



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología**

**“EVALUACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*)
XENOTRASPLANTADO CON CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA Y SU
TRATAMIENTO CON CASIOPEÍNA® Illia.”**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

JOSÉ ULISES HERNÁNDEZ ZAMUDIO

Dirigido por:

MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

2025

México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología**

**“EVALUACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*)
XENOTRASPLANTADO CON CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA Y SU
TRATAMIENTO CON CASIOPEÍNA® Illia.”**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta:

JOSÉ ULISES HERNÁNDEZ ZAMUDIO

Dirigido por:

MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Presidente

Firma

Dra. Mónica Leticia Martínez Pacheco

Secretario

Firma

Dr. Moisés Pérez Mendoza

Vocal

Firma

Dra. Santiaga Marisela Ahumada Solórzano

Vocal

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

2025

México

RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracranal más común de la infancia, y presenta gran heterogeneidad biológica. En los diferentes estadios podemos observar procesos de crecimiento, migración e invasividad hacia diferentes tejidos. Estos procesos son de suma importancia para comprender la biología de este tumor encaminada a desarrollar estrategias para su tratamiento. Debido a la gran probabilidad del NB de alto riesgo para producir metástasis, es importante contar con un tratamiento eficiente y con bajos efectos secundarios. Esto ha conducido a la búsqueda de nuevos tratamientos como las Casiopeínas® (Cas), una familia de compuestos coordinados de cobre(II) que han demostrado tener un efecto citostático y citotóxico en diferentes tumores. Para analizar esta actividad, existen múltiples modelos *in vivo* de xenotrasplantes derivados de células tumorales (CDX) en modelos animales. En años recientes, el modelo del pez cebra (*Danio rerio*) ha sido de gran utilidad, por el hecho de que en etapas tempranas del desarrollo presenta un sistema inmune indiferenciado y falta de pigmentación, esto último permite observar el movimiento de las células xenotrasplantadas en tiempo real. En este proyecto encontramos que 59.4% de alevines sometidos al proceso de xenotrasplante lograron sobrevivir. También observamos que una dosis de 10 µg/ml de Casiopeína Illia inhibió la migración e invasividad de células de NB de manera estadísticamente significativa, en comparación con los alevines sin tratamiento o que solo recibieron una dosis de Casiopeína Illia de 1 µg/ml. Finalmente mediante inmunohistoquímica con el marcador endotelial CD31, comprobamos la ausencia de angiogénesis lo que significa un paso limitante en el proceso de metástasis. Con estos datos, confirmamos que la Casiopeína Illia puede ser utilizada para tratar de manera efectiva al neuroblastoma.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood, exhibiting significant biological heterogeneity. In its various stages, growth, migration, and invasiveness towards different tissues can be observed. These processes are essential to understanding the biology of this tumor, aimed at developing strategies for its treatment. Due to the high-risk NB's strong tendency to produce metastasis, it is important to have an efficient treatment with minimal side effects. This has led to the search for new treatments, such as Casiopeinas® (Cas), a family of copper(II)-based compounds that have shown cytostatic and cytotoxic effects in different tumors. To analyze this activity, multiple *in vivo* xenotransplant models cell line-derived xenograft (CDX) is available in animal models. In recent years, the zebrafish (*Danio rerio*) model has been highly useful because, in early development stages, it presents an undifferentiated immune system and lacks pigmentation, allowing real-time observation of the movement of xenotransplanted cells. In this project, we found that 59.4% of larvae subjected to the xenotransplantation process survived. We also observed that a dose of 10 µg/ml of Casiopeína Illia significantly inhibited the migration and invasiveness of NB cells compared to larvae without treatment or those that received only a 1 µg/ml dose of Casiopeína Illia. Finally, through immunohistochemistry using the endothelial marker CD31, we confirmed the absence of angiogenesis, representing a limiting step in the metastasis process. With this data, we confirm that Casiopeína Illia may be effectively used to treat neuroblastoma.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer por todo el trabajo realizado a mi director de tesis la Dra. Carmen Mejía por guiarme y aconsejarme en este camino de la investigación científica, por siempre mostrarse abierta a explicarme cualquier duda que surgió durante mi estancia en el laboratorio y durante las clases, apoyándome cuando lo necesité siempre de la mejor manera.

Agradecer a mis compañeros de la carrera, sobre todo a mis amigos que siempre me acompañaron en muchas buenas aventuras y en los malos momentos. Me quedarán guardados todos esos recuerdos bonitos, que atesoro en mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio, que fueron un gran apoyo durante la realización de mis experimentos, por esas grandes tardes vividas en la facultad. Me gustaría mencionar nombres, pero sé que con mi memoria olvidaría a alguien, sin ellos no lo habría logrado.

Por último, agradecer a las personas más importante en mi vida, a mi hermana, mi mejor amiga, quién siempre ha estado para mí y a mi mamá, todo lo que tengo y soy es gracias a ti.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
I. ANTECEDENTES	1
Neuroblastoma	1
Angiogénesis como un factor de metástasis	2
Tratamientos en el Neuroblastoma.....	5
Modelo del Pez cebra.....	8
II. HIPOTESIS	9
III. OBJETIVOS	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
Reactivos y preparación de soluciones.....	10
Cultivo celular.....	10
Etiquetado de células adherentes	10
Preparación de células para xenotrasplante	11
Descripción del objeto de estudio.....	11
Mantenimiento del Pez cebra	11
Alimentación del Pez cebra	12
Producción y recolección de los huevos.....	12
Modelo de xenotrasplante	13
Tratamiento con Casiopeína Illia y Cisplatino.....	13
Microscopía confocal	14
Inmunohistoquímica	14
Análisis estadístico	14
V. RESULTADOS	15
VI. DISCUSIÓN	20
VII. CONCLUSIONES	22
VIII. REFERENCIAS	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Isoformas de VEGF-A

Figura 2. Estructura de la Casiopeína IIIia

Figura 3. Reacción tipo Fenton de las Casiopeínas

Figura 4. Diferentes concentraciones de tricáina utilizada como sedante

Figura 5. Xenotrasplante celular en *Danio rerio*

Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia post-trasplante

Figura 7. Migración de células SK-N-SH en alevines *Danio rerio*

Figura 8. Número de células SK-N-SH localizadas en la parte posterior del alevín

Figura 9. Presencia de VEGFR-165 en alevines sin tratamiento

Figura 10. Presencia de VEGFR-165 en alevines tratados con Casiopeína IIIia

I. ANTECEDENTES

Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es un tumor infantil derivado de las células primitivas de la cresta neural del sistema nervioso simpático y se considera el tumor sólido extracranial más frecuente de la infancia (Bosse, 2016; Whittle *et al.*, 2017). Los tumores que genera, en la mayoría de los casos se encuentran en la glándula suprarrenal (~65%), ganglios simpáticos del cuello (5%), pecho (20%), abdomen o pelvis (5%) (Aygun, 2018; Colon & Chung, 2011).

Un aspecto importante en este tipo de cáncer infantil es la gran heterogeneidad clínica y biológica de los tumores, lo que propició la creación del Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma (INRG, por sus siglas en inglés), para estratificar a los pacientes de acuerdo a las características del tumor y formular así una estrategia adecuada para su tratamiento. De acuerdo con esta clasificación, en el estadio L1 el tumor se encuentra localizado, confinado a un solo tumor y con ausencia de factores de riesgo definidos por imagen (IDRFs, por sus siglas en inglés); L2, tumor locoregional con presencia de uno o más IDRFs; M, enfermedad metastásica distante [excepto estadio con enfermedad metastásica (MS)]; MS, confinada a piel, hígado o medula ósea en niños menores de 18 meses de edad con sobrevida libre de eventos. Entre los factores tomados en cuenta para esta clasificación están la edad del paciente, histología, estadio, presencia de ploidías, si existe amplificación del oncogén *N-MYC* y anomalías cromosómicas segmentarias (Tolbert & Matthay, 2018) (**Tabla 1**). Los NB de bajo riesgo tienen >90% de supervivencia, son tumores que se encuentran en estadios L1, L2 o MS, que presentan histología favorable, sin amplificación de *N-MYC* (Strother *et al.*, 2012). Mientras que los pacientes de alto riesgo tienen una probabilidad del 50% de supervivencia, pueden presentar tumores con *N-MYC* amplificado, delección del cromosoma 11q, teniendo efecto directo en una de las vías de reparación del ADN cromosómico. Comúnmente en el estadio M/MS y en algunos casos en el estadio L2, encontramos tumores pobremente diferenciados o indiferenciados que generalmente presentan metástasis (Newman *et al.*, 2019).

Los pacientes que son diagnosticados con neuroblastoma en general y sin importar el estadio en el que se encuentren, presentan metástasis en el 50 % de los casos, comúnmente hacia medula ósea, huesos y ganglios linfáticos regionales (Tolbert & Matthay, 2018).

Tabla 1. Esquema de riesgo tumoral propuesto por el INRG. Tomado del original Cohn *et al.* 2009

Estadio INRG	Edad (meses)	Categoría Histológica	Grado de diferenciación tumoral	N-MYC	Deleción 11q	Ploidía	Grupo de riesgo pre-tratamiento
<i>L1/L2</i>		GN maduro GNB inter mezclado					Muy bajo
		Ninguna, excepto GN maduro o GNB inter mezclado		NA			Muy bajo
<i>L1</i>				Amp			Alto
		Cualquiera, excepto GN maduro o GNB inter mezclado			No		Bajo
<i>L2</i>	< 18	GN maduro o GNB inter mezclado		NA	Sí		Intermedio
			Diferenciado	NA	No		Bajo
	≥18	GNB nodular; NB	Pobremente diferenciado o indiferenciado	NA	Sí		Intermedio
				Amp			Alto
<i>M</i>	< 18			NA		Hiper diploide	Bajo
	< 12			NA		Diploide	Intermedio
	12 a < 18			NA		Diploide	Intermedio
	< 18			Amp			Alto
	≥18						Alto
<i>MS</i>	<18			NA	No		Muy bajo
				Amp	SI		Alto
							Alto

Abreviaciones: NB, neuroblastoma; GN, ganglioneuroma; GNB, ganglioneuroblastoma; NA, no amplificado; Amp, amplificado.

Angiogénesis como un factor de metástasis

El proceso de metástasis implica la diseminación de células cancerosas desde un tumor primario hacia órganos distantes, lo que constituye la principal causa de mortalidad del cáncer. Este proceso tiene una amplia variedad de mecanismos celulares para lograr la diseminación de células de la lesión primaria. Entre estos mecanismos se encuentra el cambio fenotípico y estructural de la célula conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM). La TEM incluye degradación de la matriz celular por medio de las metaloproteinasas (MMP), evasión de la vigilancia inmune, modulación del microambiente tisular, desarrollo de resistencia a

intervenciones terapéuticas y presencia de angiogénesis. Este último mecanismo es muy importante para el mantenimiento de las metástasis. (Aygun, 2018; Suhail *et al.*, 2019).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales. Es un proceso biológico común presente en las primeras etapas del desarrollo humano, menstruación y cicatrización de una herida, pero también es un proceso que está implicado en tumores de alto riesgo (Compton & Compton, 2020).

La angiogénesis es de vital importancia dado que las neoplasias malignas tienen un tamaño limitado y por tanto les es necesario obtener nutrientes, oxígeno y eliminar desechos; por lo que es importante que desarrollen una vasculatura adecuada para poder sobrevivir. Además de tener estas funciones, los vasos nuevos sirven como conductos para el transporte de células tumorales, logrando una diseminación hacia sitios distantes de su origen. La angiogénesis se puede dividir en creación, penetración y crecimiento de vasos sanguíneos, procesos que inician cuando la célula tumoral se encuentra estresada al percibir la falta de nutrientes y oxígeno en el ambiente tumoral (Masoumi *et al.*, 2012; Zuazo-Gaztelu & Casanovas, 2018).

La falta de oxígeno en el ambiente tumoral promueve la activación del factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1). Esta proteína heterodimérica es sensible a cambios en la concentración de oxígeno, lo que regula la transcripción de proteínas de respuesta fisiológica dependientes al cambio de oxigenación. Este complejo está conformado por dos subunidades (α y β); la subunidad HIF-1 α es sensible a la presión de oxígeno, mientras que la subunidad HIF-1 β está relacionada a la señalización por factores xenobióticos. En condiciones de cultivo donde existe una concentración estándar de oxígeno ($O_2 > 20\%$), HIF-1 α se encuentra en el citoplasma. Esta subunidad es hidroxilada por proteínas de la familia prolij-hidroxilasas de HIF (PHD), la cual después de ser hidroxilada es ubiquitinada por la proteína von-Hippel Lindau (VHL), para posteriormente ser degradada en el proteasoma. Cuando las células se encuentran en un estado hipóxico ($O_2 < 5\%$) las PHD no pueden hidroxilar a HIF-1 α , lo que conlleva a una acumulación de esta proteína que bajo estas condiciones se encuentra en el núcleo, uniéndose así a la subunidad HIF-1 β formando de esta manera el dímero HIF-1 α /HIF-1 β (HIF-1), el cual actúa como un factor de transcripción. En el organismo, el complejo HIF-1 actúa como un método de adaptación y regulación de oxígeno donde controla diferentes procesos esenciales, así como proteínas involucradas en la angiogénesis, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Grau, 2011; Hu *et al.*, 2016).

VEGF es una proteína constitutiva involucrada en el proceso de angiogénesis cuya actividad se ve incrementada en microambientes hipóxicos y está mediada por HIF-1. Entre sus múltiples funciones está el aumento en la expresión de genes encargados de la síntesis de proteínas de adhesión como *CD31* (*PECAM-1*). La familia VEGF incluye a *VEGF-A* (conocida solo como *VEGF*), *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, el factor de crecimiento placentario (*PIGF*), *VEGF-E* y *VEGF's*. *VEGF-A*

es la principal subfamilia involucrada en la generación de vasos sanguíneos en procesos fisiológicos normales o patológicos como el cáncer. El gen que codifica a *VEGF-A* está conformado por ocho exones y siete intrones. La formación de sus isoformas es provocada por empalme alternativo. Así la diferencia que existe entre las isoformas se caracteriza por su tamaño y la nomenclatura utilizada para nombrarlas como *VEGF – A_{xxx}*, donde las xxx representan el número de aminoácidos presentes en la proteína final (Hagstrom *et al.*, 2014; Peach *et al.*, 2018). Dentro de *VEGF-A*, se encuentran las isoformas *VEGF – A₁₂₁*, *VEGF – A₁₄₅*, *VEGF – A₁₆₅*, *VEGF – A₁₈₃*, *VEGF – A₁₈₉* y *VEGF – A₂₀₆*. Las isoformas *VEGF – A_{xxx}* forman parte del grupo de proteínas proangiogénicas, mientras que las proteínas *VEGF – A_{xxx}b* conforman la familia de proteínas antiangiogénicas, las cuales presentan un empalme alternativo en el sitio proximal del exón 8 también conocido como 8a, quedando solo con el sitio terminal del exón 8 (8b) (**Figura 1**) (Mamer, Wittenkeller, & Imoukhuede, 2020; Woolard *et al.* 2009) Las isoformas antiangiogénicas incluyen a *VEGF-A₁₂₁b*, *VEGF-A₁₄₅b*, *VEGF-A₁₆₅b*, *VEGF-A₁₈₃b*, *VEGF-A_{189b}* y *VEGF-A_{206b}*. La primera isoforma descrita fue *VEGF – A₁₆₅*, que actúa en diversas vías de señalización de distintos tipos de cáncer y representa un factor pronóstico desfavorable en cáncer cervical, de ovario, mama y pulmón (Hanrahan *et al.*, 2003; Matsuyama *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2020). El sitio de acción de la vía de señalización de *VEGF – A₁₆₅* es el receptor 1 de tirosina-cinasa (TrkR1), de *VEGF* (*VEGFR-1*) y el receptor 2 de *VEGF* (*VEGFR-2*); además de los correceptores neuropilina-1 (NRP-1) y neuropilina-2 (NRP-2). *VEGF – A₁₆₅* puede unirse tanto al receptor *VEGFR-1* que se encuentra principalmente en células endoteliales durante el desarrollo embrionario y a *VEGFR-2* que se encuentra en células endoteliales de vasos sanguíneos. Se ha observado que la vía de señalización con *VEGFR-2* es la principal vía en procesos de angiogénesis inducida por hipoxia; además de que tiene una capacidad de autofosforilación 10 veces mayor que *VEGFR-1*(Mamer *et al.*, 2020; Rosales, 2012).

La señalización de *VEGF – A₁₆₅* está regulada por su inhibidor *VEGF – A₁₆₅b*, el cual se ha demostrado que tiene efectos antiangiogénicos a través de la inhibición de los receptores *VEGFR-1* y *VEGFR-2*. Lo anterior es provocado por el empalme alternativo que sufre el exón 8a, ya que éste codifica el sitio de unión del correceptor NRP-1, el cual es importante en la activación río abajo de *VEGFR-2*; por lo tanto, hay una inhibición competitiva por el receptor (Zhang *et al.*, 2018). Además, se ha comprobado la capacidad de *VEGF – A₁₆₅b* para inhibir la migración de células endoteliales ya que tiene un efecto similar con el fármaco inhibidor de angiogénesis Bevacizumab, lo que lo sitúa como un fuerte antiangiogénico (Hua *et al.*, 2010).

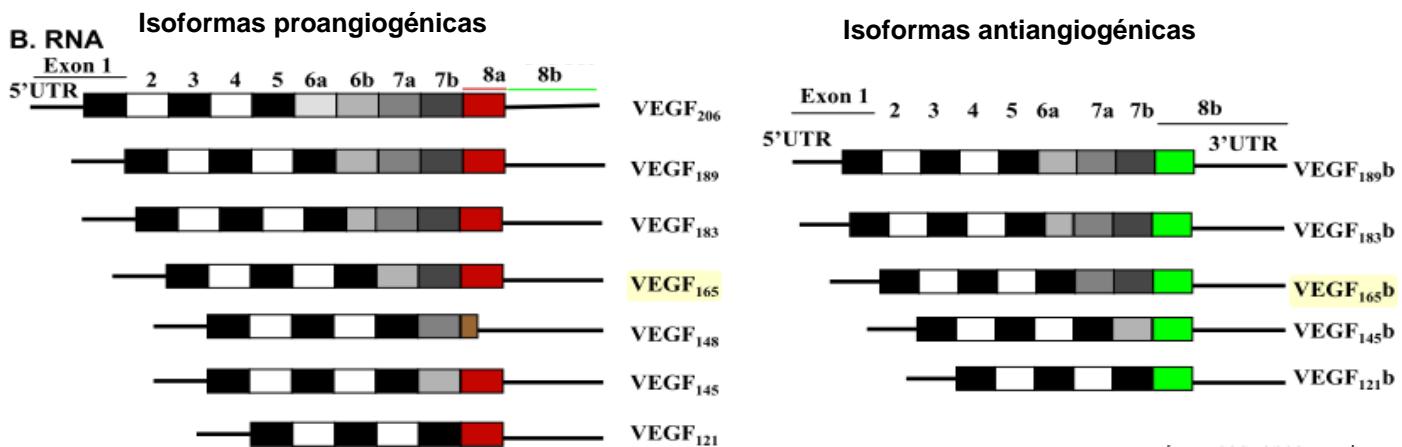


Figura 1. Diferentes isoformas de VEGF-A formadas por empalme alternativo. Tomado del original (Woolard *et al.* 2009)

Tratamientos en el Neuroblastoma

A pesar de los avances en el conocimiento clínico y biológico del neuroblastoma, los pacientes con histología desfavorable, amplificación de *N-MYC* y presencia de la proteína proangiogénica *VEGF* – *A*₁₆₅, entran en el grupo de alto riesgo, donde el rango de supervivencia se encuentra entre el 40-50%. Los infantes que se estratifican en este grupo, necesitan una terapia multimodal constituida por erradicación del tumor en el sitio primario y los otros sitios activos, resección quirúrgica o bien, sesiones de quimioterapia que incluyan la combinación de varios fármacos. Entre los fármacos más utilizados se encuentran la ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, etopósido y cisplatino (Patel *et al.*, 2020; Whittle *et al.*, 2017).

La familia del cisplatino tiene un núcleo de platino y su mecanismo de acción incluye la activación de este centro activo, el cual inhibe la división celular mediante el daño al ADN. El sitio de unión más común para la interferencia del cisplatino con el ADN, es la unión al N7 de la desoxiguanosina a través de un enlace covalente, por lo que es ampliamente utilizado para tratar una gran variedad de tumores incluyendo aquellos de cabeza, cuello, testicular, ovario, colon y NB, entre otros (Burney, 2011; Wang & Zhu, 2018).

Sin embargo, los compuestos derivados del platino han mostrado múltiples efectos secundarios entre los que se encuentran: daño celular en los riñones provocado por el estrés oxidativo y la inflamación, llegando a provocar daño renal agudo y daño tubular, lo que se traduce en una pérdida importante de electrolitos (Manohar & Leung, 2018); pérdida auditiva desencadenada por inflamación a través del estrés en el retículo endoplásmico, necróptosis y apoptosis por la vía intrínseca (Gentilin

et al., 2019); así como neuropatía periférica principalmente en extremidades superiores (Albany et al., 2021).

Así mismo se ha observado que el tratamiento con cisplatino genera resistencia a la terapia en diversos tumores incluyendo al neuroblastoma, lo que ocasiona recaídas; por lo que se han buscado otros fármacos que produzcan un menor número de efectos secundarios y ayuden a mejorar la calidad de vida del paciente (Amable, 2016).

En el campo médico se han utilizado una variedad de compuestos a base de metales para diagnosticar o tratar enfermedades como el cáncer. Los complejos de cobre se destacan como agentes antitumorales, tal es el caso de las Casiopeínas® (Ruiz-Azuara, 1992, 1996, 2002), una familia de aproximadamente 100 compuestos sintetizados a partir de complejos coordinados de Cu(II), los cuales han mostrado tener un potencial antineoplásico comprobado mediante la acción citotóxica (Bravo-Gómez, García-Ramos, Gracia-Mora, & Ruiz-Azuara, 2009). Las Casiopeínas tienen como fórmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$, donde N-N es un sustituyente de dimina aromática (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina), y el donante de oxígeno (O-O) es acetilacetonato o salicilaldehído (Ruiz-Azuara, 1996). La actividad biológica de estos compuestos se ha evaluado tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando efectos antiproliferativos, citotóxicos y genotóxicos (De Vizcaya-Ruiz et al., 2003; Serment-Guerrero et al., 2011). Las investigaciones se han centrado en tres derivados principales: Casiopeína IIgly, Casiopeína IIIia y Casiopeína IIIEa (**Figura 2**) (Becco, et al. 2014; García-Ramos et al., 2017).

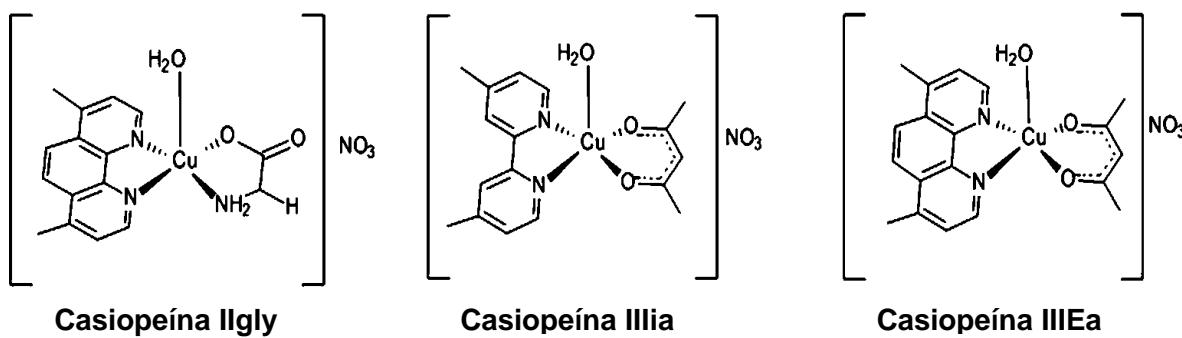


Figura 2. Estructura de las Casiopeínas®. Tomado del original (García-Ramos et al., 2017).

Se han realizado diversos estudios sobre las Casiopeínas en una variedad de modelos humanos y animales, destacando la influencia antiproliferativa en cultivos celulares de cáncer de mama (González-Ballesteros et al., 2024), cáncer cervicouterino (Valencia-Cruz et al., 2013), cáncer de pulmón (Kachadourian et al., 2010), cáncer colorectal (Carvallo-Chaigneau et al., 2008), glioma C6 de rata (Trejo-Solís et al., 2005), meduloblastoma (Mejía & Ruiz-Azuara, 2008), neuroblastoma

(García-Ramos, Gutiérrez, *et al.*, 2017; Valencia-Cruz *et al.*, 2013), fibroblastos de ratón 3T3-L1 (Jaime-Martínez, LA *et al.* 2022), cultivos primarios de linfocitos humanos (García-Ramos *et al.*, 2017), así como el tumor venéreo transmisible (TVT) en perros y el carcinoma canino (manuscritos en preparación, 2024). Todos los ensayos realizados muestran un patrón en el mecanismo de acción de las Casiopeínas basado en la estimulación de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO's), acoplamiento al ADN y alteración del metabolismo energético, promoviendo así la inducción de la apoptosis mitocondrial (Becco *et al.*, 2014; Kachadourian *et al.*, 2010; Marín-Hernández *et al.*, 2012; Serment-Guerrero *et al.*, 2011; Valencia-Cruz *et al.*, 2013). Estos hallazgos permiten visualizar un panorama del mecanismo de acción de las Casiopeínas, pero aún hace falta investigar cómo interactúan estos compuestos en la vía de señalización de la metástasis en el neuroblastoma.

En las células cancerígenas se ha reportado que existe un elevado ambiente oxidativo lo que favorece que diversos compuestos propicien el aumento de las ERO's. Las células cancerígenas se pueden adaptar a estas especies oxidantes mediante el incremento de las concentraciones de antioxidantes como el glutatión (GSH). Kachadourian *et al.*, en el 2010, demostraron que la Casiopeína IIgly indujo la sobreproducción de las ERO's al catalizar la reacción tipo Fenton y usar el glutatión (GSH) como fuente de electrones en líneas celulares de cáncer de pulmón (H157 y A549). La hipótesis sugiere que el GSH reacciona con Casiopeína IIgly, lo que produce la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la formación del radical glutatilo (GS[·]). Este glutatilo puede reaccionar con otro GS[·], producto de la misma reacción o la oxidación del GSH mediada por O₂, lo que genera a su vez GS[·] y superóxido (O₂^{·-}) para formar glutatión oxidado (GSSG). El GSSH es un compuesto formado por dos moléculas de glutatión unidas por un enlace de tipo disulfuro (S-S). Por otra parte, la SOD (superóxido dismutasa) cataliza al O₂^{·-} para formar H₂O₂, que a su vez reacciona con el Cu(I) para retornar a su estado oxidado de Cu(II) y producir el radical ·OH, el cual inicia el daño al ADN mitocondrial. Este deterioro trae una baja en la expresión de proteínas del complejo-I de la cadena respiratoria mitocondrial provocando su desacople, lo que se asocia con la formación de O₂^{·-}. La regresión a Casiopeína IIgly oxidada reinicia el ciclo de oxidación de GHS y por consiguiente las posteriores reacciones (**Figura 3**) (Kachadourian *et al.*, 2010).

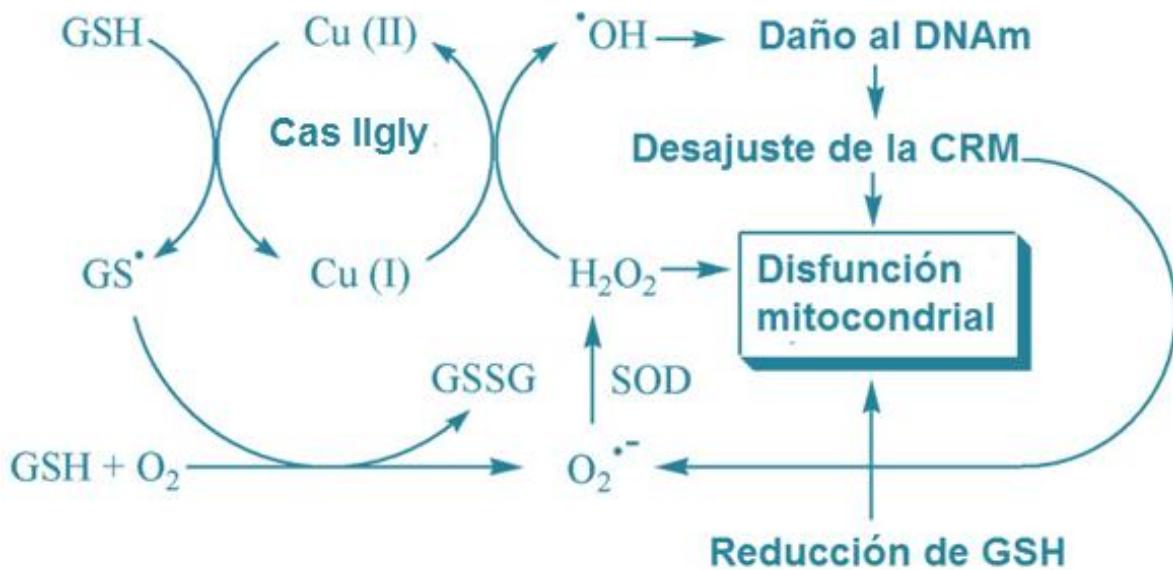


Figura 3. Reacción tipo Fenton por las Casiopeínas. Tomado del original (Kachadourian et al., 2010)

Sin embargo, la metástasis es un proceso que requiere de ser estudiada sobre un modelo animal que ponga en evidencia marcadores claros como la angiogénesis. Es por esto que decidimos emplear al pez cebra (*Danio rerio*) para tal fin.

Modelo del Pez cebra

El pez *Danio rerio* pertenece a la familia *Cyprinidae*, es una especie originaria de la India, aunque en la actualidad se ha popularizado su distribución como un animal doméstico por lo cual se encuentra presente en todo el mundo. Tiene un gran valor en las investigaciones científicas debido a sus múltiples cualidades que pueden ser aprovechadas en diferentes ramas de la ciencia. Al ser un animal de tamaño pequeño, alcanzando solo una longitud mayor a 4 cm en machos adultos y 5 cm en hembras adultas, se pueden mantener en espacios reducidos, además no necesita cuidados especiales ya que tiene una gran adaptación a los cambios en su ambiente. Para su uso en el laboratorio se han establecido condiciones básicas que contribuyen a una buena vida reproductiva. Otra característica importante del pez cebra es que en las condiciones adecuadas puede tener una vida reproductiva activa durante todo el año, donde las hembras pueden producir más de 200 óvulos por desove teniendo un porcentaje de fecundación mayor al 90% (Vargas-Vargas, 2017).

Danio rerio es un importante modelo animal para el estudio de enfermedades humanas incluyendo el cáncer. Esto se debe a que ortológicamente comparten el 70% de genes conservados evolutivamente y cerca del 80% de ellos intervienen en las vías de señalización de enfermedades humanas (Etchin, Kanki, & Look, 2011).

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 al pez cebra como modelo de xenotrasplantes para estudiar el comportamiento de las células tumorales y la respuesta a terapias en el contexto de un organismo completo (Barriuso, Nagaraju, & Hurlstone, 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, Snaar-Jagalska, & Ten Dijke, 2017). 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 días posteriores a la fertilización (dpf), debido a que el desarrollo del timo no ocurre hasta después de este tiempo (Willett, Cortes, Zuasti, & Zapata, 1999), y por lo tanto no hay un sistema inmune adaptable que ataque a las células transplantadas.

En este trabajo proponemos que los ensayos de xenotrasplantes de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH en el pez cebra, pueden ayudar a comprender el proceso de angiogénesis cuando se administra la Casiopeína Illia como agente quimioterapéutico.

II. HIPOTESIS

El tratamiento con Casiopeína Illia en el modelo de xenotrasplante de células de neuroblastoma en pez cebra, tendrá un efecto antiangiogénico evitando la formación de metástasis

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto de la Casiopeína Illia sobre el proceso de angiogénesis en un modelo de pez cebra (*Danio rerio*), xenotrasplantado con células SK-N-SH de neuroblastoma.

Objetivos específicos

1. Estandarizar el modelo de xenotrasplante de células de neuroblastoma en *Danio rerio*.
2. Determinar la dosis de Casiopeína Illia que provoca un efecto antimetastásico en el modelo

3. Evaluar la presencia de angiogénesis en el pez cebra xenotrasplantado con células de neuroblastoma.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y preparación de soluciones

La Casiopeína Illia [Cu (4,4 'dimetil) (2,2'-bipiridina) (acetilacetonato) aqua, 4,4-dimetil-2,2'-bipiridina, acetilacetonato cobre(II) nitrato] fue sintetizada en el Laboratorio de Química Medicinal del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM, siguiendo el procedimiento patentado (Ruiz-Azuara, 1992; Ruiz-Azuara, 1996; Ruiz-Azuara, 2002); mientras que el Cisplatino se adquirió en SIGMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

Las concentraciones de trabajo se obtuvieron por dilución de la solución madre (1:1), donde se disolvió 1 mg de cada compuesto en 1 ml de agua destilada. Las concentraciones empleadas tanto para Casiopeína Illia como para Cisplatino fueron 1 y 10 μ g/ml.

Cultivo celular

Las células de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC-HTB11, VA, USA), se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se mantuvieron en incubadora de CO₂ a 37°C.

Etiquetado de células adherentes

Se retiró la tapa del medio de crecimiento y se drenó suavemente el exceso de medio EMEM tocando el borde de la caja con papel secante. Se preparó el medio de tinción agregando 5 μ L de la solución de etiquetado de tinte, suministrada a 1 ml de medio de crecimiento normal.

Previamente para la preparación del alícuota celular, se agregaron 40 mg del marcador Dil rojo (Invitrogen™ D282, ONT, Canadá) en un tubo de centrifuga de 5 ml cubierto con papel aluminio; después se añadieron 2 ml de etanol al 97% para obtener una concentración final de 20 mg/ml. La solución se colocó en baño María durante 1 min, después se agitó en vórtex a tres tiempos de 30 s para disolver los cristales y se almacenó a temperatura ambiente en completa oscuridad. Cuando había precipitación de cristales se repitió el proceso de baño María, y posteriormente se agitó tres veces en vórtex.

Con ayuda de una micropipeta, se colocaron 100 μ L del medio de tinción en la esquina de la caja Petri y se agitó suavemente hasta que todas las células estuvieron cubiertas. Las cajas se mantuvieron a 37°C durante 20 min. Se decantó el medio de tinción y se lavaron las cajas Petri tres veces. Para cada ciclo de lavado,

se cubrieron las células con medio de cultivo fresco y a una temperatura de 37°C incubando durante 10 min y luego se drenó el medio.

Preparación de células para xenotrasplante

Un total de 2×10^6 células SK-N-SH se colocaron en un tubo cónico de 50 ml, posteriormente se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 min para precipitar las células, se decantó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l de PBS quedando a una concentración de 20 células/nL. A continuación, se etiquetaron con el marcador celular Dil (Invitrogen™ D282) para su posterior detección. Las células se incubaron con el rastreador celular Dil a una concentración final de 2.5 μ g/ml durante 4 min a 37°C, seguido de 15 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron para quitar el exceso de tinte. Previo a la inyección, las células marcadas con Dil fueron evaluadas bajo un microscopio óptico (Zeiss, Thornwood, NY, EE.UU.) para confirmar la viabilidad celular usando la tinción de exclusión de azul de tripano, y sólo las muestras con más del 90% de viabilidad se trasplantaron en el pez.

Descripción del objeto de estudio

Se utilizó la línea de pez cebra TAB-WIK la cual es una mezcla entre TAB-14 y WIK, los cuales fueron amablemente donados por el Dr. Ernesto Maldonado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, campus Puerto Morelos de la UNAM. Como característica principal, esta cepa tiene baja variación genética obtenida a través de cruces entre ambas cepas donde se eliminaron las variantes recesivas letales. Además, se ha observado en el caso de TAB-14 una gran fertilidad en las hembras con producción de huevos durante todo el año (ZFIN staff, 2016). Los embriones se obtuvieron de los cruces de machos y hembras adultos y fueron crecidos en agua E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, pH 7) a 27°C con 14 h de luz y 10 h de oscuridad.

Mantenimiento del Pez cebra

El mantenimiento de los embriones y peces adultos se realizó con agua marca AGUAQ obtenida de la Universidad Autónoma de Querétaro. La información nutrimental del agua por porción de 100 ml es: 0 kcal, proteínas 0 g, sodio 3.1 mg y su proceso de purificación fue cloración, lecho profundo, carbón activado, osmosis inversa, luz ultravioleta y ozono. El agua en el acuario se mantuvo con un pH de 7.5 y una temperatura de 23°C a 26°C. Los peces adultos se separaron en hembras y machos y se colocaron en dos tanques con un volumen de 25 litros y flujo constante de oxígeno. La limpieza total de agua por tanque se realizó cada 10 días para no estresar a los peces y diariamente se realizó el cambio de $\frac{1}{2}$ litro de agua para mantener los tanques limpios y no producir un cambio osmótico manteniendo un pH estable.

La temperatura en el acuario se mantuvo a 26°C con el equipo de aire acondicionado MIRAGE VLU y la iluminación se controló con un temporizador en ciclos de 14 h de luz por 10 h de obscuridad.

Alimentación del Pez cebra.

Los peces adultos se alimentaron dos veces al día con una mezcla de TetraMin® (Tetra Japan & Spectrum Brands, Inc., Tokyo Japan) y con camarón de salmuera mejor conocido como *Artemia salina* (Premium Grade Brine Shrimp Eggs, Ogden, Utah USA).

El cultivo de *A. salina* se realizó colocando 1 g de huevos en un cono de criadero con soporte en 700 ml de agua (AGUAQ) y 63 ml de stock de sales (LOMAS, México, CDMX) por cada 100 ml de agua, así como 9 ml de stock de sales. Durante el proceso de eclosión se colocó un flujo de oxígeno dentro del cono, el cual se mantuvo en exposición de luz por 48 h. Finalmente se recolectó la *A. salina* (Premium Grade Brine Shrimp Eggs, Ogden, Utah USA) eclosionada, se filtró y se limpió con agua (AGUAQ). Para posteriormente añadirle hojuelas molidas de TetraMin® para alimentar a los peces.

Producción y recolección de los huevos

Para la obtención de embriones se colocaron los peces adultos (1:2 hembra y macho) en un tanque de reproducción la noche anterior a la fertilización. A la mañana siguiente poco después del primer contacto con la luz, el pez cebra puso huevos por apareamiento natural. Para evitar la depredación de los huevos, el tanque de cría contenía en la superficie interna una placa de acrílico con orificios pequeños que permitían el paso de los huevos protegiéndolos de los peces adultos. Después de dos horas del primer contacto con la luz, los peces adultos fueron retirados del tanque de cría y reacomodados en los tanques iniciales de acuerdo a su sexo para posteriores experimentos. Los huevos fertilizados se recolectaron y fueron depositados en cajas Petri con agua mantenidos a temperatura ambiente, donde se observaron para identificar la etapa del desarrollo embrionario del pez cebra (Kimmel *et al.*, 1995).

Anestesia de los peces

Para determinar la mejor concentración de anestésico que nos permitiera realizar el xenotrasplante en los alevines, probamos diferentes concentraciones (100, 150, 200, 250, 300 y 350 µg/ml) de tricaina (MS-222, EE.UU.) disueltas en agua de pecera E3 a 27°C. Brevemente, se agregaron 10 ml de cada concentración de tricaina en cajas Petri conteniendo 10 alevines de 2 dpf. Posteriormente los alevines se colocaron bajo el microscopio estereoscópico para observar su comportamiento durante los primeros cinco minutos posteriores a la exposición del anestésico. Una

vez que se determinó que los alevines estaban en una sedación profunda, se cambiaron a agua de pecera E3 a 27°C sin anestésico.

Modelo de xenotrasplante

Previamente, los alevines de pez cebra de 2 dpf fueron decorionados y anestesiados. Despues, aproximadamente 1,000 células SK-N-SH teñidas con el marcador celular Dil, se trasplantaron en la zona abdominal de cada uno de los 100 alevines utilizados en el estudio (N=100) con una micropipeta Oocyte (Marca Drummond, Modelo 3-000-510-X). Luego de la confirmación de una masa celular visible en el sitio de la inyección, los peces se transfirieron a una incubadora de 32°C. Para observar los focos de metástasis, los peces vivos fueron anestesiados con 250 µg/ml de tricaina y posteriormente incrustados con una orientación lateral en una placa Petri con agarosa al 1%. Una vez sedados, los alevines de 2 dpf fueron xenotrasplantados con ~1,000 células SK-N-SH en el saco vitelino (**Figura 4**). Posteriormente, los peces de 1 dpt se colocaron en agua de pecera a 32°C para determinar su sobrevivencia.

Mediante microscopía de fluorescencia y confocal (Olympus, Tokio, Japón) a bajo aumento (4X) e intervalos de 2.5 micras en el eje Z respectivamente, se obtuvo una visión general de las células tumorales a través de los peces y a mayor aumento (20X), se definió la localización precisa de las mismas y los focos metastásicos en el pez. Las imágenes se procesaron usando el software ImageJ2/Fiji (Scheneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). Para contar el número de células metastásicas, se seleccionaron las colas de los peces utilizando la herramienta de selección poligonal. Un valor de $p<0.05$ se consideró estadísticamente significativo y se determinó mediante una ANOVA utilizando el programa estadístico RStudio.

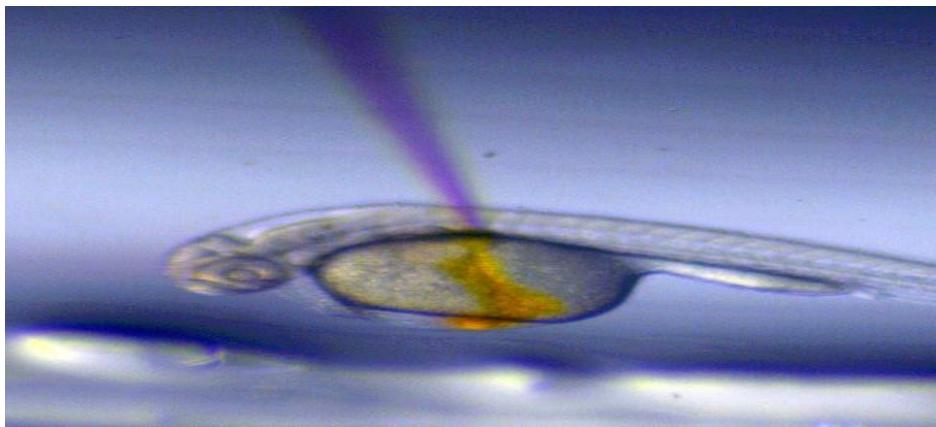


Figura 4. Xenotrasplante de células SK-N-SH. Alevín de 2 dpf siendo xenotrasplantado con 1,000 células de neuroblastoma SK-N-SH teñidas con Dil, con ayuda de una micropipeta con punta de cristal, mediante perforación del vitelo.

Tratamiento con Casiopeína Illia y Cisplatino

Los diferentes tratamientos fueron aplicados directamente en el agua de los peces. Para tal efecto, se usaron las concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml de la

Casiopeína Illia, las cuales previamente fueron establecidas por nuestro grupo en un estudio de toxicidad y teratogénesis (Hernández-González L. (2022). Tesis de Licenciatura en Microbiología, UAQ). Así, en cajas multipozos de 24 pozos, se depositaron tres embriones de 2 dpf en cada pozo. A cada pozo se le añadieron 2 ml de agua de pecera con una u otra concentración de Casiopeína Illia.

Los grupos de trabajo utilizados fueron alevines sin tratamiento, solo con agua de pecera E3, alevines xenotrasplantados con células SK-N-SH sin tratamiento, un grupo con tratamiento de Casiopeína Illia a una concentración de 1 μ g/ml y otro grupo de alevines con una concentración de 10 μ g/ml. Todos los grupos se mantuvieron en agua con oxigenación a una temperatura de 31°C.

Microscopía confocal

Los alevines anestesiados se montaron en portaobjetos cóncavos y se sellaron bajo cubreobjetos con esmalte para ser observados en un microscopio confocal Zeiss LSM 780 DUO (Zeiss, Thornwood, NY, EE.UU.). Las imágenes se obtuvieron en campo claro con fluorescencia de Dil (Invitrogen™ D282, ONT, Canadá) en objetivo de 10X. Las tomas de la zona caudal del pez se hicieron con un aumento de 400X. Las fotografías se realizaron 7 dpt en peces con tratamiento y sin tratamiento.

Inmunohistoquímica

Los peces xenotrasplantados se fijaron en formaldehído al 4% durante 1 h, se deshidrataron en etanol y se embebieron en resina Epon 812 (TAAB Laboratorios Equipment Ltd., Berks, Reino Unido). Cada bloque se cortó en crio secciones de 7 mm y se incubaron con el anticuerpo primario CD31 (Ab (H-3): sc-376764 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, TX, EE. UU.). Despues se hicieron seis lavados con tampón PBST durante 15 min cada uno, las secciones fueron incubadas en conjunción con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, TX, EE. UU.). Las muestras se montaron en medio de montaje (Vector Lab, EE.UU.) y se sellaron bajo cubreobjetos con esmalte. Las muestras se observaron y fotografiaron bajo microscopio óptico en un aumento de 4X.

Análisis estadístico

Todas las metodologías planteadas se realizaron por triplicado y los datos se presentaron como la media \pm desviación estándar. Para evaluar las diferencias en el número de células entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) tras verificar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. En caso de encontrarse diferencias significativas, se aplicó una prueba post hoc de Tukey para identificar qué grupos presentaron diferencias estadísticas entre sí. La prueba se realizó utilizando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Se utilizó el programa r 4.4.2 para el análisis estadístico.

V. RESULTADOS

Los resultados de los tratamientos con cisplatino a concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no se incluyen en este apartado, ya que los alevines no sobrevivieron al primer día post-trasplante.

Estandarización del modelo de xenotrasplante

Determinación de la concentración de tricáína. Se hizo un conteo de los alevines que sobrevivieron a las diferentes concentraciones de tricáína (**Figura 5**). Observamos que a bajas concentraciones (100-150 μg), los alevines mostraron una sobrevivencia del 100%, pero aún presentaban movimientos de la aleta caudal y movimiento opercular, por lo que no se podían manipular. A una concentración de 200 μg la sobrevivencia fue del 90%, pero aún encontramos alevines que no habían respondido a la anestesia ya que presentaban movimiento opercular, lo que indicaba que se podía presentar algún movimiento del pez durante el xenotrasplante. Mientras que a concentraciones de 250 μg de tricáína, encontramos una sobrevivencia del 85% y un 100 % de inducción anestésica, por lo cual esta fue la concentración de trabajo. Finalmente, a concentraciones de entre 300-350 μg , la sobrevivencia de los alevines fue del 60-50 %.

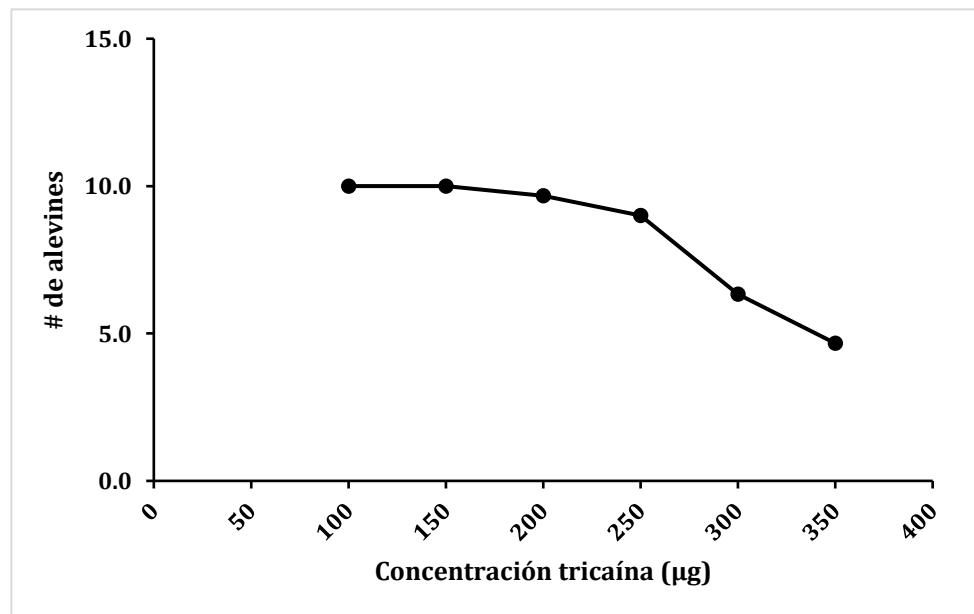


Figura 5. Sobrevivencia de alevines anestesiados. Concentraciones de tricáína diluida en 20 ml de agua de pecera utilizada como sedante de alevines de *Danio rerio* tab-wyk. La flecha señala la concentración utilizada (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tricáína).

Sobrevivencia de alevines luego del xenotrasplante de células SK-N-SH

Como se puede observar en la **Figura 6**, la sobrevivencia de los alevines de 2 dpt xenotrasplantados con ~1,000 células SK-N-SH en el saco vitelino, mostró una tendencia cercana al 60%.

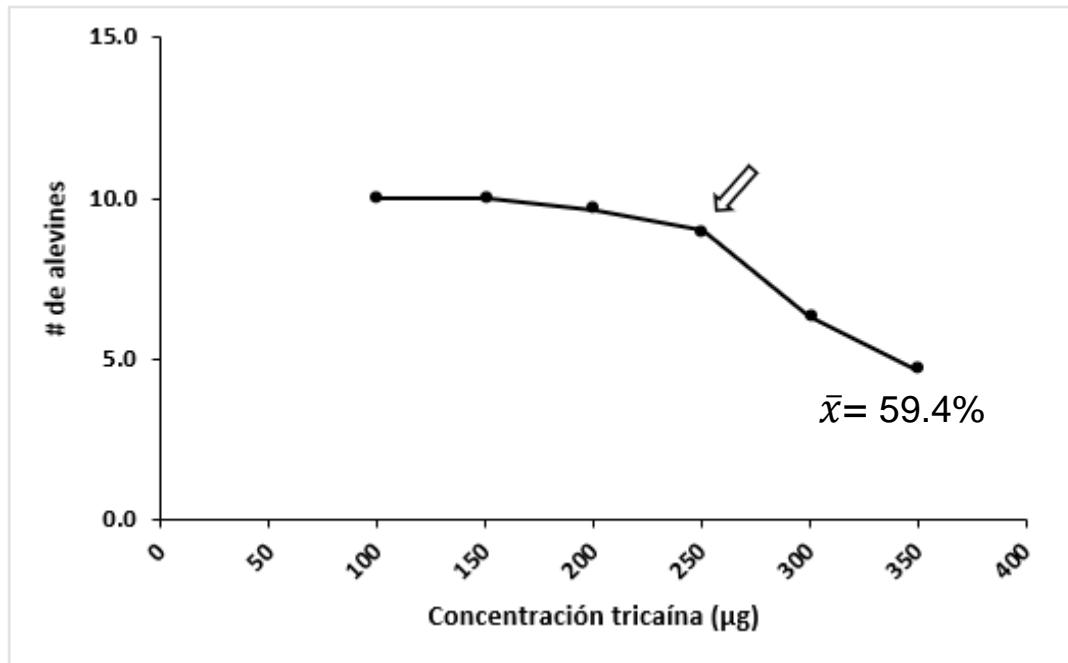


Figura 6. Sobrevivencia de alevines posterior a la aplicación de tricaina. Porcentaje de sobrevivencia de alevines de 1 dpt xenotrasplantados con células SK-N-SH, en cada concentración se utilizaron 10 alevines. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. (n=100)

Localización de las células tumorales en el pez

Después de 7 días de incubación, los alevines xenotrasplantados con células SK-N-SH teñidas con Dil, se observaron mediante microscopio confocal Zeiss LSM 780 a un aumento de 10X para confirmar el marcaje mediante fluorescencia roja.

En alevines sin tratamiento, las células SK-N-SH se observaron en varias zonas del pez como los ojos, saco vitelino, notocorda y vena caudal. Además, en un aumento de 400X se encontró fluorescencia roja cerca de la aleta caudal, confirmando la presencia de células de neuroblastoma en esta zona (**Figura 7a**).

Por otra parte, en los alevines tratados con 1 μ g/ml de Casiopeína Illia, las células se encontraron a lo largo de la notocorda sin llegar a la región caudal hematopoyética (**Figura 7b**).

Finalmente, en el caso de los peces tratados con 10 μ g/ml de Casiopeína Illia, las células de neuroblastoma se encontraron en el saco vitelino y en la zona media del pez, esto se observó a un aumento de 10X en un microscopio confocal. Debajo de la aleta dorsal se pudo observar una pequeña población de células; sin embargo,

cuando se observó la zona caudal en un aumento de 400X, no se observó fluorescencia alguna, por lo que concluimos que las células de neuroblastoma no migraron en estos alevines (**Figura 7c**).

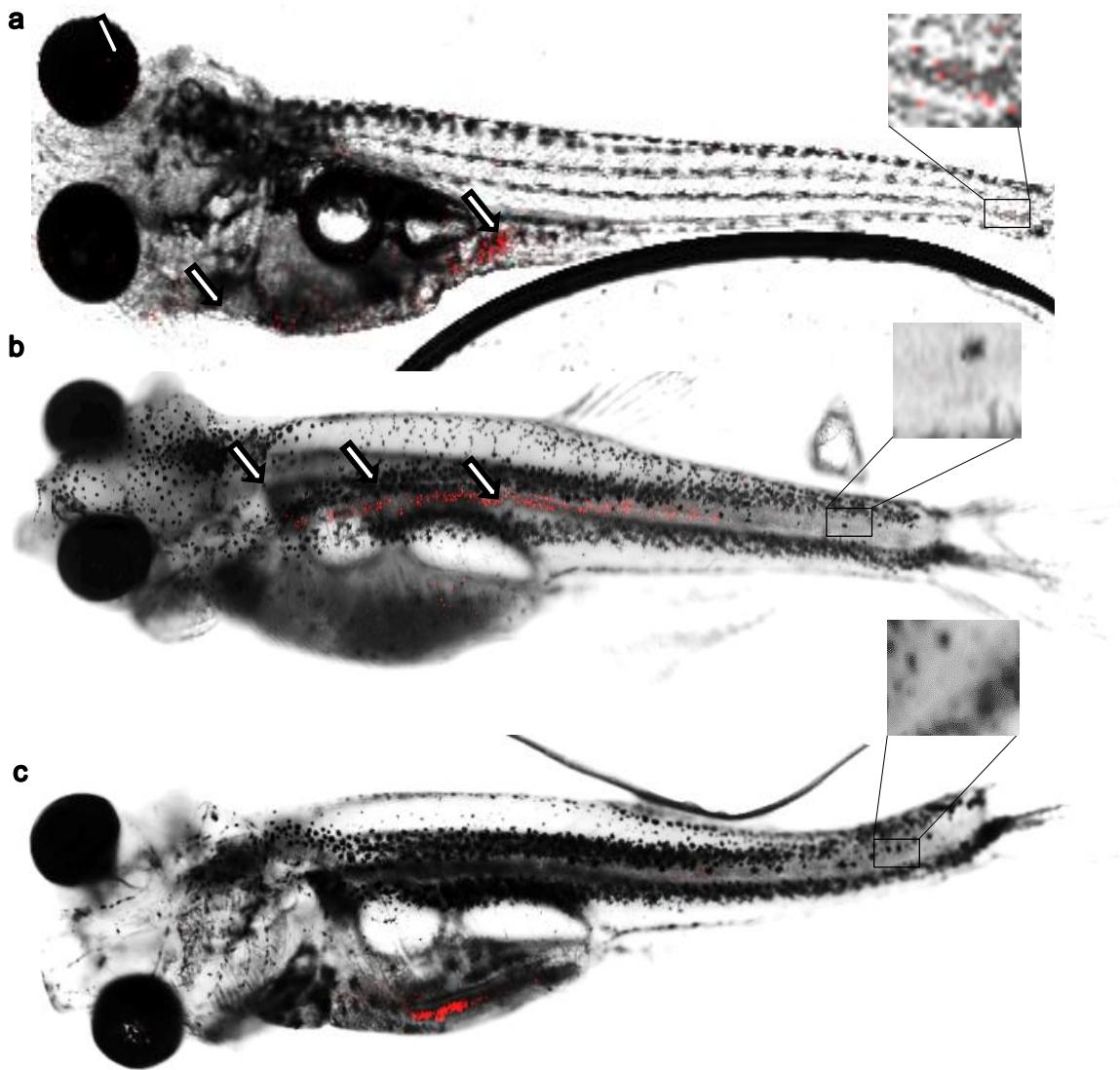


Figura 7. Migración de células SK-N-SH a los 7 dpt. a. Alevín sin tratamiento. **b.** Alevín tratado con CasIIIia a una concentración de 1 µg/ml **c.** Alevín tratado con CasIIIia a una concentración de 10 µg/ml. Células SK-N-SH marcadas de color rojo con Dil. Detalle de la zona caudal (400x).

Observamos que las células SK-N-SH migraron de diferente forma en los alevines que recibieron tratamiento, en comparación con aquellos que no fueron tratados. Esto fue más evidente en la zona caudal del pez, donde contabilizamos entre 80-100 células de neuroblastoma en alevines sin tratamiento cuyas células se encontraban en múltiples sitios del pez cebra (**Tabla 2**). Cabe resaltar que estas células las observamos en tejidos pertenecientes al sistema nervioso simpático como son el ojo, la notocorda y el tubo neural, específicamente en la zona caudal

de los alevines. En peces tratados con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Casiopeína Illia (Cas1), solo algunas células se encontraron en la parte del intestino, mientras que la mayoría de ellas (34 células en promedio, $*p<0.05$) se observaron en la zona del tubo neural y la notocorda, concretamente en la zona caudal. La **Figura 8** muestra la comparación del número de células en la zona caudal de los alevines de *Danio rerio* sometidos a los diferentes tratamientos. El análisis de varianza (ANOVA) indicó diferencias significativas entre los grupos. Posteriormente, la prueba *post hoc* de Tukey reveló diferencias significativas entre el grupo sin tratamiento y los grupos tratados con Casiopeína Illia a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, así como entre los dos grupos tratados. Se presentan los valores de las comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey, donde las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 2. Número de células en la zona caudal de alevines *Danio rerio*

Tratamiento	Número de células alevín 1	Número de células alevín 2	Número de células alevín 3	Promedio de células
Sin tratamiento	81	68	78	75.67
Casiopeína 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	32	31	40	34.33
Casiopeína 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	0	0	0.33

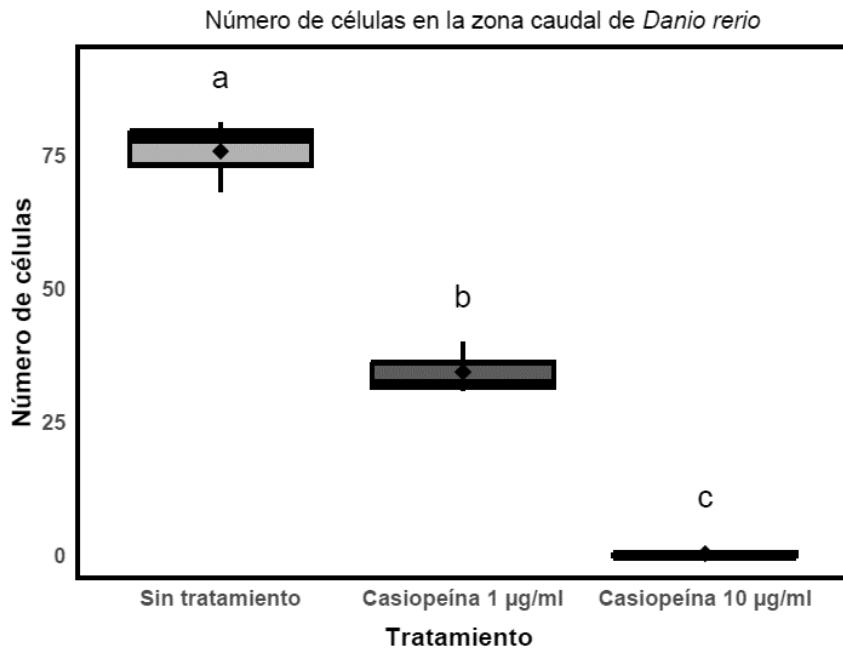


Figura 8. Figura 8. Número de células SK-N-SH localizadas en la zona caudal de los alevines de *Danio rerio* sometidos a distintos tratamientos. Se presentan los valores medios y la dispersión de los datos. Se realizó un ANOVA seguido de una prueba *post hoc* de Tukey para identificar las diferencias entre los grupos. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó en el programa R versión 4.2.2.).

Determinación de CD31

Realizamos un análisis inmunohistoquímico para establecer la presencia de la proteína de adhesión endotelial CD31, como marcador de angiogénesis. En un microscopio óptico a un aumento de 10X se tomaron imágenes del saco vitelino, intestino y notocorda, zonas donde previamente se había observado migración de las células de neuroblastoma; sin embargo, no encontramos la presencia de la proteína CD31 bajo ninguna condición (**Figura 9 y 10**).

Las fotografías corresponden al estómago y saco vitelino, órganos en donde se observaron las células SK-N-SH antes de aplicar los tratamientos (**Figura 9**)

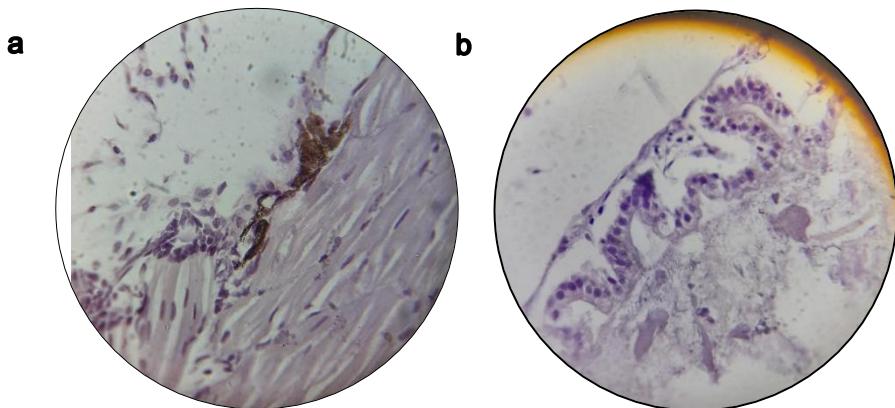


Figura 9. Inmunohistoquímica de CD31 en *Danio rerio* de 7dpt sin tratamiento (10X). **a)** Corte longitudinal de la parte posterior del alevín cercano a la aleta caudal; **b)** Corte longitudinal de intestino y saco vitelino de alevín.

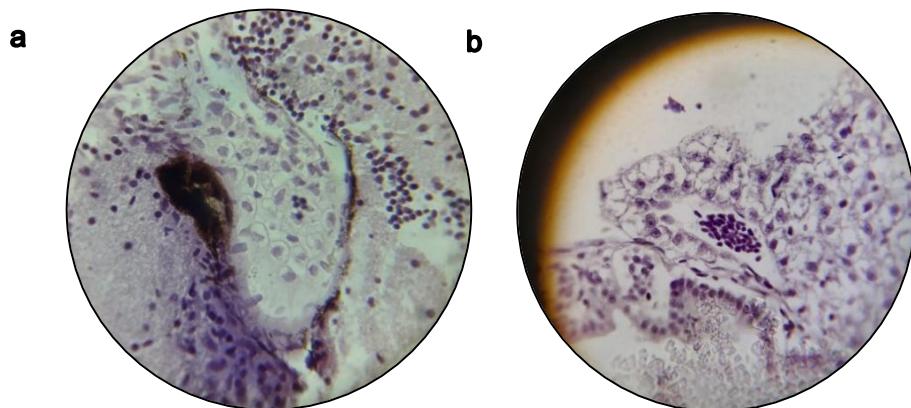


Figura 10. Inmunohistoquímica de CD31 en *Danio rerio* de 7dpt con tratamiento de CasIIIa a una concentración de 10 µg/ml tomado a 10x. **a.** zona caudal **b.** Corte longitudinal de intestino

VI. DISCUSIÓN

El modelo de pez cebra en la actualidad ha aumentado su investigación de manera considerable, debido a esto es necesario mejorar los métodos para su óptima manipulación. Un tema importante para su correcta manipulación es la anestesia, donde nos encontramos con un amplio número de compuestos que se pueden utilizar. Entre los métodos más utilizados se encuentra el enfriamiento gradual, donde la temperatura debe bajar hasta 10°C para inmovilizar al pez. Dentro de los compuestos químicos mayormente utilizados están el clorhidrato de lidocaína, el isoflurano y el metanosulfonato de tricánea (MS-222) (Collymore *et al.*, 2014). La tricánea es considerada en algunos casos como un agente que puede generar estrés en los animales, donde se ha observado disminución en la velocidad de nado, aumento de ansiedad, acidosis respiratoria, depresión cardíaca, insuficiencia cardíaca y muerte dependiendo de la concentración y tiempo de exposición al que se ven sometidos los peces *Danio rerio* (Huang *et al.*, 2010; Popovic *et al.*, 2012). En el caso de nuestro estudio, observamos que en alevines tratados con una concentración de 250 µg/ml de tricánea, no se generaron efectos negativos en un lapso de 24 h.

La concentración establecida para la inducción anestésica de los alevines fue la misma concentración que en peces adultos es utilizada para aplicar eutanasia (250 µg/ml). Aunque se debe tener en cuenta que el intercambio de iones y respiración de los peces teleósteos se realiza a través de la piel; mientras que en peces adultos es mediante branquias, estructuras que tienen una mayor captación de iones y oxígeno tal y como lo señala Rombough (2007).

El seguimiento de las células en tiempo real en un experimento *in vivo*, es un gran reto, debido que en individuos adultos de *Danio rerio* la opacidad de sus tejidos no permite la visualización de las células. Los individuos de esta especie como menciona Brown *et al.* 2016, presentan producción de pigmentos a partir de los 2 dpf, lo cual es un impedimento para poder observar las células. Para prevenir la pigmentación en etapas tempranas del pez cebra se ha optado por la utilización de líneas mutantes tales como *Nacre* o *Casper*. La línea mutante utilizada durante el experimento en curso fue *TAB-WYK* la cual presentó pigmentación a partir de 2 dpf, aun así, fue posible observar bajo microscopía confocal la ubicación de las células a los 7 dpf, ya que las manchas de pigmentación eran de un color tenue que no interfería con la visualización de las células SK-N-SH teñidas con el marcador celular c-Dil.

El sitio donde se realizó el xenotrasplante fue el saco vitelino ya que esta región demuestra tener una gran cantidad de nutrientes para el crecimiento del pez y las células transplantadas, así como ser acelular lo que ayuda a poder observar de mejor manera la motilidad de las células xenotrasplantadas y no tener respuesta inmunitaria adaptativa, siendo el saco vitelino el sitio más empleado para inyectar células de neuroblastoma en general (Zhao *et al.* 2009; Veinotte *et al.* 2014)

El oncogén *N-MYC* es el factor pronóstico independiente más importante asociado al NB de alto riesgo ligado a resistencia a fármacos y desarrollo de metástasis. En el caso de las células SK-N-SH se sabe que, aunque es una línea celular que expresa *N-MYC*, no presenta amplificación del oncogén (Veas-Perez *et al.* 2010), por lo cual es plausible pensar en la posibilidad de que no hubiera proteínas angiogénicas como es el caso del marcador molecular CD31.

La alta mortalidad en alevines tratados con las concentraciones de Cisplatino 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se ha demostrado que este compuesto en alevines de *Danio rerio* genera daño en la línea lateral de los alevines debido a sus efectos ototóxicos, además de encontrar relación a mayor mortalidad en los alevines provocada directamente por la exposición del fármaco en alevines de 7 dpf (Lee *et al.*, 2022; Padovani *et al.*, 2024). Se ha demostrado también que el uso de cisplatino en células CHP-212 provoca necrosis (manuscritos en preparación, 2024) lo cual podría ser un factor importante en la sobrevivencia de los alevines.

Por otro lado, los alevines tratados con Casiopeína Illia mostraron una migración de células de neuroblastoma distinta a los alevines que no fueron tratados con el fármaco, demostrando que las Casiopeínas tienen un efecto importante en el tratamiento de células de neuroblastoma. Lo anterior se demostró en los ensayos *in vitro* realizados por Avalos-Velázquez *et al.* en 2019 en nuestro laboratorio, donde las células SK-N-SH presentaron una mayor tasa de mortalidad cuando fueron tratadas con Casiopeína Illia 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en comparación con el Cisplatino 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a tiempos de exposición que iban desde las 24 h hasta las 120 h. Las células no presentaron migración o invasividad cuando fueron expuestas a los ensayos de la herida o al transwell, respectivamente.

En los alevines de 7 dpt, las células SK-N-SH sin tratamiento se encontraron en varias zonas, destacando el intestino, que forma parte del saco vitelino durante las primeras etapas del desarrollo. También se observaron células en la parte posterior de la notocorda y a lo largo del tubo neural, estructuras que en organismos vertebrados dan lugar al encéfalo y la médula espinal. Ambas zonas forman parte del sistema nervioso simpático, el cual constituye uno de los principales órganos blanco del neuroblastoma (Newman *et al.*, 2019). La presencia de células en estas áreas sugiere que las células tumorales mantienen su capacidad de migración e invasividad en tejidos homólogos a los de los humanos. Además, se observó fluorescencia en los ojos de los alevines sin tratamiento.

En los alevines tratados con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Casiopeína Illia, la mayoría de las células se localizaron en la notocorda y el tubo neural, mientras que la fluorescencia en la zona caudal y en los ojos fue menor. La prueba post hoc de Tukey mostró que el número de células en este grupo fue significativamente menor en comparación con el grupo sin tratamiento ($p = 0.0001$), con un promedio de 36.52 ± 4.35 células.

Por otro lado, en los alevines tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Casiopeína Illia, se observó una reducción aún mayor en el número de células, con un promedio de 2.38 ± 0.75 , lo que representa una diferencia significativa respecto al grupo sin tratamiento ($p = 0.0000031$) y al grupo tratado con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p = 0.0003$). En este caso, la mayoría de las células se localizaron en la zona del intestino, región que durante las etapas tempranas del desarrollo forma parte del saco vitelino, sitio donde se realizó el xenotrasplante. La ausencia de células en otras áreas sugiere que, a esta concentración, las células no migraron desde el sitio de trasplante, lo que coincide con los resultados de estudios previos sobre migración e invasividad en este modelo (Avaloz-Velazquez et al., 2019). La inmunohistoquímica con el marcador endotelial CD31 realizada en alevines tratados y no tratados, mostró que no había presencia de este anticuerpo. Esto sugiere que, en ninguna de las variables, se evidenció metástasis. La ausencia del marcador molecular CD31 es indicativa de una falta de crecimiento tumoral agresivo o metástasis en nuestro modelo de *Danio rerio* (Vanchinathan, V. et al. 2015) por ende, no hay formación de nuevos vasos sanguíneos generados por la presencia de las células tumorales SK-N-SH.

Finalmente, el hecho de no encontrar focos de metástasis cuando los peces xenotrasplantados fueron tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Casiopeína Illia, nos permite hipotetizar que este compuesto fue capaz de inhibir el proceso de angiogénesis.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante esta investigación demostraron que las células de neuroblastoma que fueron xenotrasplantadas en los alevines de *Danio rerio*, no sufren un proceso de angiogénesis y por lo tanto de migración, cuando son tratadas con Casiopeína Illia.

La concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostró una diferencia significativa en comparación con los alevines sin tratamiento, al observarse una reducción en el número de células localizadas en la zona caudal del pez cebra. En la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se pudo observar que las células que migraron a la zona caudal eran escasas y en ciertos casos no se observaron. Estos resultados demuestran que el tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Casiopeína Illia tuvo un efecto antiangiogénico y anti-migratorio más pronunciado sobre las células de neuroblastoma SK-N-SH, sugiriendo un efecto dosis-dependiente. Con estos datos, proponemos que la Casiopeína Illia puede ser útil en el tratamiento contra el neuroblastoma en este modelo animal.

VIII. REFERENCIAS

- Albany, C., Dockter, T., Wolfe, E., Le-Rademacher, J., Wagner-Johnston, N., Einhorn, L., ...
Costello, B. A. (2021). Cisplatin-associated neuropathy characteristics compared with those associated with other neurotoxic chemotherapy agents (Alliance A151724). *Supportive Care in Cancer*, 29(2), 833–840. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05543-5>
- Amable, L. (2016, April 1). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*, Vol. 106, pp. 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>
- Avalos-Velázquez, L., Vitela-Ramos, M., Azuara, L., Mejia, C. (2019). Migración, invasividad y ciclo celular en NB por Casiopeínas. *Revista Nthe*, núm. 31, pp. 50-58.
- Aygun, N. (2018). Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. *Current Pediatric Reviews*, 14(2), 73–90.
<https://doi.org/10.2174/1573396314666180129101627>
- Barriuso, J., Nagaraju, R., Hurlstone, A. (2015). Zebrafish: A New Companion for Translational Research in Oncology. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(5), 969–975.
- Becco, L., García-Ramos, J. C., Azuara, L. R., Gambino, D., & Garat, B. (2014). Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series. *Biological Trace Element Research*, 161(2), 210–215. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0098-1>
- Bosse, K. R. & M. J. M. (2016). Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer*, 122(1), 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Bravo-Gómez, M. E., García-Ramos, J. C., Gracia-Mora, I., & Ruiz-Azuara, L. (2009). Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N) (acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N) (glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(2), 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006>
- Brown, D.R., Samsa, L.A., Qian, L., Liu, J. (2016) Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. *Journal of cardiovascular development and disease*. 3(2).
- Burney, I. (2011). Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 11(3), 424. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3210059/>
- Carvallo-Chaigneau, F., Trejo-Solís, C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez-Aguilera, E., Macías-Rosales, L., Cortés-Barberena, E., ... Constantino-Casas, F. (2008). Casiopeína III-IA induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals*, 21(1), 17–28. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9089-4>
- Colon, N. C., & Chung, D. H. (2011). *Neuroblastoma*. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2011.03.011>
- Compton, C., & Compton, C. (2020). Cancer Initiation, Promotion, and Progression and the Acquisition of Key Behavioral Traits. In *Cancer: The Enemy from Within* (pp. 25–48). https://doi.org/10.1007/978-3-030-40651-6_2
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J. A., & Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeina II. *Toxicology*, 194(1–2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.08.009>
- Drabsch, Y., Snaar-Jagalska, B. E., & Ten Dijke, P. (2017). Fish tales: The use of zebrafish xenograft human cancer cell models. *Histology and Histopathology*, 32(7), 673–686. <https://doi.org/10.14670/HH-11-853>
- Etchin, J., Kanki, J. P., & Look, A. T. (2011). Zebrafish as a Model for the Study of Human Cancer. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 105, pp. 309–337). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381320-0-00014-1>

- García-Ramos, J. C., Gutiérrez, A. G., Vázquez-Aguirre, A., Toledano-Magaña, Y., Alonso-Sáenz, A. L., Gómez-Vidales, V., ... Ruiz-Azuara, L. (2017). The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *BioMetals*, 30(1), 43–58. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9983>
- García-Ramos, J. C., Vértiz-Serrano, G., Macías-Rosales, L., Galindo-Murillo, R., Toledano-Magaña, Y., Bernal, J. P., ... Ruiz-Azuara, L. (2017). Isomeric Effect on the Pharmacokinetic Behavior of Anticancer Cu^{II} Mixed Chelate Complexes: Experimental and Theoretical Approach. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(12), 1728–1736. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601199>
- Gentilin, E., Simoni, E., Candito, M., Cazzador, D., & Astolfi, L. (2019, December 1). Cisplatin-Induced Ototoxicity: Updates on Molecular Targets. *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 25, pp. 1123–1132. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.08.002>
- González-Ballesteros, M.M.; Sánchez-Sánchez, L.; Espinoza-Guillén, A.; Espinal-Enríquez, J.; Mejía, C.; Hernández-Lemus, E.; Ruiz-Azuara, L. (2024) Antitumoral and Antimetastatic Activity by Mixed Chelate Copper(II) Compounds (Casiopeínas®) on Triple-Negative Breast Cancer, In Vitro and In Vivo Models. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 8803. <https://doi.org/10.3390/ijms25168803>
- Grau, P. W. (2011). Artículo de revisión El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular HIF-1 factor induced by hypoxia and oxygen sensitivity. Role of intracellular iron. In *Acta Med Per* (Vol. 28).
- Hagstrom, S. A., Ying, G. S., Pauer, G. J. T., Sturgill-Short, G. M., Huang, J., Maguire, M. G., & Martin, D. F. (2014). VEGFA and VEGFR2 gene polymorphisms and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy. *JAMA Ophthalmology*, 132(5), 521–527. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.109>
- Hanrahan, V., Currie, M. J., Gunningham, S. P., Morrin, H. R., Scott, P. A. E., Robinson, B. A., & Fox, S. B. (2003). The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *Journal of Pathology*, 200(2), 183–194. <https://doi.org/10.1002/path.1339>
- Hu, K., Babapoor-Farrokhyan, S., Rodrigues, M., Deshpande, M., Puchner, B., Kashiwabuchi, F., ... Sodhi, A. (2016). Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in uveal melanoma. *Oncotarget*, 7(7), 7816–7828. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6868>
- Hua, J., Spee, C., Kase, S., Rennel, E. S., Magnussen, A. L., Qiu, Y., ... Hinton, D. R. (2010). Recombinant human vegf165b inhibits experimental choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(8), 4282–4288. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4360>
- Jaime-Martinez LA, Martinez-Pacheco ML, Ruiz-Azuara L, Mejia C. BAX But Not BCL2 Is Necessary for Apoptosis in Neuroblastoma Cells Treated with Casiopeína® Illia. *Anticancer Res.* 2022 feb;42(2):885-892. doi: 10.21873/anticanres.15546. PMID: 35093886.
- Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., & Day, B. J. (2010). Casiopeína Ilgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268(3), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.010>
- Lee, D.S.; Schrader, A.; Bell, E.; Warchol, M.E.; Sheets, L. (2022) Evaluation of Cisplatin-Induced Pathology in the Larval Zebrafish Lateral Line. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14302. <https://doi.org/10.3390/ijms232214302>
- Mamer, S. B., Wittenkeller, A., & Imoukhuede, P. I. (2020). VEGF-A splice variants bind VEGFRs with differential affinities. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71484>

y

- Mandujano-Tinoco, E. A., Gallardo-Pérez, J. C., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Enríquez, S. (2013). Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochemical et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(3), 541–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.013>
- Manohar, S., & Leung, N. (2018, February 1). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology*, Vol. 31, pp. 15–25. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>
- Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., López-Ramírez, S. Y., García-García, J. D., Rodríguez-Zavala, J. S., Ruiz-Ramírez, L., ... Rodríguez-Enríquez, S. (2012). Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Archives of Toxicology*, 86(5), 753–766. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0809-3>
- Masoumi Moghaddam, S., Amini, A., Morris, D. L., & Pourgholami, M. H. (2012, June). Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol. 31, pp. 143–162. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9337-5>
- Matsuyama, M., Chijiwa, T., Inoue, Y., Abe, Y., Nishi, M., Miyazaki, N., ... Nakamura, M. (2009). Alternative splicing variant of vascular endothelial growth factor-A is a critical prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 22(6), 1407–1413. https://doi.org/10.3892/or_00000582
- Mejia, C., & Ruiz-Azuara, L. (2008). Casiopeinas iigly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathology and Oncology Research*, 14(4), 467–472. <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9060-x>
- Newman, E. A., Abdessalam, S., Aldrink, J. H., Austin, M., Heaton, T. E., Bruny, J., ... Madonna, M. B. (2019, March 1). Update on neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*, Vol. 54, pp. 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.09.004>
- Padovani, B.N.; Morales Fénero, C.; Paredes, L.C.; Amaral, M.A.d.; Domínguez-Amoroch, O.; Cipelli, M.; Gomes, J.M.M.; da Silva, E.M.; Silva, L.M.; Vieira, R.d.S.; et al. (2024) Cisplatin Toxicity Causes Neutrophil-Mediated Inflammation in Zebrafish Larvae. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 2363. <https://doi.org/10.3390/ijms25042363>
- Patel, K. A., Patel, B. M., Thobias, A. R., Gokani, R. A., Chhikara, A. B., Desai, A. D., & Patel, P. S. (2020). Overexpression of VEGF165 is associated with poor prognosis of cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 46(11), 2397–2406. <https://doi.org/10.1111/jog.14483>
- Peach, C. J., Mignone, V. W., Arruda, M. A., Alcobia, D. C., Hill, S. J., Kilpatrick, L. E., & Woolard, J. (2018, April 23). Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19041264>
- Pérez-Mora, A. (2008). *Evaluación del daño ocasionado al ADN en cultivo de linfocitos humanos tratados con casiopeína Igly: nuevo compuesto de cobre II*. UNAM.
- Rosales, A. & G. A. (2012). Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico: Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3, 89–111. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-11242012000100007&lng=es&nrm=iso
- Ruiz-Azuara, L. (1992). *United States Patent*. Vol. RE 35,458.
- Ruiz-Azuara, L. (1996). *United States Patent*. 5(576,326).
- Ruiz-Azuara, L. (2002). No Title. *Mark Tittle Casiopeína, Reg, 407543 SECOFI*.

- Scheneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675.
- Serment-Guerrero, J., Cano-Sanchez, P., Reyes-Perez, E., Velazquez-Garcia, F., Bravo-Gomez, M. E., & Ruiz-Azuara, L. (2011). Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas®. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1376–1384. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>
- Strother, D. R., London, W. B., Schmidt, M. Lou, Brodeur, G. M., Shimada, H., Thorner, P., ... Strother, D. (2012). Outcome After Surgery Alone or With Restricted Use of Chemotherapy for Patients with Low-Risk Neuroblastoma: Results of Children's Oncology Group Study P9641. *J Clin Oncol*, 30, 1842–1848. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.9990>
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019, August 28). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, Vol. 9, pp. 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- Tolbert, V. P., & Matthay, K. K. (2018, May 1). Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell and Tissue Research*, Vol. 372, pp. 195–209. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2821-2>
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropón, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S. T., ... Sotelo, J. (2005). Casiopeína IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*, 7(6), 563–574. <https://doi.org/10.1593/neo.04607>
- Valencia-Cruz, A. I., Uribe-Figueroa, L. I., Galindo-Murillo, R., Baca-López, K., Gutiérrez, A. G., Vázquez-Aguirre, A., ... Mejía, C. (2013). Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS ONE*, 8(1), 54664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054664>
- Vijay Vanchinathan, Neda Mizramani, Ramya Kantipudi, Erich J. Schwartz, Uma N. Sundram, The Vascular Marker CD31 Also Highlights Histiocytes and Histiocyte-Like Cells Within Cutaneous Tumors, American Journal of Clinical Pathology, Volume 143, Issue 2, February 2015, Pages 177–185, <https://doi.org/10.1309/AJCPRHM8CZH5EMFD>
- Vargas-Vargas, R. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia En México*, 29, 86–96.
- Veas-Perez de Tudela, M., Delgado-Esteban, M., Cuende, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2010). Human neuroblastoma cells with MYCN amplification are selectively resistant to oxidative stress by transcriptionally up-regulating glutamate cysteine ligase. *Journal of neurochemistry*, 113(4), 819–825. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06648.x>
- 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. <https://doi.org/10.1242/dmm.015784>
- Wang, Z., & Zhu, G. (2018). DNA Damage Repair Pathways and Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14251-9>
- Whittle, S. B., Smith, V., Doherty, E., Zhao, S., McCarty, S., & Zage, P. E. (2017, April 3). Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol. 17, pp. 369–386. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1285230>
- Willett, C. E., Cortes, A., Zuasti, A., & Zapata, A. G. (1999). Early Hematopoiesis and Developing Lymphoid Organs in the Zebrafish. *Dev Dyn*, 214, 323–336. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199904\)214:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4)
- Woolard, J., Bevan, H. S., Harper, S. J., & Bates, D. O. (2009). Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of Its biological activity. *Microcirculation*, Vol. 16, pp. 572–592.

<https://doi.org/10.1080/10739680902997333>

ZFIN Staff (2016) Mutation Details Curation of Older Features. ZFIN Historical Data

Zhang, H., Jia, E., Xia, W., Lu, C., & Zhu, W. (2018). VEGF165b mutant with a prolonged half-life and enhanced anti-tumor potency in a mouse model. *Journal of Biotechnology*, 284, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.002>

Zhao H., Tang C., Cui K., Ang B.-T., Wong S. T. C. (2009). A screening platform for glioma growth and invasion using bioluminescence imaging. *Laboratory investigation. J. Neurosurg.* 111, 238–246

Zuazo-Gaztelu, I., & Casanovas, O. (2018, July 2). Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology*, Vol. 8, p. 248. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00248>