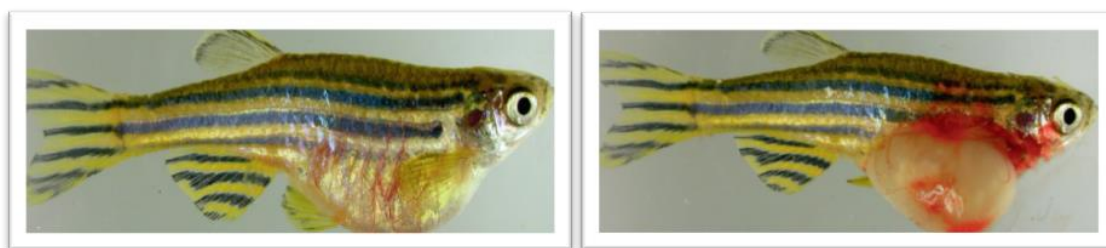
El pez cebra está adquiriendo mucha importancia como modelo en el estudio del CHC debido a que histológicamente su hígado es similar al de los mamíferos y conservan muchos mecanismos de desarrollo, regeneración y oncogénesis. Además, este modelo permite grandes tamaños de muestra debido a su alta fecundidad y bajo coste de alojamiento, imágenes *in vivo* de la hepatogénesis y, junto con los avances en edición genómica y secuenciación, abre un mundo de posibilidades de estudio (Wrighton *et al.*, 2019).

Actualmente se están investigando las mutaciones genéticas y los cambios epigenéticos que

puedan tener relación con el CHC humano y el estudio molecular de la organogénesis hepática. Dos de las mutaciones más comunes encontradas en el carcinoma hepatocelular fueron la de la telomerasa transcriptasa inversa (47-60% de los casos de CHC) y de la p53 (30% de los casos de CHC). En los casos más agresivos de CHC se encontraron mutaciones en el gen conocido como “ubiquitina que contiene dominios de dedo PHD y RING” (regulador de la metilación del ADN) (Storer y Zon, 2010; Mudbhary *et al.*, 2014; Llovet *et al.*, 2015).

Por otro lado, entre los cambios epigenéticos identificados nos encontramos los remodeladores de cromatina. Estos remodeladores acaban formando complejos que regulan la expresión de los genes (Shain y Pollack, 2013; Llovet *et al.*, 2015).

Para desarrollar el CHC en este animal se utilizan técnicas como ZFN, TALEN o CRISPR/Cas (Ilustración 10 y 11). Finalmente, para potenciar el desarrollo del tumor se pueden utilizar medios deficientes de p53 o tratamiento químico de 7, 12-dimetil-1,2-benzatraceno (Gaj *et al.*, 2013).



**Ilustración 10 y 11:** El mismo ejemplar de pez cebra con un carcinoma hepatocelular. En la derecha se ha expuesto el tumor abriendo la cavidad celómica (Mizgirev *et al.*, 2018).

### 3.6.3 Melanoma

El melanoma es un cáncer de piel que surge cuando la célula responsable de la producción de la melanina padece una transformación maligna que causa una proliferación celular de manera descontrolada.

Esta célula, el melanocito, forma parte de las células derivadas de la cresta neural que se forma durante la etapa de desarrollo embrionario. Desde la cresta neural migra hacia la epidermis y se encuentra entre la dermis y la epidermis. Tienen apariencia dendrítica y su principal función es producir y secretar el pigmento melánico llamado melanina. La melanina da color a la piel y sirve principalmente para protección solar (Bologna *et al.*, 2019).

El primer caso de melanoma se documentó el 1787 en un paciente donde se observaron depósitos secundarios en el cuello (Murphy *et al.*, 1996). La etiología precisa del melanoma es desconocida, aunque se identifican como factores de riesgo principales la exposición a la luz solar o radiación ultravioleta, presencia de xeroderma pigmentoso, antecedentes familiares y tipo de piel. Piel de

colores más claras, cabello rubio o pelirrojo o presencia de pecas presentan un riesgo mayor (Lavanderos *et al.*, 2010).

Para la estadificación del melanoma se utiliza el sistema TNM (tumor-nódulo-metástasis) del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*). En este sistema se tiene en cuenta el estado del tumor primario y la presencia o ausencia de metástasis ganglionar o a distancia (Bartlett y Karakousis, 2015).

Para pronosticar los melanomas de estadio I y II se valora el nivel de profundidad mediante la medición del grosor en milímetros (Breslow, 1970), la ulceración, el índice mitótico y otros factores como la edad (a mayor edad peor pronóstico), localización, patrón de crecimiento y lesiones satélite.

En el estadio III se valora el número de ganglios afectados y la micrometástasis frente a macrometástasis ganglionar y metástasis intralinfáticas. Además, se valora la ulceración de la lesión primaria y la edad del paciente.

Finalmente, en el estadio IV se valora la localización de las metástasis, número de localizaciones metastásicas, elevaciones de LDH sérica y otros factores como el estado general y edad (Espinosa *et al.*, 2005).

El tratamiento consistirá principalmente en la extirpación quirúrgica y linfadenectomía, inmunoterapia y radioterapia (Herrera y Granados, 2013).

Una ventaja de los peces cebra como modelo de estudio de melanomas es que la distribución de los melanocitos en la hipodermis es muy similar a la que encontramos en la capa basal epidérmica en los humanos (Ilustración 12). Sin embargo, en otros animales que se usan frecuentemente para estudios, como los roedores, los melanocitos se concentran principalmente en los folículos del pelo (Kelsh., 2004; Logan *et al.*, 2006). Otra razón es la facilidad de identificación de patrones de pigmentación, tanto en embriones como en larvas, debido a la transparencia óptica y su rápido desarrollo extrauterino (Parichy, 2007; Booterabi *et al.*, 2017).

Kaufman (2016) describe el gran avance en la comprensión del melanoma y en el desarrollo de tratamientos específicos obtenido en los últimos años gracias al uso del pez cebra como modelo.

Si el melanoma se identifica y se trata en sus primeras fases (mediante escisión) la probabilidad de cura es muy alta (>90%). Sin embargo, en los casos donde se identifican metástasis la tasa de



**Ilustración 12.** En la parte de arriba se ve a un pez cebra normal y en la parte de abajo a un pez cebra con una lesión oscura que corresponde a un melanoma (Hughes., 2011).

supervivencia baja radicalmente, tratándose normalmente de meses (Lo y Fisher, 2014). Hasta el 2011 solo 2 métodos estaban aprobados en Estados Unidos para tratar melanomas: quimioterapia con dacarbazina, que no resulta muy efectiva a largo plazo e interleuquina-2 (IL2), un modificador de respuesta biológica (Rosenberg, 1994; Serrone *et al.*, 2000).

Recientemente se ha revolucionado el mundo de tratamientos de melanomas, con dos nuevas vías estudiadas en los peces cebra: por un lado, los inhibidores de la tirosina quinasa actuando sobre la proteína BRAF (proteína implicada en el crecimiento de las células) y después con un inhibidor MEK (gen que actúa junto con BRAF). Por otro lado, se está investigando el tratamiento con anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos activan los linfocitos en tejidos periféricos y bloquean vías de señalización celular e inhiben el crecimiento del tumor (Robert *et al.*, 2011).

Además, se está avanzando en la comprensión de la patogenia de esta neoplasia. Por ejemplo, Patton *et al.* (2005) generaron el primer modelo de cáncer dependiente del gen *BRAF* en el pez cebra, y demostraron la alta relación entre la proteína BRAF y el melanoma.

### **3.6.4 Leucemia**

La leucemia se define como la proliferación neoplásica de células, linfoides o no linfoides, en la médula ósea. Su clasificación se realiza dependiendo de la línea celular de la que provienen, pudiendo ser linfoides (linfocitos) o mieloides (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos/monocitos y linfocitos). Además, en base a su comportamiento en el tiempo podrán ser agudas o crónicas. Las agudas se comportan agresivamente y se observan células inmaduras en medula ósea mientras que las crónicas tienen un progreso más lento y las células predominantes están bien diferenciadas (Baeten y Jong, 2018).

La leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) son enfermedades malignas. Sus orígenes se encuentran en una célula hematopoyética multipotencial que se caracteriza por la proliferación clonal de células blásticas anómalas en la medula ósea afectando a la producción normal de células. Esto puede dar como resultado anemia y trombocitopenia.

Presentan variantes, con características citológicas y genéticas diferentes y en ocasiones con rasgos clínicos característicos. En adultos, la incidencia de LMA (80%) es mucho más común que LLA y en la infancia es lo contrario (Lassaletta, 2016).

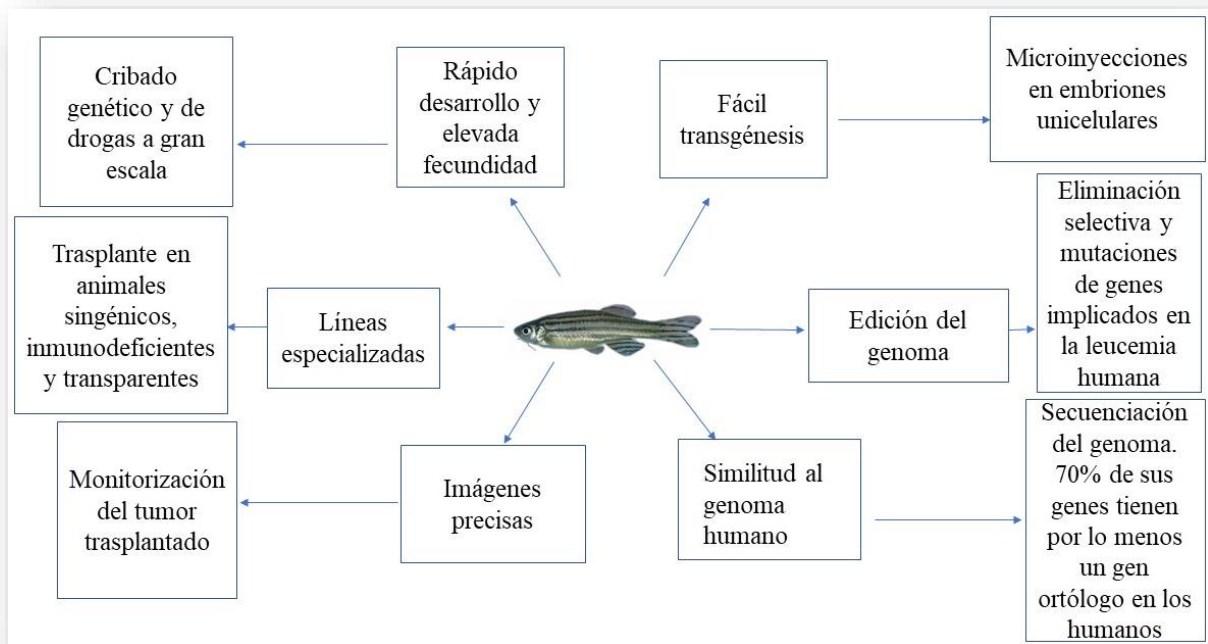
Se suelen asociar a cambios citogenéticos, aunque pueden desarrollarse en pacientes con anomalías hereditarias. Los agentes causantes potenciales son la radiación a dosis altas, exposición al benceno, tratamientos de otros cánceres con agentes alquilantes u otras drogas (arsénico, cloranfenicol), entre otros.

El diagnóstico se realiza mediante análisis morfológico, inmunobiológico (citometría de flujo y reacción de la polimerasa), citogenético (número total de cromosomas y estructura) y molecular mediante el aspirado de la médula ósea.

El tratamiento consta de una primera fase de quimioterapia, llamada inducción de la remisión, es decir, lograr que no haya células leucémicas en la médula ósea, y un tratamiento post-remisión como la quimioterapia, autotransplante o alotransplante (Herrera y Granados, 2013; Lassaletta, 2016).

A la hora de estudiar la leucemia en el pez cebra es importante destacar que la linfematopoyesis de los peces se realiza fundamentalmente en el riñón y bazo, en vez de en la médula ósea, ya que carecen de ella. A pesar de que difieran en el lugar de linfematopoyesis, este proceso está genética y molecularmente conservado. Además, los linajes celulares, vías de señalización y regulación son similares (Paik y Zon, 2010).

Elegir la línea adecuada de pez cebra para estas investigaciones es fundamental. Para poder trasplantar tumores sin provocar una inmunosupresión previa se escogen líneas mutantes como rag2 (poseen número reducido de células T y B) o mutantes hipomórficos c-myb (sabiendo que el gen myb es crucial para el crecimiento, supervivencia y diferenciación de células hematopoyéticas). Además, la elección de líneas transparentes como Casper o transgénicos fluorescentes permiten la visualización de las células *in vivo*, reduciendo el coste y facilitando el estudio (Ilustración 13) (Teng *et al.*, 2013; Kaufman, 2016; He *et al.*, 2017).



**Ilustración 13.** Ventajas del pez cebra como modelo de estudio de la leucemia (Adaptado de Baeteng y Jong, 2018).

Desde que Langenau (2003) consiguió reproducir la LLA de células T en el pez cebra hasta este momento, se han generado diversidad de tumores hematopoyéticos malignos como: la LLA de células B, neoplasias mieloproliferativas, síndrome displásico y LMA.

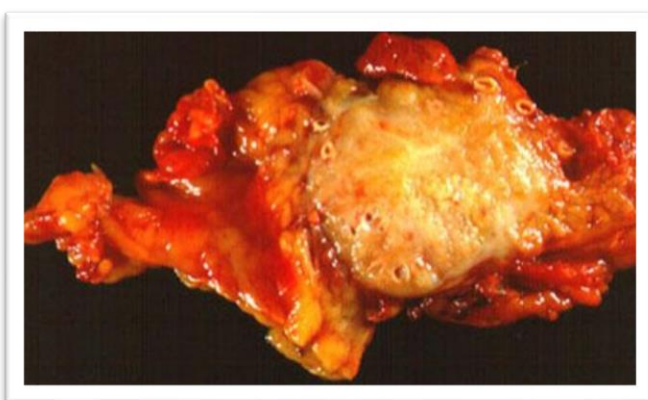
Algunos de los resultados de las investigaciones más relevantes son: la importancia de la vía de la proteína quinasa B (AKT) en el desarrollo de LLA de células T, siendo AKT una proteína que promueve la supervivencia celular, su relación con mTOR (proteína relacionada con la multiplicación y supervivencia de las células) y la comprensión de la evolución clonal de las células malignas (Blackburn y Langenau, 2014). Además, Blackburn y Langenau (2014) demostraron que cuando AKT está activada el tratamiento con dexametasona no es efectivo.

El uso del pez cebra como modelo de estudio da la posibilidad de conocer vías moleculares desconocidas de la enfermedad, valorar la proliferación, diseminación e interacción de las células tumorales.

Permite, por otro lado, desarrollar terapias específicas trasplantando células leucémicas de pacientes y estudiando la evolución, pudiendo valorar el efecto de diferentes tratamientos hasta conocer el óptimo en cada caso (Rasighaemi *et al.*, 2015; He *et al.*, 2017).

### 3.6.5 Cáncer pancreático

El cáncer pancreático es una de las neoplasias con peor pronóstico. No es un tumor frecuente, y suele afectar a edades avanzadas. Ocupa tan solo un 2.1% de los cánceres diagnosticados, pero su incidencia va en aumento desde hace 50 años. En España se registran 4000 casos anuales, según datos de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) (AECC, 2018b)



**Ilustración 14.** Adenocarcinoma pancreático de un paciente que desde la resección sobrevivió un año (Tomislav, 2019)

Este cáncer se puede clasificar de dos maneras: por apariencia general (sólida o quística) o por el patrón celular predominante (ductal, acinar o endocrino). Dentro de los sólidos nos encontramos el adenocarcinoma ductal pancreático (90% de los tumores pancreáticos), neoplasias neuroendocrinas, carcinomas de células acinares y blastomas pancreáticos.

La mayor parte de los tumores pancreáticos son carcinomas exocrinos (95%) y de esos un 85% son adenocarcinomas localizados, en un 60% de casos, en la cabeza del páncreas (Gupta, *et al.*, 2017).

Existen diversos factores de riesgo del cáncer de páncreas, pero los principales son: el tabaquismo (duplicando el riesgo), la obesidad, la pancreatitis crónica, enfermedades crónico-degenerativas (como diabetes mellitus) y factores hereditarios. Se ha demostrado que personas con dos parientes de primer grado que hayan padecido cáncer pancreático presentan un riesgo moderado y con más de tres el riesgo es elevado.

El adenocarcinoma pancreático, el más común, se desarrollada a partir de mutaciones genéticas sucesivas en el epitelio ductal pancreático. Los genes que más frecuentemente se han visto mutados son: *KRAS* (90%), *p16* (95%), *p53* (50-75%) y *SMAD4/DPC4* (55%) (Maitra y Hruban, 2008; Barone *et al.*, 2016).

En el diagnóstico es importante una buena anamnesis y examen físico, pero será indispensable la evaluación por imagen. Además, la valoración de marcadores tumorales como la proteína CA 19-9 resultan de utilidad. Esta proteína es sintetizada por células ductales pancreáticas, biliares y epitelios gástricos, colónicos, endometriales y salivales. Resulta muy sensible, ya que se elevan en un 90% de los casos de cáncer pancreático, pero poco específico, ya que la elevación del marcador tumoral CA 19-9 puede deberse a otras razones como ictericia obstructiva o pancreatitis crónica (Kim *et al.*, 2004).

La TC presenta una sensibilidad de 89-97% para tumores mayores de 15 milímetros. En cambio, la RM es más eficaz para valorar lesiones menores de 1 centímetro y existen otros métodos como el ultrasonido endoscópico o la tomografía por emisión de positrones (PET) o la laparoscopia. Para su estadiaje se utilizará el sistema TNM (Herrera y Granados, 2013).

El único tratamiento con potencial curativo sería la cirugía (Ilustración 14), pero al diagnosticarse en etapas avanzadas, menos del 20% son candidatos a ella y en el 70% de los casos los márgenes quirúrgicos son positivos. Se estima que tras una resección completa el 30% no supera los 5 años de vida (Godoy *et al.*, 2018).

Esta tasa de supervivencia se está manteniendo por debajo de los 5 años, a pesar de los estudios y avances tecnológicos. El pez cebra ha abierto la posibilidad de poder conocer mejor la biología de este cáncer e identificar posibles dianas terapéuticas para así poder mejorar esa tasa (Vaquero y Castells, 2013).



El cáncer pancreático en pez cebra se intentó inducir mediante mutagénesis aleatoria pero solo un 2% de los peces cebra lo desarrollaban. Actualmente, se ha conseguido mejorar enormemente su reproductividad gracias al avance de las técnicas como la transgénesis mediante transposones, xenotrasplante o la mutación del gen KRAS en células pancreáticas, involucrado en señalización, crecimiento, maduración y muerte celular (Stoletov y Klemke, 2008; Liu y Leach, 2011; Hwang *et al.*, 2016).

Gracias al modelo de Park y Leach (2018) que expresa el gen KRAS temporalmente se ha podido controlar la gravedad de diferenciación de las células pancreáticas oncogénicas originando un posible modelo experimental preclínico para tratamientos. Este avance se ha conseguido mediante la combinación de técnicas que permiten controlar la expresión génica espacial y temporalmente (Park y Leach, 2018).

### **3.6.6 Rbdomiosarcoma**

Los sarcomas son tumores de origen mesenquimal que pueden aparecer en cualquier tejido blando del cuerpo como la grasa, músculo, tejido conjuntivo o nervios. Se conocen más de 30 tipos y se agrupan según las características histológicas. El rbdomiosarcoma es un tumor maligno del músculo estriado y es el sarcoma de tejidos blandos más frecuente en niños y adolescentes menores de 20 años (Ognjanovic *et al.*, 2009; Hayes y Langenau, 2016).

No se conoce un agente causal claro, pero sí múltiples factores concomitantes como mutaciones, por ejemplo, en la p53. Los factores de riesgo descritos incluyen síndromes hereditarios, uso de radioterapia frente a otros tumores, ciertos carcinógenos químicos, el linfedema crónico o causas infecciosas (Herrera y Granados, 2013).

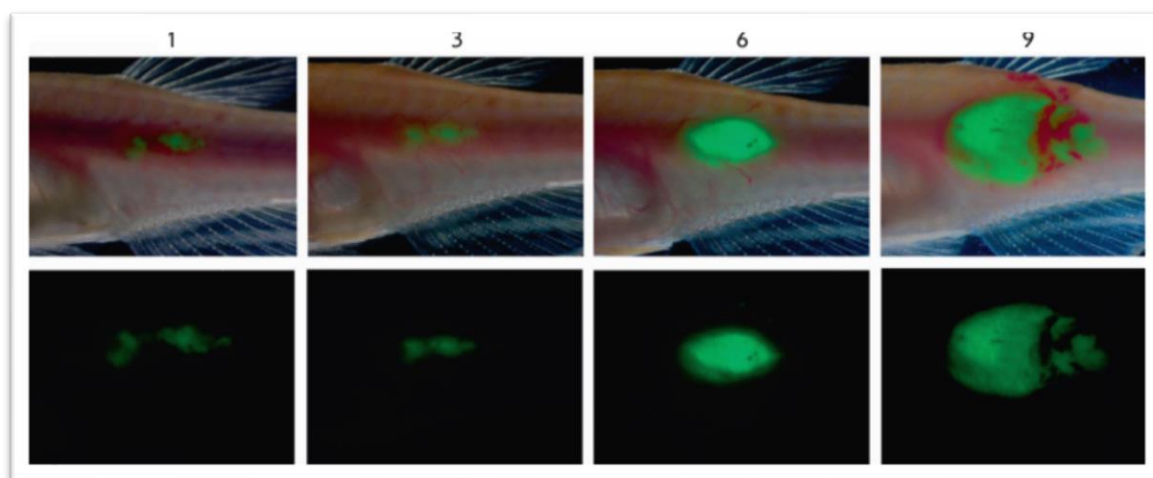
El diagnóstico en adultos se basa en el análisis de una biopsia del tumor primario, ganglios linfáticos y zonas sospechosas. Entre las pruebas para su diagnóstico se incluye la prueba inmunohistoquímica, microscopía óptica y electrónica, análisis citogenético, hibridación *in situ* o citometría de flujo. Además el diagnóstico por imagen con TC o RM será útil a la hora de acotar el tumor y determinar la posible presencia de metástasis (Herrera y Granados, 2013).

Dependiendo del caso el tratamiento puede ser la cirugía (microcirugía de Mohs, escisión local amplia, amputación y/o linfadenectomía), radioterapia (externa o interna) o quimioterapia. El 40 % de los casos presentan recaídas continuas y la esperanza de vida una vez metastatiza a pulmón no supera los 5 años (Herrera y Granados, 2013).

El uso del pez cebra como modelo se está mostrando especialmente útil para el estudio del rhabdomyosarcoma embrionario (RSME), originado en las células musculares embrionarias, que en esa especie presenta una conservación muy alta con el RMSE humano. Se consiguió reproducir por medio de la inducción del gen *KRAS* bajo el control de un fragmento que regula el inicio de la transcripción, conocido como promotor. Entre los fragmentos promotores se encuentran: el gen activador de la recombinación 2 (*rag2*), la cadherina 15 (*cdh15*) o la cadena ligera de miosina 2 (*myl2*).

La creación de estos tres modelos buscaba encontrar el origen de las células que provocan RMSE. Se concluyó que el transgén con *myl2* presenta más diferenciación muscular y se semeja más en expresión génica al RMSE humano bien diferenciado. Y aquellos con *rag2* se encuentran más indiferenciados, pudiendo ser el origen del RMSE (Langenau *et al.*, 2007; Storer *et al.*, 2013).

Gracias a este animal se ha avanzado en la comprensión del desarrollo y progresión de esta neoplasia. Se ha estudiado la invasión y progresión metastásica y se han analizado las diferencias transcripcionales entre los tumores, usando la secuenciación de ARN. Se ha demostrado, por ejemplo, que ante la delección de *p53* el RMSE es más agresivo (Seki *et al.*, 2015).



**Ilustración 15.** Rhabdomyosarcoma por trasplante intramuscular marcado con proteína fluorescente verde en el pez cebra. Se puede observar el crecimiento según avanzan los días (números de la parte superior de la imagen) (Mizgirev *et al.*, 2018).

Además, la corta latencia del tumor en este animal, la fácil manipulación, la biología conservada, la fácil visualización mediante el marcado con proteína fluorescente y las nuevas tecnologías como la Técnica de Hibridación Genómica Comparativa, capaz de identificar delecciones y amplificaciones de regiones genómicas completas, ha posibilitado la identificación de genes que posiblemente tengan un papel crucial en el desarrollo del RMSE (Ilustración 15). Estos avances han abierto las puertas al estudio de tratamientos específicos (Phelps y Chen, 2016).

### 3.6.7 Glioma

El glioma es la neoplasia primaria del cerebro o médula espinal producida por la transformación maligna de las células gliales: los astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales. Estas células son las encargadas de dar soporte estructural y metabólico a las neuronas. Su incidencia se estima en 11.8 casos por 100000 habitantes (Herrera y Granados, 2013).

Se clasifican según el tipo de célula al que más se asemejan histológicamente (ependimomas, astrocitoma u oligodendrogliomas), grado (del I al IV según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud) y ubicación (supra o infra tentoriales). El astrocitoma supone el 75-90% de los gliomas diagnosticados y el 40% de ellos corresponde al glioblastoma (Maher *et al.*, 2001).

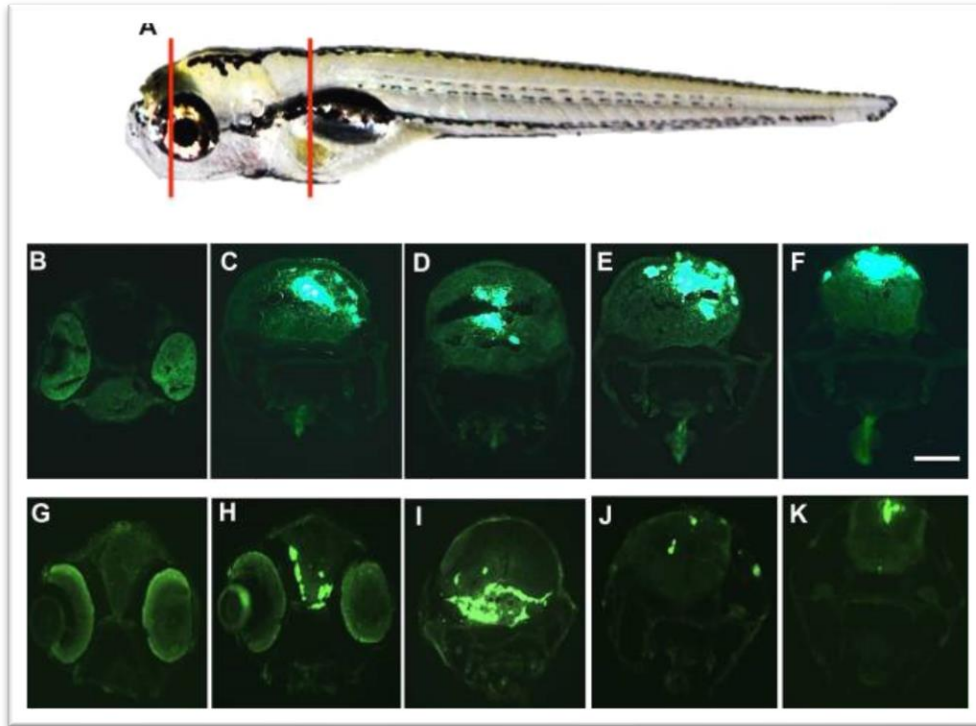
El único factor de riesgo conocido es la exposición a radiación ionizante y se conocen 7 variantes del genoma que predisponen a la aparición de gliomas como la alteración de la telomerasa transcriptasa inversa o del receptor del factor de crecimiento epidérmico, entre otros.

En cuanto al diagnóstico se inicia con un examen neurológico y pruebas de imagen. Generalmente se utiliza la RM con o sin uso de contraste, aunque también pueden ser útiles la TC, la PET, la tomografía por emisión de fotones únicos y los marcadores moleculares. En el caso de que la localización lo permita se tomará una biopsia o biopsia estereotáctica (Ann *et al.*, 2017).

El tratamiento dependerá del tipo de glioma, pero se suele basar en la cirugía, radioterapia, quimioterapia con agentes alquilantes, terapias con medicamentos dirigidos (bevacizumab) o inmunoterapia. Además, se puede aplicar tratamiento sintomático en casos necesarios como anticonvulsivantes o antiinflamatorios que reduzcan la presión (Ann *et al.*, 2017).

Para el estudio del desarrollo de glioma, los peces cebra se muestran particularmente útiles debido al hecho de que tienen embriones transparentes. La técnica más comúnmente usada para el estudio de glioma en los peces cebra es el xenotrasplante con marcación de fluorescencia de las células cancerígenas (Ilustración 16). La metodología no está estrictamente estandarizada aún, pero el método prevalente implica aislamiento de células cancerígenas (provenientes de humanos u otras fuentes), hacer un cultivo de esas células y marcarlas con un fluorescente. A continuación, se trasplantan en cerebros de embriones de pez cebra y se observa mediante un microscopio de fluorescencia la evolución de las células cancerígenas (Li *et al.*, 2010; Vittori *et al.*, 2015).

En el 2016 se publicó la puesta a punto de un método de trasplante intracraneal de glioblastomas que actualmente está siendo usado en múltiples estudios para el análisis del glioma en peces cebra. En este estudio, se describe un método estandarizado detallando el número de células trasplantadas y los ratios de supervivencia, entre otras especificaciones (Welker *et al.*, 2016).



**Ilustración 16.** Imágenes de células tumorales del glioma en el pez cebra. (A) Las líneas rojas representan el área anatómica en la que se realizaron las secciones transversales. (B-F) Criosecciones transversales de un glioblastoma compacto) (G-K) Criosecciones transversales de un tumor difuso (Adaptado de Welker *et al.*, 2016).

Además, el pez cebra está ayudando a profundizar en otros aspectos, como la respuesta de la red microglial ante el trasplante de células de glioblastoma o el papel de las llamadas células madre tumorales ya que a estas células se les atribuye la capacidad de originar, mantener y expandir los tumores y de dar lugar a metástasis y recidivas (Hamilton *et al.*, 2016; Wenger *et al.*, 2017).

También se han investigado los medicamentos usados en quimioterapia (5-FU y Erlotinib) valorando su efecto en la metástasis de tumores en peces cebra de 30 días encontrándose una reducción del 50% del tamaño de los tumores tras dos días del tratamiento (Eden *et al.*, 2014).

## 4. Conclusiones

- A. El cáncer causa millones de defunciones al año en el mundo y su incidencia está incrementando por lo que el conocimiento de la carcinogénesis de los tumores, posibles tratamientos y factores de riesgo está adquiriendo cada vez más relevancia
- B. El pez cebra es un organismo modelo que se ha desarrollado relativamente hace poco tiempo, pero que presenta múltiples ventajas con respecto a otros modelos, habiendo ganado una gran importancia en pocos años.
- C. Gracias a este modelo de estudio y al avance de las técnicas biomédicas se ha obtenido información relevante de diferentes neoplasias, mecanismos carcinogénicos y tratamientos que ayudarán a reducir la elevada incidencia de cáncer.

## 5. Bibliografía

- AECC Asociación Española Contra el Cáncer (2018a). *Evolución del cáncer de hígado*. Recuperado de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-higado/evolucion-cancer-higado>
- AECC Asociación Española Contra el Cáncer (2018b). *Cáncer de páncreas*. Recuperado de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pancreas>
- Amsterdam, A., Lin, S., y Hopkins, N. (1995). The Aequorea victoria Green Fluorescent Protein Can Be Used as a Reporter in Live Zebrafish Embryos. *Developmental Biology*, 171(1), 123–129. doi:10.1006/dbio.1995.1265
- Andrews, C., Exell, A., y Carrington, N. (2003). *The Manual of Fish Health: Everything You Need to Know about Aquarium Fish, Their Environment and Disease Prevention*. Ontario, Canada: Firefly Books.
- Ann, N., Bush, O., Chang, S. M., y Berger, M. S. (2017). Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurgical Review*, 1-14. doi.org/10.1007/s10143-016-0709-8
- Armengol, C., Sarrias, M. R., y Sala, M. (2018). Hepatocellular carcinoma: Present and future. *Medicina Clinica*, 150(10), 390-397. doi.org/10.1016/j.medcli.2017.08.010
- Ata, H., Clark, K. J., y Ekker, S. C. (2016). The zebrafish genome editing toolkit. *Methods in cell biology*, 135. doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.04.023
- Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J., y Strasser, A. (2017). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. *Nature Publishing Group*, 25(1), 104-113. doi.org/10.1038/cdd.2017.169
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... Martins, R. N. (2012). Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, (69). doi:10.3791/4196
- Baeten, J. T., y Jong, J. L. O. (2018). Genetic Models of Leukemia in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. doi:10.3389/fcell.2018.00115
- Barone, E., Corrado, A., Gemignani, F., y Landi, S. (2016). Environmental risk factors for pancreatic cancer: an update. *Archives of Toxicology*, 90(11), 2617-2642. doi.org/10.1007/s00204-016-1821-9

- Bartlett, E. K., y Karakousis, G. C. (2015). Current Staging and Prognostic Factors in Melanoma. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 24(2), 215–227. doi:10.1016/j.soc.2014.12.001
- Berghmans, S., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., T, L., Kanki, J., y Jette, C. (2005). Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *BioTechniques*, 39(2), 227-237. doi.org/10.2144/05392RV02
- Blackburn, J. S., y Langenau, D. M. (2014). Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 755–762. doi:10.1242/dmm.015842
- Blanco-Vives, B., y Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 98(3), 268–275. doi:10.1016/j.physbeh.2009.05.015
- Boch, J. (2011). TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology*, 29(2), 135–136. doi:10.1038/nbt.1767
- Bologna, J. L., Schaffer, J. V., Cerroni, L. (2019). *Dermatología 4ª edición*. Barcelona, España: Elsevier, 1858-2007
- Bootorabi, F., Manouchehri, H., Changizi, R., Barker, H., Palazzo, E., Saltari, A., ... Aspatwar, A. (2017). Zebrafish as a Model Organism for the Development of Drugs for Skin Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1550. doi:10.3390/ijms18071550
- Breslow, A. (1970). Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery*, 172(5), 902–908. doi:10.1097/00000658-197011000-00017
- Brown, H. K., Schiavone, K., Tazzyman, S., Heymann, D., y Chico, T. J. (2017). Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(4), 379–389. doi:10.1080/17460441.2017.1297416
- Bruijn, E., Cuppen, E., y Feitsma, H. (2009). Highly Efficient ENU Mutagenesis in Zebrafish. *Zebrafish*, 3–12. doi:10.1007/978-1-60327-977-2\_1
- Bucking, C., Lemoine, C. M. R., y Walsh, P. J. (2013). Waste Nitrogen Metabolism and Excretion in Zebrafish Embryos: Effects of Light, Ammonia, and Nicotinamide. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319(7), 391–403. doi:10.1002/jez.1802

- Cheng, R., Ford, B. L., O'Neal, P. E., Mathews, C. Z., Bradford, C. S., Thongtan, T., ... Bailey, C. S. (1997). Zebrafish (*Danio rerio*) p53 tumor suppressor gene: cDNA sequence and expression during embryogenesis. *Molecular marine biology and biotechnology* 6(2), 88-97
- Collins, J. E., White, S., Searle, S. M. J., y Stemple, D. L. (2012). Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome Research*, 22(10), 2067–2078. doi:10.1101/gr.137901.112
- Cortemeglia, C., y Beitinger, T. L. (2005). Temperature Tolerances of Wild-Type and Red Transgenic Zebra Danios. *Transactions of the American Fisheries Society*, 134(6), 1431–1437. doi:10.1577/t04-197.1
- Culp, P., Nusslein-Volhard, C., y Hopkins, N. (1991). High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(18), 7953–7957. doi:10.1073/pnas.88.18.7953
- Driever W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., S.C., Neuhauss, J., Malicki, D.L., ... C. Boggs. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123, 37-42
- Dobson, J., y Duncan, B. (2014). *Manual de oncología en pequeños animales 3ª edición*. Barcelona, España: EDICIONES S
- Eden, C. J., Ju, B., Murugesan, M., Phoenix, T. N., Nimmervoll, B., Tong, Y., ... Gilbertson, R. J. (2014). Orthotopic models of pediatric brain tumors in zebrafish. *Oncogene*, 34(13), 1736–1742. doi:10.1038/onc.2014.107
- Espinosa, J. Rodríguez, N. y Jalón J. I. (2005). *Factores pronósticos en el melanoma maligno cutáneo*. En Gonzalez, M (Ed), *Factores pronósticos en oncología 2ª Edición*, 247-255. Madrid, España: Mc Graw Hill
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., y Choe, K. P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85(1), 97–177. doi:10.1152/physrev.00050.2003
- Farazi, P. A., y DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, 6(9), 674–687. doi:10.1038/nrc1934
- Feitsma, H., y Cuppen, E. (2008). Zebrafish as a Cancer Model. *Molecular Cancer Research*, 6(5), 685-694. doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2167



- Ferreira, A., y Milán, M. (2015). Dally Proteoglycan Mediates the Autonomous and Nonautonomous Effects on Tissue Growth Caused by Activation of the PI3K and TOR Pathways. *PLOS Biology*, 13(8). doi:10.1371/journal.pbio.1002239
- Fisher, S., Grice, E. A., Vinton, R. M., Bessling, S. L., Urasaki, A., Kawakami, K., y McCallion, A. S. (2006). Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish. *Nature Protocols*, 1(3), 1297–1305. doi:10.1038/nprot.2006.230
- Gaj, T., Gersbach, C. A., y Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Genome Reference Consortium. (2017). Zebrafish Genome Overview. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/zebrafish>
- Godoy, A., Cantero, A., Ales, I., y Benavides, M. (2018). Cáncer de páncreas exocrino. Epidemiología, historia natural y estadificación. *Revisiones en cáncer*. 32(4)
- Gong, Z., Koh, C. H. V., Nguyen, A. T., Zhan, H., Li, Z., Lam, S. H., ... Parinov, S. (2010). The Zebrafish Model for Liver Carcinogenesis. *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*, 197–218. doi:10.1007/978-1-4419-6082-5\_11
- Gupta, R., Amanam, I., y Chung, V. (2017). Current and future therapies for advanced pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 116(1), 25-34. doi.org/10.1002/jso.24623
- Hamilton, L., Astell, K. R., Velikova, G., y Sieger, D. (2016). A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells In Vivo. *Zebrafish*, 13(6), 523–534. doi:10.1089/zeb.2016.1339
- Hansen, K., Coussens, M. J., Sago, J., Subramanian, S., Gjoka, M., y Briner, D. (2012). Genome Editing with CompoZr Custom Zinc Finger Nucleases (ZFNs). *Journal of Visualized Experiments*, (64). doi:10.3791/3304
- Hayes, M. N., y Langenau, D. M. (2016). Discovering novel oncogenic pathways and new therapies using zebrafish models of sarcoma. *Methods in Cell Biology*, 138. doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.11.011
- He, S., Jing, C.-B., y Look, A. T. (2017). Zebrafish models of leukemia. *Methods in Cell Biology*, 138, 563–592. doi:10.1016/bs.mcb.2016.11.013

- He, S., Lamers, G. E., Beenakker, J. W. M., Cui, C., Ghotra, V. P., Danen, E. H., ... SnaarJagalska, B. E. (2012). Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *The Journal of Pathology*, 227(4), 431-445.
- Herrera, A., y Granados, M. (2013). *Manual de oncología : procedimientos médico quirúrgicos*. Ciudad de Méjico, Méjico: McGraw-Hill Interamericana de España
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Matthews, L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. doi:10.1038/nature12111
- Hwang, K. L., y Goessling, W. (2016). Baiting for Cancer: Using the Zebrafish as a Model in Liver and Pancreatic Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 391–410. doi:10.1007/978-3-319-30654-4\_17
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., ... Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227–229. doi:10.1038/nbt.2501
- Hwang, P.P., y Chou, M.Y. (2013) Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 465(9):1233-1247.
- Ignatius, M. S., Hayes, M. N., Moore, F. E., Tang, Q., Garcia, S. P., Blackburn, P. R., ... Langenau, D. M. (2018). tp53 deficiency causes a wide tumor spectrum and increases embryonal rhabdomyosarcoma metastasis in zebrafish. *eLife*, 7. doi:10.7554/elife.37202
- Issaeva, N. (2019). p53 Signaling in Cancers. *Cancers*, 11(3), 332. doi:10.3390/cancers11030332
- Jones, P. A., y Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415–428. doi:10.1038/nrg816
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., ... Kohara, Y. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447(7145), 714–719. doi:10.1038/nature05846
- Kaufman, C. K. (2016). Zebrafish Melanoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439–450. doi:10.1007/978-3-319-30654-4\_19

- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biology*, 8(1). doi:10.1186/gb-2007-8-s1-s7
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., y Mishina, M. (2004). A Transposon-Mediated Gene Trap Approach Identifies Developmentally Regulated Genes in Zebrafish. *Developmental Cell*, 7(1), 133–144. doi:10.1016/j.devcel.2004.06.005
- Kelsh, R. N. (2004). Genetics and Evolution of Pigment Patterns in Fish. *Pigment Cell Research*, 17(4), 326–336. doi:10.1111/j.1600-0749.2004.00174.x
- Kim, J.-E., Lee, K. T., Lee, J. K., Paik, S. W., Rhee, J. C., y Choi, K. W. (2004). Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(2), 182–186. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03219.x
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., y Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. doi:10.1002/aja.1002030302
- Koolman, J., Röhm, K.-H. (2012). *Bioquímica Humana: Texto y Atlas*. Madrid, España: Médica Panamericana S.A.
- Land, H., Parada, L., y Weinberg, R. (1983). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222(4625), 771–778. doi:10.1126/science.6356358
- Langenau, D. M. (2003). Myc-Induced T Cell Leukemia in Transgenic Zebrafish. *Science*, 299(5608), 887–890. doi:10.1126/science.1080280
- Langenau, D. M., Keefe, M. D., Storer, N. Y., Guyon, J. R., Kutok, J. L., Le, X., ... Zon, L. I. (2007). Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes & Development*, 21(11), 1382–1395. doi:10.1101/gad.1545007
- Lassaletta, A. (2016, julio). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*, XX(6), 380-389. Recuperado de [www.sepeap.org](http://www.sepeap.org)
- Lavanderos F., J., Pérez P., J., Jeria N., S., y Concha C., D. (2010). Actualizaciones en melanoma maligno cutáneo. *Cuadernos De Cirugía*, 24(1), 47-56. doi:10.4206/cuad.cir.2010.v24n1-08
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), 1-20. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

- Lee, L. M. J., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A., & Hendrix, M. J. C. (2005). The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Developmental Dynamics*, 233(4), 1560–1570. doi:10.1002/dvdy.20471
- Lerga, T. M., y O’Sullivan, C. K. (2008). Rapid determination of total hardness in water using fluorescent molecular aptamer beacon. *Analytica Chimica Acta*, 610(1), 105–111. doi:10.1016/j.aca.2008.01.031
- Li, D., Peng, K., Li, Y., y Peng, Y. (2010). Advancements on the zebrafish glioma model. *Chinese Journal of Cancer*, 29(6), 621-625. Recuperado de <http://www.cjcsysu.com/ENpdf/2010/6/621.pdf>
- Liu, S., y Leach, S. D. (2011). Zebrafish Models for Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 71–93. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130330
- Llovet, J. M., Villanueva, A., Lachenmayer, A., y Finn, R. S. (2015). Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(7), 408–424. doi:10.1038/nrclinonc.2015.103
- Lo, J. A., y Fisher, D. E. (2014). The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*, 346(6212), 945–949. doi:10.1126/science.1253735
- Logan, D. W., Burn, S. F., y Jackson, I. J. (2006). Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Research*, 19(3), 206–213. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00307.x
- Maher, E. A., Furnari, F. B., Bachoo, R. M., Rowitch, D. H., Louis, D. N., Cavenee, W. K., y Depinho, R. A. (2001). Malignant glioma : genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development*, 15(11), 1311-1333. doi:10.1101/gad.891601
- Maitra, A., y Hruban, R. H. (2008). Pancreatic Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), 157–188. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121
- Malkin, D. (2011). Li-Fraumeni Syndrome. *Genes & Cancer*, 2(4), 475–484. doi:10.1177/1947601911413466
- Marchal, J. A., Aránega, A., Gaforio, J. J. (2006). *Avances en Oncología básica y aplicada* (pp. 220-229). Granada, España: Editorial Universidad de Granada

- Martínez, J., Lledó, J. L., Aicart-Ramos, M., Mateos, B., y Albillos, A. (2016). Carcinoma hepatocelular. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(12), 683–692. doi:10.1016/j.med.2016.05.022
- Masser, M.P., Rakocy, J., y Losordo, T. (1999). Recirculating aquaculture tank production systems: management of recirculating systems. *Southern Regional Aquaculture Publication*, 452
- Ministerio de Medio Ambiente. (2000). Libro Blanco del Agua. Recuperado de <http://hispagua.cedex.es/node/66958>
- Mizgirev, I. V., Safina, D. R., Demidyuk, I. V, y Kostrov, S. V. (2018). Organism-Level Tumor Models in Zebrafish *Danio rerio*. *Acta Naturae*, 10(37), 24-29.
- Mudbhary, R., Hoshida, Y., Chernyavskaya, Y., Jacob, V., Villanueva, A., Fiel, M. I., ... Ukomadu, C. (2014). UHRF1 Overexpression Drives DNA Hypomethylation and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*, 25(2), 196-209. doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.003
- Murphy, G. P., Lawrence, W., Lenhard, R. E., Organización Panamericana de la Salud (Wash.), y American Cancer Society. (1996). *Oncología clínica: Manual de la American Cancer Society*. Washington: Organización Panamericana de la Salud.
- Ni, J., Wangenstein, K. J., Nelsen, D., Balciunas, D., Skuster, K. J., Urban, M. D., y Ekker, S. C. (2016). Active recombinant Tol2 transposase for gene transfer and gene discovery applications. *Mobile DNA*, 7(1). doi.org/10.1186/s13100-016-0062-z
- Novoa, B., y Figueras, A. (2011). Zebrafish: Model for the Study of Inflammation and the Innate Immune Response to Infectious Diseases. *Current Topics in Innate Immunity II*, 253–275. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3\_15
- Nusslein-Volhard, C., y Dahm, R. (Eds.). (2002). Zebrafish. Oxford, Inglaterra: *Oxford University Press*.
- Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B., y Ross, J. A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 115(18), 4218–4226. doi:10.1002/cncr.24465
- Paik, E. J., y Zon, L. I. (2010). Hematopoietic development in the zebrafish. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(6-7), 1127–1137. doi:10.1387/ijdb.093042ep
- Park, J. T., y Leach, S. D. (2018). Zebrafish model of KRAS-initiated pancreatic cancer. *Animal Cells and Systems*, 22(6), 353-359, doi:10.1080/19768354.2018.1530301

- Parichy, D. M. (2007). Homology and the evolution of novelty during Danio adult pigment pattern development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 308B(5), 578–590. doi:10.1002/jez.b.21141
- Parichy D. M. (2015). Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife*, 4. doi:10.7554/eLife.05635
- Patton, E. E., Widlund, H. R., Kutok, J. L., Kopani, K. R., Amatruda, J. F., Murphey, R. D., ... Zon, L. I. (2005). BRAF Mutations Are Sufficient to Promote Nevi Formation and Cooperate with p53 in the Genesis of Melanoma. *Current Biology*, 15(3), 249–254. doi:10.1016/j.cub.2005.01.031
- Pavlidis, M., Digka, N., Theodoridi, A., Campo, A., Barsakis, K., Skouradakis, G., ... Tsalafouta, A. (2013). Husbandry of Zebrafish, Danio Rerio, and the Cortisol Stress Response. *Zebrafish*, 10(4), 524–531. doi:10.1089/zeb.2012.0819
- Phelps, M., y Chen, E. (2016). Zebrafish Rhabdomyosarcoma. En Langenau, D. M. (Ed.), *Cancer and Zebrafish. Mechanism, Techniques and Models* (371-389). Charleston, Estados Unidos: Springer
- Praveenraj J., Kiruba-Sankar R., Dam Roy S., Lohith K., Shailesh K., Raymond Jani Angel J., Venkatesh Thakur R.(2017). Danio rerio (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae): A new record from Andaman Islands, India. *Acta Ichthyol.* 47 (4), 391–396. doi: 10.3750/AIEP/02242
- Rasighaemi, P., Basheer, F., Liongue, C., y Ward, A. C. (2015). Zebrafish as a model for leukemia and other hematopoietic disorders. *Journal of Hematology & Oncology*, 8(1). doi:10.1186/s13045-015-0126-4
- Revsbech, N. P., Risgaard-Petersen, N., Schramm, A., y Nielsen, L. P. (2006). Nitrogen transformations in stratified aquatic microbial ecosystems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(4), 361–375. doi:10.1007/s10482-006-9087-5
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., ... Wolchok, J. D. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 364(26), 2517–2526. doi:10.1056/nejmoa1104621
- Roberts, H., y Palmeiro, B. S. (2008). Toxicology of Aquarium Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(2), 359–374. doi:10.1016/j.cvex.2007.12.005

- Rojas-Muñoz A., Bernard A., y Izpisúa J.C., (2007). El pez cebrá, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*, (366), 66-69.
- Rosenberg, S. A. (1994). Treatment of 283 Consecutive Patients With Metastatic Melanoma or Renal Cell Cancer Using High-Dose Bolus Interleukin 2. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 271(12), 907-913. doi:10.1001/jama.1994.0351036003303
- Ruhl, N., McRobert, S. P., y Currie, W. J. S. (2009). Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*). *Lab Animal*, 38(8), 264–269. doi:10.1038/labon0809-264
- Sapienza, C., y Issa, J.P. (2016). Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annual Review of Nutrition*, 36(1), 665–681. doi:10.1146/annurev-nutr-121415-112634
- Seki, M., Nishimura, R., Yoshida, K., Shimamura, T., Shiraishi, Y., Sato, Y., ... Takita, J. (2015). Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nature Communications*, 6(1). doi:10.1038/ncomms8557
- SEOM Sociedad Española de Oncología Médica (2018). *Las cifras del Cáncer en España 2019*. Recuperado de <https://seom.org/publicaciones/el-cancer-en-espanyacom>
- Serrone, L., Zeuli, M., Sega, F. M., y Cognetti, F. (2000). Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *Journal of Experimental & Cancer Research*, 19, 21–34
- Shain, A. H., y Pollack, J. R. (2013). The Spectrum of SWI / SNF Mutations , Ubiquitous in Human Cancers. *PLOS one*, 8(1). doi.org/10.1371/journal.pone.0055119
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., y Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. doi:10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., y Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291(5813), 293–296. doi:10.1038/291293a0
- Stoletov, K., y Klemke, R. (2008). Catch of the day: Zebrafish as a human cancer model. *Oncogene*, 27(33), 4509-4520. doi.org/10.1038/onc.2008.95
- Storer, N. Y., White, R. M., Uong, A., Price, E., Nielsen, G. P., Langenau, D. M., y Zon, L. I. (2013). Zebrafish rhabdomyosarcoma reflects the developmental stage of oncogene

expression during myogenesis. *Development*, 140(14), 3040-3050.  
doi:10.1242/dev.087858

Storer, N. Y., y Zon, L. I. (2010). Zebrafish Models of p53 Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), 1-13. doi:10.1101/cshperspect.a001123

Stuart, G. W., McMurray, J. V., y Westerfield, M. (1988). Replication , integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos, *Development*, (103), 403-412.

Teng, Y., Xie, X., Walker, S., White, D. T., Mumm, J. S., y Cowell, J. K. (2013). Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer*, 13(1). doi:10.1186/1471-2407-13-453

Tomislav, M. D. (2019). Pancreatic Cancer. *Medscape*. Recuperado de <https://emedicine.medscape.com>

Vaquero, E. C., y Castells, A. (2013). *Tumores malignos del páncreas*. Barcelona, España: Servicio de Gastroenterología del Hospital Clinic, 657-666. Recuperado de [https://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/44\\_Tumores\\_malignos\\_del\\_pancreas.pdf](https://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/44_Tumores_malignos_del_pancreas.pdf)

Varga, Z. M. (2011). Aquaculture and Husbandry at the Zebrafish International Resource Center. *The Zebrafish: Genetics, Genomics and Informatics*, 453–478. doi:10.1016/b978-0-12-374814-0.00024-0

Vargas-vargas, R. A. (2017). Pez cebra ( *Danio rerio* ) y anestesia . Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*, 29 (1), 86-96. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2448-87712017000400086&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-87712017000400086&lng=es&tlng=es).

Varshney, G. K., y Burgess, S. M. (2013). Mutagenesis and phenotyping resources in zebrafish for studying development and human disease. *Briefings in Functional Genomics*, 13(2), 82–94. doi:10.1093/bfpg/elt042

Veinotte, C. J., Dellaire, G., y Berman, J. N. (2014). Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 745–754. doi:10.1242/dmm.015784

Vilella, A. J., Severin, J., Ureta-Vidal, A., Heng, L., Durbin, R., y Birney, E. (2009). EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Research*, 19(2), 327–335. doi:10.1101/gr.073585.107



- Vittori, M., Motaln, H., y Turnšek, T. L. (2015). The Study of Glioma by Xenotransplantation in Zebrafish Early Life Stages. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(10), 749–761. doi:10.1369/0022155415595670
- Weinberger, A. D., y Gilmore, M. S. (2012). CRISPR-Cas: To Take Up DNA or Not, That Is the Question. *Cell Host & Microbe*, 12(2), 125–126. doi:10.1016/j.chom.2012.07.007
- Welker, A. M., Jaros, B. D., Puduvali, V. K., Imitola, J., Kaur, B., & Beattie, C. E. (2016). Correction: Standardized orthotopic xenografts in zebrafish reveal glioma cell-line-specific characteristics and tumor cell heterogeneity. *Disease Models & Mechanisms*, 9(9), 1063–1065. doi:10.1242/dmm.027235
- Wenger, A., Larsson, S., Danielsson, A., Elbæk, K. J., Kettunen, P., Tisell, M., ... Carén, H. (2017). Stem cell cultures derived from pediatric brain tumors accurately model the originating tumors. *Oncotarget*, 8(12), 18626–18639. doi:10.18632/oncotarget.14826
- Wilkie, M. P. (2002). Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 284–301. doi:10.1002/jez.10123
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., y Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473–486. doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.010
- Wrighton, P. J., Oderberg, I. M., & Goessling, W. (2019). There's Something Fishy About Liver Cancer: Zebrafish Models of Hepatocellular Carcinoma. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. doi:10.1016/j.jcmgh.2019.05.002
- Zahangir, M., Haque, F., Mustakim, G., Khatun, H., e Islam, M. (2015). Effect of water pH on the early developmental responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Progressive Agriculture*, 26(1), 85-89. doi:10.3329/pa.v26i1.24521

## 6. Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AECC: Asociación Española Contra el Cáncer

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

AKT: Proteína quinasa B

ARN: ácido ribonucleico

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*

Cas: Sistema asociado a CRISPR

CHC: Carcinoma hepatocelular

CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas

Dpf: Día post fecundación

ENU: N-etil-N nitrosourea

Hpf: Horas post fecundación

Gb: Gigabases

GFP: Proteína verde fluorescente

GLOBOCAN: *Global Cancer Observatory*

GRCz11: *Genome Reference Consortium Zebrafish Build 11*

LDH: Lactato deshidrogenasa

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

NCIB: *National Center for Biotechnology Information*

P53: Proteína 53

P16: Proteína 16

PET: Tomografía por emisión de positrones

RFP: Transgen de la proteína roja

RM: Resonancia magnética

RMSE: Rbdomiosarcoma embrionario

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

TALEN: Nucleasa de actividad similar a activador de transcripción

TC: Tomografía computarizada

TILLING: Inducción dirigida de lesiones locales en el genoma

TNM: Tumor-nódulo-metástasis

WGS: Secuencia escopeta de genoma completo

ZFN: Zinc-finger nucleases o nucleasas con dedos de zinc