

# El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina

El pez cebra se ha convertido en un modelo inigualable para investigar diferentes procesos biológicos. Y ahora, sus cualidades genéticas y embrionarias se aprovechan para buscar nuevos medicamentos que permitan controlar enfermedades devastadoras, como el cáncer y el parkinson

---

Agustín Rojas-Muñoz, Antonio Bernad Miana y Juan Carlos Izpisúa Belmonte

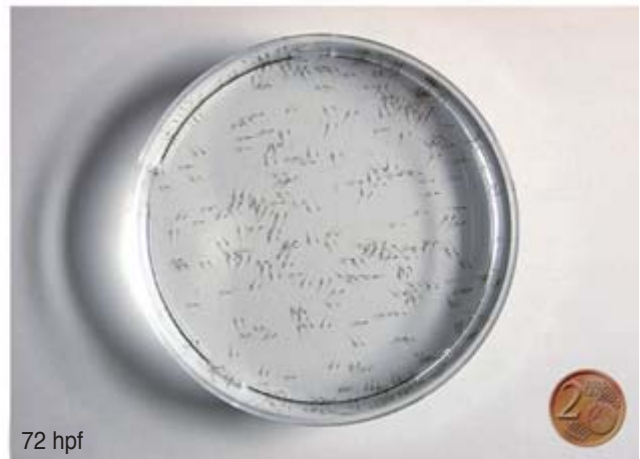
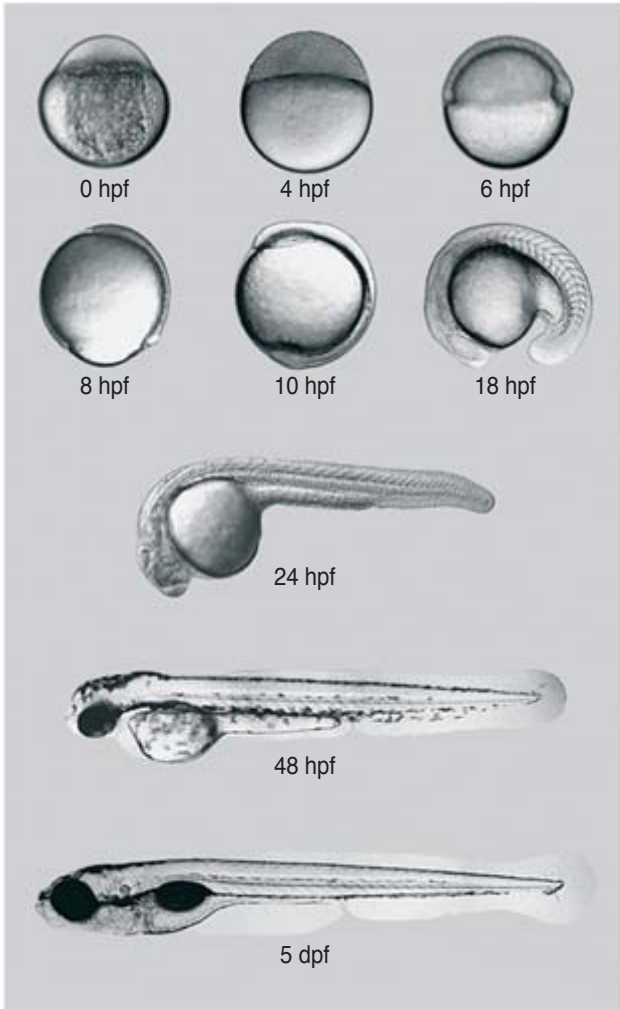
# M

uchas enfermedades son el resultado directo de errores en las instrucciones presentes en los genes. Generalmente, los genes ejercen su función biológica a través de las proteínas. Los genes y las proteínas están presentes en todos los seres vivos; son los arquitectos de la vida y los ladrillos para su construcción. La receta para preparar todos los tipos de proteínas está escrita en los genes. Errores en la información presente en estas recetas o plantillas se traducen en proteínas que funcionan anormalmente. Sin embargo, y a diferencia de un restaurante, las recetas en el cuerpo humano no se preparan a petición del comensal. El embrión, cuando se implanta, ya cuenta con un plan de desarrollo preestablecido acorde con la especie a la que pertenece. Este plan corporal consiste en un control temporal y espacial muy estricto, que determina la variedad de proteínas presentes en cada lugar y edad específicos del organismo. Los errores en este sistema de control también producen aberraciones en el funcionamiento de las proteínas. La mayoría de estos errores no son compatibles con la vida; en el mejor de los casos, generan alteraciones que pueden conducir a enfermedades devastadoras.

Conocer los agentes causantes de muchas de las enfermedades hereditarias ha significado por sí mismo un avance fundamental de la ciencia básica. Sin embargo, la búsqueda de una solución para esas patologías apenas ha comenzado. Actualmente, los seres humanos mueren de las mismas enfermedades genéticas que nuestros antepasados hace siglos. Sólo los cambios en el estilo de vida han modificado la esperanza de vida y la incidencia relativa de ese tipo de enfermedades. Tal situación explica que el cáncer y los trastornos cardíacos, por ejemplo, sigan sin un tratamiento eficaz. Urgen, pues, nuevos métodos y estrategias encaminados a estudiar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes, así como intentar descubrir medicamentos y terapias efectivas contra estas y otras enfermedades. En los siguientes párrafos abordaremos algunos de estos aspectos y su relación con la biomedicina y la biotecnología en un futuro cercano. Un futuro que, sin duda, contará con un diminuto pez tropical denominado pez cebra.

## El pez cebra, modelo biológico

¿Qué tienen en común la mosca del vinagre, el ratón común, el pez cebra y los humanos? A primera vista muy poco. Sin embargo, años de investigación han puesto de manifiesto un sorprendente parecido en la mayoría de sus procesos biológicos fundamentales. Entre las semejanzas están



**1. EL CICLO DE VIDA DEL PEZ CEBRA.** La hembra deposita los huevos en el agua, donde los fecunda el macho. Las etapas del desarrollo embrionario se suceden rápidamente; se dan en horas pasada la fecundación (hpf) o días pasada la fecundación (dpf). Las hembras depositan más de 200 embriones por semana; los protege una membrana, el corion (*panel medio derecho*). Pasados tres días,

los embriones eclosionan. Se los puede mantener en el laboratorio en cajas de cultivo gracias a su reducido tamaño (*panel inferior derecho*). A partir de los tres meses de vida pueden reproducirse de manera continua. Un adulto en edad de reproducción mide aproximadamente 4 centímetros. A diferencia del ser humano, el pez cebra continúa creciendo hasta la muerte.

el tipo de proteínas utilizadas para construir las diferentes partes del cuerpo, los mecanismos empleados para producir un organismo adulto, así como los procesos que marcan su envejecimiento y muerte. Por esta razón se puede asegurar que, en este contexto biológico, lo que

es cierto para la mosca del vinagre lo es también para el ser humano. Ante tamaño grado de conservación biológica, determinados organismos lejanamente emparentados con el ser humano sirven como modelo para identificar agentes causantes de enfermedades hereditarias.

Entre los modelos biológicos más cercanos al ser humano se encuentra el pez tropical *Danio rerio*, o pez cebra. Durante mucho tiempo, no fue más que una mascota popular. Su uso en investigación básica se incrementó de manera sustancial hace un decenio, cuando se demostró que

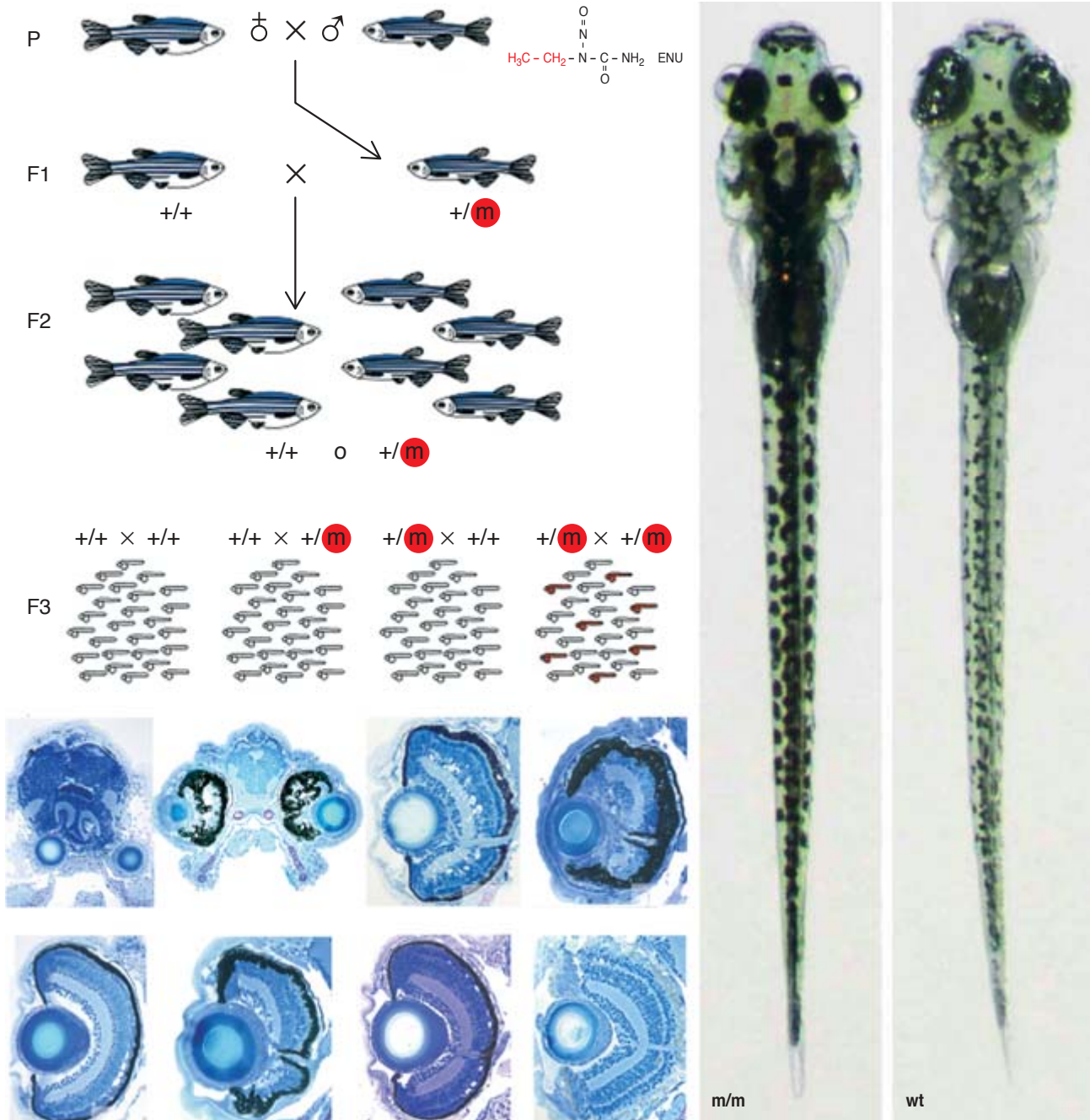
podría ser utilizado en gran escala para identificar nuevos genes por medio de cribados mutacionales.

En los cribados mutacionales se inducen errores en la información contenida en los genes, alterando de esta manera la función de las proteínas que generan. Los genes dotados de una función específica se

identifican por las malformaciones en la estructura o alteraciones en el proceso de interés que esos errores causan. Es como tratar de identificar la función de cada una de las piezas de un automóvil retirando al azar una cada vez para observar cómo afecta a su funcionamiento. Sin embargo, a diferencia de los coches y

la mayoría de los vertebrados, los embriones del pez cebra son transparentes. Esta característica facilita la identificación del órgano afectado por la mutación.

La escala en que se han llevado a cabo cribados en el pez cebra es sorprendente. Mediante ese método se han encontrado en los últimos



**2. EL PEZ CEBRA ES UNA HERRAMIENTA GENÉTICA.** Al incubar machos en mutágenos, por ejemplo en ENU (etilnitrosourea), se altera la información presente en los genes —variante m—. Al cruzar estos machos con hembras de tipo salvaje (wt) —cruce parental, P—, podemos identificar malformaciones congénitas en una cuarta parte

de las parejas estudiadas en la Filial 3 (F3). Algunas malformaciones saltan a la vista, como la reducción en el tamaño de los ojos en el panel de la derecha (m/m). Otras necesitan un examen más detallado. El panel inferior reúne una selección de malformaciones oculares identificadas por medio de cortes histológicos.

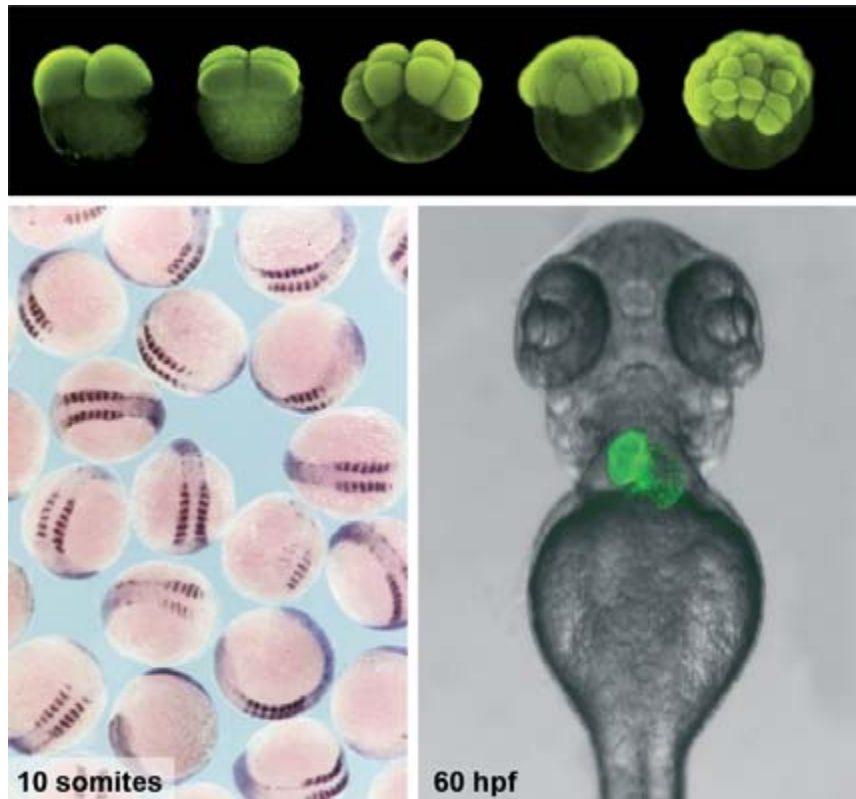
diez años más de mil mutaciones que afectan al desarrollo de órganos, a su funcionamiento o a lo uno y lo otro. Eso sí, hay que tener en cuenta que, aun cuando los cribados han generado amplia información acerca de la función temprana de alrededor de 400 genes, no se ha establecido todavía la relación de la mayoría de éstos con enfermedades específicas.

Otras características explican el éxito del pez cebra como modelo biológico para estudiar el desarrollo temprano en vertebrados. Por ejemplo, tiene un tiempo aproximado de generación de tres meses y los adultos se mantienen fértiles durante más de doce. Esto significa que se puede tener un suministro constante de embriones a un costo relativamente bajo, comparado con otros vertebrados.

Además, la fecundación de los huevos y la totalidad del desarrollo se llevan a cabo fuera de la hembra, condición que facilita el estudio directo de las etapas tempranas de la ontogenia. Añádase que suelen obtenerse de 200 a 500 embriones por pareja a la semana. Las ventajas que estas características innatas ofrecen para la investigación básica se ven favorecidas por el creciente número de técnicas que se han desarrollado alrededor de este modelo biológico.

### La caja de herramientas del pez cebra

Los estudios pioneros de George Streisinger con *Danio rerio* a finales de los años setenta sentaron las bases para su posterior uso como modelo biológico. Tanto el pez cebra como el ser humano son organismos diploides. Es decir, tienen por duplicado las recetas necesarias para mantener el flujo constante de la información biológica de una generación a otra. Una copia es aportada por la madre y otra por el padre. En el pez cebra, los embriones con una sola copia cromosómica (haploides) pueden desarrollarse de manera normal sólo hasta las 72 hpf (horas post-fecundación). Streisinger desarrolló métodos para generar embriones haploides o diploides de origen exclusivamente materno. De ese modo identificó los primeros mutantes de esta especie. Tales avances metodológicos, junto con el corto período entre generaciones, la gran cantidad de embriones



**3. EL PEZ CEBRA ES UN MODELO UNICO** para estudiar diferentes aspectos de la biología de los vertebrados. Debido a su éxito como herramienta genética, se ha creado una extensa gama de técnicas alrededor de este animal. Su desarrollo externo y la transparencia del embrión permiten la investigación pormenorizada de las primeras fases del desarrollo de los vertebrados; por ejemplo, la distribución de proteínas depositadas por la hembra en el huevo. Una de estas proteínas se visualiza en color verde en el panel superior, desde la fase de dos células hasta la fase de 64 células. De forma similar, se puede analizar la distribución temporal y espacial de diferentes ARN mensajeros por medio de la hibridación *in situ*. Por ejemplo, el panel inferior izquierdo muestra el lugar y momento precisos en que se requiere la actuación de un gen necesario para que se desarrollen los músculos del tronco. Recientemente, se ha logrado integrar material genético en el genoma del pez cebra. Gracias a este procedimiento, denominado transgénesis, se han visualizado células y órganos en tiempo real mediante la proteína fluorescente GFP; es el caso del corazón del panel inferior derecho (a las 60 horas de la fecundación). Esta técnica promete revolucionar el estudio de los procesos biológicos.

obtenidos por pareja semanalmente, el reducido tamaño de los adultos y su desarrollo externo redujeron las restricciones que hasta ese momento impedían la mutagénesis a gran escala en vertebrados.

La investigación viene aplicando una amplia diversidad de metodologías que permiten la manipulación de la función génica en el pez cebra con una excelente resolución espacial y temporal. Por ejemplo, la transparencia del embrión ha permitido el desarrollo de técnicas no invasoras de observación basadas en proteínas fluorescentes como la proteína

fluorescente verde (GFP, de Green Fluorescent Protein). Tales macromoléculas emiten un haz de luz que permite percibir los más íntimos detalles de las células que las portan, en vivo y en directo. Viene a ser como la diferencia entre seguir una competición deportiva por televisión o tratar de reconstruir lo sucedido en ella a partir de un reducido grupo de fotografías. Esta ventaja constituye una revolución técnica sólo disponible en el pez cebra.

La transparencia del embrión ha permitido identificar la dinámica de expresión de genes diana *in vivo*

IMPACTO DEL PEZ CEBRA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA		
CAMPO DE APLICACION	EJEMPLO	COMENTARIO/DIANA
<b>Desarrollo de nuevos fármacos</b>		
Descubrimiento	Control de arritmia severa Regulación de señalización Cáncer	Ortólogo de HERG Proteínas G heterotriméricas Genérico
Mecanismo de acción	Angiogénesis Fenotipos tempranos inducidos por fármacos	Metioninaaminopeptidasa (MetAP-2) Proteínas ribosómicas
Metabolismo y excreción	Metabolismo de moléculas pequeñas	
Farmacodinámica y farmacocinética	Rutas de absorción	Genérico
Mutágeno	Efectos sobre la integridad del genoma	Genérico
<b>Modelos de enfermedad</b>		
Cáncer	Leucemia Metástasis Genética y cribado	c-myc
Trastornos del sistema inmunitario	Genérico/Básico Trasplante	
Cardiovascular	Mutante Gridlock Insuficiencia circulatoria	<i>Hey2</i> Syndecan-2
Trastornos del comportamiento	Alteraciones del sueño y drogodependencias	Receptores de opiáceos
Enfermedades raras	Síndrome de DiGeorge Anemia de Fanconi Atrofia muscular espinal	Mutación Van Gogh (tbx1) FANCD2 Smn
Enfermedades infecciosas	Patogénesis estreptocócica	Genérico
Factores ambientales	Efecto de la dieta en la patología neuroológica Flora bacteriana del intestino y patología  Osteoporosis	Piruvato deshidrogenasa  Regulación de la expresión génica en el intestino Microgravedad
<b>Toxigenómica</b>		
Contaminación ambiental	Evaluación de la calidad del agua Compuestos orgánicos Metilmercurio Cadmio	Genérico Genérico Genérico HSp70
<b>Piscicultura</b>		
Estudio de patogénesis	Infecciones bacterianas y víricas	Estreptococo y Salmonela
Desarrollo de vacunas	Vacunas antivíricas	Virus con cápside
Mejora	Efectos secundarios poblacionales	Hormona de crecimiento en salmón
Biorreactores	Producción de proteínas de interés biomédico	FVII Genérico

por medio de la transgénesis. Por transgénesis se entiende la capacidad de introducir genes y sus regiones reguladoras dentro del genoma. Este procedimiento nos faculta para controlar la función génica y observar el momento y lugar en que se activan los genes diana. No sólo se pueden

identificar grupos de células por medio de la transgénesis, sino también órganos e incluso procesos fisiológicos, como la digestión de grasas o la actividad neuronal. Con esa técnica se aceleró el advenimiento de una segunda generación de cribados mutacionales encaminados a estudiar

la función celular en el contexto del organismo.

Por otra parte, la microinyección de ARNm o ADN permite la síntesis masiva o regulada de proteínas. El ADN, ácido nucleico del que están compuestos los genes, se transcribe en ARNm, copia que sólo se produce

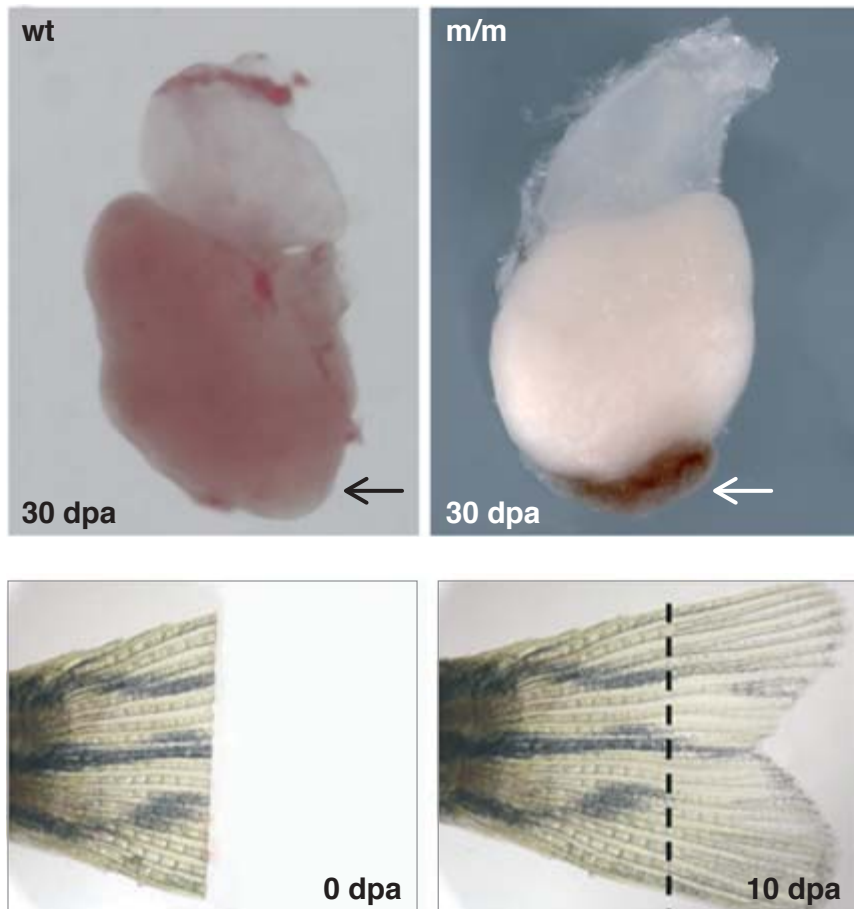
cuando lo requiere la célula. Cuando se inyecta ARNm al comienzo del desarrollo embrionario, todas las células del embrión fabricarán la proteína correspondiente. De manera opuesta, el desarrollo de moléculas capaces de reducir los niveles normales de producción de proteínas (por ejemplo, los morfolinós), ha permitido la evaluación rápida de la función de genes diana. Los morfolinós se unen al ARNm y evitan que dirija la síntesis de proteínas.

Asimismo, es posible generar mosaicos genéticos por medio del trasplante de blastómeros (células embrionarias) de un organismo a otro. A través de la aplicación de este procedimiento se han evaluado *in vivo* los efectos celulares de las manipulaciones genéticas ya descritas. La identificación de promotores endógenos —regiones específicas de los genes que indican el momento y lugar en que la célula requiere la información que esos mismos genes contienen— a los que se pueda regular a voluntad constituyó la llave para manipular la actividad génica con gran resolución temporal. Merced a ese puñado de avances metodológicos, el pez cebra se ha convertido en el segundo modelo biológico de mayor relevancia entre los vertebrados, después del ratón.

Además de las herramientas diseñadas para manipular la función genética, la comunidad científica que trabaja con el pez cebra está generando un grupo de herramientas virtuales esenciales para entender la función de los genes y las proteínas. Entre estas herramientas se cuenta la secuencia de su genoma, vale decir, la identificación de cada una de las palabras y signos de puntuación presentes en cada una de las recetas necesarias para construirlo. Y se han establecido patrones de expresión genética global, así como bases de datos que pueden ser escrutadas libremente a través de Internet.

### El pez cebra, modelo biomédico y biotecnológico

Las mismas características que han hecho del pez cebra una herramienta de gran valor para estudiar la biología del desarrollo, se aprovechan ahora para el descubrimiento de nuevos medicamentos. En particular, el costo



**4. A DIFERENCIA DE LA MAYORÍA DE LOS VERTEBRADOS**, el pez cebra está capacitado para regenerar diferentes estructuras de su anatomía. Con una rápida e indolora incisión desde el vientre adulto cabe eliminar parte del corazón sin afectar la viabilidad. A los pocos días, un individuo normal (wt) recupera la forma y función de su corazón (*panel medio izquierdo*), mientras que un individuo con malformaciones genéticas específicas (m/m) produce una cicatriz que inhibe la regeneración (*panel medio derecho*). El corazón humano cicatriza en respuesta a un trauma y es incapaz de reemplazar el tejido cardíaco afectado. La cola del pez cebra crece luego de ser amputada. Esta estructura es de fácil acceso en el adulto y su estudio ha permitido la identificación de varios genes necesarios para regenerar órganos en vertebrados. En cada panel se indican los días transcurridos después de la amputación (dpa).

de mantener el pez cebra es entre 100 y 1000 veces menor que el de mantener ratones de laboratorio. Sin embargo, el mayor ahorro, desde el punto de vista biomédico, es el de compuestos químicos. Como varias larvas pueden vivir en un volumen de líquido del tamaño de una gota de agua, sólo se necesitan cantidades mínimas de los compuestos por ensayo. Una ventaja única para identificar *in vivo* compuestos dotados de actividad biológica en fases tempranas del desarrollo.

No hace mucho, diversos grupos recurrieron al pez cebra para establecer modelos biomédicos de enfermedades humanas: la distrofia muscular, la degeneración del músculo cardíaco, la fibrosis quística, diferentes tipos de cáncer, la anemia, el procesamiento de colesterol y enfermedades del sistema inmune. Estos modelos, acoplados con la posibilidad de evaluar el efecto de numerosos compuestos químicos con potencial terapéutico, han marcado el nacimiento de una nueva etapa en biomedicina. Una etapa que sustenta su éxito en la investigación básica. El límite parece hallarse sólo en la imaginación de la comunidad científica y su capacidad de generar nuevos modelos en el pez cebra que semejen enfermedades humanas. Importa mencionar que no cabe pensar en una aproximación similar con roedores, cuyo desarrollo ocurre *in utero* y aportan una cifra limitada de embriones. Por su parte, los resultados obtenidos de cultivos celulares se resienten de la falta de contexto, tanto en lo que se refiere

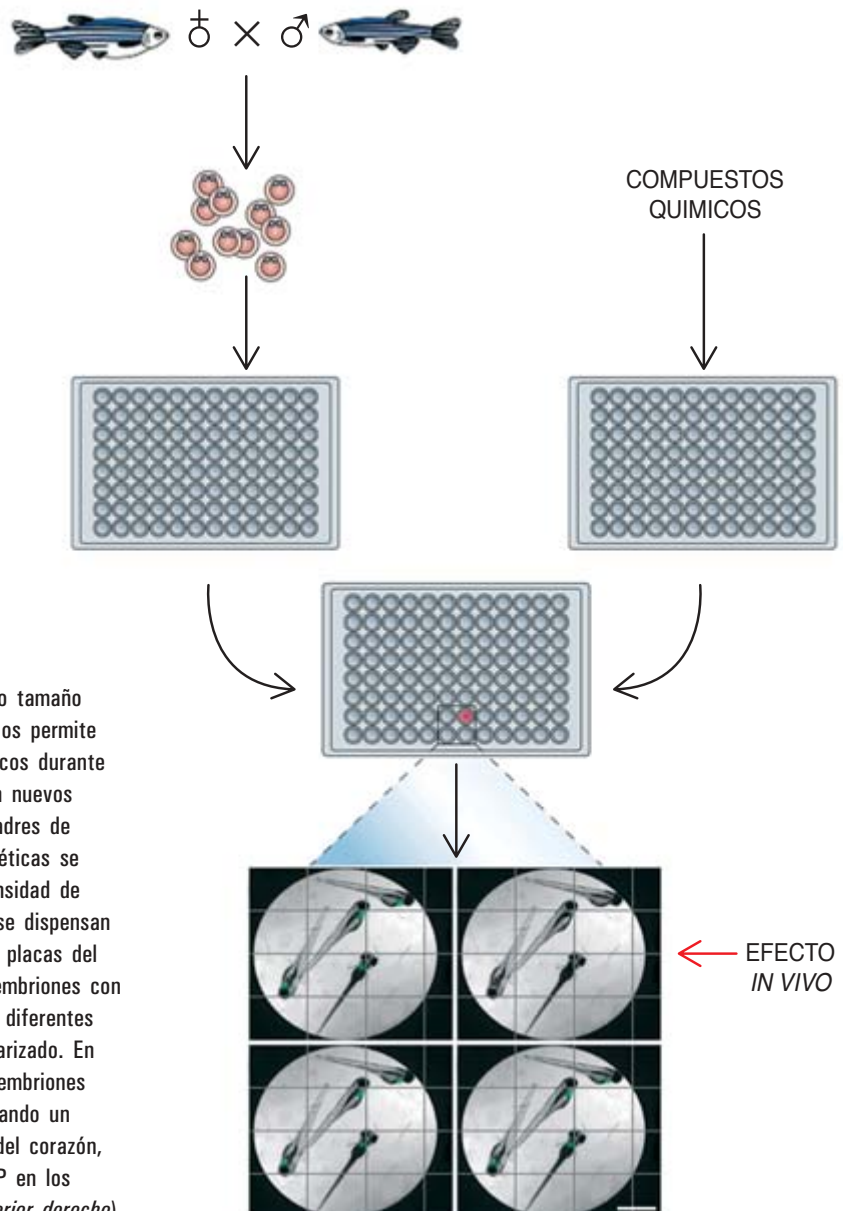
al tipo de tejido como a la fase del desarrollo.

El pez cebra también ha comenzado a ganar terreno en biotecnología. En ese dominio, se han diseñado algunas variantes que emiten luz en la oscuridad y pueden usarse como biosensores, ya que emiten luz únicamente cuando se encuentran en un medio muy contaminado por metales pesados y otros desechos industriales. Varios problemas de salud en humanos, entre ellos la esterilidad y el cáncer, guardan relación con la exposición a este tipo de compuestos. Habida cuenta de la preocupación por los efectos de la contaminación del medio y sus consecuencias en el ser humano, cabe pensar que el número y

diversidad de biosensores generados a partir del pez cebra se multiplicarán en los próximos años. Por otra parte, adultos o embriones utilizados como biorreactores podrían ofrecer a la industria una nueva forma de producir a gran escala proteínas que requieran una maduración compleja.

## Conclusiones

El pez cebra se utilizó inicialmente como una herramienta para estudiar el desarrollo de los órganos en vertebrados. Después, su abanico de ventajas experimentales lo han convertido en una herramienta biomédica y biotecnológica de gran valor añadido. En ambos casos, el alto grado de semejanza genética y fisiológica



**5. INVESTIGACION A GRAN ESCALA.** El reducido tamaño de la numerosa progenie del pez cebra no sólo nos permite analizar el efecto de múltiples compuestos químicos durante el desarrollo embrionario, sino identificar también nuevos medicamentos. Los embriones provenientes de padres de tipo salvaje o portadores de malformaciones genéticas se distribuyen en placas de 96 pocillos con una densidad de hasta cuatro embriones por pocillo. Igualmente, se dispensan diluciones de diferentes compuestos químicos en placas del mismo formato. Posteriormente, se incuban los embriones con los compuestos químicos. Su efecto se evalúa a diferentes tiempos por medio de un sistema óptico computarizado. En el ejemplo de la figura, el corazón de todos los embriones expresa la proteína fluorescente verde (GFP). Cuando un compuesto afecta específicamente el desarrollo del corazón, no se puede detectar la señal emitida por la GFP en los embriones del pocillo correspondiente (*panel superior derecho*).

con el ser humano han sido de vital importancia.

Con todo, la llave de su éxito quizá se deba a la posibilidad de realizar experimentos a gran escala, ya que permite generar plataformas encaminadas al análisis sistemático de compuestos químicos con potencial terapéutico. Por este camino se han identificado nuevos genes y compuestos químicos que regulan la proliferación descontrolada de células, una esperanza de tratamiento para las personas con cáncer. Asimismo, se buscan nuevos blancos terapéuticos por medio del uso sistemático de morfolinos y cribados genéticos.

## Los autores

**Juan Carlos Izpísima Belmonte** es profesor del Laboratorio de Expresión Génica y director del Centro de Células Madre del Instituto Salk en La Jolla, labor que comparte con la dirección del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. **Agustín Rojas-Muñoz** ocupa el cargo de investigador asociado en el grupo de Izpísima-Belmonte en el Instituto Salk de San Diego.

**Antonio Bernad Miana** es profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con destino en el departamento de inmunología y oncología del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid. Los autores centran sus investigaciones en la regeneración de órganos y tejidos, para lo que utilizan el pez cebra como herramienta biológica.

## Bibliografía complementaria

GENETIC APPROACHES TO DISEASE AND REGENERATION. M. T. Keating en *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 359, págs. 795-8; 2004.

TECHNOLOGY FOR HIGH-THROUGHPUT SCREENS: THE PRESENT AND FUTURE USING ZEBRAFISH. D. R. Love, F. B. Pichler, A. Dodd, B. R. Coppy D. R. Greenwood en *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, págs. 564-71; 2004.

IN VIVO DRUG DISCOVERY IN THE ZEBRAFISH. L. I. Zon y R. T. Peterson en *Nature Review Drug Discovery*, vol. 4, págs. 35-44; 2005.

TRANSGENES AS SCREENING TOOLS TO PROBE AND MANIPULATE THE ZEBRAFISH GENOME. A. Amsterdam y T. S. Becker en *Developmental Dynamics*, vol. 234, págs. 255-68; 2005.