



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

Establecimiento de un modelo de xenotrasplante para el estudio del comportamiento de células tumorales humanas en embriones de pez cebra

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CARLOS HUMBERTO MUÑOZ MONTECINOS

Director del Seminario de Título:

Dr. Miguel Allende Connelly

Co-Director del Seminario de Título:

Dr. Diego Rojas Benítez

Septiembre, 2017

Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por el Sr. **CARLOS HUMBERTO MUÑOZ MONTECINOS**:

“Establecimiento de un modelo de xenotrasplante para el estudio del comportamiento de células tumorales humanas en embriones de pez cebra”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título

Dr. Miguel Allende Connelly

Co-Director Seminario de Título

Dr. Diego Rojas Benítez

Comisión Evaluadora y Revisora

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Dra. Verónica Palma Alvarado

Santiago de Chile, Septiembre de 2017

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | viii |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1. Cáncer | 5 |
| 2. Neuroblastoma | 6 |
| 3. Leucemia Promielocítica Aguda..... | 6 |
| 4. Línea celular HL-60..... | 7 |
| 5. Pez cebra como modelo de estudio de cáncer..... | 9 |
| 6. Xenotrasplantes en pez cebra como herramienta de estudio de hematopoyesis y el sistema inmune..... | 13 |
| 7. Proteómica como herramienta de investigación en cáncer y en función inmune..... | 15 |
| OBJETIVOS | 17 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 1. Manejo y líneas de pez cebra | 18 |
| 2. Líneas Celulares y Cultivo | 18 |
| 3. Cepa Bacteriana y Cultivo..... | 19 |
| 4. Tinción de Células HL-60..... | 19 |
| 5. Inyección de células Humanas en Embriones de pez cebra | 20 |
| 6. Infección bacteriana local y sistémica | 21 |
| 7. Transección de la aleta caudal..... | 21 |
| 8. Análisis Proteómico | 22 |
| RESULTADOS | 23 |
| 1. Embriones de pez cebra se desarrollan correctamente a altas temperaturas. | 23 |
| 2. Inyección de células de neuroblastoma SK-N-SH y SH-SY5Y y su distribución en larvas de pez cebra. | 24 |
| 3. Seguimiento de células tumorales SK-N-SH y SH-SY5Y en larvas de pez cebra..... | 25 |
| 4. Inyección de células tumorales SK-N-SH en larvas de 2dfp..... | 27 |
| 5. Inyección de células humanas de leucemia HL-60..... | 28 |
| 6. Evaluación de respuesta de células HL-60 ante eventos de inflamación. . | 29 |
| 7. Análisis proteómico de larvas trasplantadas con células HL-60 | 32 |
| 8. Selección de posibles marcadores moleculares asociados a respuesta inmune de células humanas..... | 37 |

| | |
|---|----|
| DISCUSIÓN..... | 43 |
| 1. Establecimiento de xenotrasplantes de células de neuroblastoma y leucemia en el pez cebra..... | 43 |
| 2. Seguimiento del comportamiento de células cancerígenas xenotrasplantadas en el pez cebra..... | 45 |
| 3. Proteómica de embriones de pez cebra trasplantados con células humanas | 48 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de las cuatro muestras secuenciadas

Tabla 2: Clasificación funcional de proteínas identificadas en cada muestra.

Tabla 3: Proteínas humanas disminuidas en muestra 3 respecto a la muestra 2.

Tabla 4: Proteínas humanas aumentadas en muestra 3 respecto a la muestra 2.

Tabla 5: Proteínas de pez cebra disminuidas en muestra 2 respecto a muestra 4

Tabla 6: Proteínas de pez cebra aumentadas en muestra 2 respecto a muestra 4

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparación de larvas de pez cebra de 5dpf incubados a diferentes temperaturas.

Figura 2: Inyección y posterior localización de células de neuroblastoma humano en larvas de pez cebra.

Figura 3: Seguimiento temporal células GFP+ en larvas Tab5 tras 2, 3 y 5 dpf.

Figura 4: Inyección de células SK-N-SH en vitelo de larva de 2dpf.

Figura 5: Distribución de células HL-60 en larva de 2 dpf.

Figura 6: Células HL-60 migran en respuesta a infección bacteriana.

Figura 7: Células HL-60 migran hacia sitio de inflamación tras corte de cola.

Figura 8: Gráficos de frecuencia de proteínas humanas asociadas a procesos biológicos “Sistema Inmune” y “Respuesta Inmune” para muestra 2 y 3

Figura 9: Gráficos de frecuencia de proteínas de pez cebra asociadas a los procesos biológicos “Proceso de Desarrollo” y “Desarrollo de Sistema” para la muestra 2 y 4.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CHT: Caudal hematopoietic tissue (Tejido Caudal Hematopoyético)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio Eagle modificado de Dulbecco)

Dpc: Días post corte

Dpf: Días post fecundación

Dpi: Días post inyección

GFP: Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)

Hpf: Horas post fecundación

IL-6: Interleucina 6

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Medio Dulbecco modificado de Iscove)

LB: Luria-Bertani

LPM: Leucemia promielocítica aguda

MHCI: Major histocompatibility complex class I (complejo principal de histocompatibilidad de clase I)

N.S: No significativo

PBS: Phosphate-buffered saline (Buffer fosfato salino)

RPM: revoluciones por minuto

UFC: Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

En el cáncer, la compleja relación espacio-temporal entre las células tumorales y su microambiente es determinante en el crecimiento, invasión y capacidad de metástasis de los tumores. Es por eso que el estudio de esta enfermedad en un contexto *in vivo* que simule este ambiente, es fundamental para el avance en su comprensión y el desarrollo de posibles terapias. El trasplante de células tumorales humanas en modelos animales ha sido una de las estrategias más utilizadas para entender, bajo un contexto fisiológico, cómo progresa esta enfermedad. Dentro de estos modelos, el pez cebra ha destacado en los últimos años por las ventajas que brinda su transparencia en estadios tempranos de su desarrollo, la cual permite seguir en tiempo real el comportamiento de las células tumorales.

En este trabajo se realizaron trasplantes de células tumorales humanas de neuroblastoma y leucemia promielocítica aguda en embriones de pez cebra, con el objetivo de comprender cómo las células tumorales se comportan dentro del pez, y cómo pueden afectar el desarrollo de éste. Se logró determinar que las células de neuroblastoma de las líneas SK-N-SH y SH-SY5Y mantienen su posición tras varios días post inyección, y no proliferan. Por otro lado, las células de leucemia de la línea HL-60 son capaces de colonizar el tejido caudal hematopoyético del pez, y de responder a estímulos inflamatorios. Mediante el uso de proteómica cuantitativa se propuso estudiar tanto la respuesta del pez cebra al trasplante de células humanas de leucemia, como la respuesta de estas células ante una infección por *Salmonella* Thyphimurium. De esta

forma, de un total de 192 proteínas humanas que modificaron sus niveles de abundancia significativamente en respuesta a la infección bacteriana, se determinó que 28 estaban relacionadas a la respuesta inmune y a la diferenciación celular, mientras que en el pez cebra, 36 de 335 proteínas relacionadas a procesos de desarrollo modificaron sus niveles tras el xenotrasplante.

Estos resultados muestran que las células tumorales modulan el microambiente en el que se desarrollan y viceversa. Además muestran que células humanas de linaje inmune mantienen su capacidad de respuesta ante estímulos inflamatorios en el contexto fisiológico del pez cebra, lo que también sugiere el uso de este animal como un excelente modelo para el estudio de la función inmune de células humanas.

ABSTRACT

In cancer, the complex space-temporal relationship between tumor cells and their microenvironment is critical for sustained tumor growth, invasion and metastasis. In this regard, the study of this disease in an *in vivo* context is essential for our understanding and the development of future therapies. Transplantation of human tumor cells in animal models has become a broadly used approach to understand cancer progression under a physiological context. Among these, the zebrafish has emerged as a versatile model for the study of human cancer mainly due to its transparency in its early developmental stages, which allow to carry out *in vivo* imaging and tracking of the xenotransplanted cells.

In this work, neuroblastoma and acute promyelocytic leukemia human tumor cells were transplanted in zebrafish embryos to study the behavior of these cells inside the fish, and investigate how the human cells could affect its development.

While neuroblastoma cells from cell lines SK-N-SH and SH-SY5Y were immotile and unable to proliferate, leukemia cells from cell line HL-60 showed specific homing towards the caudal hematopoietic tissue of the zebrafish embryo, and were able to respond to an inflammatory stimulus. Moreover, using quantitative proteomic analysis, we intended to determine which proteins were involved in the zebrafish response towards the human xenograft, as well as human proteins involved in the response of the cells to *Salmonella* Typhimurium, infection. From a total of 192 human proteins, which showed significantly different abundance levels in response to the bacterial infection, 28 were found to be related to immune response and cell differentiation processes. Meanwhile, in

the zebrafish, 36 from the 335 proteins, which modified their abundance levels after the xenotransplantation, were related to developmental process.

These results suggest that tumor cells modulate the microenvironment in which they grow and vice versa. Furthermore, these results show that human myeloid progenitor cells are able to respond to inflammatory stimulus in the physiological context of the zebrafish, which suggests the use of this animal as an excellent model for the study of the human immune system and its components.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país y en el año 2013 cobró 24.592 vidas, correspondiente al 25,6% del total de muertes (Ministerio de Salud, 2013), por lo que el estudio de esta enfermedad es de vital importancia para la salud pública nacional y mundial.

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por el desarrollo de células que proliferan descontroladamente, debido a mutaciones en sus genomas que comprometen los mecanismos de regulación del ciclo celular. Estas mutaciones afectan tres tipos de genes: oncogenes, genes supresores de tumor y genes de estabilidad (Vogelstein y Kinzler, 2004). Con el paso del tiempo, la pérdida de estabilidad conlleva a la aparición de diversos clones genéticamente distintos, los cuales están representados con distintas frecuencias dentro del tumor (Blackburn y Langenau, 2014).

Las células tumorales se desarrollan dentro de un ambiente complejo. Este involucra el establecimiento de un nicho tumoral compuesto por diversos tipos celulares que interactúan entre ellos y que mediante la adquisición de al menos diez capacidades biológicas permiten el desarrollo del tumor: i. evasión de supresores del crecimiento, ii. señalización de proliferación mantenida, iii. inducción de la angiogénesis, iv. resistencia a la muerte celular, v. reprogramación del metabolismo, vi. acumulación de mutaciones en el genoma, vii. evasión de la destrucción por el sistema inmune, viii. adquisición de

inmortalidad replicativa, ix. inflamación y x. la activación de la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

2. Neuroblastoma

Dentro de los distintos tipos de cáncer, el neuroblastoma es el tumor sólido más común y mortal en niños menores de un año en el mundo (Brodeur, 2003). Este tumor se origina a partir de células precursoras del sistema nervioso periférico, y usualmente surge en una ubicación paraespinal en el abdomen o en el pecho (Brodeur, 2003). Este tipo de cáncer representa el 7% de todos los cánceres infantiles y alrededor del 15% de las muertes por cáncer en infantes (Chu y col., 2011). Cuando el neuroblastoma se desarrolla espontáneamente en pacientes menores que un año de edad, puede mostrar diferenciación espontánea y regresión. En contraste, tumores en niños mayores que un año a menudo presentan gran riesgo en el momento del diagnóstico, caracterizado por la amplificación del oncogén N-myc y la presencia de metástasis a distancia (Krieger-Hinck y col., 2010)

3. Leucemia Promielocítica Aguda

Las leucemias son un tipo de cáncer causado por la proliferación maligna de células derivadas de la médula ósea que invaden el torrente sanguíneo, órganos distantes, y que inducen pérdida de médula ósea normal. Son usualmente clasificadas según sean crónicas o agudas, y si son mieloides o linfoides. Las leucemias comparten algunas características como una formación deficiente de células sanguíneas, anemia y hemorragias, generalmente causada por la pérdida de plaquetas, y una masa celular con niveles anormales de células de leucemia en la sangre, órganos linfoides y otros (de Thé y col., 2012).

Dentro de los distintos tipos de leucemia, la leucemia promielocítica aguda (LPM) es una rara condición que es extremadamente maligna debido a su rápida evolución y la repentina ocurrencia de hemorragias principalmente causadas por desórdenes de coagulación. La LPM está asociada con una translocación cromosómica específica que siempre involucra al gen del receptor de ácido retinoico en el cromosoma 17 (de Thé y col., 2012).

Gracias a la intensa investigación que permitió una acabada comprensión molecular de los mecanismos de esta enfermedad, la leucemia promielocítica aguda es una enfermedad que pasó de ser altamente mortal a una altamente curable, con una remisión completa y una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años mayor al 90% con los tratamientos adecuados (Wang y col., 2008). Este importante avance en el tratamiento de la enfermedad se debe a diferentes factores, entre ellos al desarrollo de herramientas celulares que permitieron conocer la biología de la LPM. Una de las líneas celulares más importantes utilizadas en la investigación de esta enfermedad ha sido la línea HL-60.

4. Línea celular HL-60

La línea celular humana HL-60 proviene de un único paciente con leucemia promielocítica aguda, y consiste principalmente en promielocitos (>90%) (Collins, 1987). Fue una de los primeros cultivos a largo plazo de células de leucemia mieloide en ser establecido y ha sido extensamente caracterizado durante las últimas décadas. A comienzos de los años 80, Breitman y colaboradores describieron una serie de compuestos químicos capaces de inducir la maduración morfológica y funcional de las células HL-60 (Breitman y col., 1980). Se ha descrito además, que la línea celular original

tiene varias propiedades de células malignas, y expresa varios oncogenes (Fleck y col., 2005).

La contribución de esta línea celular, sin embargo, no se remite sólo al área del cáncer. Gracias a la línea HL-60 se han hecho importantes aportes en el área del cáncer, la hematología y la inmunología. Como fuente de células de leucemia, la línea HL-60 ha sido usada para el estudio de neoplasia y de terapias, pero además, como fuente de células sanguíneas, han sido usadas para análisis de regulación y diferenciación bioquímica y biológica en la mielopoyesis. Cuando estas células son estimuladas con factores inmunomoduladores, desarrollan propiedades de defensa del hospedero (Harris y Ralph, 1985).

Esta línea celular ha sido ampliamente usada como modelo de estudio del control de la proliferación y de la diferenciación celular. Se puede inducir la diferenciación de estas células a granulocitos mediante tratamiento con ácido retinoico o con dimetilsulfóxido (Breitman y col., 1980). Numerosos estudios se han enfocado en encontrar otras moléculas capaces de inducir su diferenciación a granulocitos o monocitos. Otra poderosa aplicación de esta línea celular radica en su uso para el estudio de citoquinas y modificadores de la respuesta biológica (Harris y Ralph, 1985). Al ser una línea celular estable, puede ser propagada por largos periodos de tiempo en cultivo y puede ser congelada para su almacenamiento, algo que no puede realizarse a partir de granulocitos o monocitos derivados de médula ósea o sangre periférica (Millius y Weiner, 2010). Esto convierte a la línea HL-60 en un excelente y simple modelo para estudiar diversos aspectos de la biología de células mieloides, como por ejemplo el neutrófilo (Millius y Weiner, 2010).

Los estudios realizados utilizando la línea celular HL-60 se han llevado a cabo principalmente en cultivo *in vitro*. Escasos estudios han analizado el comportamiento de estas células en un contexto *in vivo* (Lin y col., 2011; Shen y col., 2007), y lo han hecho desde una mirada farmacológica, probando compuestos que inhiban la proliferación de estas células. Debido a que las células crecidas en cultivos *in vitro* de 2 dimensiones pueden diferir considerablemente en morfología, interacciones célula-célula y célula-matriz, y diferenciación de aquellas crecidas en sistemas de 3 dimensiones (Yamada y Cukierman, 2007), es importante otorgar a las células un ambiente más adecuado para su estudio, como el que otorga un modelo animal. A nuestro saber, no se han realizado estudios *in vivo* en los cuales se estudie la capacidad de las células HL-60 de diferenciarse y de mostrar actividad propia de células de linaje inmune, como migración o respuesta inflamatoria.

5. Pez cebra como modelo de estudio de cáncer.

La investigación en biomedicina depende del uso de modelos animales para entender la patogénesis de las enfermedades humanas a nivel celular y molecular, y de esta forma proveer de sistemas para desarrollar y testear nuevas terapias. Modelos animales mamíferos, como el ratón, han sido fundamentales en el modelamiento de las enfermedades humanas, principalmente debido a la gran homología entre los genomas, y a las numerosas similitudes en aspectos que van desde la anatomía hasta la biología celular y fisiología. No obstante, los modelos animales utilizados a lo largo de la historia van mucho más allá de mamíferos; involucran a muchas otras especies de vertebrados e incluso animales invertebrados (Lieschke y Currie, 2007). Por ejemplo, existe un sorprendente grado de conservación funcional en la base de los procesos en biología

celular entre mamíferos e invertebrados, lo cual sugiere que las enfermedades surgidas a partir de la interrupción de estos procesos conservados podrían ser modeladas a nivel genético y molecular en animales como gusanos y moscas. En este sentido, las estrategias de mutagénesis a gran escala que están disponibles en sistemas invertebrados han sido extraordinariamente exitosas en determinar la función de genes, entregando importante información acerca de cómo funcionan genes ortólogos a los humanos en procesos similares. No obstante, a pesar de estas ventajas, los organismos invertebrados carecen de una serie de estructuras y órganos que están involucrados en la patogénesis de enfermedades humanas, y por lo tanto su rol en el modelamiento de enfermedades humanas estará limitado. Por su parte, a pesar de que *screenings* de genética directa y genética inversa basada en mutaciones al azar son factibles en ratones, no pueden hacerse a la misma escala que se hacen en invertebrados porque los ratones requieren un considerable apoyo de personal y de infraestructura (Lieschke y Currie, 2007).

En relación a los estudios en cáncer, el modelo murino ha permitido realizar grandes avances en la comprensión de las vías y mecanismos moleculares utilizados por las células cancerígenas (Rangarajan y Weinberg, 2003). Desafortunadamente, la completa recapitulación de la complejidad genética de los tumores humanos no ha sido posible usando modelos animales, impidiendo por lo tanto, modelar y comprender a cabalidad la enfermedad. Entre las debilidades del modelo genético en ratón están la limitada variedad de tumores y su rápido crecimiento, con un tiempo de duplicación promedio menor a dos días. Además, hay ejemplos de compuestos que parecen tener una acción opuesta en tumores de ratón comparado con su acción en humanos. Por ejemplo, compuestos como brefeldinas, o algunos compuestos de unión al surco menor

del ADN parecen tener menor actividad in tumores murinos que en aquellos derivados de humanos (Sausville y Burger, 2006).

Debido a las obvias limitaciones éticas y prácticas, estudios *in vivo* de células humanas están limitados a xenotrasplantes (Konantz y col., 2012). Este término hace referencia al trasplante, implantación o infusión de un tejido específico desde una especie animal a otra. En el área de investigación de cáncer, el trasplante de células cancerígenas humanas en ratones ha permitido el estudio de la proliferación de estas células, la invasión, migración y la inducción de la angiogénesis (Drabsch y col., 2016). Sin embargo, existen desventajas en el uso del ratón como modelo de xenotrasplantes. Éstas incluyen un largo periodo para observar los injertos de células humanas, las dificultades para observar una única o unas pocas células xenotrasplantadas, o que la heterogeneidad de los injertos entre muestras requiere laboriosos experimentos con un gran número de animales, lo que siempre es un problema ético. Adicionalmente los costos de realizar xenotrasplantes en modelo murino aumentan debido al requerimiento de cepas inmunosuprimidas que a menudo necesitan cuidados y tratamientos específicos (Konantz y col., 2012).

En este contexto, el pez cebra ha ganado atención como un buen modelo vertebrado para estudios de enfermedades humanas, incluido el cáncer. El pez cebra es un pequeño pez teleósteo de agua dulce, que habita en el noreste de India. Inicialmente se comenzó a utilizar como animal modelo en genética del desarrollo en la década de 1960 (Barriuso y col., 2015). Las ventajas que presenta el modelo para estudios genéticos son su alta fecundidad, la generación de embriones transparentes que se desarrollan fuera de la madre, y la conservación de órganos propios de vertebrados, lo que permite realizar comparaciones con los humanos. La verdadera utilidad del modelo

quedó demostrada en *screenings* de genética directa, los cuales identificaron mutantes en prácticamente cada órgano o tipo celular, la mayoría de los cuales son compartidos con los mamíferos, demostrando así que el pez cebra podría ser usado para identificar mutantes genéticos para casi cualquier fenotipo (White y col., 2013).

A pesar de que el último ancestro común de peces y humanos está separado por más de 400 millones de años, la biología del cáncer entre estos dos organismos comparte muchas características tanto a nivel molecular como a nivel fisiológico (Drabsch y col., 2016). Se sabe que los peces desarrollan cáncer hace más de un siglo. En la década del 80 se sugirió al pez cebra como modelo de cáncer luego de encontrar que la exposición a carcinógenos como dimetilnitramina causaba formación de tumores de baja penetrancia (White y col., 2013). La exposición de peces cebra a mutágenos comunes como la etilnitrosourea, dmba y N-metil-nitroguanidina induce varios tipos de neoplasias, incluyendo papilomas de piel, adenomas hepáticos, rhabdomiosarcoma, entre otros (White y col., 2013). Sin embargo, fue gracias a la aparición de la tecnología de transgénesis en el pez cebra que el campo pudo dar un salto. Langenau, Look y colaboradores demostraron que la expresión del oncogén murino Myc bajo el promotor de pez cebra del gen activador de recombinación (*rag2*, por sus siglas en inglés) resultó en el inicio de leucemias en adultos que emergían desde el timo y se propagaban rápidamente (Langenau y col., 2003). Además, se mostró que una cepa de pez cebra mutante para *tp53* (el cual codifica el supresor de tumor p53) desarrollaba tumores en la vaina de nervio periférico, demostrando así que tanto oncogenes como supresores de tumores mantienen conservado su rol (White y col., 2013).

Gracias a su tamaño y cualidades ópticas, el pez cebra es además un modelo amigable con los ensayos de trasplantes. De hecho, varios grupos de investigación han

usado el pez cebra como modelo de xenotrasplantes para estudiar el comportamiento de las células tumorales y la respuesta a terapia en el contexto de un organismo completo (Barriuso y col., 2015). Las características del pez cebra permiten estudiar distintas facetas de la biología del cáncer, como el crecimiento tumoral, invasión, inducción de angiogénesis, metástasis y la identificación de nuevas estrategias de tratamiento (Drabsch y col., 2016).

El primer ensayo de trasplante de células humanas en pez cebra fue llevado a cabo por Lee y colaboradores el año 2005. En ese trabajo los autores muestran que células de melanoma humano son capaces de sobrevivir, moverse y proliferar dentro del pez cebra. Estas células no fueron capaces de formar tumores en el pez, ante lo cual los autores sugieren un posible rol anti tumorigénico del microambiente de embriones de pez cebra. Además, mostraron que melanocitos humanos inyectados en pez cebra se ubicaron preferentemente en tejidos como la piel, lo que sugiere que estas células humanas son capaces de interpretar señalizaciones moleculares que guíen el *homing* hacia este tejido (Lee y col., 2005).

6. Xenotrasplantes en pez cebra como herramienta de estudio de hematopoyesis y el sistema inmune.

El trasplante de células humanas en modelos animales no se acota sólo al trasplante de células tumorales. El estudio del desarrollo y función del sistema inmune *in vivo* ha usado intensivamente este tipo de ensayos, principalmente en modelos murinos humanizados (Legrand y col., 2006). Investigaciones en el área de hematopoyesis han sido enormemente facilitadas gracias al trasplante de células troncales hematopoyéticas, el cual involucra el trasplante de una población celular

sanguínea de un donante en un animal receptor Lu y col., 2015). Para seguir *in vivo* el destino de las células trasplantadas se han desarrollado numerosas técnicas como tomografía de emisión de positrones, resonancia magnética, bioluminiscencia utilizando luciferasa, entre otros. Estas técnicas son invasivas, tiene sensibilidad limitada, a veces requieren anestesia o cirugía, y son difíciles de llevar a cabo en los tiempos requeridos para estudiar la biología de las células troncales hematopoyéticas. Se requiere la posibilidad de obtener imágenes en tiempo real de las células trasplantadas, y esto es posible utilizando al pez cebra como modelo animal (Staal y col., 2016).

El pez cebra, gracias a sus características, es se ha convertido en un importante modelo en esta área de investigación. Aunque los órganos hematopoyéticos de mamíferos y pez cebra se encuentran en diferentes sitios, la hematopoyesis está conservada tanto a nivel celular como molecular entre estos grupos. El pez cebra aloja sus células troncales hematopoyéticas en la médula renal, y tiene tipos celulares sanguíneos similares a los humanos (Lu y col., 2015).

Otra importante ventaja al trabajar con embriones de pez cebra es que no se requiere compatibilidad inmune si el trasplante se realiza durante los primeros 5 dpf debido a que el desarrollo del timo no ocurre hasta después de este tiempo (Lu y col., 2015), y por lo tanto no hay un sistema inmune adaptable que ataque a las células trasplantadas. Este modelo animal único puede utilizarse para develar genética y funcionalmente las contribuciones universales y especie-específica del microambiente en el mantenimiento y desarrollo de células progenitoras hematopoyéticas (Iwanami y col., 2017). En este trabajo proponemos que ensayos de trasplantes de líneas celulares humanas de progenitores hematopoyéticos, como la línea celular HL-60, en el pez cebra, podría ayudar a comprender este importante proceso.

7. Proteómica como herramienta de investigación en cáncer y en función inmune.

La detección oportuna del cáncer es fundamental para su tratamiento. A pesar de los avances en los métodos convencionales de diagnóstico de esta enfermedad, como las mamografías o el test de antígeno prostático, éstos aun no alcanzan la sensibilidad y especificidad necesarias para detectar la enfermedad tempranamente (Wulfkuhle y col., 2003).

Los biomarcadores son importantes en la detección y monitoreo del cáncer. Sirven como sellos del estado fisiológico de las células tumorales en un tiempo dado, y cambian durante el proceso de la enfermedad. Mutaciones génicas, alteraciones en la transcripción y traducción génica, y alteraciones en los productos proteicos son todos potenciales biomarcadores específicos para la enfermedad. La utilidad de un biomarcador radica en su capacidad de ser un indicador temprano de la enfermedad, de ser un buen monitor de su progreso, ser de fácil detección, y de ser medible entre distintas poblaciones (Srinivas y col., 2002). Los análisis proteómicos son una buena alternativa para identificar dichos biomarcadores.

La proteómica es el estudio del proteoma de una célula o un organismo. A diferencia del genoma, el proteoma es dinámico y está en constante flujo debido a diversos factores. Estos incluyen los diferentes empalmes alternativos de los respectivos ARNs, modificaciones post-traduccionales, y la regulación temporal y funcional de la expresión génica. La proteómica permite la identificación de los cambios proteicos causados por el proceso de la enfermedad de una forma relativamente precisa (Srinivas y col., 2002). De esta forma, la proteómica es una herramienta que permite identificar marcadores moleculares que den cuenta del estado particular de una célula a un tiempo

determinado. Esto la convierte en una excelente herramienta para estudiar la progresión tumoral y las interacciones que se producen entre las células tumorales y el microambiente tumoral. Gracias a los avances en esta tecnología y en el área de la bioinformática, hoy es posible secuenciar el proteoma de distintos organismos e identificar de forma precisa las proteínas que pertenecen a las diferentes especies. Por lo tanto, es factible secuenciar un organismo completo sometido a un xenotrasplante y luego separar las proteínas de cada especie, sin necesidad de separar previamente las células de cada especie.

En este trabajo se realizaron xenotrasplantes de células tumorales humanas en embriones de pez cebra, con el fin de estudiar su comportamiento en este contexto fisiológico. Se utilizaron líneas celulares de neuroblastoma y de leucemia. Tras observar que las células de leucemia respondían a estímulos inflamatorios dentro del pez, se realizó un análisis proteómico de peces cebra trasplantados con células HL-60 para comprender cómo afecta el microambiente propio del pez cebra a las células tumorales y viceversa, y para estudiar cuáles son las proteínas involucradas en la respuesta de estas células tumorales humanas de linaje inmune ante estímulos inflamatorios.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la interacción entre células tumorales humanas y embriones de pez cebra en el contexto de xenotrasplante.

Objetivos Específicos

1. Establecer un protocolo de xenotrasplantes de células humanas en embriones de pez cebra.
2. Analizar respuesta funcional de células humanas xenotrasplantadas ante estímulos inflamatorios.
3. Analizar mediante un estudio global de proteínas la respuesta molecular de células humanas y de pez cebra ante el xenotrasplante.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Manejo y líneas de pez cebra

Se utilizó la línea de pez cebra Tab5 (silvestre). Embriones de pez cebra fueron obtenidos a partir de cruces entre machos y hembras adultos, y fueron crecidos en medio embrionario E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, pH 7), a 28°C con fotoperiodos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, o a 34°C en condiciones de oscuridad.

Para los experimentos de inyección bacteriana (inyección local en vesícula ótica o sistémica) o para la inyección de células de neuroblastoma en vitelo, larvas de 2dpf fueron anestesiadas con Tricaína (Sigma-Aldrich) al 0,01 % m/v, y con el fin de inmovilizarlas para la inyección se montaron en agarosa de bajo punto de fusión a una concentración de 1% m/v (diluida en E3).

2. Líneas Celulares y Cultivo

Se utilizaron las líneas celulares humanas de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC #HTB-11) y SH-SY5Y (ATCC #CRL-2266), y la línea celular humana promielocítica HL-60. Las 3 líneas celulares fueron crecidas en incubador húmedo, a 37°C y 5% de CO₂

Las células de neuroblastoma fueron cultivadas placas Petri de 100 mm, con medio DMEM, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (HyClone, USA) y con

penicilina-estreptomicina 1% (Gibco, USA). Las células fueron crecidas hasta un 80 – 90% de confluencia al momento de ser cosechadas para la inyección.

La línea celular HL-60 fue cultivada en botellas rectangulares de 25cm² (Corning, USA) utilizando medio IMDM (Gibco, USA), suplementado con un 20% de suero fetal bovino (HyClone, USA), penicilina-estreptomicina 1% (Gibco, USA) y L-glutamina 1% (Gibco, Brasil). La concentración de células se mantuvo siempre en un rango de entre 1×10^5 y 1×10^6 células/mL.

3. Cepa Bacteriana y Cultivo

Para los experimentos de infección en larvas de pez cebra se utilizó la cepa bacteriana *Salmonella entérica* serovar Typhimurium Δ aroA::Amp (Sebkova y col., 2008). Se tomaron colonias aisladas mantenidas a 4°C desde una placa Petri con medio Luria-Bertani (LB) sólido, suplementado con ampicilina 1%. Las colonias fueron inoculadas en medio LB líquido suplementado con ampicilina 0,1%, y se crecieron durante toda la noche a 37°C y agitadas a 180 RPM.

4. Tinción de Células HL-60

Se utilizó el trazador fluorescente Mitotracker Red CMXRos (ThermoFisher) con el objetivo de marcar la línea celular HL-60. Para lograr una correcta tinción, las células en cultivo fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante y posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo libre de suero. Se agregó Mitotracker (concentración stock de 1 mM) en una dilución de 1/2000, quedando a una concentración final de 0,5 μ M, y se esperó 30 minutos, agitando ocasionalmente. Posteriormente se centrifugó a

500g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en PBS, quedando las células a una concentración de aproximadamente 20 células/nL.

5. Inyección de células Humanas en Embriones de pez cebra

Embriones de pez cebra de entre 3,5 – 4 horas post fecundación (hpf) fueron inyectados con células humanas en la región central o marginal del blastodisco. Las líneas celulares de neuroblastoma fueron tratadas con tripsina para romper las adhesiones a la placa, luego fueron centrifugadas a 200g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y posteriormente fueron resuspendidas en PBS hasta una concentración final de aproximadamente 20 células/nL.

Las células HL-60 fueron centrifugadas a 500g durante 10 minutos, luego se realizó el proceso de tinción, y finalmente fueron resuspendidas en PBS hasta una concentración cercana a 20 células/nL.

Se inyectaron aproximadamente 10 nL de volumen de las células resuspendidas en PBS, lo que se traduce en la inyección cerca de 200 células humanas por embrión de pez.

Las líneas celulares de neuroblastoma fueron además inyectadas en larvas de 2 dpf, en el vitelo. Se inyectaron aproximadamente 50 nL células resuspendidas en PBS, lo que corresponde a cerca de 1000 células por embrión.

6. Infección bacteriana local y sistémica

Se realizaron dos tipos de infecciones bacterianas, una de tipo local en la vesícula ótica de larvas, y la otra de tipo sistémica.

Para la infección en vesícula ótica se crecieron colonias de *S. Typhimurium* en medio LB durante toda una noche a 180 RPM, luego se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se diluyeron hasta obtener una densidad óptica de 1. Se inyectó aproximadamente un volumen de 5 nL, que equivale a 200 – 400 células bacterianas.

Para la infección sistémica se realizó el mismo procedimiento, pero las bacterias se diluyeron hasta una densidad óptica de 7. La inyección se llevó a cabo en el Ducto de Cuvier (He y cols., 2012), y se inyectaron entre 5 – 10 nL, equivalente a 2000 – 5000 UFC.

El número de UFC inyectadas se corroboró inyectando el volumen de dilución bacteriana correspondiente a cada procedimiento en PBS, y luego se sembró en placas de LB-agar usando diluciones seriadas.

7. Transección de la aleta caudal

Larvas de 2 dpf trasplantadas con células humanas HL-60 fueron anestesiadas con Triclaína, y luego se les removió la zona posterior caudal carente de melanóforos mediante el uso de bisturí. Posteriormente las larvas fueron incubadas a 34°C.

8. Análisis Proteómico

Se realizó un análisis de proteómica cuantitativa de 4 muestras:

- 1) Células HL-60 en cultivo, N= $1,0 \times 10^6$
- 2) Larvas Tab5 de 2 dpf trasplantadas con células HL-60, N=10
- 3) Larvas de 2 dpf trasplantadas con células HL-60, 6 horas después de una infección sistémica con *S. Typhimurium*, N=10
- 4) Larvas Tab5 de 2 dpf, inyectadas con PBS, N=10.

Las muestras fueron colectadas en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, se guardaron a -80°C y posteriormente se enviaron para el análisis.

La proteómica comparativa fue llevada a cabo por la empresa Bioproximity, LLC (EE.UU) por medio de un sistema de cromatografía líquida asociada a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS).

9. Análisis estadístico

Usando el software Graphpad prism 5.0, se realizaron análisis de ANOVA de dos vías con una prueba de Bonferroni para evaluar la significancia estadística de las diferencias de las medias aritméticas entre dos grupos. Los intervalos de confianza fueron 95% (* = $p < 0,05$), 99% (** = $p < 0,01$) y 99,9% (***) = $p < 0,001$)

RESULTADOS

1. Embriones de pez cebra se desarrollan correctamente a altas temperaturas.

La temperatura estándar de incubación del pez cebra desde su fecundación es de 28°C (Kimmel y cols., 1995), mientras que la temperatura de incubación de cultivos celulares humanos es de 37°C. Sin embargo, se ha reportado que embriones de pez cebra pueden desarrollarse normalmente a temperaturas de hasta 35°C (Haldi y cols., 2006). Con el objetivo de confirmar el correcto desarrollo embrionario a altas temperaturas, cercanas a la temperatura de incubación de las células humanas, embriones de pez cebra Tab5 fueron crecidos a 34°C, y se evaluó el desarrollo hasta 5 dpf (Figura 1).



Figura 1: Comparación de larvas de pez cebra de 5dpf incubados a diferentes temperaturas. **A.** Larva de 5 dpf incubada desde las 4hpf a 28°C. **B.** Larva de 5 dpf incubada desde las 4 hpf a 34°C. Se observa un fenotipo normal, con un mayor desarrollo de pigmentos.

Las larvas hasta este estadio de desarrollo muestran un fenotipo normal aunque se desarrollan levemente más rápido que los embriones crecidos a 28°C. Por ejemplo eclosionan antes del corion, la vejiga natatoria se infla primero y presentan una ligera mayor pigmentación.

2. Inyección de células de neuroblastoma SK-N-SH y SH-SY5Y y su distribución en larvas de pez cebra.

Embriones de 3,5 – 4 hpf fueron inyectados con aproximadamente 200 células humanas de neuroblastoma que expresan GFP de manera constitutiva (líneas SK-N-SH y SH-SY5Y) en el centro del blastodisco (Figura 2A), y se observó la localización de estas células en larvas 24 horas después. Las células se ubicaron mayoritariamente en el sector anterior de la larva, principalmente en la cabeza del pez (Figura 2B y C), mientras que un porcentaje menor de larvas presentó células en zonas posteriores. Se modificó el sitio de inyección con el objetivo de dilucidar si éste tenía relación con la ubicación de las células en las larvas. La nueva inyección se realizó en la periferia del blastodisco y 24 horas después se observó la localización de células, encontrándose éstas principalmente en la zona media y posterior de las larvas (Figura 2D). Este resultado nos indica que la ubicación de las células en la larva depende directamente del sitio de inyección en el embrión.

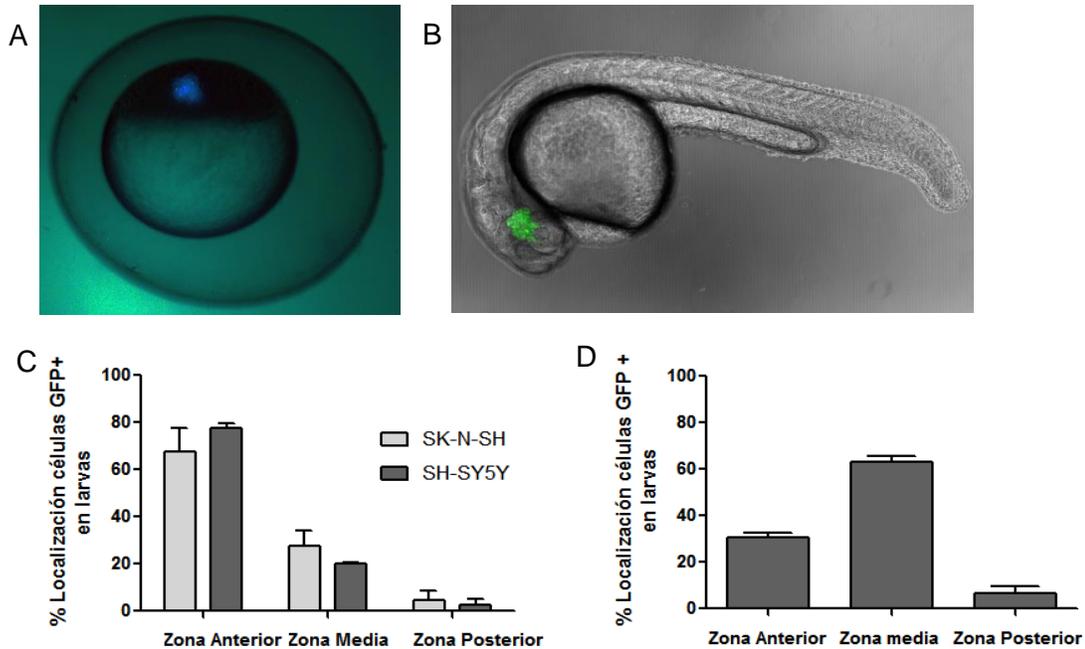


Figura 2: Inyección y posterior localización de células de neuroblastoma humano en larvas de pez cebra. **A.** Células SK-N-SH GFP+ inyectadas en el centro del blastodisco de un embrión de pez cebra de 4 hpf. **B.** Células SK-N-SH GFP+ ubicadas en la cabeza de una larva de pez cebra de 1 dpf tras haber sido inyectadas como se muestra en **A.** **C.** Porcentaje de células SK-N-SH y SH-SY5Y ubicadas en las zona anterior, media y posterior de larvas de pez cebra de 2 dpf, que fueron inyectadas en el centro del blastodisco de embriones de 4 hpf. **D.** Porcentaje de células SK-N-SH y SH-SY5Y ubicadas en las zona anterior, media y posterior de larvas de pez cebra de 2 dpf, que fueron inyectadas en la periferia del blastodisco de embriones de 4 hpf. Se observa un cambio en la ubicación de las células humanas dependiendo del sitio de inyección en el embrión.

3. Seguimiento de células tumorales SK-N-SH y SH-SY5Y en larvas de pez cebra.

Se siguió a las células de neuroblastoma inyectadas en embriones de 4 hpf de pez cebra durante 7 días, con el objetivo de estudiar el comportamiento de las células humanas en los embriones, tanto a 28°C como a 34°C. Para las líneas celulares y las temperaturas utilizadas, los resultados fueron similares. Las células de neuroblastoma siempre estuvieron en la misma ubicación, es decir, no se observó migración alguna de estas células, y a lo largo de los días la intensidad de la marca GFP decayó hasta desaparecer en casi la mitad de las larvas al día 7 (Figura 3).

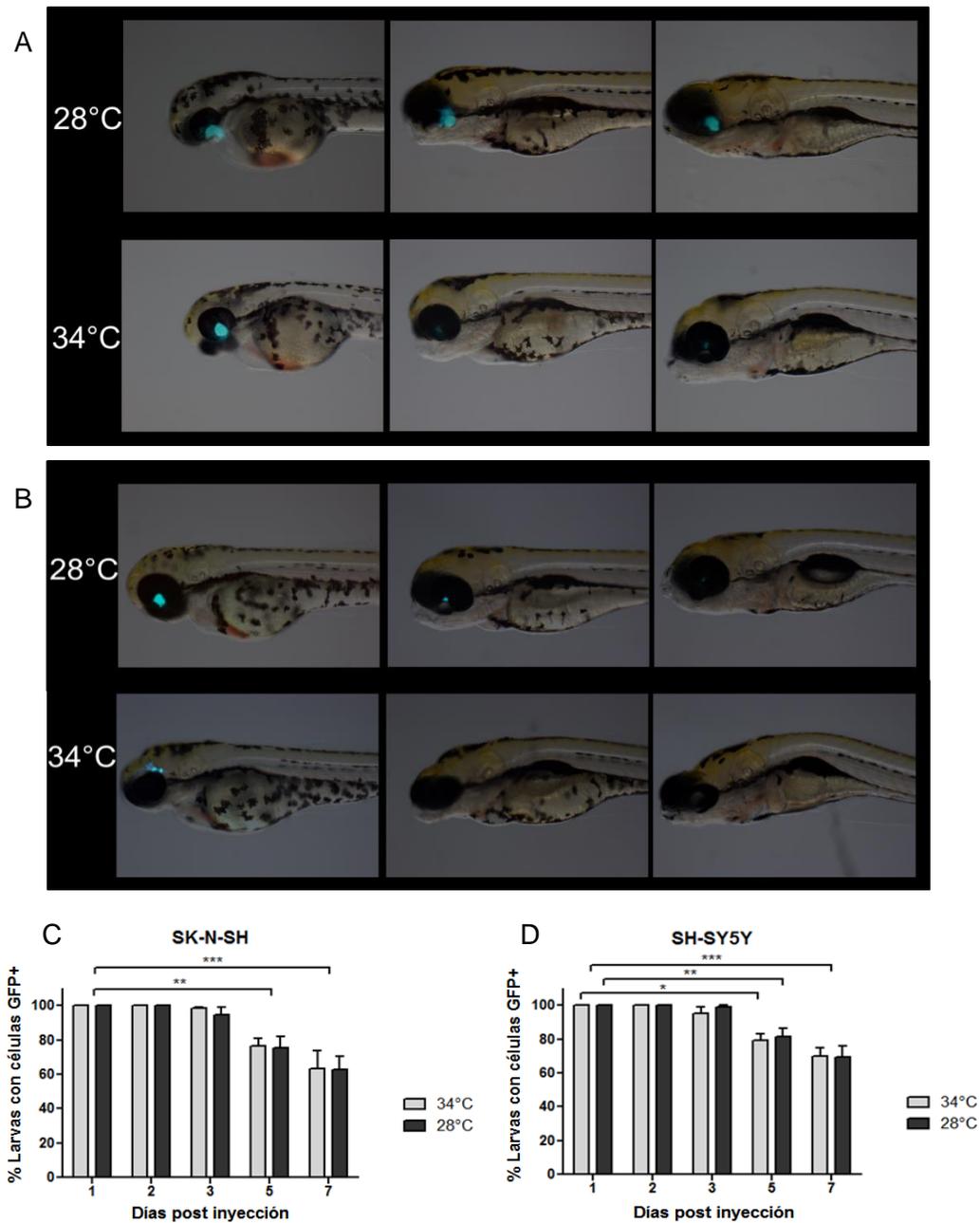


Figura 3: Seguimiento temporal células GFP+ en larvas Tab5 tras 2, 3 y 5 dpf. **A.** Larvas trasplantadas con la línea celular SK-N-SH y crecidas a 28°C o a 34°C. **B.** Larvas trasplantadas con la línea celular SH-SY5Y y crecidas a 28°C o a 34°C. **C.** Gráfica de porcentaje de larvas con presencia de células SK-N-SH GFP+ tras 2, 3 y 5 días post trasplante. **D.** Gráfica de porcentaje de larvas con presencia de células SH-SY5Y GFP+ tras 2, 3 y 5 días post trasplante.

4. Inyección de células tumorales SK-N-SH en larvas de 2dpf.

Las células inyectadas en embriones en estadio de blástula no proliferaron ni migraron, sugiriendo que no se encuentran en un ambiente adecuado para comportarse como células tumorales. En la literatura se ha descrito al vitelo de embriones de 2dpf como uno de los lugares más utilizados para los xenotrasplantes de células tumorales humanas (Langenau, 2016). Se procedió a inyectar células humanas de neuroblastoma (línea SK-N-SH) en el vitelo de larvas de embriones de 2dpf, con el fin de estudiar si este ambiente era más propicio para la proliferación de las células tumorales. Seis horas después de la inyección las células humanas se mantuvieron en su posición inicial, sin embargo, a las 24 horas, la marca de células GFP+ desapareció completamente, por lo que al igual que en la inyección en blástula, no se observó proliferación ni migración alguna.

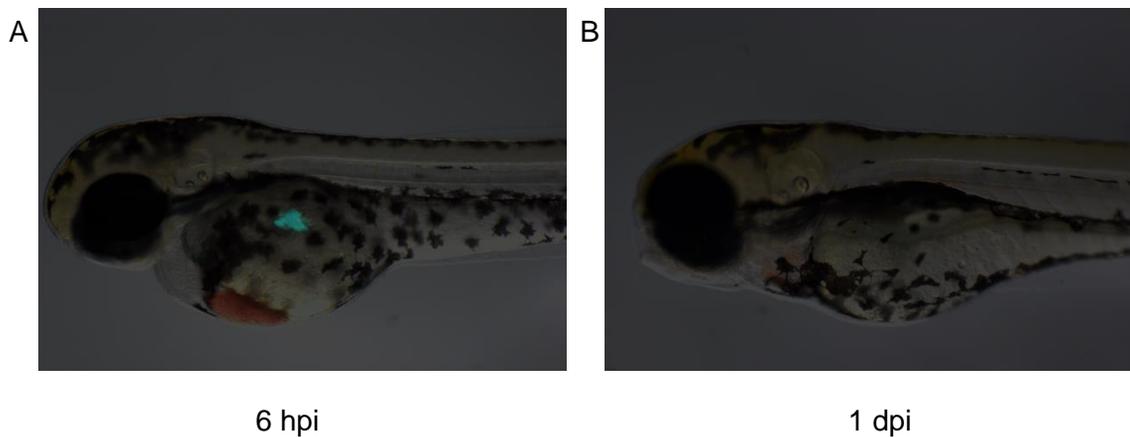


Figura 4: Inyección de células SK-N-SH en vitelo de larva de 2dpf. **A.** Larva 6 hpi. **B.** Larva 1 dpi. Se observa la rápida desaparición de la marca GFP+.

5. Inyección de células humanas de leucemia HL-60

Debido a que las células de neuroblastoma no proliferaron ni migraron en el pez, se procedió a realizar trasplantes con una línea celular de leucemia que previamente había sido utilizada para ensayos de trasplante en nuestro laboratorio. La línea celular HL-60 corresponde a células humanas derivadas de un paciente con leucemia mieloblástica aguda, y consiste principalmente en promielocitos (Collins, 1987). Se quiso evaluar el comportamiento de estas células en el pez cebra, y cómo estas células podían afectar el desarrollo del mismo.

Las células fueron inyectadas en embriones de pez cebra de 4 hpf y se observó su distribución en larvas de 2 dpf. A diferencia de lo observado en las células de neuroblastoma, las células de leucemia se distribuyen a lo largo de toda la larva, siendo el tejido caudal hematopoyético (CHT, por sus siglas en inglés) el que alberga al mayor número de células (Figura 5A). El CHT es un tejido en el que se desarrollan células del sistema inmune innato del pez cebra (Xu y cols., 2012), por lo tanto, el que las células de leucemia mieloblástica humana se hayan ubicado principalmente ahí, sugiere una migración guiada por señales moleculares altamente conservadas. Se observa una similitud en la distribución de las células mieloides humanas inyectadas en el pez comparada con las células mieloides propias del pez (en este caso neutrófilos).

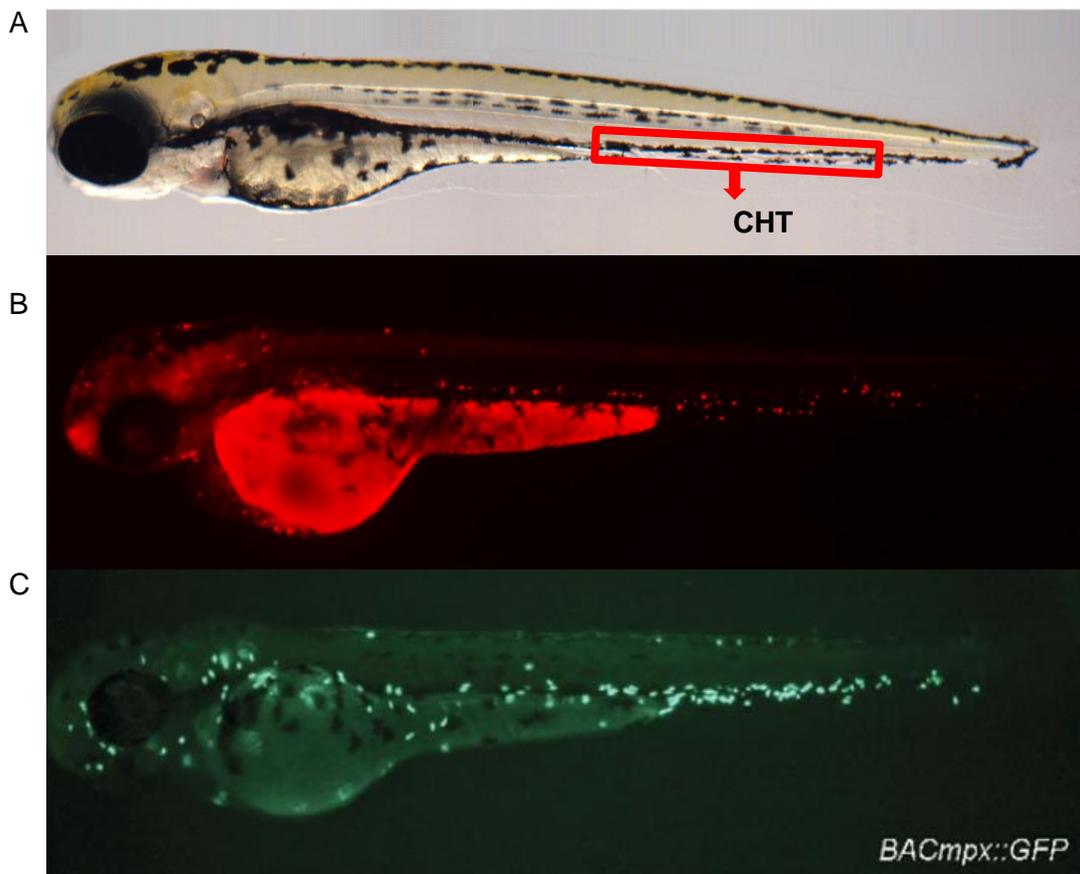


Figura 5: Distribución de células HL-60 en larva de 2 dpf. **A.** Delimitación del CHT en larva Tab5. **B.** Larva Tab5 de 2dpf inyectada en estadio de blástula con células HL-60 marcadas con Mitotracker. **C.** Larva *Bacmpx::GFP*, reportera de neutrófilos. Se aprecia una similitud en la distribución de las células de linaje inmune humanas comparadas con las células inmunes propias del pez, las cuales se ubican principalmente en el CHT.

6. Evaluación de respuesta de células HL-60 ante eventos de inflamación.

Dado que los promielocitos humanos inyectados en el pez cebra adoptaron una distribución muy similar a la de células mieloides del pez (macrófagos y neutrófilos), se procedió a evaluar si estas células humanas tienen la capacidad de responder en el contexto fisiológico de las larvas ante eventos inflamatorios. Se utilizaron dos metodologías para inducir inflamación en larvas de 2 dpf: a) inyección localizada de 200 – 300 UFC de la bacteria *S. Typhimurium* en la vesícula ótica, y b) transección de la aleta

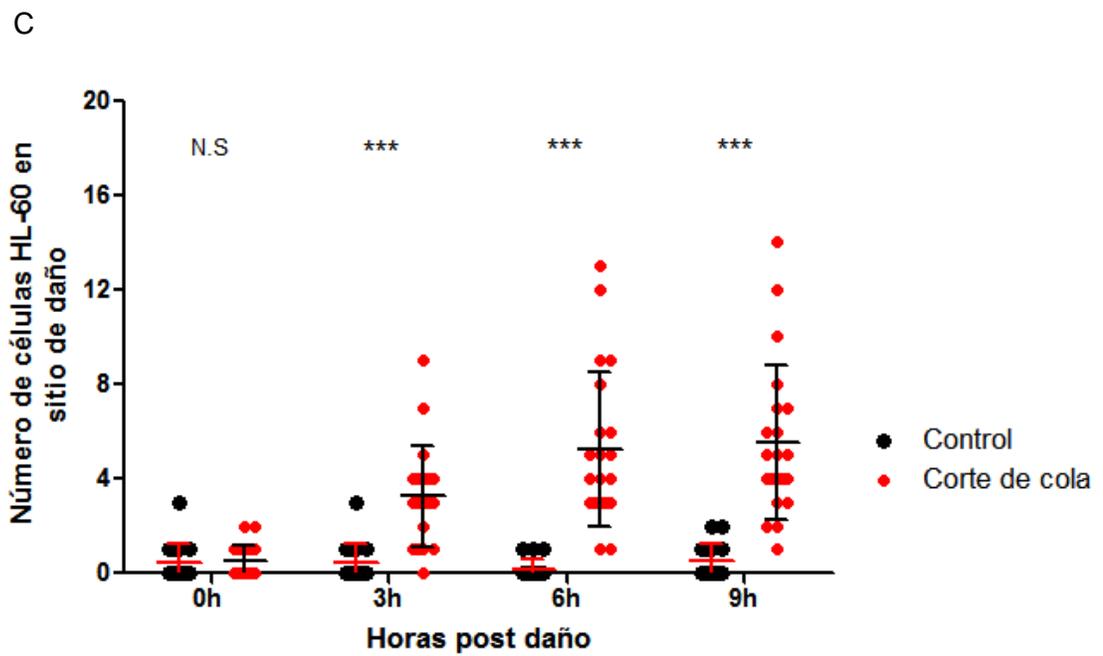
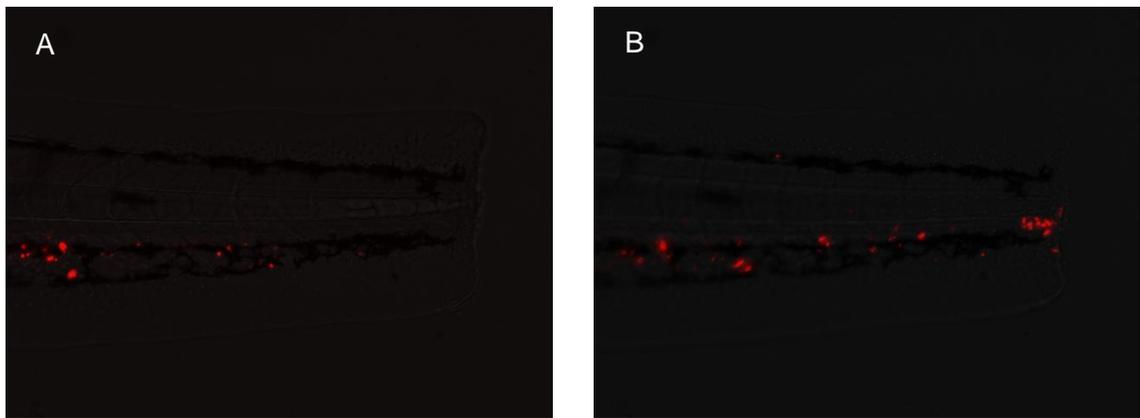


Figura 7: Células HL-60 migran hacia sitio de inflamación tras corte de cola. **A.** Corte de cola a larva Tab5 de 2 dpf. **B.** 4 hpc se observa el reclutamiento hacia el sitio de daño de las células humanas. **C.** Cuantificación del número de células HL-60 en el sitio de corte tras 0, 3, 6, y 9 hpc.

7. Análisis proteómico de larvas trasplantadas con células HL-60

La migración de las células HL-60 a los sitios de inflamación tanto por infección con *Salmonella* como por corte de cola revela la capacidad de respuesta ante estímulos inflamatorios que estas células tienen en un contexto heterólogo *in vivo*. Para entender en mayor profundidad este proceso, se evaluó cuáles son las proteínas expresadas por las células HL-60 en respuesta a la infección bacteriana, y también cuales son las proteínas expresadas por el pez cebra en respuesta al xenotrasplante. Se realizó para esto un análisis proteómico cuantitativo de 10 larvas xenotrasplantadas de 2 dpf, 6 horas después de haber sido infectadas de forma sistémica con *Salmonella*, y de larvas 10 de 2dpf xenotrasplantadas y no infectadas. Como muestras controles se analizó un cultivo celular de 1×10^6 células HL-60 con el mismo tratamiento previo a ser inyectadas en el pez, y por último 10 larvas de pez cebra de 2dpf inyectadas con PBS a las 4 hpf (Tabla 1).

Tabla 1: Descripción de las cuatro muestras secuenciadas.

| Muestra | HL-60 | Pez Cebra | Salmonella |
|---------|-------|-----------|------------|
| 1 | + | - | - |
| 2 | + | + | - |
| 3 | + | + | + |
| 4 | - | + | - |

El análisis proteómico cuantitativo reveló cerca de 50000 proteínas por muestra. Se realizó un filtro de parsimonia, lo que redujo el número total de proteínas por muestra a unas 13000. Mediante el uso de la plataforma online Panther (www.pantherdb.org), se clasificaron las proteínas de cada muestra según el proceso biológico al que están asociadas en la base de datos de GeneOntology. El porcentaje de proteínas que

pertenece a los distintos procesos biológicos permaneció relativamente constante entre muestras (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación funcional de proteínas identificadas en cada muestra. Se seleccionó el total de proteínas identificadas en cada muestra y se clasificaron acorde al proceso biológico al cual están asociadas según *Gene ontology*.

| | Muestra 1 | Muestra 2 | | Muestra 3 | | Muestra 4 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Proceso Biológico | Humano | Humano | Pez cebra | Humano | Pez cebra | Pez cebra |
| Adhesión Biológica | 82 | 57 | 107 | 49 | 109 | 124 |
| Regulación Biológica | 301 | 172 | 252 | 164 | 252 | 299 |
| Eliminación Celular | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Biogénesis | 449 | 224 | 375 | 208 | 378 | 413 |
| Proceso Celular | 1614 | 840 | 1410 | 805 | 1370 | 1564 |
| Desarrollo | 295 | 172 | 353 | 173 | 349 | 373 |
| Crecimiento | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Sistema Inmune | 182 | 100 | 188 | 106 | 186 | 232 |
| Localización | 417 | 222 | 403 | 204 | 390 | 461 |
| Locomoción | 18 | 7 | 17 | 14 | 22 | 30 |
| Proceso Metabólico | 1505 | 700 | 1236 | 681 | 1217 | 1393 |
| Organización Multicelular | 237 | 151 | 272 | 144 | 260 | 300 |
| Reproducción | 74 | 39 | 49 | 39 | 42 | 59 |
| Respuesta a Estímulos | 360 | 201 | 323 | 182 | 319 | 362 |
| Proceso Rítmico | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | | | | | | |
| Total Procesos | 5538 | 2886 | 4986 | 2771 | 4896 | 5612 |
| Total proteínas buscadas en Panther | 12255 | 6043 | 7107 | 5669 | 7005 | 9478 |
| Porcentaje de proteínas asociadas a un proceso biológico | 45,19 | 47,76 | 70,16 | 48,88 | 69,89 | 59,21 |

Al revisar los proteomas de cada muestra de forma global, no se observaron mayores diferencias en los porcentajes de proteínas asociadas a procesos biológicos entre cada muestra. Por ejemplo, al comparar las proteínas humanas totales asociadas a la categoría “Sistema Inmune” de la muestra 2 contra la muestra 3, los números prácticamente no cambian (100 proteínas en muestra 2, y 106 proteínas en muestra 3). Aun así se debe considerar que este tipo de análisis sólo considera número de proteínas asociadas a un proceso biológico, y no si estas proteínas son iguales o distintas entre sí.

Posteriormente se comparó el número de proteínas humanas de la muestra 2 y 3 asociadas a las subcategorías del proceso “Sistema Inmune” (Figura 8). La muestra 3 presenta un número de mayor de proteínas asociadas a las categorías “Respuesta Inmune” y “Presentación y procesamiento de antígeno”, mientras que presenta un menor número de proteínas asociadas a la categoría “Activación de Macrófagos”. Dentro del proceso biológico “Respuesta Inmune”, la mayoría de las proteínas que están presentes en la muestra 3 y no en la 2 corresponden a proteínas asociadas al proceso “Activación del Complemento”.

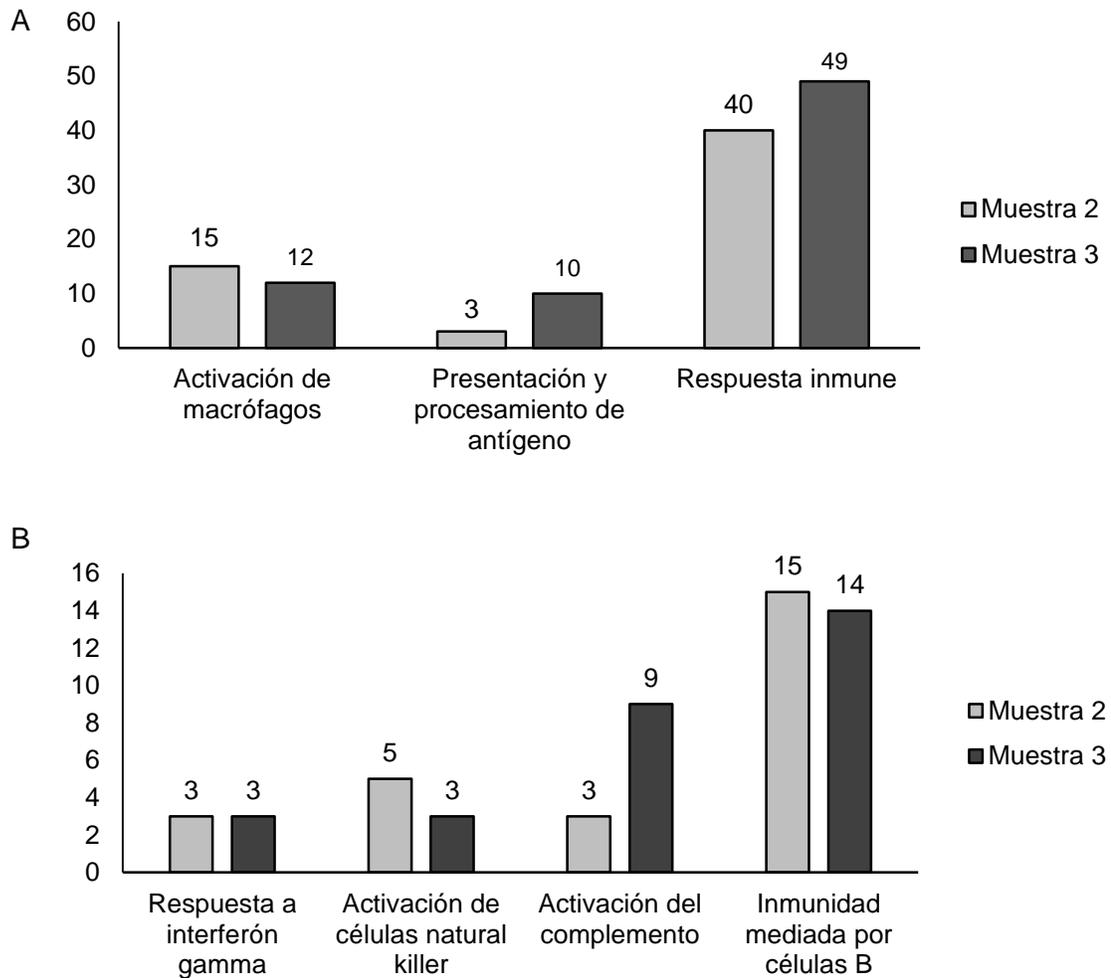


Figura 8: Gráficos de frecuencia de proteínas humanas de muestra 2 y muestra 3 asociadas a procesos biológicos. **A.** Número de proteínas humanas asociadas a los procesos de “Sistema Inmune”. **B.** Número de proteínas humanas asociadas a los procesos de “Respuesta Inmune”. Se observa un leve aumento en el número de proteínas asociadas a los procesos de “Presentación y procesamiento de antígeno”, y de “Respuesta Inmune” en la muestra 3 respecto a la 2.

Se realizó luego el mismo procedimiento, pero esta vez comprando las proteínas de pez cebra de las muestra 2 y la muestra 4 asociadas a las subcategorías del proceso biológico “Proceso de Desarrollo” (Figura 9). La muestra 2 presenta un mayor número de proteínas asociadas a la categoría “Especificación de patrón”, mientras que en la muestra 4 hay un mayor número de proteínas pertenecientes al proceso “Diferenciación

celular”. Dentro de la categoría “Desarrollo de sistema”, la muestra 4 tiene un 33% más de proteínas asociadas al proceso “Desarrollo de corazón” que la muestra 2.

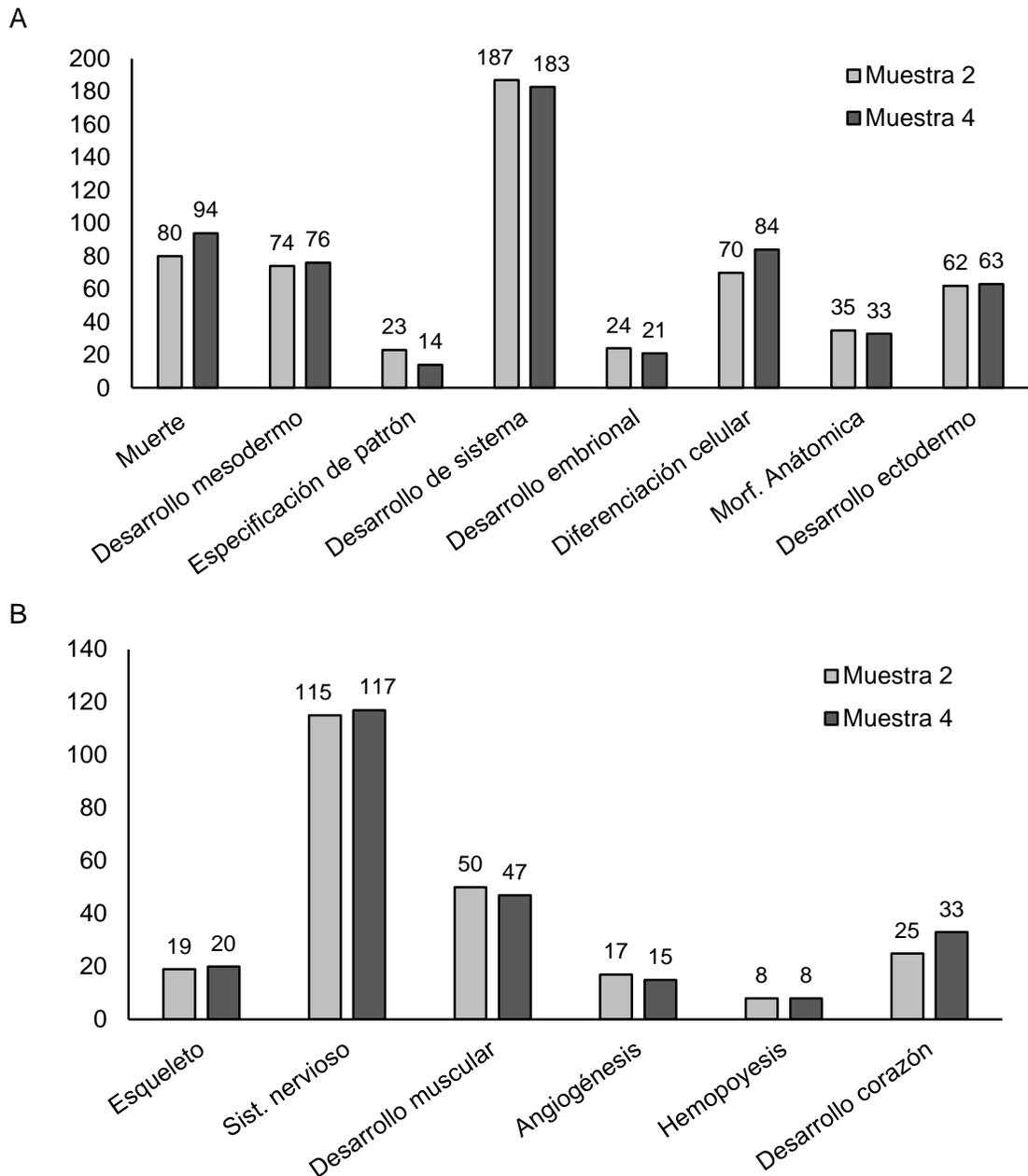


Figura 9: Gráficos de frecuencia de proteínas de pez cebra de la muestra 2 y 4 asociadas a procesos biológicos. **A.** Número de proteínas asociadas a las categorías de “Proceso de Desarrollo”. **B.** Número de proteínas asociadas a las categorías del proceso “Desarrollo de Sistema”. No hay grandes diferencias entre ambas muestras, excepto en las categorías “Diferenciación celular” y “Desarrollo de Corazón.”

8. Selección de posibles marcadores moleculares asociados a respuesta inmune de células humanas.

Dentro del listado completo de proteínas obtenido para cada muestra tras la secuenciación, muchas proteínas estuvieron presentes en más de una de ellas. Estas proteínas fueron detectadas con distintos niveles de intensidad en cada muestra, lo que entrega una idea de su nivel de abundancia. Con el objetivo de identificar posibles marcadores moleculares asociados al proceso de respuesta de las células humanas a la infección bacteriana, se buscaron aquellas proteínas humanas que más cambiaron su nivel de intensidad comparando la muestra 2 y la muestra 3, con el fin de encontrar proteínas asociadas al proceso de respuesta inmune o de diferenciación celular. También se buscaron proteínas de pez cebra con cambios significativos comparando la muestra 2 y la muestra 4, para así comprender cómo el pez cebra responde al xenotrasplante. Se consideraron como proteínas con cambios significativos todas aquellas proteínas cuyo cambio fuese mayor a 2 veces la desviación estándar. Esto se calcula en base al logaritmo en base dos del cociente entre la intensidad en la muestra

2 dividido por la intensidad en la muestra 3: $\log_2 \frac{\text{intensidad muestra 2}}{\text{intensidad muestra 3}}$.

De esta forma se identificaron 192 proteínas humanas y 335 proteínas de pez cebra, las cuales fueron buscadas en la base de datos de Uniprot (www.uniprot.org). De las 192 proteínas humanas, se encontraron 28 proteínas involucradas directamente en procesos de respuesta inmune, migración y diferenciación de células hematopoyéticas, según estudios previos (Tabla 3 y 4). En el caso de las proteínas de pez cebra, se encontraron 36 proteínas que participan directamente en procesos de desarrollo, principalmente en desarrollo de músculo, desarrollo neuronal y de células troncales hematopoyéticas (Tabla 5 y 6).

Tabla 3: Proteínas humanas disminuidas en muestra 3 respecto a la muestra 2.

| Gen | Proteína | Función |
|------------|--|---|
| NR1H3 | Oxysterols receptor LXR-alpha | Diversos efectos en respuesta del sistema inmune innato |
| EHMT2 | Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2 | Su inhibición conlleva a diferenciación en células HL60 |
| RACK1 | Receptor of activated protein C kinase 1 | Promueve proliferación de células de LMA |
| NEDD4 | E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4 | Protooncogen (no estudiado en leucemia) |
| SWT1 | Transcriptional protein SWT1 | Sobreexpresado en LPA |
| SATB1 | DNA-binding protein SATB1 | Regula positivamente la expresión de PU.1 |
| NLRC5 | NLRC5 | Modulador negativo de la respuesta inflamatoria |
| PLCG1 | 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1 | Requerida para la mantención de CTLM |
| SSC5D | Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D | Interactúa físicamente con ciertas bacterias |
| XRCC5 | X-ray repair cross-complementing protein 5 | Baja su expresión en células HL-60 tratadas con A.R |
| F2RL1 | Proteinase-activated receptor 2 | Agonista de esta proteína reduce la migración celular |
| ANAPC1 | Anaphase-promoting complex subunit 1 | Importante en la progresión del ciclo celular |
| TCAF1 | TRPM8 channel-associated factor 1 | Inhibe la migración de células de cáncer de próstata |
| PCSK6 | Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 | Posible rol en maduración de proteína TACE |

Tabla 4: Proteínas humanas aumentadas en muestra 3 respecto a muestra 2

| Gen | Proteína | Función |
|------------|---|---|
| SLIT3 | Slit homolog 3 protein | Incrementa la migración de monocitos primarios |
| EDC4 | Enhancer of mRNA-decapping protein 4 | Importante en la regulación de IL-6 |
| ITGAX | Integrin alpha-X | Inducido durante diferenciación de monocitos y granulocitos |
| CPSF1 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 | Sobrevida de células troncales hematopoyéticas |
| DIDO1 | Death-inducer obliterator 1 | Modula la diferenciación y división celular |
| FAM40B | Family with sequence similarity 40, member B | Migración celular |
| ITGB2 | Integrin beta-2 | Importante en función inmune innata |
| CHD8 | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 | Importante en proliferación de células de LMA |
| SLC15A1 | Solute carrier family 15 member 1 | Transportador de peptidoglicano |
| IDH1 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic | Permite diferenciación celular |
| MED12 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 | Regulador esencial de la homeostasis de HSC |
| STAT5A | Signal transducer and activator of transcription 5A | Participa en producción de IL-6 |
| RUFY4 | RUN and FYVE domain-containing protein 4 | Regulador positivo de la autofagia |
| CDK7 | Cyclin-dependent kinase 7 | Promueve el paso de G2/M del ciclo celular |

Tabla 5: Proteínas de pez cebra disminuidas en muestra 2 respecto a muestra 4.

| Gen | Proteína | Función |
|---------|--|--|
| sarm1 | Sterile alpha and TIR motif-containing 1 | Regula morfología neuronal |
| syncrip | Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein | Sinapsis neuromuscular |
| anxa11a | Annexin | Expresado en músculo dañado |
| dchs1b | Dachsous cadherin-related 1b | Desarrollo de válvula mitral |
| vmhcl | Ventricular myosin heavy chain-like | Expresado en corazón en desarrollo |
| ttn.2 | Titin | Mantenimiento de sarcómeros en musculo estriado |
| srl | Sarcalumenin | Función cardiaca bajo estrés fisiológico |
| tenm3 | Teneurin-3 | Conexión funcional de células de ganglio de retina |
| vdra | Vitamin D3 receptor A | Expresado en musculo esquelético |
| gsk3ab | Glycogen synthase kinase 3 alpha b | Necesario para la sobrevivencia de cardiomiocitos |
| hlx1 | H2.0-like homeo box 1 | Desarrollo de Sistema nervioso central |
| lmo7b | LIM domain 7b | Desarrollo de corazón |
| kdm6al | Lysine (K)-specific demethylase 6A | Desarrollo de corazón |
| dot1l | Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific | Proliferación y homeostasis de intestino |
| rasa1b | RAS p21 protein activator | Desarrollo vascular |
| myo18ab | Myosin XVIIIAb | Integridad y función muscular durante desarrollo |
| col6a3 | Collagen, type VI, alpha 3 | Integridad muscular |

| | | |
|---------|---|--|
| entpd5b | Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5b | Homeostasis de fosfato y mineralización ósea |
| tfap2c | Transcription factor AP-2 gamma | Desarrollo de cresta neural |
| ncl | Nucleolin | Desarrollo de corazón |

Tabla 6: Proteínas de pez cebra aumentadas en muestra 2 respecto a la muestra 4

| Gen | Proteína | Función |
|------------|---|---|
| neb | nebulin | Desarrollo de músculo |
| sema3ga | semaphorin 3ga | Migración de células de cresta neural |
| mbtps1 | Site-1 protease | Rol en somitogénesis |
| tra2b | Splicing factor, arginine/serine-rich, 10 | Rol en somitogénesis y en desarrollo neuronal |
| trim3a | Tripartite motif-containing 3a | Respuesta inmune a patógenos |
| setdb1b | Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1-B | Mantención de HSC |
| bmi1a | Polycomb complex protein BMI-1-A | Renovación y mantenimiento de HSC |
| hdac8 | Histone deacetylase 8 | Regula quiescencia y mantención de HSC |
| hpse2 | Heparanase 2 | Importante en inmunidad innata |
| ncor2 | Nuclear receptor corepressor 2 | Desarrollo de HSC |

| | | |
|--------|----------------------------------|---|
| erbb4a | Receptor protein-tyrosine kinase | Estimula mitosis de progenitores neurales |
| flii | Flightless I | Proteína reguladora de actina |
| zeb2a | Uncharacterized protein | Importante en patrón neuronal |
| klb | Klotho beta | Anti envejecimiento |
| ntm | Neurotrimin | Regula el desarrollo de proyecciones neuronales |
| strip2 | Striatin-interacting protein 2 | Regulación de crecimiento y migración celular |

DISCUSIÓN

El uso de modelos animales para el estudio del cáncer ha sido fundamental en los avances que se han logrado en la comprensión de esta enfermedad. Los xenotrasplantes de células tumorales humanas en animales han permitido estudiar dichas células en un contexto fisiológico complejo, más cercano al ambiente propio en el que se desarrolla la enfermedad, que el que se obtiene en los cultivos *in vitro*. En este trabajo se estudió el comportamiento de distintas líneas celulares humanas de cáncer trasplantadas en embriones de pez cebra, con el objetivo de encontrar marcadores moleculares asociados a procesos de progresión tumoral o de diferenciación celular.

1. Establecimiento de xenotrasplantes de células de neuroblastoma y leucemia en el pez cebra

El modelo de pez cebra presenta importantes ventajas para estudiar el comportamiento de células tumorales humanas en un contexto *in vivo*. Sin embargo, las células de pez cebra y humanas se incuban a temperaturas diferentes, lo que presenta una dificultad experimental. La temperatura de incubación estándar del pez cebra es de 28°C (Kimmel y col., 1995). Por su parte, los cultivos celulares humanos son crecidos a 37°C, lo que significa una importante diferencia de temperatura entre células humanas y el pez cebra. Sin embargo se ha reportado que peces cebra incubados hasta 35°C no ven afectado su plan de desarrollo (Haldi y col., 2006), mientras que otros estudios indican que sobre 34°C los embriones presentan problemas e incluso mueren antes de

los 4dpf (Pruvot y col., 2011). En el caso de las células humanas, estudios muestran que en trasplantes de líneas celulares derivadas de tumores del sistema nervioso (línea U87) y de leucemia (Jurkat, NB4 y K562) en pez cebra, parámetros como la supervivencia y la proliferación no se ven afectados al ser cultivadas a 28°C y 34°C respectivamente (Zhao y col., 2009; Pruvot y col., 2011). Considerando lo anterior, en este estudio se escogió una temperatura de 34°C para la incubación de embriones inyectados con células humanas.

Las células de neuroblastoma de las líneas celulares SK-N-SH y SH-SY5Y mostraron los mismos patrones de distribución tras ser inyectadas en embriones de 4hpf. En la mayoría de las larvas la masa de células humanas se ubicó en la cabeza, y no se observó migración, es decir las células siempre mantuvieron su posición. La ubicación no azarosa de las células de neuroblastoma podía deberse a que éstas estuvieran respondiendo a señales moleculares del pez cebra, que las hicieran migrar hacia la región anterior. Por otro lado, el fenómeno podía explicarse considerando que las células de la región central del blastodisco cercanas al polo animal, tras la gastrulación, pasarán a formar estructuras de la región anterior del pez, como los ojos, cerebro, nariz, piel, entre otros (Gilbert, 2011), por lo que por el simple arrastre de las células humanas producto de los movimientos de las células del pez, las células de neuroblastoma se ubicarán en la región anterior. Estudios previos de xenotrasplantes han mostrado que la ubicación de células humanas inyectadas en embriones tempranos de pez cebra depende del sitio de inyección (Lee y cols., 2005). Para comprobar esta segunda hipótesis, se cambió la región de inyección, desde el centro del blastodisco hacia el borde. Al cambiar el sitio de inyección la distribución de las células humanas también cambió (Figura 2D). Al inyectar en la región externa del blastodisco, la mayoría de las

células se ubicó en la región media de la larva, comprendida entre el fin de la cabeza hasta el ano. Por lo tanto, el sitio de inyección en la blástula es determinante para la ubicación del tumor en el embrión de pez cebra.

2. Seguimiento del comportamiento de células cancerígenas xenotrasplantadas en el pez cebra.

Las células tumorales poseen una serie de características distintivas, como su capacidad de proliferar constantemente, la capacidad de realizar metástasis e invadir otros tejidos, evitar ser reconocidas y destruidas por el sistema inmune, entre otras (Hanahan y Weinberg, 2011). Las características mencionadas son de fácil evaluación en el modelo de pez cebra debido a la transparencia de éste en estadíos tempranos, lo que permite hacer un seguimiento de las células en un contexto *in vivo* y en tiempo real. En nuestro modelo se utilizaron las líneas celulares de neuroblastoma SK-N-SH y SK-SY5Y, que expresan GFP de manera constitutiva, permitiendo su seguimiento en el pez cebra. Ninguna de las larvas xenotrasplantadas mostró un aumento en la intensidad de fluorescencia en el tiempo, lo que habría sido un indicador de proliferación de las células cancerígenas. Una vez inyectadas en embriones de pez cebra en estadio de blástula, las células humanas permanecieron como una masa celular, y no modificaron su posición durante los siete días que fueron seguidas. Sólo se observó una pérdida en la intensidad de fluorescencia a lo largo de los días, llegando ésta a desaparecer en casi la mitad de las larvas tras el periodo mencionado. Una de las posibles causas que explique la ausencia de proliferación y/o migración es la muerte de las células causada por la diferencia de temperatura a la cual estas células son crecidas en cultivo en comparación con la temperatura a la cual son incubadas una vez que están en el pez

cebra. No hay reportes en la literatura de trasplantes de líneas celulares de neuroblastoma en pez cebra, aunque hay reportes de líneas celulares de otros tipos de cáncer de sistema nervioso, como el glioblastoma. Estas células lograron crecer en embriones de pez cebra incubados a 28°C (Zhao y col., 2009), lo que sugiere que la temperatura no sería un factor tan crítico. Por otro lado es posible que el microambiente en el cual se desarrollan estas células en el pez resulte tener un efecto supresor de la proliferación de las células de neuroblastoma.

Uno de los sitios de inyección más utilizados para realizar los trasplantes es el vitelo del pez a los 2dpf, debido a que es un ambiente rico en nutrientes y es libre de células, permitiendo el crecimiento celular y la migración sólo mediante movimientos activos (Veinotte y cols., 2014). Se realizaron ensayos de trasplante de células de neuroblastoma en el vitelo de larvas de 2dpf, sin embargo nuevamente no se observó proliferación ni migración. En este tipo de ensayo la fluorescencia de las células humanas se perdió en sólo un día en la totalidad de las larvas inyectadas, lo que es mucho más rápido si lo comparamos con el ensayo de inyección en blástula. Este resultado sugiere que el vitelo es un ambiente hostil para este tipo celular.

La línea celular HL-60 ha sido ampliamente usada en el estudio del control de la proliferación y de la diferenciación celular (Sun y Wang, 1995), y más recientemente se ha utilizado para el estudio de leucemia promielocítica aguda en modelos animales, principalmente en modelo murino (Amir y cols., 1998; Zhao y cols., 2006; Lin y cols., 2011). Sin embargo, no se han realizado estudios de esta línea celular en modelo de pez cebra. Gracias a las características de este animal, se logró visualizar en tiempo real el destino y comportamiento de estas células humanas.

Como estrategia alternativa, se inyectaron células HL-60 en embriones de 4hpf y se observó la distribución de éstas dos días después. A diferencia de las células de neuroblastoma, las células HL-60 no forman una masa celular, sino que se distribuyen a lo largo del pez. La mayoría de éstas se encuentra en el tejido caudal hematopoyético, un tejido análogo al hígado fetal de mamíferos (Kulkeaw y Sugiyama, 2012). Esto sugiere conservación en la señalización que destina a los progenitores mieloides a esta zona. Un reciente estudio demuestra que células humanas provenientes de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple, son capaces de migrar al tejido caudal hematopoyético de larvas de pez cebra tras ser inyectadas en la circulación. Además demostraron que el eje de señalización CXCR4 – CXCL12, la integrina VLA-4 y la quinasa FAK, todas moléculas que participan en la migración y/o adhesión de células de mieloma múltiple en la médula ósea de mamíferos, son importantes para la colonización de las células humanas en el tejido caudal hematopoyético del pez cebra, lo que confirma una conservación en vertebrados de las señales moleculares que participan en la migración hacia los nichos hematopoyéticos (Sacco y col., 2016).

El número de marcas fluorescentes permaneció constante en el tiempo, lo que nos sugiere que las células HL-60 no están proliferando en el pez. Sin embargo, la marca fluorescente proviene de un trazador, que pierde intensidad en el tiempo, por lo que no podemos asegurar que la proliferación no existe. Células que expresen una proteína fluorescente de manera estable, o el uso de técnicas de inmunofluorescencia contra proteínas específicas de proliferación serían de gran utilidad para responder esta interrogante.

Considerando que las células HL-60 son progenitores mieloides que pueden diferenciarse a neutrófilos o macrófagos dependiendo de las señales del medio, se

evaluó si estas células eran capaces de responder a señales inflamatorias en el pez cebra. Para evaluar esto, se realizaron dos ensayos: el primero en base a una infección local en la vesícula ótica con la bacteria *Salmonella* Typhimurium, y el segundo partiendo de la transección de la aleta caudal de las larvas de pez cebra. En ambos casos se observó un reclutamiento de las células humanas al sitio de inflamación. Además, la cinética de inflamación es muy similar a la cinética de la respuesta de neutrófilos del pez cebra ante eventos de infección bacteriana y daño tisular (Mathias y cols., 2006), lo que sugiere una conservación en el tipo de respuesta entre células mieloides humanas y de pez cebra. En concordancia con esta idea, se ha descrito que los neutrófilos del pez cebra son similares a los de mamíferos en morfología, comportamiento y función, además de que ambos responden a similares señales moleculares de reclutamiento a sitios de daño y/o infección (de Oliveira y cols., 2016), Estos resultados proponen al pez cebra como un excelente modelo para estudiar el comportamiento de células inmunes mieloides humanas en un contexto *in vivo*.

3. Proteómica de embriones de pez cebra trasplantados con células humanas

Mediante la técnica de proteómica cuantitativa se buscó conocer las proteínas humanas y de pez cebra involucradas en la respuesta a los procesos de xenotrasplante y de infección por *Salmonella* Typhimurium. En términos globales, los porcentajes de proteínas asociadas a los diferentes procesos biológicos en los que fueron clasificadas no variaron considerablemente entre las distintas muestras. Se esperaba una diferencia mayor al comparar algunos procesos biológicos entre muestras. Por ejemplo, tras comparar la muestra de xenotrasplante con la de xenotrasplante e infección (muestra 2 y muestra 3, respectivamente), se esperaba en esta última un mayor número de

proteínas asociadas al proceso biológico “Sistema Inmune”, considerando que en esta muestra el pez se encontraba bajo una infección bacteriana sistémica. La escasa diferencia se explica en parte debido a que el porcentaje de proteínas que fue asociada a un proceso biológico fue siempre menor al 50% en el caso de las proteínas humanas, mientras que para las proteínas de pez cebra el porcentaje varió entre un 50% y un 70% dependiendo de la muestra. Esto nos indica que un alto número de proteínas (en el caso de las proteínas humanas es más de la mitad) no fue asociada a ningún proceso. Por otro lado, este tipo de análisis sólo considera presencia o ausencia de una proteína, sin considerar las variaciones en los niveles de abundancia de la proteína.

Dado los resultados de migración de las células HL-60 hacia los sitios de inflamación, se enfocó la búsqueda de proteínas humanas en el proceso biológico de “Sistema Inmune”. Por otro lado, se ha reportado que el lipopolisacárido de bacterias como *Salmonella Typhimurium* es capaz de inducir la diferenciación de células mieloides en granulocitos y macrófagos (Weiss y Sachs, 1977), por lo que también la búsqueda se enfocó en el proceso biológico de “Desarrollo”, dentro del cual se encuentran sub procesos como el de hematopoyesis.

Al desglosar el proceso biológico “Sistema inmune” se observaron algunas diferencias entre la muestra 2 y la 3. El número de proteínas asociadas al proceso “Respuesta Inmune” fue aproximadamente un 20% mayor en la muestra con infección bacteriana, perteneciendo la mayoría de estas proteínas al proceso de “Activación del complemento”. Estudios previos muestran que bacterias como *Corynebacterium parvum* pueden inducir en macrófagos la producción de proteínas del complemento (Zimmer y col., 1982). De forma contraproducente, en la muestra 3 hay menos proteínas asociadas al proceso “Activación de Macrófagos”, aunque en la muestra 3 aparecen proteínas

asociadas a procesos de respuesta y diferenciación de células mieloides que están ausente en la muestra 2. Por ejemplo, la proteína G-CSFr (granulocyte colony-stimulating factor receptor, por sus siglas en inglés) es considerada un marcador específico de granulocitos (Theilgaard-Mönch y col., 2005). Por otro lado, algunos marcadores de células de leucemia promielocítica que dan cuenta de células no diferenciadas, como el caso del receptor de leptina (Nakao y col., 1998), aparecen en la muestra 3 y no en la 2, lo que sugiere que hay aún un número considerable de células no diferenciadas en la muestra 3.

Las células de leucemia humana podrían afectar el patrón de proteínas propias del pez, afectando de esta forma su desarrollo. Se ha reportado que células de melanoma humano pueden inducir la formación de ectópica del eje embrionario en embriones de pez cebra por medio de la secreción de la proteína Nodal, que es un potente morfógeno (Topczewska y col., 2006), lo que confirma una comunicación entre las células humanas y el pez. Teniendo esto en mente, se evaluó cómo el xenotrasplante podía afectar el desarrollo de embriones de pez cebra comparando el proteoma de la muestra 2 (xenotrasplante) con la muestra 4 (larvas control). No se observaron mayores diferencias en cuanto al número de proteínas asociadas al proceso biológico "Desarrollo". En cuanto a los subprocesos, se encontró un aumento del 33% en la muestra dos en proteínas asociadas al proceso "Desarrollo de corazón". Nuevamente, se debe considerar que este tipo de ensayos sólo considera presencia o ausencia de proteínas, y no cambios en los niveles de abundancia de éstas. Además, el análisis proteómico de la muestra 4 reveló cerca de 10000 proteínas, de las cuales el 100% corresponde a proteínas de pez cebra, mientras que en la muestra 2 contiene unas 13000 proteínas, de las cuales unas 7000 son de pez cebra y cerca de 6000 son

proteínas humanas, por lo que es de esperar que haya un mayor número de proteínas de pez cebra asociadas a los distintos procesos biológicos en la muestra 4.

Posteriormente se analizaron aquellas proteínas con cambios significativos en sus niveles de abundancia, comparando la muestra 2 con la 3 para las proteínas humanas, y la muestra 2 con 4 para las proteínas de pez cebra. Se encontraron 28 proteínas humanas cuyas funciones están implicadas en hematopoyesis o función inmune. Entre las proteínas cuyos niveles son más altos en la muestra 2 se encuentran una serie de proteínas implicadas en la proliferación de células de LPA. Las proteínas codificadas por los genes EHMT2, RACK1 y PLCG1 promueven la proliferación de células de leucemia mieloide aguda (Savickiene y col., 2014; Zhang y col., 2013; Schnoeder y col., 2016). Se encontró además la proteína codificada por el gen XRCC5, la cual, según un estudio previo, baja sus niveles de expresión en células HL-60 diferenciadas tras un tratamiento con ácido retinoico (Wang y col., 2009). Por otro lado, al analizar las proteínas con niveles aumentados en la muestra 3, se encontraron varias proteínas implicadas en respuesta inmune innata, migración celular y en diferenciación celular. Las codificadas por los genes EDC4, ITGB2 y STAT5A han sido descritas como importantes en la respuesta inmune innata ante infecciones bacterianas (Seto y col., 2015; Mócsa y col., 2006; Kawashima y col., 2001). Además, y en concordancia con las proteínas disminuidas en esta muestra respecto a la 2, se encontraron 5 proteínas involucradas en el proceso de diferenciación celular. Entre éstas, ITGAX aumenta su expresión durante la diferenciación de monocitos y granulocitos (Shelley y col., 2002), mientras que DIDO1 e IDH1 han sido descritas como promotoras de la diferenciación en diferentes tipos celulares (Fütterer y col., 2017; Birendra y DiNardo, 2016). Estos

resultados sugieren que el contexto de infección por Salmonella en el pez cebra promueve la diferenciación de las células HL-60.

Las células HL-60 se pueden diferenciar con una serie de compuestos, entre ellos el DMSO. El trazador fluorescente utilizado en este trabajo para seguir visualmente a las células humanas está preparado en DMSO. Sin embargo, los protocolos de diferenciación de esta línea celular utilizando este reactivo utilizan concentraciones superiores al 1%, y durante al menos 7 días (Millius y Weiner, 2010). Nuestro ensayo utiliza una proporción de 1/2000, se administra durante 30 minutos y luego se realizan lavados con PBS, por lo que descartamos que el efecto de diferenciación sea producto del trazador.

El análisis de las proteínas que más variaron sus niveles en pez cebra mostró 36 proteínas asociadas a procesos de desarrollo, principalmente neural, muscular y de células troncales hematopoyéticas. En la muestra con xenotrasplante, es decir la muestra 2, se encontraron 16 proteínas con niveles significativamente aumentados respecto a la muestra control. Estas proteínas pertenecen a diversos procesos, siendo el más representado el de desarrollo neural. Se sabe que las células del sistema inmune innato no sólo tienen un rol en la respuesta inflamatoria, sino que también en el desarrollo, la regeneración y la homeostasis (Wynn y col., 2013; Nicolás-Ávila y col., 2017). El rol de estas células en procesos de desarrollo está tomando cada vez más relevancia. Recientemente se ha descrito que los macrófagos del pez cebra son capaces de guiar y modelar el patrón de pigmentación (Eom y Parichy, 2017), y que el proceso de desarrollo angiogénico de vasos anastomóticos longitudinales dorsales es dependiente de este tipo celular (Gerri y col., 2017). Esto confirma que el sistema inmune

es relevante no sólo en el combate de patógenos, sino también en el desarrollo del pez cebra.

Se sabe que el sistema inmune y el sistema nervioso se regulan mutuamente. La evidencia sugiere que varias proteínas clasificadas como inmunes tienen funciones no inmunes en el cerebro, entre ellas se encuentran citoquinas pro inflamatorias, proteínas del sistema inmune innato (como proteínas del complemento), proteínas del sistema inmune adaptativo y inmunorreceptores de unión a MHC I (Boulanger, 2009). Además, ciertas citoquinas tienen efectos directos en el desarrollo del sistema nervioso. Se ha reportado que IL-6, una citoquina proinflamatoria, altera el desarrollo de cerebro en embriones de ratón (Smith y col., 2007), mientras que otras proteínas inmunes están implicadas en eventos de desarrollo neuronal posteriores, como el establecimiento y maduración de conexiones sinápticas (Boulanger, 2009). Es posible entonces que proteínas inmunes secretadas por las células HL-60 estén modulando el desarrollo del sistema nervioso de los embriones de pez cebra.

Estudios previos han mostrado que el sistema inmune innato modula homeostasis del nicho hematopoyético (revisado en Casanova-Acebes y col., 2014). Esta modulación también se ha reportado en un experimento de xenotrasplantes de células de leucemia humana en modelo murino, las cuales son capaces de afectar el microambiente de la médula ósea del hospedero (Colmone y col., 2008). Por lo tanto, el aumento de la cantidad de proteínas de pez cebra involucradas en procesos de homeostasis de células hematopoyéticas puede estar regulado por las células de leucemia humana.

El xenotrasplante produjo una disminución en los niveles de 20 proteínas de pez cebra relacionadas con procesos de desarrollo, fundamentalmente con desarrollo de músculo cardíaco y esquelético. A pesar de las variaciones en los niveles de estas proteínas, las larvas trasplantadas con células humanas tenían un fenotipo normal. En la literatura no hay reportes de trasplantes de células de leucemia que afecten el desarrollo muscular. Sin embargo hay bastante conocimiento acerca de cómo células del sistema inmune innato modulan la regeneración de tejidos dañados en pez cebra y otros organismos (Aurora y Olson, 2014), y se ha postulado que el proceso regenerativo recapitula ciertos procesos del desarrollo. Por lo tanto es posible que algunos de los factores moleculares secretados por el sistema inmune que modulan la regeneración estén involucrados en esta modulación de los niveles de proteínas relacionados con el desarrollo. Se requieren experimentos adicionales que aborden más profundamente cómo la baja en los niveles de estas proteínas podría estar afectando el desarrollo de los embriones, por ejemplo mediante el uso de morfolinós que afecten el ARNm de estos genes candidatos, o la generación de mutantes de los mismos. Además se requiere comprobar si efectivamente esta baja es causada por factores liberados por las células HL-60.

Los resultados obtenidos en este trabajo comprueban que el pez cebra es un modelo funcional para el estudio *in vivo* de ciertas células humanas. Aunque el microambiente en el pez cebra no fue óptimo para el seguimiento de células de neuroblastoma, las células de leucemia mostraron migración hacia nichos hematopoyéticos, y fueron capaces de responder a señales inflamatorias. Gracias al uso de la proteómica cuantitativa se logró conocer parte de las proteínas involucradas en el proceso de interacción entre las células humanas, el hospedero teleosteo y un patógeno

bacteriano. Futuros experimentos que aborden el rol de las proteínas sugeridas en este trabajo en estas interacciones ayudarán a entender mejor la compleja relación entre que surge tras un trasplante de células entre organismos de distintas especies.

Gracias a las ventajas que presenta el pez cebra, el modelo de xenotrasplante desarrollado en este trabajo podría ser de mucha utilidad para comprender la función inmune de células mieloides humanas.

CONCLUSIONES

En base a los resultados de este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

1. Embriones de pez cebra son un modelo con muchas ventajas para el estudio del comportamiento de células tumorales humanas en tiempo real e *in vivo*.
2. La ubicación de las células tumorales en el pez depende en gran parte de factores como el tipo celular y el sitio de inyección en el embrión.
3. Las células de neuroblastoma no proliferan en el pez cebra, y el tiempo de supervivencia que tienen depende del lugar donde fueron inyectadas.
4. Las células de leucemia humana de la línea HL-60 colonizan nichos hematopoyéticos en el pez cebra, y son capaces de responder a estímulos inflamatorios tanto infecciosos como de daño tisular.
5. El contexto fisiológico de la infección bacteriana sistémica en el pez cebra induce la producción de proteínas relacionadas con la diferenciación de las células HL-60
6. Las células HL-60 producen una variación en la producción de una serie de proteínas de pez cebra relacionadas principalmente a procesos de desarrollo muscular, de sistema nervioso y de regulación de células hematopoyéticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiahu, T., Levy, J., & Sharoni, Y. 1999. Lycopene and 1, 25-dihydroxyvitamin d3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in hl-60 leukemic cells. *Nutrition and Cancer*, 33(1), 105-112.
- Aurora, A. B., & Olson, E. N. 2014. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell stem cell*, 15(1), 14-25.
- Barriuso, J., Nagaraju, R., & Hurlstone, A. 2015. Zebrafish: a new companion for translational research in oncology. *Clinical Cancer Research*, 21(5), 969-975.
- Birendra, K. C., & DiNardo, C. D. 2016. Evidence for clinical differentiation and differentiation syndrome in patients with acute myeloid leukemia and IDH1 mutations treated with the targeted mutant IDH1 inhibitor, AG-120. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 16(8), 460-465.
- Blackburn, J. S., & Langenau, D. M. 2014. Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. *Disease models & mechanisms*, 7(7), 755-762.
- Boulanger, L. M. 2009. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron*, 64(1), 93-109.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E., & Collins, S. J. 1980. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(5), 2936-2940.

- Brodeur, G. M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 203-216.
- Casanova-Acebes, M., Noelia, A., Weiss, L. A., & Hidalgo, A. 2014. Innate immune cells as homeostatic regulators of the hematopoietic niche. *International journal of hematology*, 99(6), 685-694.
- Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E., & Sipkins, D. A. 2008. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*, 322(5909), 1861-1865.
- Chu, C. M., Rasalkar, D. D., Hu, Y. J., Cheng, F. W. T., Li, C. K., & Chu, W. C. W. 2011. Clinical presentations and imaging findings of neuroblastoma beyond abdominal mass and a review of imaging algorithm. *The British journal of radiology*. 84: 81-91
- de Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. 2016. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 378-391.
- de Thé, H., Le Bras, M., & Lallemand-Breitenbach, V. 2012. Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol*, 198(1), 11-21.
- Drabsch, Y., Snaar-Jagalska, B. E., & Ten Dijke, P. 2016. Fish tales: The use of zebrafish xenograft human cancer cell models. *Histology and histopathology*, 11853.
- Eom, D. S., & Parichy, D. M. 2017. A macrophage relay for long-distance signaling during postembryonic tissue remodeling. *Science*, 355(6331), 1317-1320.
- Fleck, R. A., Romero-Steiner, S., & Nahm, M. H. 2005. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(1), 19-27.

- Fütterer, A., de Celis, J., Navajas, R., Almonacid, L., Gutiérrez, J., Talavera-Gutiérrez, A., ... & Martínez-A, C. 2017. DIDO as a Switchboard that Regulates Self-Renewal and Differentiation in Embryonic Stem Cells. *Stem cell reports*, 8(4), 1062-1075.
- Gerri, C., Marín-Juez, R., Marass, M., Marks, A., Maischein, H. M., & Stainier, D. Y. R. 2017. Hif-1 α regulates macrophage-endothelial interactions during blood vessel development in zebrafish. *Nature communications*, 8, 15492.
- Harris, P., & Ralph, P. 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *Journal of leukocyte biology*, 37(4), 407-422.
- He, S., Lamers, G. E., Beenakker, J. W. M., Cui, C., Ghotra, V. P., Danen, E. H., Meijer, A. H., Spaink, H. P., & Snaar-Jagalska, 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.
- Iwanami, N., Hess, I., Schorpp, M., & Boehm, T. 2016. Studying the adaptive immune system in zebrafish by transplantation of hematopoietic precursor cells. *Methods in Cell Biology*.
- Kawashima, T., Murata, K., Akira, S., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Feng, S., ... & Nosaka, T. 2001. STAT5 induces macrophage differentiation of M1 leukemia cells through activation of IL-6 production mediated by NF- κ B p65. *The Journal of Immunology*, 167(7), 3652-3660.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.

- Konantz, M., Balci, T. B., Hartwig, U. F., Delleire, G., André, M. C., Berman, J. N., & Lengerke, C. 2012. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1266(1), 124-137.
- Krieger-Hinck, N., Schumacher, U., Müller, A., & Valentiner, U. 2009. The effect of the PPAR- γ agonist rosiglitazone on neuroblastoma SK-N-SH cells in a metastatic xenograft mouse model. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 18(8), 387-393.
- Kulkeaw, K., & Sugiyama, D. 2012. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. *Stem cell research & therapy*, 3(6), 55.
- Langenau, D. M., Traver, D., Ferrando, A. A., Kutok, J. L., Aster, J. C., Kanki, J. P., ... & Look, A. T. 2003. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*, 299(5608), 887-890.
- Lee, L. M., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A., & Hendrix, M. J. 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.
- Legrand, N., Weijer, K., & Spits, H. 2006. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2053-2058.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353-367.
- Lin, J. J., Hsu, H. Y., Yang, J. S., Lu, K. W., Wu, R. S. C., Wu, K. C., ... & Chung, J. G. 2011. Molecular evidence of anti-leukemia activity of gypenosides on human

myeloid leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo using a HL-60 cells murine xenograft model. *Phytomedicine*, 18(12), 1075-1085.

- Lu, J. W., Hsieh, M. S., Liao, H. A., Yang, Y. J., Ho, Y. J., & Lin, L. I. 2015. Zebrafish as a model for the study of human myeloid malignancies. *BioMed research international*, 2015.
- Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T. X., Kanki, J., Look, A. T., & Huttenlocher, A. 2006. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of leukocyte biology*, 80(6), 1281-1288.
- Millius A, Weiner OD. 2010 Manipulation of neutrophil-like HL-60 cells for the study of directed cell migration. *Methods Mol Biol*. 591:147-58.
- Ministerio de Salud de Chile. 2013. Tasa de Tumores Malignos según Sexo, Chile 1997-2013. <http://www.deis.cl/series-y-graficos-de-mortalidad/>
- Mócsai, A., Abram, C. L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L. L., & Lowell, C. A. 2006. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature immunology*, 7(12), 1326-1333.
- Nakao, T., Hino, M., Yamane, T., Nishizawa, Y., Morii, H., & Tatsumi, N. 1998. Expression of the leptin receptor in human leukaemic blast cells. *British journal of haematology*, 102(3), 740-745.
- Nicolás-Ávila, J. Á., Adrover, J. M., & Hidalgo, A. 2017. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity*, 46(1), 15-28.
- Pruvot, B., Jacquet, A., Droin, N., Auberger, P., Bouscary, D., Tamburini, J., Muller, M., Fontenay, M., Chluba, J., & Solary, E. 2011. Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *haematologica*, 96(4), 612-616.

- Rangarajan, A., & Weinberg, R. A. 2003. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 952-959.
- Sausville, E. A., & Burger, A. M. 2006. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer research*, 66(7), 3351-3354.
- Savickiene, J., Treigyte, G., Stirblyte, I., Valiuliene, G., & Navakauskiene, R. 2014. Euchromatic histone methyltransferase 2 inhibitor, BIX-01294, sensitizes human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells to growth inhibition and differentiation. *Leukemia research*, 38(7), 822-829.
- Seto, E., Yoshida-Sugitani, R., Kobayashi, T., & Toyama-Sorimachi, N. 2015. The assembly of EDC4 and Dcp1a into processing bodies is critical for the translational regulation of IL-6. *PLoS one*, 10(5), e0123223.
- Schnoeder, T. M., Arreba-Tutusa, P., Mohr, J., Weinert, S., Frey, S., Sammt, A., Bullinger, L., & Heidel, F. H. 2016. Myeloid Leukemia Stem Cells Depend on Phospholipase C Gamma 1 (Plcg1) Signaling.
- Sebkova, A., Karasova, D., Crhanova, M., Budinska, E., & Rychlik, I. 2008. *aro* mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane integrity. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3155-3160.
- Shelley, C. S., Teodoridis, J. M., Park, H., Farokhzad, O. C., Böttinger, E. P., & Arnaout, M. A. 2002. During differentiation of the monocytic cell line U937, Pura mediates induction of the CD11c β 2 integrin gene promoter. *The Journal of Immunology*, 168(8), 3887-3893.
- Shen, J., Tai, Y. C., Zhou, J., Wong, C. H. S., Cheang, P. T. S., Wong, W. S. F., ... & Chen, C. S. 2007. Synergistic antileukemia effect of genistein and chemotherapy in

mouse xenograft model and potential mechanism through MAPK signaling. *Experimental hematology*, 35(1), 75-e1.

- Smith, S. E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *Journal of Neuroscience*, 27(40), 10695-10702.
- Srinivas, P. R., Verma, M., Zhao, Y., & Srivastava, S. 2002. Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clinical chemistry*, 48(8), 1160-1169.
- Staal, F. J., Spaink, H. P., & Fibbe, W. E. 2015. Visualizing human hematopoietic stem cell trafficking in vivo using a zebrafish xenograft model. *Stem cells and development*, 25(4), 360-365.
- Sun, H., & Wang, Y. 1995. Apoptosis of human leukemic HL-60 cells induced to differentiate by treatment with RA or DMSO. *Cell Research*, 5(2), 181-186.
- Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L. C., Borup, R., Rasmussen, T., Bjerregaard, M. D., Nielsen, F. C., Cowland, J. B. & Borregaard, N. 2005. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood*, 105(4), 1785-1796.
- Veinotte, C. J., Dellaire, G., & 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.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789-799.
- Wang, J., Fong, C. C., Tzang, C. H., Xiao, P., Han, R., & Yang, M. 2009. Gene expression analysis of human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation and cytotoxicity induced by natural and synthetic retinoids. *Life sciences*, 84(17), 576-583.

- Wang, Z. Y., & Chen, Z. 2008. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 111(5), 2505-2515.
- Weiss, B., & Sachs, L. 1978. Indirect induction of differentiation in myeloid leukemic cells by lipid A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(3), 1374-1378.
- Wertman, J., Veinotte, C. J., Delleire, G., & Berman, J. N. 2016. The zebrafish xenograft platform: evolution of a novel cancer model and preclinical screening tool. *En Cancer and Zebrafish* (pp. 289-314). Springer International Publishing.
- White, R., Rose, K., & Zon, L. 2013. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nature reviews Cancer*, 13(9), 624-636.
- Wulfkuhle, J. D., Liotta, L. A., & Petricoin, E. F. 2003. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nature reviews cancer*, 3(4), 267-275
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445-455.
- Xu, J., Du, L., & Wen, Z. 2012. Myelopoiesis during zebrafish early development. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(9), 435-442.
- Yamada, K. M., & Cukierman, E. 2007. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 130(4), 601-610.
- Zhang, D., Wang, Q., Zhu, T., Cao, J., Zhang, X., Wang, J., Wang, X., Li, Y., & Zhang, J. 2013. RACK1 promotes the proliferation of THP1 acute myeloid leukemia cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 384(1-2), 197-202.
- Zhao, H., Tang, C., Cui, K., Ang, B. T., & Wong, S. T. 2009. A screening platform for glioma growth and invasion using bioluminescence imaging: Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*, 111(2), 238-246.

- Zhao, J., Huang, W. G., He, J., Tan, H., Liao, Q. J., & Su, Q. 2006. Diallyl disulfide suppresses growth of HL-60 cell through increasing histone acetylation and p21WAF1 expression in vivo and in vitro. *Acta pharmacologica sinica*, 27(11), 1459.
- Zimmer, B., Hartung, H. P., Scharfenberger, G., Bitter-Suermann, D., & Hadding, U. 1982. Quantitative studies of the secretion of complement component C3 by resident, elicited and activated macrophages. Comparison with C2, C4 and lysosomal enzyme release. *European journal of immunology*, 12(5), 426-430.

