



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Verónica Andreina Lyon Bonucci**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS  
CELULARES DE PEZ CEBRA EN ESTADIOS EMBRIONARIOS  
Y ADULTOS, TANTO DE TIPO SALVAJES COMO MUTANTES,  
PARA APLICACIONES EN ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y  
MOLECULARES**

Traballo Fin de Grao

*xuño 2025*

## **RESUMEN**

El desarrollo y la caracterización de líneas celulares de pez cebra requiere de la elaboración de un protocolo que facilite su establecimiento. Actualmente existen pocas metodologías optimizadas para este modelo, a pesar de su creciente importancia en investigación biomédica y genética. Este trabajo tiene como objetivo diseñar una metodología para generar cultivos celulares a partir de embriones y peces cebra adultos, tanto de tipo salvajes como mutantes. La finalidad común es la estandarización de las condiciones óptimas para el cultivo de sus células, independientemente del genotipo de origen.

Se evaluaron distintas condiciones de disgregación celular, utilizando enzimas proteolíticas como tripsina y pronasa y se utilizó medio de cultivo L-15, suplementado con distintas concentraciones de FBS, y bajo diferentes formas de esterilización. También, se exploró la transformación vírica con retrovirus SnRV como estrategia de inmortalización. Se llevaron a cabo ensayos de cultivo celular a partir de embriones en estadios de 30% y 50% de epibolia, estadio de yema y fase faringular Prim-5, con el fin de preservar su viabilidad celular, evitando el desarrollo de embriones hasta etapas más avanzadas y, de este modo, reduciendo el uso de animales en la experimentación. Asimismo, se iniciaron ensayos para el desarrollo de líneas celulares derivadas de corazón, intestino, ojos, músculo y cerebro extraído de peces cebra adultos, comparando individuos salvajes y mutantes.

Aunque se logró la siembra inicial y se observaron signos tempranos de adherencia y viabilidad en algunas condiciones, la mayoría de los cultivos no consiguieron mantenerse de forma estable a largo plazo. Con todo, este trabajo sienta las bases metodológicas para futuras optimizaciones orientadas al establecimiento efectivo de líneas celulares. Este proyecto no solo contribuye al avance del conocimiento en biomedicina, sino que también promueve un enfoque más ético y sostenible en la investigación científica.

Palabras clave: pez cebra - desarrollo embrionario - cultivos celulares - tejidos - adultos

## **RESUMO**

O desenvolvemento e caracterización de liñas celulares de peixe cebra requiren da creación dun protocolo que facilite o seu establecemento. Actualmente existen poucas metodoloxías optimizadas para este modelo, malia a súa crecente importancia en investigación biomédica e xenética. Este traballo ten como obxectivo deseñar unha metodoloxía para xerar cultivos celulares a partir de embrións e peixes cebra adultos, tanto de tipo salvaxes coma mutantes. A finalidade común é a estandarización das condicións óptimas para o cultivo das súas células, independentemente do xenotipo de orixe.

Avaliáronse distintas condicións de disgregación celular, empregando enzimas proteolíticas como tripsina e pronasa, e empregouse medio de cultivo L-15, suplementado con distintas concentracións

de FBS, e baixo diferentes formas de esterilización. Tamén, foi explorada a transformación vírica con retrovirus SnRV como estratexia de inmortalización. Leváronse a cabo ensaios de cultivo celular a partir de embrións en estadios de 30% e 50% de epibolia, estadio de xema e fase faringular Prim-5, co obxectivo de preservar a súa viabilidade celular, evitando o desenvolvemento de embrións ata etapas máis avanzadas e, deste xeito, reducindo o uso de animais na experimentación. Asemade, iniciáronse ensaios para o desenvolvemento de liñas celulares derivadas de corazón, intestino, ollos, músculo e cerebro extraídos de peixe cebra adultos, comparando individuos salvaxes e mutantes.

Aínda que se acadou a sementeira inicial e se observaron os primeiros signos de adherencia e viabilidade en algunhas condicións, a maioría dos cultivos non conseguiron manterse de xeito estable a longo prazo. Con todo, este traballo senta as bases metodolóxicas para futuras optimizacións orientadas ao establecemento efectivo de liñas celulares. Este proxecto non só contribúe ao avance do coñecemento en biomedicina, senón que tamén promove un enfoque máis ético e sostible na investigación científica.

Palabras chave: peixe cebra - desenvolvemento embrionario - cultivos celulares - tecidos - adultos

## **ABSTRACT**

The development and characterization of zebrafish cell lines require the establishment of a protocol that facilitates their derivation. Currently, there are few optimized methodologies for this model, despite its growing importance in biomedical and genetic research. This work aims to design a methodology to generate cell cultures from both embryos and adult zebrafish, including wild-type and mutant specimens. The common goal is to standardize the optimal conditions for culturing their cells, regardless of the genotype of origin.

Different conditions for cell dissociation were evaluated, using proteolytic enzymes such as trypsin and pronase and L-15 culture medium was used, supplemented with various concentrations of FBS and under different sterilization methods. Also, viral transformation using SnRV retrovirus was also explored as a strategy for immortalization. Cell culture assays were carried out using embryos at the 30% and 50% epiboly stages, yolk stage, and the pharyngula Prim-5 stage, with the goal of preserving cell viability by avoiding embryo development to more advanced stages and thus reducing the use of animals in experimentation. Likewise, assays were initiated for the development of cell lines derived from the heart, intestine, eyes, muscle, and brain extracted from adult zebrafish, comparing wild-type and mutant individuals.

Although initial seeding was achieved and early signs of adhesion and viability were observed under some conditions, most cultures failed to remain stable in the long term. However, this work lays the methodological groundwork for future optimizations aimed at the effective establishment

of cell lines. This project not only contributes to the advancement of biomedical knowledge but also promotes a more ethical and sustainable approach to scientific research.

Keywords: zebrafish - embryonic development - cell cultures - tissues - adults

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	6
1.1.	Biología del pez cebra .....	6
1.1.1.	Características del pez cebra como modelo experimental.....	6
1.1.2.	Desarrollo embrionario del pez cebra .....	6
1.2.	Biología de las células en cultivo .....	9
1.2.1.	Tipos de cultivos celulares .....	9
1.2.2.	Fases del crecimiento celular .....	9
1.2.3.	Establecimiento y caracterización de líneas celulares.....	11
1.2.3.1.	Proceso de inmortalización mediante transformación vírica .....	12
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	13
3.1.	Mantenimiento de los peces y obtención de embriones .....	13
3.2.	Suplementación de los medios de cultivo para el desarrollo de líneas celulares	14
3.3.	Generación de líneas celulares de embriones de pez cebra.....	14
3.3.1.	Selección de embriones según el estadio embrionario.....	14
3.3.2.	<i>Bleaching</i> .....	15
3.3.3.	Decorionación y disgregación celular de embriones.....	16
3.3.3.1.	Decorionación y disgregación mediante exposición a pronasa.....	16
3.3.3.2.	Decorionación y disgregación mediante exposición a tripsina .....	17
3.3.4.	Recuento en cámara de Neubauer .....	17
3.3.5.	Siembra.....	17
3.3.5.1.	Transformación vírica .....	19
3.4.	Generación de líneas celulares derivadas de órganos de peces cebra adultos salvajes y mutantes.....	19
3.4.1.	Extracción de órganos y disgregación celular .....	19
3.4.2.	Siembra.....	20
3.5.	Análisis de datos.....	20

3.5.1.	Representaciones gráficas .....	20
3.6.	Estimación del número de células por embrión .....	21
4.	RESULTADOS .....	21
4.1.	Evaluación del desarrollo de cultivos celulares embrionarios bajo diferentes condiciones experimentales.....	21
4.1.1.	Condiciones óptimas de viabilidad y establecimiento de células embrionarias	21
4.1.2.	Comparación morfológica y dinámica celular, en estadio de 50% de epibolia, en función del tratamiento enzimático aplicado.....	26
4.1.2.1.	Contaminación, viabilidad y análisis morfológico en función del número de embriones sembrados .....	28
4.1.3.	Evaluación del estadio de yema en el rendimiento del cultivo celular .....	30
4.1.3.1.	Efectos del tratamiento viral sobre la morfología y viabilidad celular en diferentes condiciones de FBS .....	31
4.1.4.	Comportamientos diferenciales en cultivos celulares derivados de embriones en estadios de 30% de epibolia y faringular Prim-5.....	32
4.2.	Evaluación del desarrollo de cultivos celulares derivados de órganos de peces cebra adultos	34
4.2.1.	Efecto del filtrado en líneas derivadas de peces salvajes y mutantes.....	36
4.2.2.	Morfología y contaminación bajo condiciones de 25% de FBS .....	37
5.	DISCUSIÓN.....	38
5.1.	Evaluación de condiciones enzimáticas y medios suplementarios .....	38
5.1.1.	Ajustes técnicos y viabilidad en líneas celulares derivadas de embriones....	40
5.2.	Inmortalización vírica y limitaciones en cultivos embrionarios .....	41
5.3.	Desafíos y estrategias en líneas celulares derivadas de órganos adultos .....	41
5.4.	Hacia líneas celulares homogéneas en pez cebra .....	43
6.	CONCLUSIONES .....	44
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	45

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biología del pez cebra

### 1.1.1. Características del pez cebra como modelo experimental

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleosteo de agua dulce, que habita en ecosistemas de arroyos lentos y aguas poco profundas. Ajusta su ciclo reproductivo en respuesta a los picos en los niveles de agua, lo que demuestra su sensibilidad a los cambios ambientales estacionales. De este modo, si se controlan ciertos factores como el fotoperiodo, la temperatura y la calidad del agua, puede llegar a reproducirse durante todo el año en condiciones de laboratorio (Meyers, 2018).

La secuenciación del genoma del pez cebra ha indicado que al menos el 70% de los genes humanos que codifican proteínas, incluidos los genes asociados a enfermedades, tienen un ortólogo en los peces cebra. Esto sugiere que la mayor parte de la fisiología y las patologías humanas pueden modelarse en esta especie, por lo que ha pasado a considerarse una herramienta fundamental para la investigación científica y farmacológica (Ablain & Zon, 2013; Ge, 2018; Hickman *et al.*, 2017; K. Howe *et al.*, 2013; Meyers, 2018; Santoriello & Zon., 2012).

Además de las distintas aplicaciones que puede tener el pez cebra, durante la última década su utilización ha surgido como un sistema novedoso y atractivo para estudiar la embriogénesis y organogénesis en vertebrados, sobre todo debido a su alta fecundidad, su desarrollo *in vitro*, sus embriones transparentes y su fácil manipulación y mantenimiento (Driever & Rangini, 1993). La susceptibilidad a muchas técnicas de biología celular y molecular, y la facilidad para su manipulación genética, han contribuido a su creciente popularidad dentro del ámbito científico. Sin embargo, los análisis *in vitro* mediante cultivo celular en etapas más tempranas continúan menos avanzados que en otros sistemas vertebrados (Arana *et al.*, 2025).

Desde el punto de vista de la tecnología basada en los cultivos celulares y en comparación con otros organismos modelo, el pez cebra presenta varias ventajas que lo convierten en una alternativa atractiva para los análisis de alto rendimiento (*high-throughput*, del inglés) y para aquellos enfocados en la innovación de nuevas metodologías, fármacos y terapias (Peterson & MacRae, 2012).

### 1.1.2. Desarrollo embrionario del pez cebra

El proceso reproductivo del pez cebra se rige por una serie coordinada de comportamientos y eventos fisiológicos que facilitan una fecundación externa masiva y el inicio rápido del desarrollo embrionario. Las hembras al madurar acumulan numerosos óvulos en su interior, lo que se refleja en su abdomen abultado. La presencia de un macho es esencial para que las hembras desoven (expulsen sus huevos), ya que la ovulación depende de su exposición a feromonas gonadales masculinas (Ge, 2018).

En los peces cebra domesticados, el fotoperiodo influye en el desove, cuya actividad comienza desde la primera exposición a la luz, después de un largo periodo de oscuridad, y se mantiene alrededor de una hora, durante la cual la hembra libera los huevos en lotes de 5 a 20 durante varios encuentros con el macho (Ge, 2018).

Las hembras producen una media de 200 huevos por puesta, siendo capaces de desovar a diario o cada dos y tres días, en condiciones de laboratorio. Estas tienen crías grandes y fáciles de mantener. Se desarrollan rápidamente, de modo que, 24 horas después de la fecundación, el embrión ha formado la mayoría de sus tejidos y órganos primordiales, alcanzando la madurez sexual a las 10-12 semanas posfecundación (Ge, 2018).

En 1995, Kimmel, C.B. y sus colaboradores relatan los estadios del desarrollo embrionario del pez cebra, desde el momento inicial de la fecundación, hasta el final de la etapa larvaria. Así, desde un punto de vista celular, inmediatamente después de la fecundación, se forma el blastodisco, que se corresponde con la capa superficial de células en división, que se eleva por encima del vitelo (sustancia nutritiva dentro del huevo) debido a la presión de división y expansión celular. Por lo que podemos distinguir dos regiones bien diferenciadas dentro del huevo: el polo animal, donde se formarán las estructuras que darán lugar al organismo y es caracterizado por las células en división y, por debajo, el polo vegetal, donde se encuentran los componentes nutritivos que sustentarán la vida del pez en los primeros estadios embrionarios y larvarios.

Seguidamente, se forma el blastodermo, que es el conjunto de células que se forman tras las primeras divisiones del cigoto y se ubican en la parte animal del huevo, sobre el vitelo. Por otro lado, la gastrulación es el proceso de formación de las capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo) que darán lugar a los órganos y tejidos del organismo. En este caso, el primer movimiento celular de la gastrulación de los peces es la epibolia de las células del blastodermo sobre el vitelo (Lepage & Bruce, 2010). De este modo, en la fase inicial de la gastrulación, las células del blastodermo profundo se mueven hacia el exterior para intercalarse con las células más superficiales. Posteriormente, estas últimas se movilizan sobre la superficie del vitelo hasta envolverlo por completo (Peterson & MacRae, 2012).

Después de que las células del blastodermo hayan cubierto aproximadamente la mayoría de la parte vegetal del pez, se produce un engrosamiento en todo el margen del blastodermo en epibolización. Este engrosamiento se denomina anillo germinal y está compuesto por una capa superficial, el epiblasto, y una capa interna, el hipoblasto (Lepage & Bruce, 2010). Podemos ver una representación de los estadios de epibolia al 30 y al 50% en la [Figura 1](#).

Una vez formadas, ambas capas se congregan en el futuro lado dorsal del embrión para formar un engrosamiento localizado, el escudo embrionario (*shield*, del inglés). En el estadio epibólico al 70%, predomina el blastodisco característico de los huevos telolecíticos (con mucho vitelo) donde se forma una fina capa de células en la superficie del vitelo. Estas células poseen un carácter totipotente, lo que les confiere la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares

que forman un organismo completo (Ablain & Zon, 2013). En este momento, cuando las células del endodermo se internalizan y migran, se forma el tubo endodérmico primitivo, que da origen al sistema digestivo.

Al alcanzar el 100% de epibolia (Figura 1), se presenta el estadio de yema (del inglés. *Bud stage*) marcando así el final de la gastrulación y la diferenciación del mesodermo paraxial, el cual marca la formación de los miotomos, que son los precursores del músculo esquelético del pez cebra. Este es un momento clave para el establecimiento del plan corporal básico, donde se organizan los futuros tejidos y órganos a lo largo del eje anteroposterior, iniciando así el periodo de segmentación (Kimmel *et al.*, 1995; Kimmel & Warga, 1987). En esta fase, a las 10 horas posfecundación (hpf), ocurre la especificación del neuroectodermo anterior, que dará origen al tubo neural. A partir de esta región, se evaginan las vesículas ópticas, que hacia las 12-14 hpf entran en contacto con el ectodermo superficial e inducen la formación del cristalino y de todo el globo ocular (Kimmel *et al.*, 1995).

Durante la segmentación, uno de los procesos más destacables es la somitogénesis, donde se forman las somitas: bloques segmentados de mesodermo que aparecen a ambos lados del tubo neural del embrión en formación. Este proceso está regulado por una red de factores de transcripción que controlan el inicio del desarrollo de múltiples órganos. A partir del estadio de 26 somitas formadas, se observa ya la formación del tubo cardíaco primitivo, compuesto por endocardio y miocardio (Kimmel *et al.*, 1995; Kimmel & Warga, 1987; Stainier *et al.*, 1993).

Una vez avanzada la organogénesis, en la fase faringular Prim-5, el embrión presenta entre 30-34 somitas. Los ojos son prominentes gracias a la diferenciación progresiva de las capas retinianas, el cerebro está plenamente formado, en consecuencia de la diferenciación de las vesículas encefálicas primarias. También, se aprecian estructuras como la línea lateral primitiva y los arcos branquiales en formación (Figura 1). En esta fase, el corazón comienza a latir y se observa el inicio de la circulación sanguínea. La formación completa del corazón, con su composición de aurículas y ventrículos, culmina luego de las 48 hpf (Kimmel *et al.*, 1995).

El final del desarrollo embrionario del pez cebra ocurre alrededor de las 72 hpf, momento en el cual el embrión ha completado la mayor parte de la organogénesis y eclosiona del corion, dando paso al estadio de larva libre. Esta etapa se extiende hasta los 5 días posfecundación (dpf), cuando el organismo transiciona de un estado de desarrollo dependiente a uno autónomo, capaz de interactuar activamente con su entorno. Esta capacidad se debe al crecimiento y maduración de los músculos, que permiten su locomoción activa (Kimmel *et al.*, 1995).

## **1.2. Biología de las células en cultivo**

### **1.2.1. Tipos de cultivos celulares**

Durante las dos últimas décadas, los cultivos celulares han sido una herramienta esencial para la investigación científica, ya que han permitido estudiar el comportamiento celular de múltiples formas, adaptándolos a condiciones específicas y controlables (Freshney, 2015).

Hay varios tipos de cultivos celulares que se clasifican según el tipo de material biológico de partida. Entre ellos destacan los cultivos de órganos, en los que se extrae el órgano completo del organismo y se cultiva colocándolo encima de un soporte adecuado que mantiene su arquitectura tridimensional. Por otro lado, los cultivos a partir de explantes primarios se obtienen de fragmentos de tejidos u órganos, que se cultivan en condiciones adecuadas que permiten la proliferación celular a partir de estos trozos de tejido (Huang *et al.*, 2012).

El cultivo de células disgregadas se caracteriza por estar constituido por células aisladas procedentes de un organismo. Es el modelo de cultivo más ampliamente utilizado por su capacidad de propagación. Estas células son dependientes de anclaje, presentan inhibición por contacto y detienen su proliferación al alcanzar una densidad confluyente (Fan *et al.*, 2004). Este tipo de cultivo se considera primario hasta que se realiza el primer pase o subcultivo, momento en el que pasa a denominarse cultivo secundario (Sassen *et al.*, 2017).

La mayoría de las células primarias no tienen una larga vida en cultivo, por lo que su viabilidad se mantiene durante un periodo de pocos días o incluso horas, como es el caso de los cultivos hepáticos (Orr *et al.*, 1973; Zeilinger *et al.*, 2016). Mientras permanecen *in vitro*, las células primarias tienden a perder capacidad de diferenciación, tienen una vida corta y pueden cambiar de fenotipo (Sriila *et al.*, 2024). No obstante, entre sus principales ventajas destaca el mantenimiento de la integridad de las células en cuanto a su análisis con el medio extracelular y sus relaciones célula-célula, lo que permite realizar una serie de estudios aplicables a los diversos mecanismos bioquímicos y de biología molecular (Bilodeau, 2024).

A diferencia de los cultivos primarios, las líneas celulares continuas o establecidas son cultivos celulares que pueden crecer indefinidamente. Estas líneas, también denominadas células inmortales o inmortalizadas, se originan a partir de cultivos primarios que han sufrido una transformación genética, que provoca un cambio en su genotipo, por lo que pasan a presentar un crecimiento indefinido en el tiempo. Este proceso se puede dar de forma espontánea o inducida, ya sea mediante la utilización de infecciones víricas (Yeh *et al.*, 2025), por transferencia de ADN modificado genéticamente (Bodnar *et al.*, 1998), entre otras formas.

### **1.2.2. Fases del crecimiento celular**

Inicialmente, las células de los cultivos primarios tienden a conservar la morfología celular del órgano de procedencia. Por ejemplo, un cultivo primario de tejido muscular presentará células con características similares a las del músculo original. Sin embargo, a medida que las células se

adaptan al crecimiento *in vitro*, pueden experimentar cambios morfológicos (Sun *et al.*, 1995). En general, el crecimiento de las células en cultivo sigue una serie de fases que permiten su adaptación progresiva a las condiciones *in vitro*. Primeramente, ocurre la fase estacionaria o de latencia, que suele durar 24 horas. Es una fase de adaptación a las condiciones de cultivo y en ella no aumenta el número de células (no hay proliferación celular), incluso puede haber pérdida de viabilidad. En esta fase, las células se adhieren completamente al sustrato (Ghosh & Collodi, 1994).

A continuación, tiene lugar la fase exponencial o logarítmica de crecimiento, caracterizada por la proliferación activa en la que el número de células se duplica periódicamente. Durante esta etapa, la división celular ocurre mediante mitosis hasta alcanzar la densidad de saturación, punto en el cual la proliferación se detiene (Ghosh & Collodi, 1994).

Una vez alcanzada esta densidad máxima, las células entran en una fase estacionaria o de meseta, donde cambian fenotípica y morfológicamente. En esta etapa, el metabolismo celular se altera significativamente y las células se vuelven extremadamente sensibles, lo que puede conducir a la activación de mecanismos de apoptosis o muerte celular programada (Ghosh & Collodi, 1994). La apoptosis inducida por alteraciones moleculares constituye un proceso regulado, a diferencia de la muerte celular ocasionada de manera accidental, ya sea por daño mecánico inducido o alteraciones abruptas en el medio de cultivo (Peng *et al.*, 2022).

A partir de este momento, empieza a descender el número de células viables. La muerte celular que se produce en esta etapa no siempre se debe a una inhibición por contacto ni a la escasez de nutrientes, sino puede estar asociada a la evolución natural del cultivo y al acortamiento progresivo de los telómeros. En el caso de las células no inmortalizadas, este deterioro conduce a un fenómeno conocido como senescencia celular, caracterizado por el envejecimiento intrínseco de las células, se da con los pases sucesivos y con los cambios fenotípicos. Con el tiempo, las líneas celulares pueden perder su capacidad de división o, en algunos casos, adquirir la habilidad de dividirse indefinidamente, es decir inmortalizarse (Ghosh & Collodi, 1994).

Es importante destacar que no todas las células de un cultivo proliferan de manera sincrónica (Matthews *et al.*, 2022). Además, la salida del ciclo celular está regulada por un punto de control celular clave, el encargado de revisar el daño en el ADN. Si estos daños resultan irreparables, la célula puede entrar en senescencia o activar vías apoptóticas (Chen, 2016; Matthews *et al.*, 2022; Zilfou & Lowe, 2009).

En este contexto, las líneas celulares de pez cebra se han convertido en herramientas importantes para diversos estudios biológicos. Así, pueden emplearse para investigar la regulación transcripcional de los genes (He *et al.*, 2006); para comprobar si las células son susceptibles a la infección de virus (por ejemplo, para desarrollar esquemas de mutagénesis insercional en pez cebra) (Jin *et al.*, 2017); o como células alimentadoras para establecer el cultivo de tipos celulares más exigentes (Driever & Rangini, 1993). Por ello, resulta fundamental establecer protocolos

adecuados que garanticen un óptimo asentamiento y mantenimiento de sus células derivadas en cultivos *in vitro*.

### 1.2.3. Establecimiento y caracterización de líneas celulares

Desde el punto de vista del ciclo celular, para que haya una división celular, primeramente, la célula replica su material genético durante la interfase en el periodo de la fase S (fase de síntesis). En la fase G<sub>2</sub>, ocurre la segregación cromosómica que permite la entrada definitiva al desarrollo de la mitosis (Matthews *et al.*, 2022). Para dividirse según lo estipulado en la mecánica que llevan del ciclo celular de una célula normal, las células en cultivo necesitan una serie de nutrientes y factores que, hasta que no estén presentes, la célula no entrará en periodo de mitosis para su división.

Para obtener células individuales a partir de tejido, se emplean métodos de disociación tanto enzimáticos como mecánicos. Estos son importantes a la hora de formalizar el asentamiento de un cultivo primario (Helmrich & Barnes, 1998). Entre ellos vamos a destacar el uso de las enzimas proteolíticas como la tripsina y la pronasa.

La tripsina es una proteasa sérica utilizada ampliamente en los protocolos de cultivos celulares gracias a su capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo de la arginina o lisina y el grupo amino de otro aminoácido. Esta actividad permite disgregar las células adheridas por proteínas de la matriz extracelular tanto del soporte como de ellas mismas unas con otras (Strober, 1997).

La pronasa es una mezcla de enzimas proteolíticas derivadas de *Streptomyces griseus*, capaz de remover el corion de los peces cebras gracias a sus acciones nucleasas, proteasas y de degradación de glucoproteínas. Esta eliminación facilita la manipulación del contenido celular del embrión íntegro (Geyer *et al.*, 2023; Hasegawa *et al.*, 2023; Helmrich & Barnes, 1998; Vallone *et al.*, 2007).

Una vez obtenida la disgregación celular a través de la acción enzimática, se procede a la disgregación mecánica para la extracción del mayor número de células posibles. Esta puede ser de dos formas, principalmente, por raspado o por resuspensión. Por último, las células obtenidas se siembran en soportes especiales para el cultivo celular como matraces T25 o placas de 96 y 24 pocillos, entre otros (Baust *et al.*, 2017).

Las células de pez cebras deben incubarse a una menor temperatura que las de mamífero, cuestión que se debe tener en cuenta al trabajar con cultivos celulares derivados de peces (Arana *et al.*, 2025). Por ende, es necesario ajustar las condiciones a sus rangos óptimos de temperatura para garantizar una correcta implantación, proliferación y mantenimiento de los cultivos. El objetivo principal es recrear, lo más aproximadamente posible, las condiciones naturales en las que se encuentran estos animales y, así, poder asegurar una investigación exitosa en dicha especie de trabajo (Nishizawa *et al.*, 2008).

En cuanto a la caracterización de una línea celular, esta nos permite analizar el comportamiento *in vitro* y establecer correlaciones con el tejido del que proviene. Este análisis es fundamental para evaluar la estabilidad genética y fenotípica de las células, así como su respuesta frente a distintos factores, incluidos contaminantes o condiciones de estrés. Además, facilita la identificación y desarrollo de nuevas líneas celulares con potencial impacto biomédico (Driever & Rangini, 1993). Dichos análisis pueden realizarse mediante estudios morfológicos, a través de la visualización con microscopía óptica, por ejemplo.

El método más utilizado para el almacenamiento de cultivos celulares es la criopreservación, cuyo objetivo principal es preservar la viabilidad y estructura celular usando bajas temperaturas. Para ello, se emplean agentes crioprotectores, como el dimetilsulfóxido (DMSO, del inglés *Dimethyl Sulfoxide*), que favorecen la deshidratación celular a nivel intracelular, al sustituir el agua que sale de la célula. Esto ayuda a minimizar el gradiente osmótico entre el interior y el exterior celular, reduciendo así el riesgo de formación de cristales y hielo, uno de los principales factores responsables de la muerte celular durante la congelación. Se pueden congelar en nitrógeno líquido (fase vapor) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante varios días, incluso meses (Baust *et al.*, 2017).

#### **1.2.3.1. Proceso de immortalización mediante transformación vírica**

Las líneas celulares immortalizadas pueden conseguirse a través del empleo de diversas técnicas, entre ellas, la aplicación de virus que desarrollen un mecanismo de acción capaz de estimular el ciclo celular, evadir de la apoptosis y la senescencia, y favorecer la acumulación de factores de crecimiento. Estos factores permiten la generación de señales que facilitan la reproducción y replicación celular, lo que conduce a una multiplicación celular continua (Linder & Marshall, 1990).

La immortalización celular mediante virus, especialmente utilizando retrovirus, permite que estos se integren en el material genético de la célula. Una vez integrados, estos inducen la expresión de proteínas que favorecen la reproducción celular, facilitando así su propia replicación (Pistello & Antonelli, 2016). En el presente trabajo, se ha seleccionado el retrovirus SnRV para llevar a cabo la transformación vírica.

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) el SnRV pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Orthoretrovirinae*. Como retrovirus, su mecanismo de acción implica la inserción de su material genético en el ADN de las células para modificar su expresión proteica. Este proceso puede derivar en la sobreexpresión de genes asociados a la proliferación celular, la activación de vías de señalización mitogénicas o la inhibición de mecanismos de muerte celular programada (Yeh *et al.*, 2025).

El SnRV fue originalmente identificado en cultivos celulares de peces teleósteos en Asia, y más tarde se detectó en varias líneas celulares europeas derivadas de especies marinas, incluidas DLB-1, SAF-1 o SSN-1, mostrando un amplio tropismo en células de órganos como cerebro, riñón

y gónadas (Morcillo *et al.*,2017; Ruiz-Palacios *et al.*, 2020). Su capacidad para integrarse en el genoma de células teleósteas lo convierte en una herramienta útil para inducir proliferación continua. Aunque su mecanismo molecular exacto no se ha dilucidado completamente, se ha propuesto que su actividad se relaciona con la alteración de genes reguladores del ciclo celular y la replicación intracelular viral persistente en cultivos, sin necesariamente inducir citopatogenicidad aparente (Morcillo *et al.*,2017). Estas características han motivado su uso en protocolos de inmortalización de líneas celulares de peces con fines experimentales y biotecnológicos.

## **2. OBJETIVOS**

La principal finalidad de este trabajo es el desarrollo y la caracterización de líneas celulares de pez cebra en estadios embrionarios y tejidos adultos, tanto de ejemplares salvajes como mutantes, con el fin de que puedan ser utilizadas en futuras investigaciones bioquímicas y moleculares.

A continuación, se presentan detallados los objetivos del presente trabajo:

1. Establecer un protocolo experimental que defina los medios de cultivo y las condiciones definitivas para la obtención y mantenimiento de líneas celulares derivadas de embriones y órganos de pez cebra, tanto de tipo salvajes como mutantes, a través de un análisis comparativo de distintas condiciones de cultivo.
2. Estudiar y optimizar la técnica de inmortalización de células mediante infección con el retrovirus SnRV, evaluando su eficiencia y reproducibilidad.
3. Verificar el crecimiento y expansión de las células inmortalizadas, asegurando que presenten características de proliferación indefinida y estabilidad fenotípica a lo largo del tiempo.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Mantenimiento de los peces y obtención de embriones**

Los peces cebra utilizados en este estudio se encuentran alojados en el animalario del Centro de Biomedicina y Veterinaria (CEBIOVET), ubicado en Lugo, en un sistema de peceras con renovación continua de agua mediante un circuito cerrado de ósmosis inversa. Se mantuvieron en condiciones estables, con una temperatura de 28 °C, un pH de 7 y una conductividad de 800 µS. Entre los ejemplares utilizados se incluyeron líneas salvajes y mutantes para el gen *mtres1*, generada mediante tecnología CRISPR/Cas9 por el grupo ZebraBoRes del Campus Terra de Lugo. Todos los procedimientos realizados se han llevado a cabo siguiendo lo estipulado en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la

protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Para la obtención de huevos, la noche anterior al inicio del experimento, el personal capacitado colocó machos y hembras separadas físicamente, en peceras especiales de puesta (parideras). Al día siguiente, se retiró el separador, de forma que el contacto y el aporte lumínico estimula su actividad reproductiva. Seguidamente, se comprobó si había habido puesta, se recolectaron los huevos y se transfirieron a placas Petri grandes con agua de ósmosis inversa autoclavada. Por último, los huevos se incubaron a 28°C sin CO<sub>2</sub> hasta su utilización para fines científicos.

El presente Real Decreto, dictado para la protección animal, hace referencia a la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y se aplica a todos los animales vertebrados no humanos vivos, incluidos las larvas autónomas para su alimentación. En el caso del pez cebra, este umbral se sitúa en torno a los 5 dpf, momento en el que las larvas dejan de depender del vitelo como única fuente de nutrición. Por tanto, hasta los 5 dpf, las manipulaciones con fines científicos pueden ser realizadas por personal sin necesidad de acreditación formal para experimentación animal. A partir de ese estadio del desarrollo, todos los procedimientos fueron realizados por personal capacitado con la titulación correspondiente para fines de experimentación.

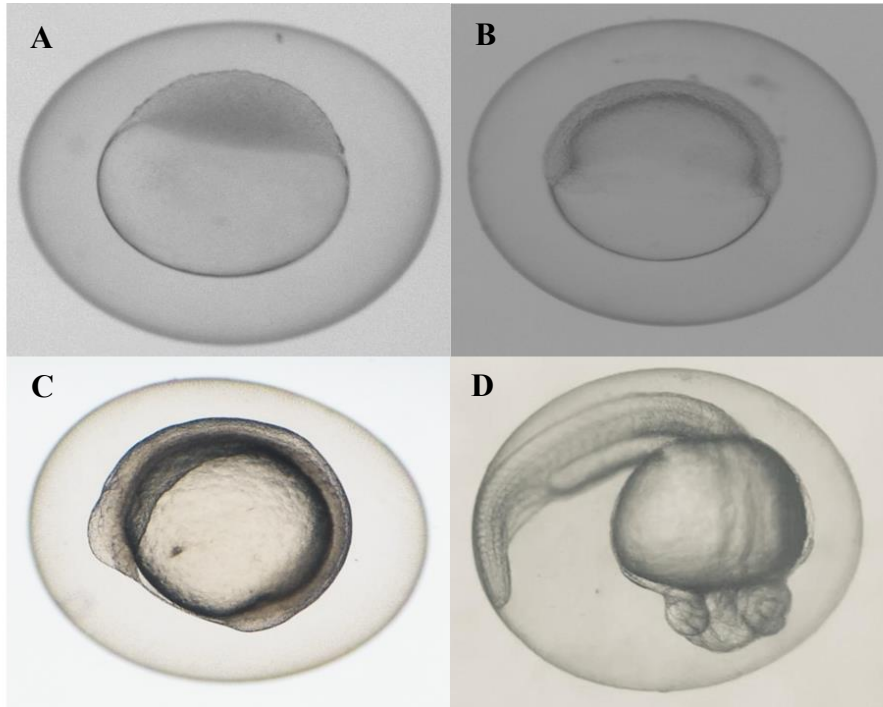
### **3.2. Suplementación de los medios de cultivo para el desarrollo de líneas celulares**

Con el fin de realizar la suplementación de los medios de cultivo para el desarrollo de las líneas celulares, en tubos Falcon™ de 50 ml se añadió medio de cultivo Leibovitz L-15 (Gibco) con diversos porcentajes de Suero Fetal Bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) (Gibco) según el estadio embrionario a estudiar (Tabla 1). Además, se adicionó 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) (Gibco) y anfotericina B a 0,25 µg/ml (Gibco). También, se tuvo en cuenta el porcentaje considerado de inoculación con retrovirus SnRV en una proporción de medio de cultivo L-15 y medio con virus de 10:1 para los ensayos de inmortalización y transformación vírica.

### **3.3. Generación de líneas celulares de embriones de pez cebra**

#### **3.3.1. Selección de embriones según el estadio embrionario**

Para la generación de líneas celulares de embriones de pez cebra, se seleccionaron huevos que mostraban signos morfológicos compatibles con una fecundación exitosa, identificados por la correcta formación de su blastodisco. Por el contrario, los huevos no fecundados, identificados por signos de transparencia en su polo animal, fueron descartados. En este caso, el protocolo se realizó en cuatro estadios embrionarios del desarrollo temprano: 30% y 50% de epibolia, estadio de yema y fase faringular Prim-5 (Figura 1).



**Figura 1.** A. 30% epibolia a las 4,70 hpf. B. 50% epibolia a las 5,25 hpf. C. Yema (*bud stage*) a las 10,00 hpf. D. Fase faringular Prim-5 a las 24,00 hpf.

Imágenes capturadas con un microscopio AZ100 Multizoom de Nikon con el objetivo de 3x.

### 3.3.2. *Bleaching*

Los huevos de pez cebra se lavaron con lejía, técnica conocida como *bleaching* (del inglés), con el objetivo de mantener bajo el número de microorganismos y parásitos. Para ello, en una placa de 6 pocillos, se añadieron en los tres superiores una solución de hipoclorito sódico al 0,033% y en los tres inferiores una disolución al 1x de tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS, del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffer*) sin cloruro cálcico ni cloruro de magnesio (Gibco). Para los ensayos en estadios embrionarios al 30% de epibolia y yema, se prepararon disoluciones que cubrieran hasta llegar al borde de los pocillos, mientras que, en los ensayos en fase faringular Prim-5 y al 50% de epibolia, solo se llenaron hasta la mitad.

Luego, se colocaron los embriones en un colador de células Corning® de 40  $\mu\text{m}$  y se transfirieron los huevos en el colador al primer pocillo que contenía la solución de hipoclorito sódico al 0,033%, quedando sumergidos durante 5 minutos. Posteriormente, se pasaron a la solución de DPBS y se dejaron sumergidos otros 5 minutos. Este procedimiento de inmersión y lavado se repitió de forma alterna entre las soluciones de hipoclorito y DPBS, siguiendo los intervalos establecidos, hasta completar el último paso en la disolución de DPBS. Asimismo, en las líneas en estadio de fase faringular Prim-5, se realizaron intervalos entre lavados sólo de 3 minutos.

### 3.3.3. Decorionación y disgregación celular de embriones

Después de la realización del *bleaching*, la disgregación de los huevos para la obtención celular se realizó mediante el empleo de enzimas específicas que ayudaron no solo a la disociación celular, sino también a debilitar o eliminar parcialmente el corion. En este caso, se emplearon Tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,25%, Gibco) y pronasa (Promega) a 0,25 mg/ml como enzimas estratégicas que facilitan el proceso de disgregación. Este procedimiento se acompañó de métodos mecánicos utilizando pipeteo repetido.

En el caso de la tripsina, debido a su mayor agresividad, los embriones fueron expuestos a la enzima durante un tiempo controlado y posteriormente disgregados mecánicamente. En cambio, con la pronasa, tras la eliminación completa del corión, los embriones decorionados fueron recuperados y sometidos a disgregación mecánica, lo que permitió trabajar con una suspensión celular limpia de restos de corion. A continuación, se detallan ambos procedimientos por separado.

#### 3.3.3.1. Decorionación y disgregación mediante exposición a pronasa

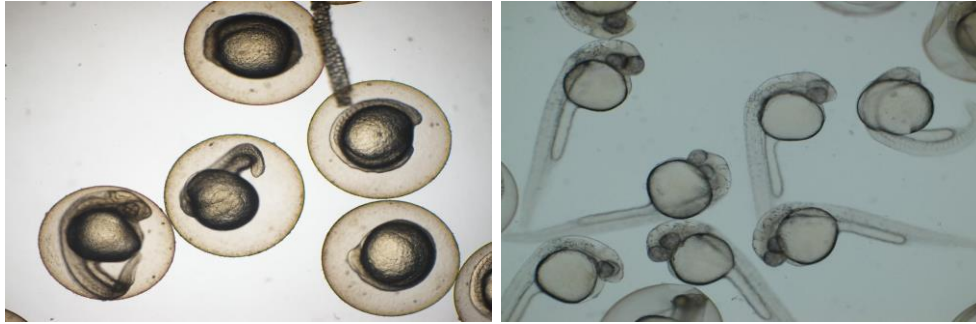
Con el objetivo de remover el corion de los huevos, por cuestiones higiénicas y para quedarnos únicamente con el entorno celular en desarrollo, se preparó una dilución 1:3 de pronasa en DPBS. Luego, para las líneas celulares derivadas de embriones de pez cebra en estadio de 50% de epibolia y yema, se calentó previamente la dilución de pronasa a 37 °C en estufa de calor seco para mejorar la actividad catalítica de la enzima.

Excepto en los cultivos derivados de embriones en estadio de yema, en los que se utilizaron placas Petri de vidrio, el proceso de decorionación se llevó a cabo en placas Petri de plástico de 90 mm. Una vez transferidos a la placa, se removió cualquier residuo de DPBS con ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación, se añadió la solución preparada de pronasa hasta cubrir completamente los embriones. Las placas se taparon y se colocaron en una cámara oscura con agitación durante 5 minutos.

Durante este proceso, es fundamental mantener las placas bien tapadas para evitar la entrada de cualquier contaminante durante la manipulación. Transcurrido el tiempo de exposición a la pronasa, se realizaron 3 lavados con DPBS, con intervalos de agitación de 5 minutos. El número de lavados fue variable, ya que dependió, por un lado, del número de huevos con los que se trabajó y, por otro, de si se decorionaron de manera progresiva. Por último, se retiraron los huevos coagulados y se seleccionaron únicamente los decorionados (Figura 2), a los cuales se les retiró el DPBS y se les añadió medio de cultivo para su posterior selección.

En este caso, se realizaron ensayos de líneas celulares de 1, 2, 3, 4 y 5 huevos por pocillo. Se seleccionaron los huevos directamente con 150 µl del medio de cultivo, y se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 ml para facilitar su disgregación mecánica por pipeteo. Por otro lado, para la creación de líneas celulares en matraces T25, se cogió un lote de huevos de entre 10 y 100

unidades y se transfirieron a un tubo Falcon™ de 50 ml. La disgregación de los huevos en los tubos se llevó a cabo a través de técnicas de disgregación por pipeteo.



**Figura 2.** Huevos con corion (izquierda) y decorionados (derecha) gracias a la acción de la pronasa.

### 3.3.3.2. Decorionación y disgregación mediante exposición a tripsina

En el caso de la disgregación mediante tripsina, tras el *bleaching* se seleccionaron huevos del último pocillo con DPBS, se retiró por completo el tampón, y se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 ml con 100  $\mu$ l de tripsina-EDTA para la creación de líneas celulares de 1, 2, 3, 4 o 5 huevos por pocillo.

Por otro lado, para la creación de líneas celulares en matraces T25, se cogió un lote de huevos de entre 10 y 100 unidades y se transfirieron a un tubo Falcon™ de 50 ml. Finalmente, los huevos se incubaron durante 10 minutos a 34°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo la disgregación de los huevos con el corion, aplastándolo contra el tubo y por pipeteo.

### 3.3.4. Recuento en cámara de Neubauer

De la disgregación celular descrita anteriormente, se tomaron 10  $\mu$ l, se transfirieron a una cámara de Neubauer y se procedió al recuento de células al microscopio en los cuatro cuadrantes grandes, y a partir de estos valores, se calculó el número de células derivadas de un solo embrión, siguiendo la fórmula (1).

$$\text{Recuento celular} = \frac{\text{Número de células viables} \times \text{factor de dilución}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.3.5. Siembra

Para la preparación de las líneas celulares, en placas de 24 y 96 pocillos y matraces T25, se añadió el volumen de medio de cultivo correspondiente para facilitar la siembra y el asentamiento de las células, siguiendo los estadios embrionarios estipulados y los medios de cultivo considerados en la [Tabla 1](#).

**Tabla 1. Resumen de los estadios del desarrollo del pez cebra utilizados y el medio de cultivo correspondiente.**

Estadio	hpf	Medio de cultivo
30% epibolia	4,70	L-15 con 20% de FBS
50% epibolia	5,25	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L-15 con 20% de FBS</li> <li>2. L-15 con 25% de FBS</li> <li>3. L-15 con 25% de FBS + SnRV (VIRUS)</li> <li>4. L-15 con 30% de FBS + 2% de penicilina/estreptomicina (200 U/mL de penicilina y 200 µg/mL de estreptomicina)</li> </ol>
Yema ( <i>bud stage</i> )	10,00	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L-15 con 10% de FBS</li> <li>2. L-15 con 20% de FBS</li> <li>3. L-15 con 10% de FBS + SnRV (VIRUS)</li> <li>4. L-15 con 20% de FBS + SnRV (VIRUS)</li> </ol>
Fase faringular Prim-5	24,00	L-15 con 20% de FBS

Para la siembra en los casos que así se indica, la suspensión celular obtenida se filtró mediante coladores antes de su siembra en placas o matraces de cultivo. Se utilizaron coladores de células pluriStrainer Mini de 40 µm para la siembra en placas de 24 y 96 pocillos o coladores de células Corning® de 40 µm para los matraces T25. Se etiquetaron y se mantuvieron los cultivos celulares en una incubadora sin CO<sub>2</sub> a 30 °C en condiciones de protección contra la luz para promover la adherencia y la proliferación durante los días de cultivo correspondientes.

Los cultivos celulares se monitorizaron diariamente para ir controlando la presencia de contaminación, falta de nutrientes o aparición de colonias celulares. En base a los cambios fenotípicos observados, se tomaron decisiones específicas sobre la manipulación del cultivo, como modificaciones en la composición del medio, realización de una o dos rondas de lavado, o prolongación del tiempo de incubación. La observación de los cultivos se llevó a cabo mediante un microscopio invertido AZ100 Multizoom de Nikon (a menos que se indique lo contrario), herramienta fundamental para la caracterización morfológica de las líneas celulares. A través de la microscopía se evaluó la presencia, distribución y evolución de las células a lo largo del periodo de cultivo.

Así, se realizó un doble lavado con DPBS cada dos días, según se vio conveniente. Para ello, se extrajo el medio de cultivo de las placas y matraces. Luego, se añadió DPBS y se retiró el

contenido residual. Seguidamente, se incorporó medio de cultivo fresco, se etiquetó la línea y se examinó la presencia de contenido celular al microscopio. Finalmente, los cultivos fueron devueltos a incubación bajo condiciones controladas.

Para el establecimiento del cultivo de las células derivadas de los embriones en el estadio de yema y tratadas con pronasa, a las 24 horas después de la siembra, se les realizó un traspaso del contenido en suspensión de la placa inicial a una nueva. A las células de placa restante, se adicionó medio de cultivo fresco y se volvieron a incubar en las mismas condiciones.

A las líneas celulares implantadas en el estadio de 50% de epibolia y que estaban previamente cultivadas en medio de cultivo Leibovitz L-15 con 25% de FBS, a los 7 días pos-siembra (dps), se les realizó un cambio de medio de cultivo a uno con 30% de FBS y 2% de penicilina/estreptomicina (200 U/mL de penicilina y 200 µg/mL de estreptomicina). No obstante, 24 horas después, se les cambió el medio de cultivo a su composición inicial de 25% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina.

#### **3.3.5.1. Transformación vírica**

Para llevar a cabo la transformación vírica, se trabajó con dos estadios embrionarios distintos: el estadio de 50% de epibolia y el estadio de yema (*bud stage*). El virus SnRV fue obtenido mediante el filtrado del sobrenadante de cultivos celulares de la línea DLB-1 (*Dicentrarchus labrax Brain 1*), derivados de encéfalo de lubina previamente infectados, proporcionados por el Dr. Alberto Cuesta (Grupo Fish Innate Immune System, Universidad de Murcia). El sobrenadante se filtró utilizando filtros estériles de 0,22 µm para eliminar restos celulares y conservar exclusivamente las partículas virales activas.

En los casos en los que así se indica, se incorporó la carga viral al medio de cultivo en una proporción de 1:10 (sobrenadante viral:medio fresco), tanto en el momento inicial como tras sucesivos pases celulares, con el objetivo de favorecer la integración del retrovirus y seleccionar eficazmente poblaciones inmortalizadas. Esta estrategia se aplicó tras alcanzar la confluencia celular deseada y realizar el correspondiente pase, empleando medios de cultivo suplementados con suero fetal bovino y antibióticos. En esos casos, se dejaron placas o pocillos sin virus como control negativo.

### **3.4. Generación de líneas celulares derivadas de órganos de peces cebras adultos salvajes y mutantes**

#### **3.4.1. Extracción de órganos y disgregación celular**

Para el trabajo con células de peces cebras adultos, primeramente, se procedió a la extracción secuencial de los órganos, concretamente corazón, ojos, cerebro, intestino y músculo (siguiendo exactamente ese orden de extracción). Las condiciones de esterilidad se garantizaron limpiando la poyata y todo el material de trabajo con etanol, y creando un entorno estéril utilizando dos mecheros Bunsen a cada lado de la lupa. Al extraer los órganos, estos se sumergieron en DPBS y se aislaron

en medio de cultivo L-15 con 20% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). Además, se llevaron a cabo ensayos utilizando medio de cultivo L-15 con 25% de FBS y el mismo porcentaje de suplemento antibiótico.

Luego, los órganos se sumergieron en tubos de microcentrífuga estériles con tripsina y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Se realizaron tres réplicas de cada órgano con individuos tanto salvajes como mutantes. Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo la disgregación de los órganos a través de técnicas de disgregación mecánica por pipeteo.

### 3.4.2. Siembra

En placas de 24 pocillos, se sembró una mezcla compuesta por medio de cultivo y la suspensión celular obtenida tras la disgregación con tripsina, en una proporción 5:2. En algunos casos, antes de la siembra, la disgregación celular fue filtrada en coladores de células Corning® de 40 µm. Posteriormente, se incubaron a 30 °C, sin CO<sub>2</sub> y protegidas de la luz. El resto de la disgregación celular no utilizada para la siembra se destinó a criopreservación. Para ello, se añadió DMSO al 10%, con el objetivo de preservar la viabilidad celular a bajas temperaturas durante varios días.

A las 24 horas pos-siembra (hps), se recogió el medio de cultivo de cada placa con el objetivo de recuperar posibles células viables no adheridas. Este contenido fue transferido a nuevas placas para favorecer su posible adhesión. En los pocillos originales se añadió medio de cultivo fresco para continuar con el mantenimiento celular. Cada dos días, y según se considerara necesario, se realizaron dos lavados con DPBS, seguidos de la incorporación de nuevo medio antes de devolver a incubación.

Conforme avanzaron los días del cultivo bajo una misma condición experimental, se realizó un recuento del número de pocillos que presentaron células viables y aquellos que no. Esto permitió calcular el porcentaje de asentamiento de la línea celular en función del número de pocillos que dejaron de contener células respecto al número inicial al comienzo del cultivo. De este modo, se calculó el porcentaje de asentamiento de cada línea celular en un momento dado, en relación con los pocillos de partida. Este procedimiento quedó reflejado en la fórmula (2). Esta metodología permitió cuantificar el grado de asentamiento celular a un tiempo determinado tras la siembra (a las x hps).

$$\text{Porcentaje de asentamiento} = \frac{\text{Número de pocillos con células a las } x \text{ hps}}{\text{Número inicial total de pocillos con la línea celular}} \times 100 \quad (2)$$

## 3.5. Análisis de datos

### 3.5.1. Representaciones gráficas

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el entorno de programación R y los paquetes *readxl*, *dplyr*, *janitor* y *ggplot2*. Se importaron los datos desde hojas de cálculo, se limpiaron los nombres de las columnas y se convirtieron a formato numérico las variables de interés, incluyendo

el número de pocillos con y sin células, el porcentaje de asentimiento de la placa y los días de viabilidad. Cada matraz se consideró equivalente a un pocillo para poder llevar a cabo la representación y análisis de los datos, con el objetivo de mantener su consistencia metodológica. Esto implicó que, para el análisis poblacional del asentimiento celular correspondiente a un matraz individual, se partió de una muestra inicial  $n=1$ .

Para el análisis, se agruparon los datos según el origen de las muestras (mutantes o salvajes) y las condiciones experimentales específicas, y se calculó la media de cada variable por grupo. Esta organización permitió comparar el comportamiento celular bajo diferentes tratamientos y tipos de tejido, manteniendo la distinción entre líneas celulares de distinto origen genético. La representación gráfica se realizó mediante diagramas de barras, lo que permitió visualizar comparativamente el número de pocillos con y sin células, el porcentaje medio de asentimiento y la media de días de viabilidad en cada condición.

### **3.6. Estimación del número de células por embrión**

Para estimar el número de células derivadas de un embrión, se emplearon dos metodologías complementarias. La primera consistió en un recuento manual en cámara de Neubauer al microscopio, en cuatro cuadrantes distintos. A partir del número de células contabilizadas por cuadrantes y su suma total, y aplicando la fórmula (1), se obtiene un valor estimado de la concentración celular en células/ml derivadas de un solo embrión.

Por otro lado, la segunda metodología se basó en una comparación con datos previamente publicados por Kimmel *et al.* (1995), quienes estimaron el número de células por embrión en los distintos estadios embrionarios (Tabla 2). A partir de esos valores, se calculó la concentración celular en células/ml, considerando el volumen con el que disgregamos los embriones (0,3 ml) y lo ajustamos teniendo en cuenta que, al mezclarlo con 0,5 ml de medio de cultivo, el volumen final fue de 0,8 ml. Por ende, multiplicamos un factor de dilución de 2,67 para obtener la concentración final de células por mililitro que hay en un pocillo de una placa de 24. A continuación, se representa la fórmula empleada (3).

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células estimado por estadio embrionario}}{\text{volumen de disgregación (ml)}} \times \text{factor de dilución} \quad (3)$$

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Evaluación del desarrollo de cultivos celulares embrionarios bajo diferentes condiciones experimentales**

#### **4.1.1. Condiciones óptimas de viabilidad y establecimiento de células embrionarias**

Para identificar las condiciones más adecuadas para el cultivo de células embrionarias de pez cebra, se evaluaron distintos factores como el estadio de desarrollo, el método de disgregación,

la composición del medio de cultivo y el tipo de soporte. Para empezar, uno de los indicadores utilizados fue la concentración celular estimada por embrión, calculada por recuento manual o a partir de datos bibliográficos.

En cuanto al recuento manual, en los cultivos derivados de embriones en estadio faringular Prim-5, el recuento del número de células obtenidas a partir de un único embrión reveló una densidad celular baja, con un total de 334 células distribuidas en los cuatro cuadrantes analizados. A partir del número de células contabilizadas por cuadrantes y su suma total, y aplicando la fórmula (1), se obtuvo un valor estimado de  $1,25 \times 10^5$  células/ml derivadas de un solo embrión a las 24 hpf.

Por otro lado, la [Tabla 2](#) muestra el número aproximado de células por embrión y la concentración celular estimada (células/ml) para cada estadio analizado. Como puede observarse, el número de células recuperadas aumenta con el avance del desarrollo embrionario, pasando de 2000 células estimadas, en el estadio de 30% de epibolia, con una concentración de  $1,78 \times 10^4$  células/ml a 12000 en fase faringular Prim-5 con una concentración de  $1,07 \times 10^5$  células/ml partiendo de los datos bibliográficos.

Cabe destacar que ambas metodologías empleadas arrojaron resultados similares, lo que permite considerarlas correlacionables y complementarias para la estimación celular en suspensiones derivadas de embriones de pez cebra. En conjunto, estos datos evidencian una relación directa entre el estadio y la densidad celular obtenida tras la disociación.

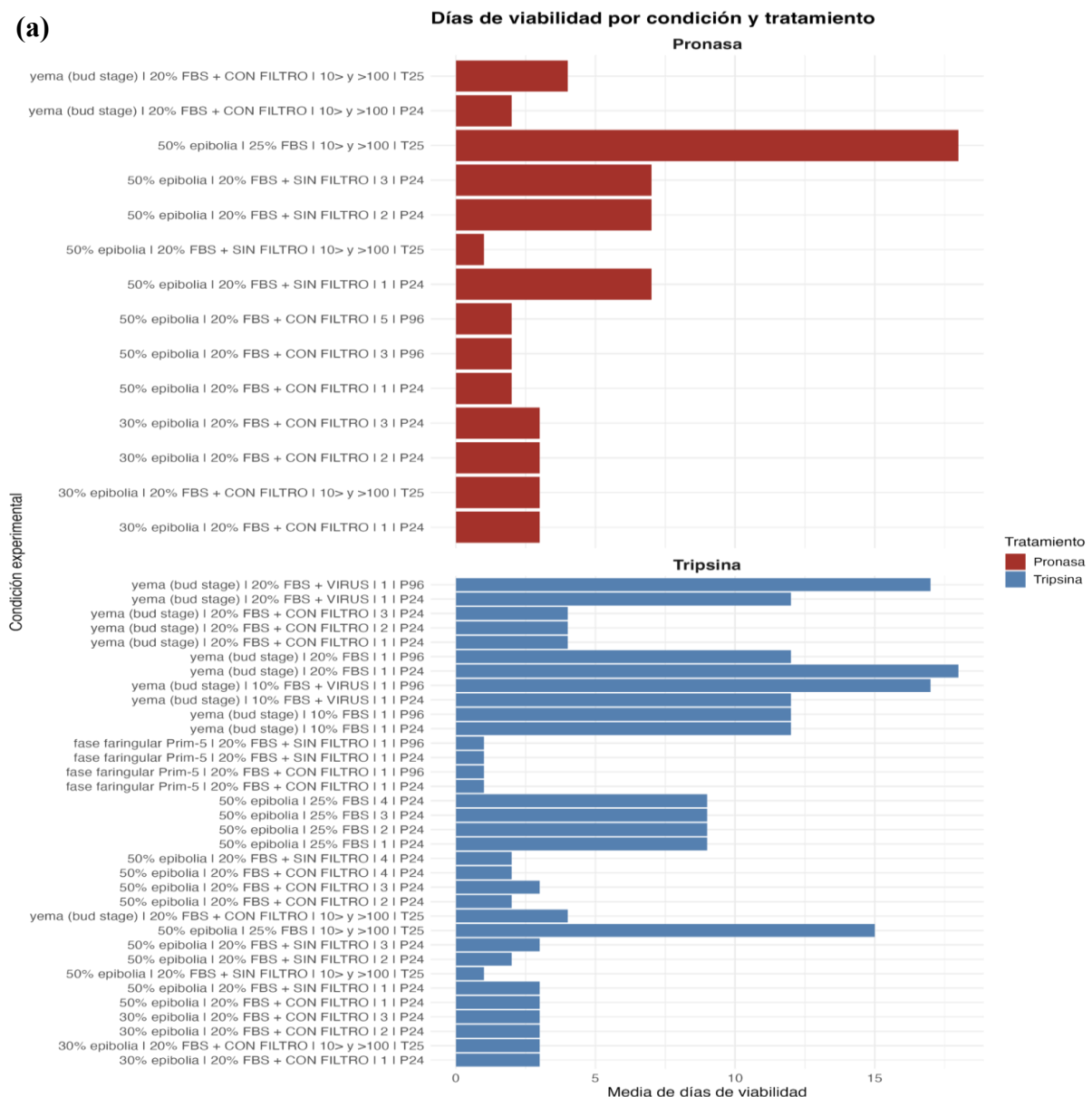
**Tabla 2. Estimación del número de células totales y concentración celular (células/ml) derivadas de un solo embrión de pez cebra en distintos estadios embrionarios.** Los valores se calcularon considerando el volumen total de medio de cultivo, el volumen tomado para la disgregación celular y el factor de dilución final tras la siembra.

Estadio embrionario	Número de células estimado	Células/ml
30% epibolia	2000	$1,78 \times 10^4$
50% epibolia	3000	$2,67 \times 10^4$
Estadio de yema	5000	$4,45 \times 10^4$
Fase faringular Prim-5	12000	$1,07 \times 10^5$

Al comparar estas estimaciones con los datos de viabilidad ([Figura 3a](#)), se observó que las condiciones más favorables se registraron en cultivos derivados de embriones en estadio de yema, disgregados con tripsina, en presencia de retrovirus y cultivados en medio L-15 con 20% de FBS. Estas condiciones permitieron mantener más de 15 dps. También destacaron los cultivos en estadio de 50% de epibolia con 25% de FBS, tanto con tripsina como con pronasa, en matraces T25. En cambio, las condiciones correspondientes a estadios más tempranos o avanzados, como 30% de epibolia o fase faringular, mostraron una viabilidad inferior a 5 días.

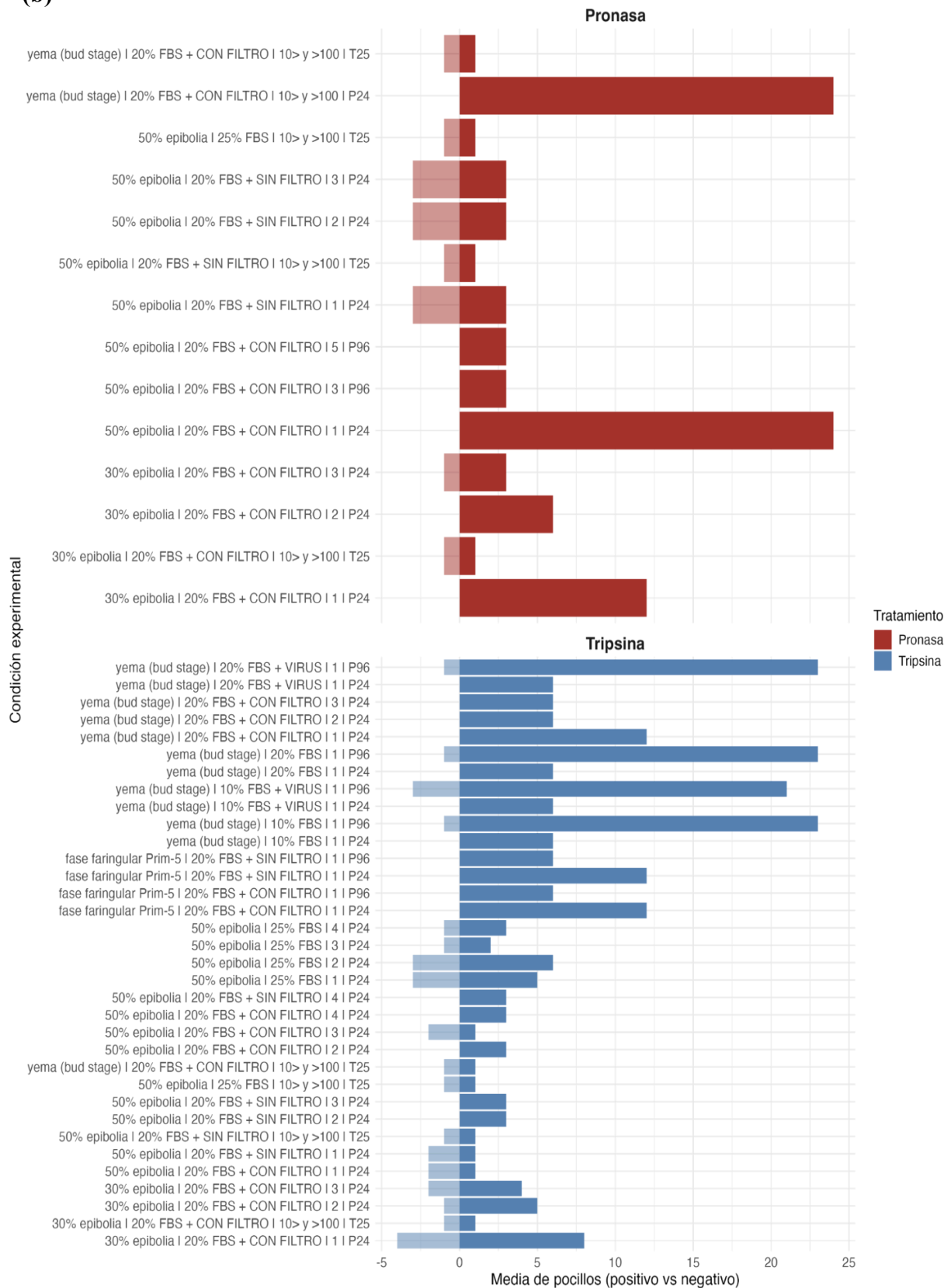
En cuanto a la diferencia entre pocillos con y sin células (Figura 3b), las condiciones con tripsina en estadio de yema y carga viral presentaron los valores más altos, con hasta 20 pocillos positivos por encima de los negativos. Algunas condiciones con pronasa también resultaron favorables, como el uso de medio al 20% de FBS en matraces y filtrado tras la disgregación, aunque con menor consistencia.

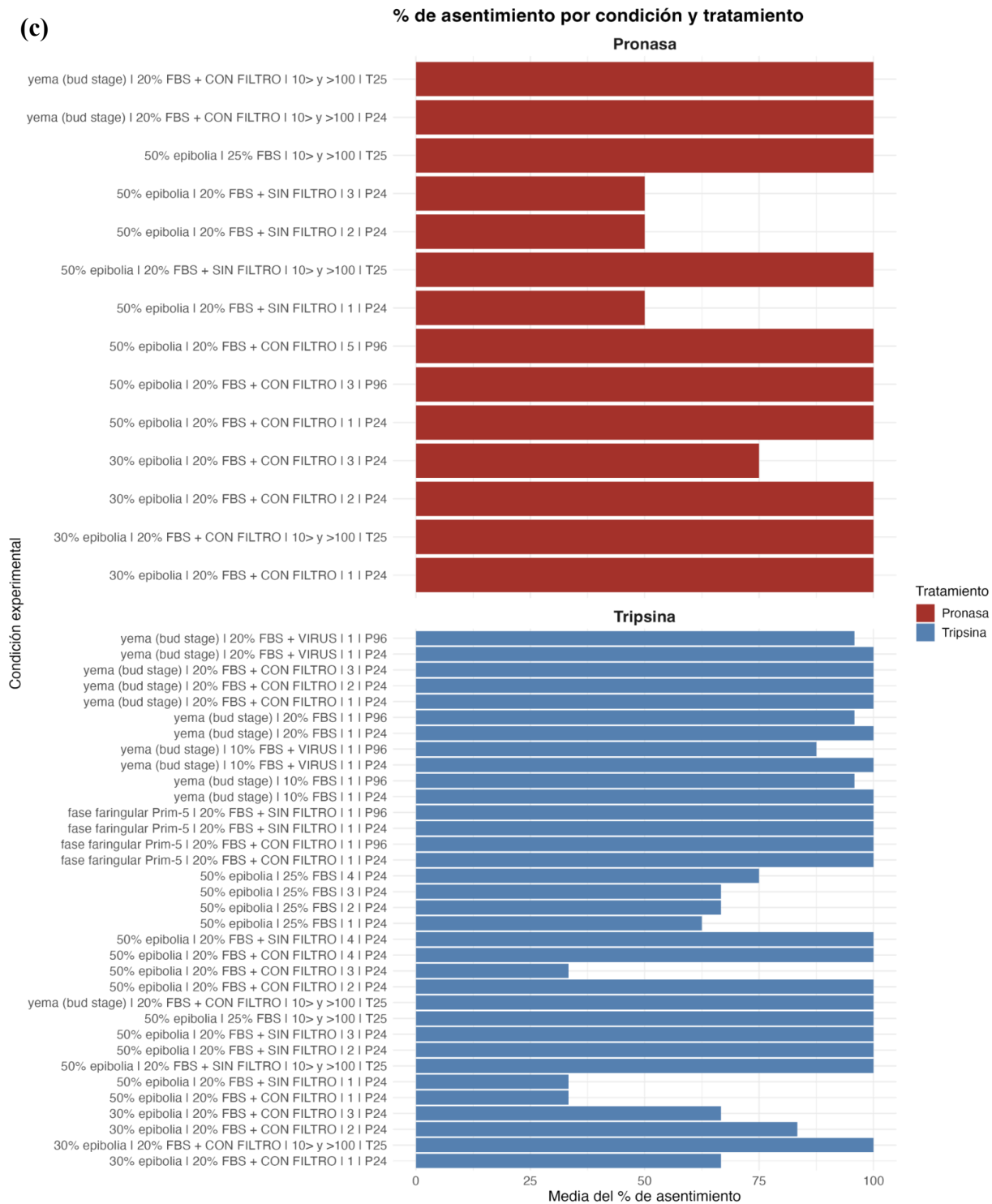
Respecto al porcentaje de asentamiento celular (Figura 3c), se alcanzaron valores cercanos al 100%, sobre todo en cultivos con pronasa en estadio de yema bajo condiciones filtradas. También se observaron buenos resultados con el tratamiento con tripsina y la siembra en presencia de virus. Por el contrario, los porcentajes más bajos se registraron en estadio Prim-5 y en condiciones con bajo contenido de FBS, sin diferencias significativas entre tratamientos enzimáticos y a pesar de la elevada concentración celular de partida.



(b)

### Pocillos con células vs sin células por condición y tratamiento





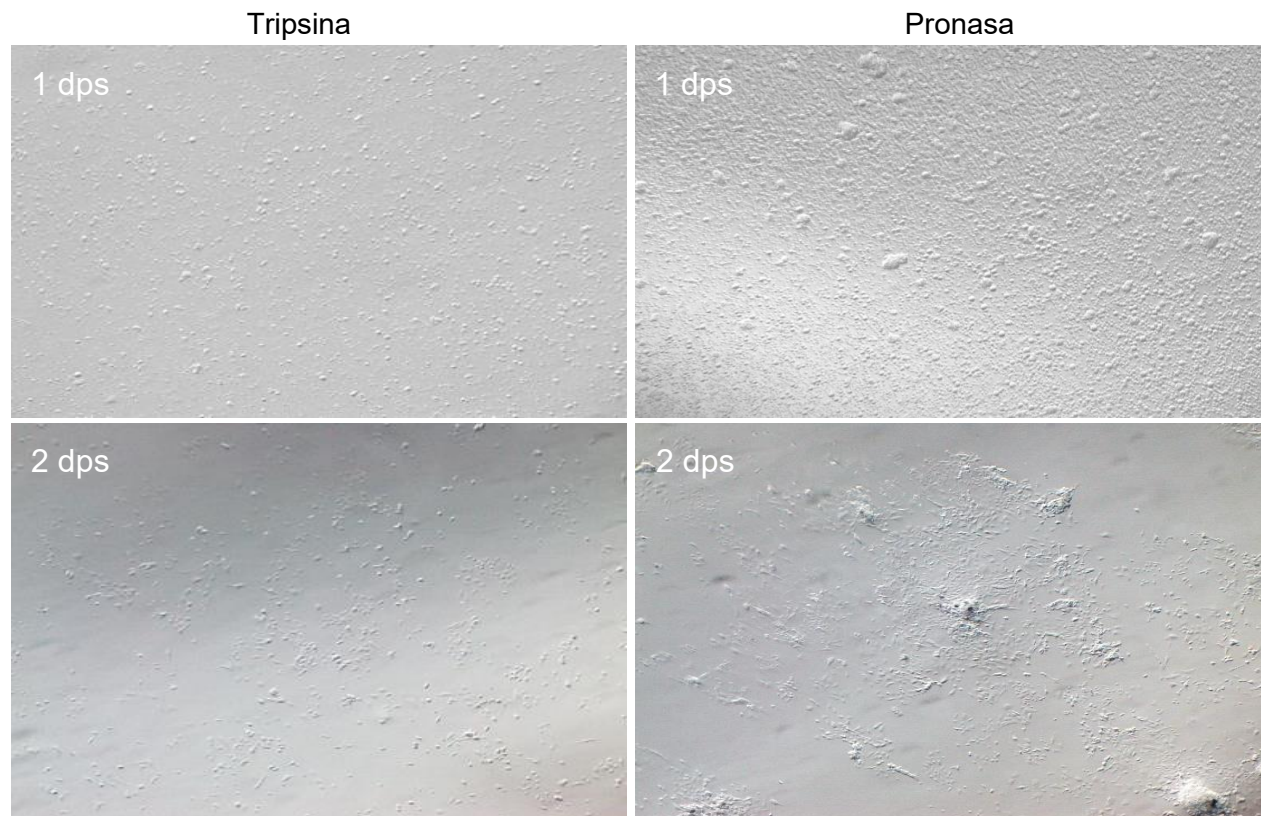
**Figura 3. Análisis de datos de las líneas celulares derivadas de embriones de pez cebra. (a) Días de viabilidad. (b) Diferencia promedio en la cantidad de pocillos con células (valores positivos) y sin células (valores negativos) en cada condición probada. (c) Porcentaje de asentamiento por condición y tratamiento.** Se agrupan por estadio embrionario (30% y 50% de epibolia, estadio de yema (*bud stage*) o fase faringular Prim-5) | Condiciones de cultivo (porcentaje de FBS y presencia/ausencia de filtro) | Número de embriones/huevos (1, 2, 3, 4, 5, 10> y >100) | Soporte de cultivo (placas de 24 y 96 pocillos o matraces T25).

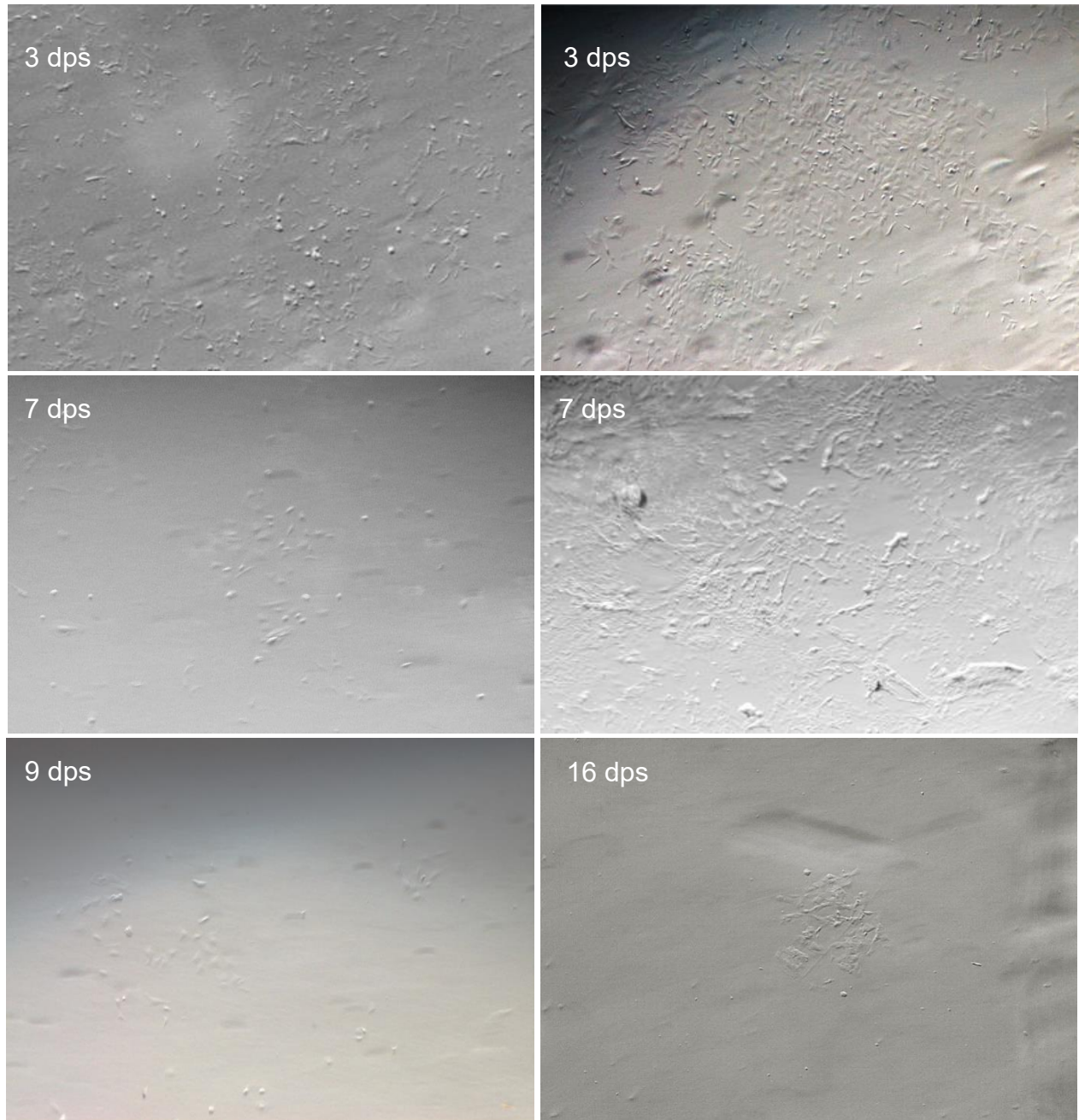
#### 4.1.2. Comparación morfológica y dinámica celular, en estadio de 50% de epibolia, en función del tratamiento enzimático aplicado

Una vez realizada directamente la siembra de las células disgregadas mediante decorionización con pronasa, se observó en el matraz T25 una proporción alta de células adheridas de forma inmediata al soporte. En contraste, en los pocillos de las placas se detectó una mayor proporción de células en suspensión. En general, a 1 dps, las células tratadas con pronasa mostraron una morfología más alargada y cuadrangular, especialmente aquellas con mayor índice de adhesión, en comparación con las células tratadas con tripsina, que presentaban una morfología redondeada y una menor adhesión al soporte (Figura 4, fila 1).

A 2 dps, se evidenció una mayor densidad celular en los cultivos tratados con pronasa frente a los tratados con tripsina, en los que las células permanecían en su mayoría aisladas y poco extendidas (Figura 4, fila 2). A partir de 3 dps, las células parecen haber superado la fase adaptación ya que en ambos tratamientos mostraron cierto crecimiento, aunque más evidente en el caso de la pronasa, con una progresiva organización del tapiz celular (Figura 4, fila 3). A 7 dps, los cultivos tratados con pronasa alcanzaron aproximadamente un 70 % de confluencia, momento en el que se procedió a la transformación vírica con retrovirus SnRV (Figura 4, fila 4).

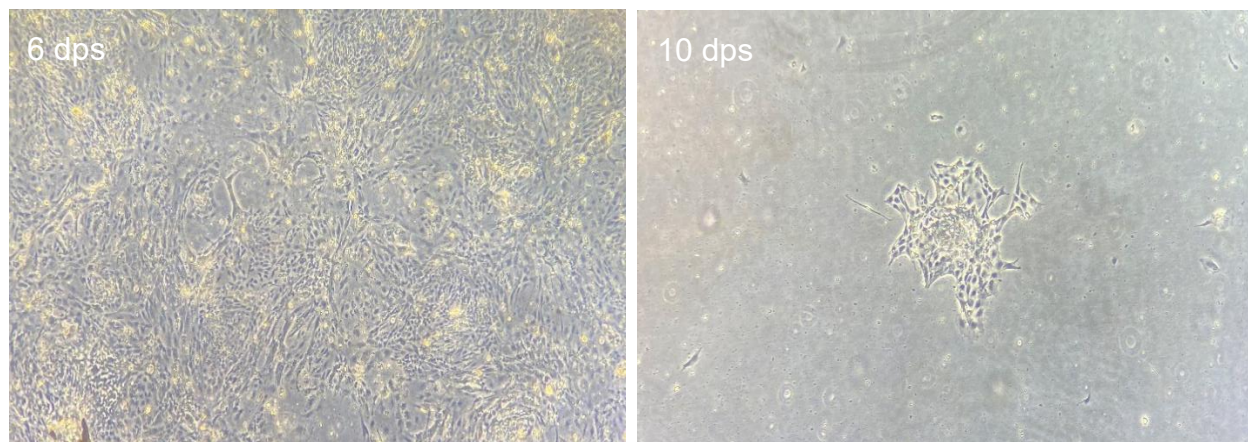
En los días posteriores al pase, como se observa a 9 y 16 dps, la mayoría de las células no lograron mantenerse en cultivo, aunque en algunos casos persistieron pequeños grupos celulares con morfología compacta (Figura 4, fila 5).





**Figura 4. Evolución líneas celulares derivadas de embriones de pez cebra en estadio de 50% de epibolia a los 1, 2, 3, 7, 9 y 16 dps.** Los huevos a las 5,25 hpf fueron tratados con pronasa para facilitar su decorionización (derecha) y por tripsinización (izquierda), filtrados y cultivados en un medio L-15 sin virus con un 25% de FBS en matraces T25. Las imágenes ilustran diferencias en la morfología celular, densidad y adherencia al soporte entre ambos tratamientos.

El número de colonias disminuyó progresivamente conforme se realizó el pase del cultivo en los diferentes matraces a los 7 dps. Como se muestra en la [Figura 5](#), a los 6 dps (antes del pase), el cultivo formaba un tapiz celular denso, mientras que a los 10 dps (después del pase), solo persistía un grupo reducido de células con morfología compacta, lo que sugiere una pérdida significativa de viabilidad tras el pase.



**Figura 5. Tapiz celular derivado de embriones de pez cebra al estadio del 50% de epibolia tratados con pronasa a los 6 dps (antes del pase) y 10 dps (después del pase).** Las células se cultivaron en medio L-15 sin virus suplementado con 25% de FBS. Las células parecen estar firmemente adheridas al fondo del matraz, formando una monocapa densa y continua. Las imágenes fueron tomadas a través de un microscopio invertido de campo claro Leica DMi1.

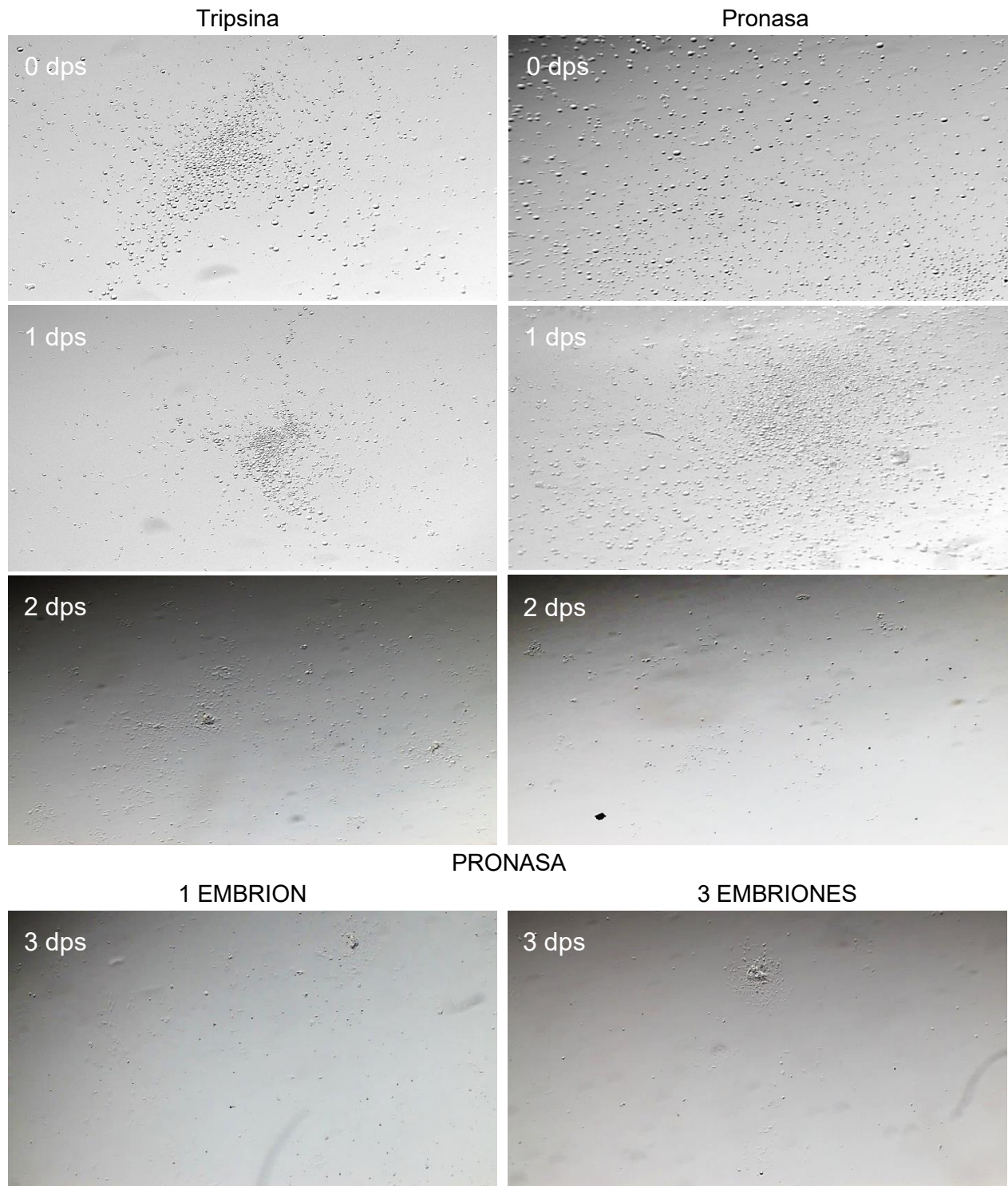
#### **4.1.2.1. Contaminación, viabilidad y análisis morfológico en función del número de embriones sembrados**

Curiosamente, las líneas celulares derivadas de dos y cuatro embriones presentaron una contaminación temprana y evidente. Esta tendencia también se observó en todos los cultivos de las placas de 96 pocillos tratados con tripsina y cultivados con 20% de FBS. En este caso, la presencia de contaminantes comprometió la adherencia celular, la proliferación y la integridad morfológica de las células, limitando su viabilidad a menos de 48 hps (Figura 3a). Por el contrario, los cultivos derivados de uno y tres embriones mostraron una menor incidencia de contaminación, lo que permitió mantener los cultivos viables durante al menos 3 dps (Figura 6).

Esta diferencia puede observarse en la evolución de un solo embrión tratado con tripsina o pronasa. A los 0 y 1 dps, ambos tratamientos mostraron morfologías celulares similares, aunque los cultivos tratados con pronasa presentaron una mayor densidad celular inicial (Figura 6, filas 1 y 2).

Sin embargo, a los 2 dps, las células tratadas con tripsina comenzaron a formar colonias con una mayor adhesión y dispersión en el fondo del pocillo, mientras que las tratadas con pronasa mostraron una extensión más limitada e individualizada (Figura 6, fila 3). En este punto, también se empezaron a detectar posibles signos de contaminación, identificables por la presencia de estructuras distintas a la morfología extendida y alargada característica de las células viables.

Por último, a los 3 dps, la línea derivada de tres embriones tratados con pronasa conservaba un pequeño grupo de células con morfología compacta, mientras que la derivada de un solo embrión mostraba células dispersas, más redondeadas y escasas (Figura 6, filas 4), lo que apunta a una considerable pérdida de viabilidad como consecuencia a la aparición de agentes contaminantes.



**Figura 6. Cultivo celular de un y tres embriones a los 0, 1, 2 y 3 dps tratados con tripsina y pronasa en estadio de 50% de epibolia.** Los huevos a las 5,25 hpf fueron tratados con pronasa para facilitar su decorionización y por tripsinización, filtrados y cultivados en un medio de cultivo L-15 con un 20% de FBS en placas de 24 pocillos. Las imágenes reflejan el progresivo cambio morfológico que experimentan las células en cultivo, comenzando con una forma redondeada y sin adherencia al soporte, hasta alcanzar una organización en pequeños grupos de células fusiformes y adheridas.

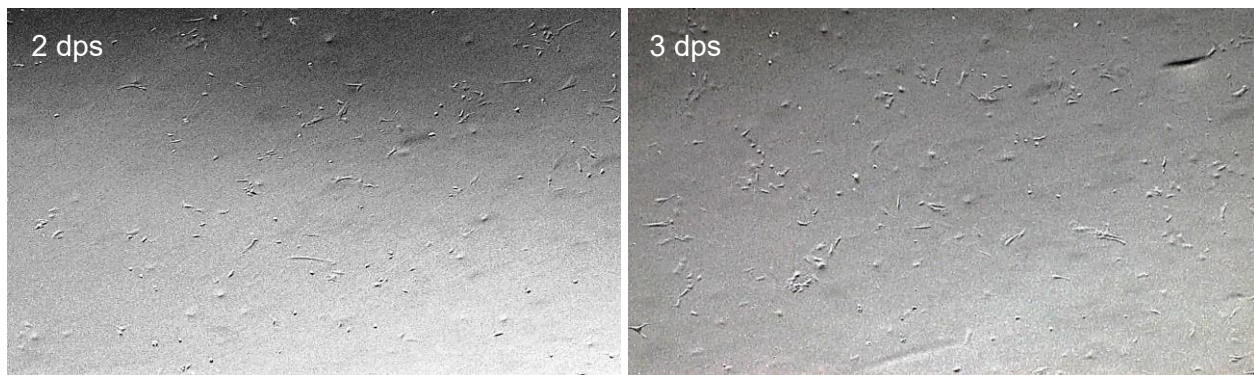
#### 4.1.3. Evaluación del estadio de yema en el rendimiento del cultivo celular

En el estadio de yema (*bud stage*, 10 hpf), se observó una concentración celular de  $4,45 \times 10^4$  células/ml, superior a la de los estadios previos de blástula (Tabla 2). Así, las condiciones de cultivo en las células tratadas con tripsina y combinadas con filtrado celular y carga viral, mostraron un mayor número de pocillos con crecimiento positivo, lo que indica una mejor viabilidad celular inicial. Estas condiciones se posicionaron como las segundas más favorables en términos de crecimiento celular.

Desde un punto de vista morfológico, en este estadio, las células presentaron forma alargada y fusiforme, aunque dispersa y sin formación de colonias definidas. A los 2 dps, algunas células presentaron prolongaciones citoplasmáticas delgadas, lo que apunta a un inicio de adherencia celular como consecuencia de un crecimiento fibroblástico. A los 3 dps, el mantenimiento de la morfología alargada y la mayor densidad celular sugieren una progresiva estabilización del cultivo (Figura 7).

En este estadio, se evaluó también la placa de transferencia, preparada a partir del medio recolectado a las 24 hrs para recuperar posibles células viables no adheridas. En ella se observaron pocas células adheridas en comparación con la placa original, lo que podría deberse a una mayor proliferación en esta última. Tras el descarte de los pocillos contaminados, se aseguró un índice de viabilidad celular de cuatro días.

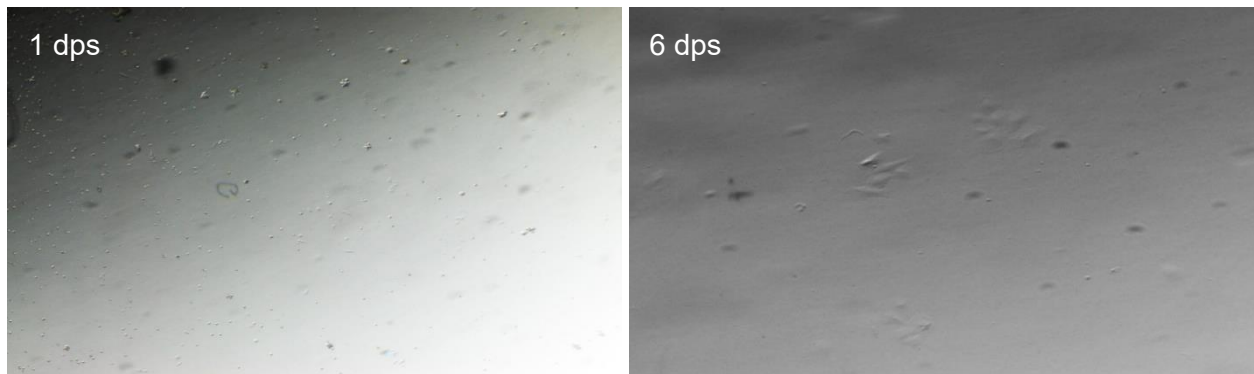
En este estadio, las condiciones más favorables en cuanto a los días de viabilidad del cultivo fueron aquellas en las que se permitió primero una fase de adaptación, sin virus, seguida de la adición de la carga viral una vez alcanzada la confluencia celular adecuada. Bajo estas condiciones, se logró una mayor supervivencia con algunas células viables hasta los diecisiete días. Este hallazgo subraya la importancia de respetar una fase de adaptación previa a la transformación viral para maximizar el éxito en la inmortalización celular.



**Figura 7. Cultivo celular derivado de un grupo de embriones en estadio de yema (*bud stage*) tratados con tripsina, a los 2 y 3 dps.** Los huevos a las 10 hpf fueron cultivados en un medio de cultivo L-15 sin virus con un 20% de FBS y filtrados con un colador de células Corning® de 40  $\mu\text{m}$ , en un matraz T25. Se observa una morfología compatible con el inicio del anclaje celular y, por ende, una estabilización progresiva del cultivo, aunque sin signos de confluencia.

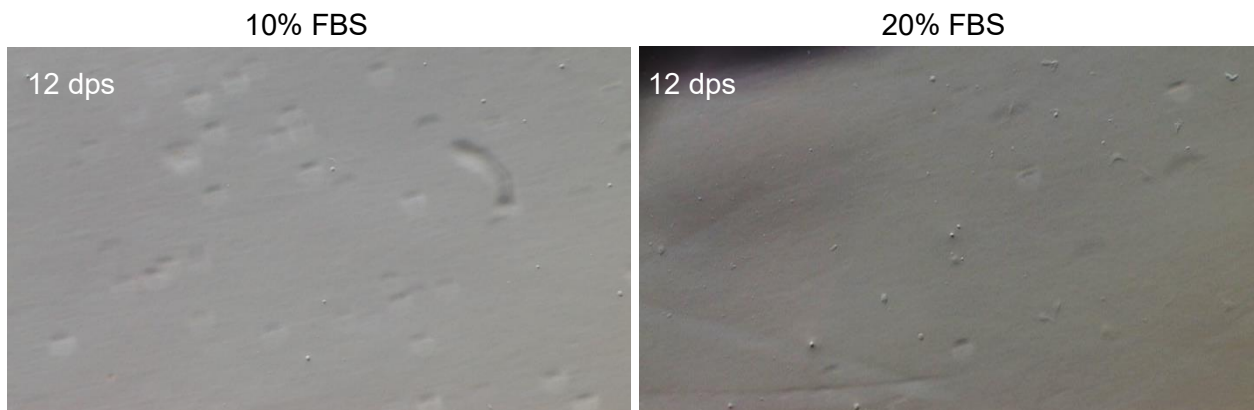
#### 4.1.3.1. Efectos del tratamiento viral sobre la morfología y viabilidad celular en diferentes condiciones de FBS

Respecto a los ensayos de transformación vírica, a los 6 dps, se observaron agregados celulares con morfología aplanada (Figura 8). Por su parte, en las condiciones de 10% de FBS y presencia de carga viral, se observó una mayor cantidad de células en comparación con las placas cultivadas sin virus. Estas células se mantuvieron viables hasta los 12 dps.



**Figura 8. Cultivo celular de un embrión a 1 y 6 dps cultivados en medio L-15 con 20% de FBS y carga vírica inicial, tratados con tripsina en estadio de yema.** Se evidencia que células presentan inicialmente una fase de adaptación hasta los seis días donde ya muestran signos de proliferación y organización. La morfología observada con células individuales y alargadas es compatible con un cultivo primario fibroblastoide temprano.

En los cultivos mantenidos en medio con 20% de FBS, se evidenció un “efecto borde”, es decir, en los pocillos de los bordes de la placa no se observaban células, mientras que en los centrales sí se mantenían viables, presentando un aumento en el tamaño celular sin divisiones completas. A los 12 dps, se confirmó la persistencia de células viables, aunque también se observó una alta proporción de restos celulares, y predominó una morfología redondeada (Figura 9). Se estableció como punto final de viabilidad los 18 dps.

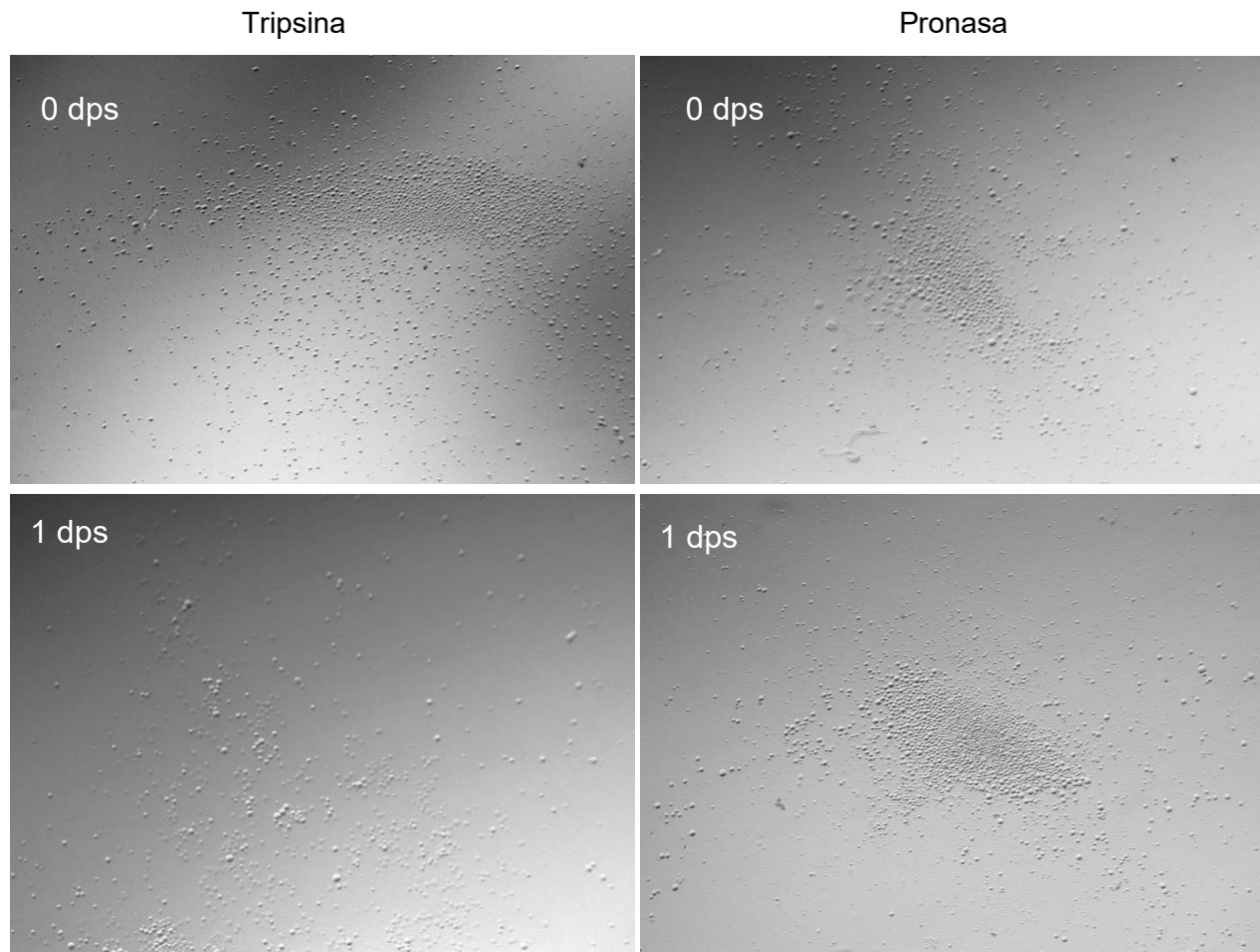


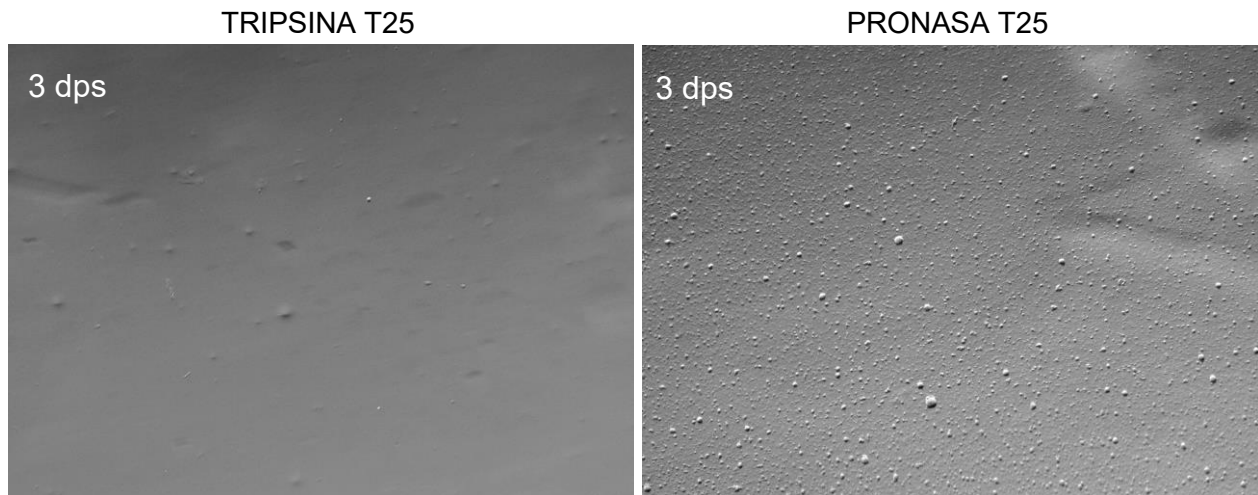
**Figura 9. Cultivo celular de un embrión a los 12 dps cultivados en medio con 10 y 20% de FBS con carga vírica inicial, tratados con tripsina en estadio de yema.** Los huevos a las 10 hpf fueron cultivados en una placa de 96 pocillos. Se evidencian la presencia de células con características fibroblastoides más marcadas sólo en condiciones de 20% de FBS, indicando una mejor adaptación al medio.

#### 4.1.4. Comportamientos diferenciales en cultivos celulares derivados de embriones en estadios de 30% de epibolia y faringular Prim-5

Los cultivos celulares derivados de embriones en estadio de 30% de epibolia mostraron comportamientos distintos en base a los tratamientos enzimáticos aplicados. En las células tratadas con tripsina, se observó que a los 0 dps, la mayoría de las células aún no se habían adherido al soporte, mantenían una morfología esférica y aparecían en diferentes dimensiones, cualidades características de las células en suspensión. En cambio, en las tratadas con pronasa, se constató una mayor proporción de células adheridas desde el inicio (Figura 10, fila 1). A 1 dps, se evidenció una reducción del tamaño celular respecto al momento inicial de la siembra (Figura 10, fila 2).

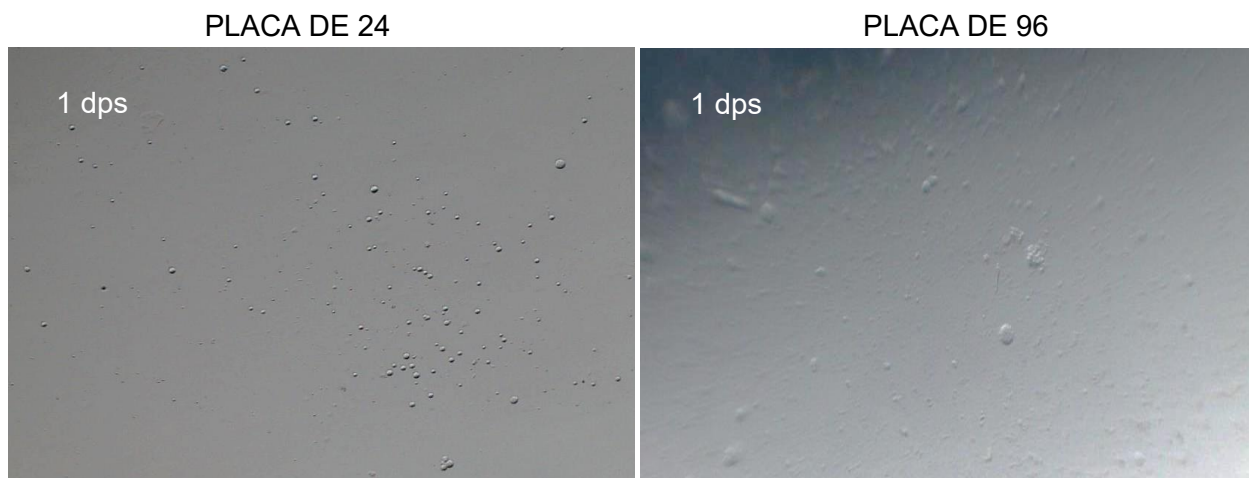
En ambos tratamientos enzimáticos se detectó la presencia de agregados contaminantes que no fueron eliminados tras el lavado, especialmente en el matraz T25 (Figura 10, fila 3) y en las líneas celulares derivadas de dos y tres embriones, junto con la mayor proporción de número de pocillos negativos, en comparación con las demás condiciones probadas (Figura 3b).





**Figura 10. Evolución líneas celulares derivadas de embriones de pez cebra en estadio de 30% de epibolia a los 0, 1 y 3 dps.** Los huevos a las 4,70 hpf fueron tratados con pronasa para facilitar su decorionización (derecha) y por tripsinización (izquierda), filtrados y cultivados en un medio de cultivo L-15 con un 20% de FBS en placas de 24 pocillos y matraces T25. Las imágenes demuestran células con pocas características de adhesión, además, sobresale la aparición de agentes contaminantes, lo que constituye un indicio de mayor mortalidad celular.

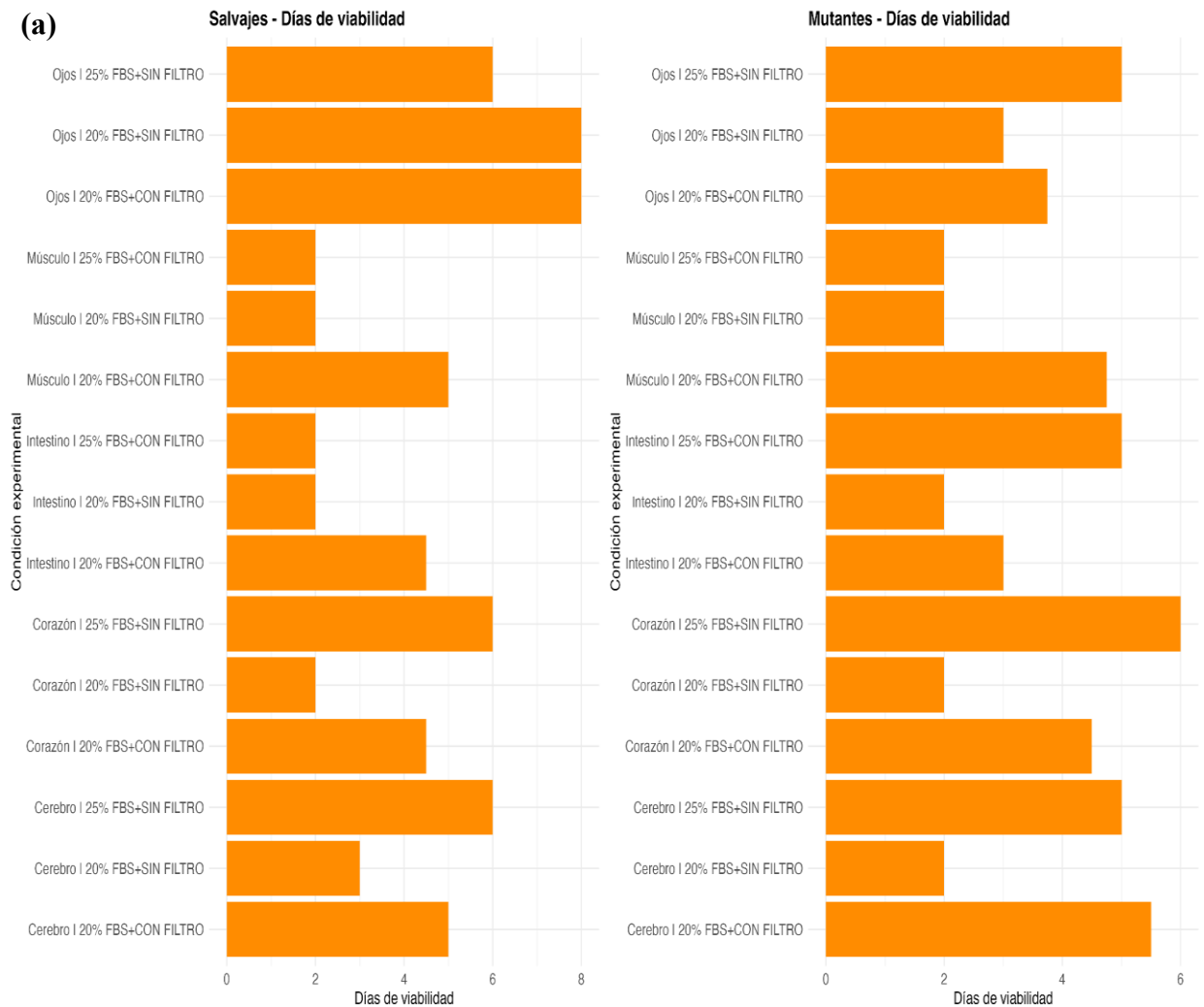
En el estadio embrionario en fase faringular Prim-5, se observó la mayor concentración celular, no obstante, la viabilidad celular no superó las 24 horas y el porcentaje de asentamiento fue muy reducido (Figura 3a y 3c). La baja cantidad de células viables podría contribuir a explicar la escasa adherencia observada y la falta de proliferación en las placas, así como la alta presencia de restos celulares desde las primeras horas pos-siembra. En las placas de 96 pocillos, no se apreciaron diferencias notables entre los cultivos filtrados y los no filtrados, visualizando abundantes restos de material biológico en ambos (Figura 11).

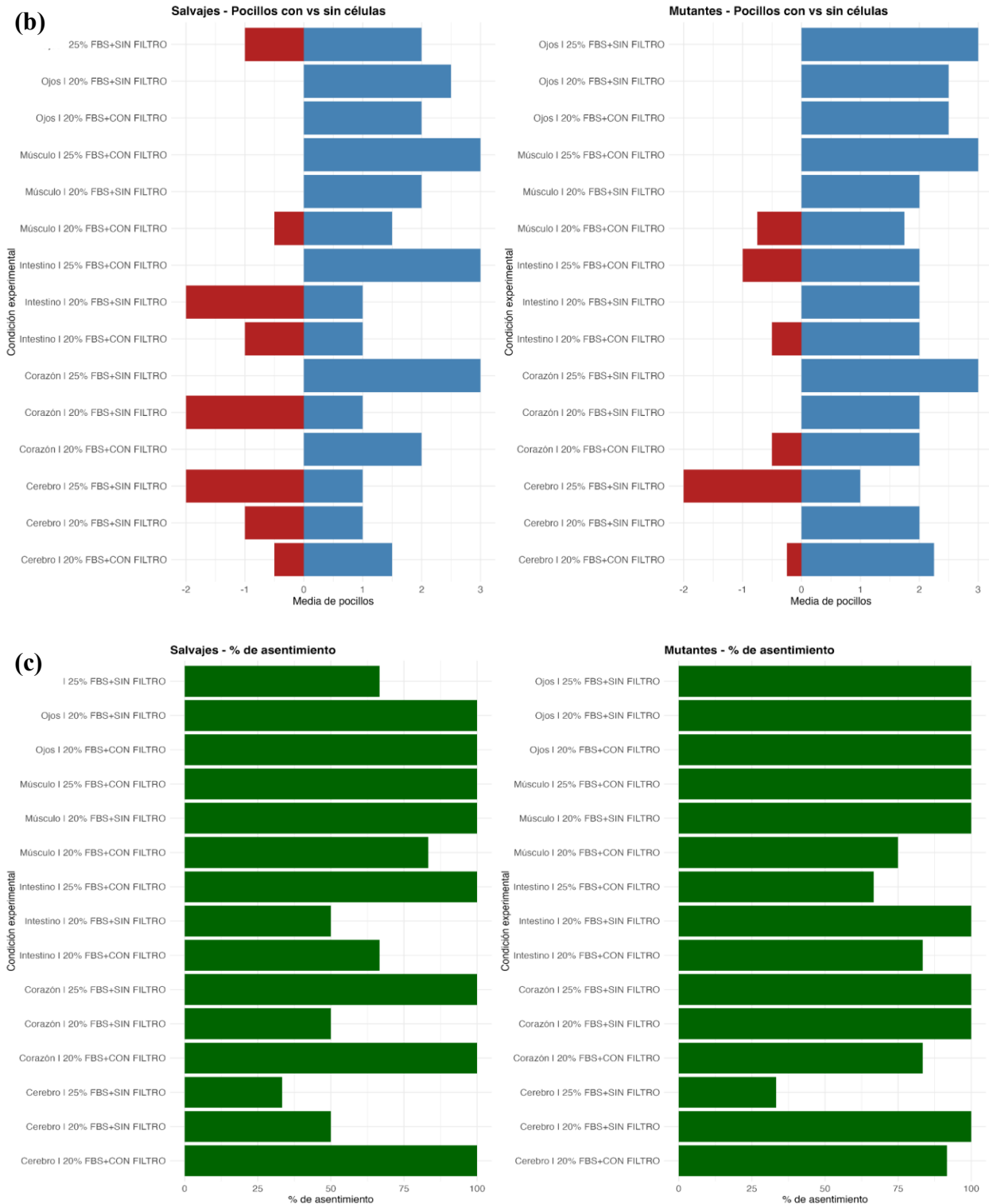


**Figura 11. Cultivo celular derivado de un embrión en fase faringular Prim-5 tratados con tripsina a 1 dps.** Los huevos a las 24 hpf fueron filtrados con un colador de células pluriStrainer Mini de 40  $\mu\text{m}$  y cultivados en un medio de cultivo Leibovitz L-15 con un 20% de FBS, en placas de 24 y 96 pocillos. En las imágenes se observa una débil adhesión celular al presentar morfología redondeada, junto con la presencia destacada de grandes acúmulos de agentes contaminantes, lo que indica un aumento en la tasa de muerte celular.

## 4.2. Evaluación del desarrollo de cultivos celulares derivados de órganos de peces cebrá adultos

Las líneas celulares derivadas de ojos mostraron una elevada viabilidad a lo largo del cultivo, manteniéndose activas durante más días que las derivadas de otros tejidos, como músculo o intestino, cuya pérdida celular fue más temprana, especialmente en líneas mutantes (Figura 12a). En estas últimas también se observó una menor proporción de pocillos con células viables frente a los que ya no contenían células, reflejo de una mayor sensibilidad a las condiciones del cultivo (Figura 12b). El porcentaje de asentamiento fue también más alto en las líneas derivadas de ojos, así como en aquellas cultivadas con medio filtrado y concentraciones más bajas de FBS, lo que sugiere que tanto el tejido de origen como las condiciones iniciales influyen notablemente en la adherencia celular (Figura 12c).





**Figura 12. Análisis de datos de las líneas celulares derivadas de órganos de peces cebras, tanto de líneas salvajes como mutantes. (a) Días de viabilidad. (b) Diferencia promedio en la cantidad de pocillos con células (valores positivos) y sin células (valores negativos) en cada condición probada. (c) Porcentaje de asentimiento por condición y tratamiento. Cada condición experimental se agrupa por tipo de tejido (ojos, músculo, intestino, corazón o cerebro) | condiciones de cultivo (porcentaje de FBS y presencia/ausencia de filtro).**

#### 4.2.1. Efecto del filtrado en líneas derivadas de peces salvajes y mutantes

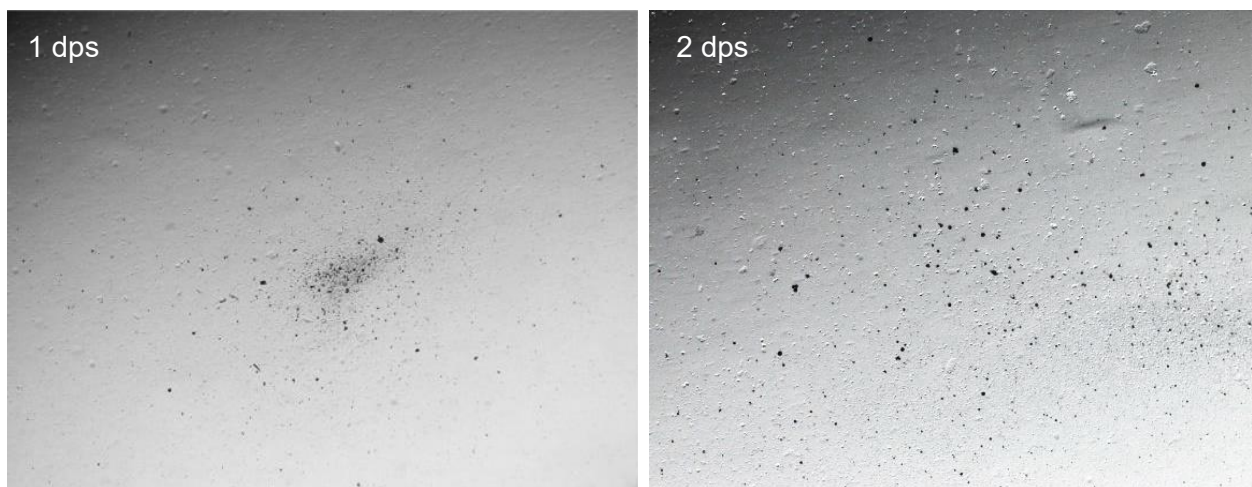
La filtración con un colador de células Corning® de 40 µm parece haber eliminado grandes agregados, favoreciendo la obtención de una suspensión celular más uniforme. Así, en las condiciones con filtrado celular, correspondientes a adultos salvajes, se observaron células adheridas al soporte a los 1 y 2 dps, a pesar de la presencia de residuos celulares y material orgánico, sobre todo en los cultivos derivados de ojo (Figura 13, fila 1). En cambio, las líneas celulares derivadas de intestino y músculo de adultos mutantes, tanto con como sin filtrado, se encontraron contaminadas a los 2 dps.

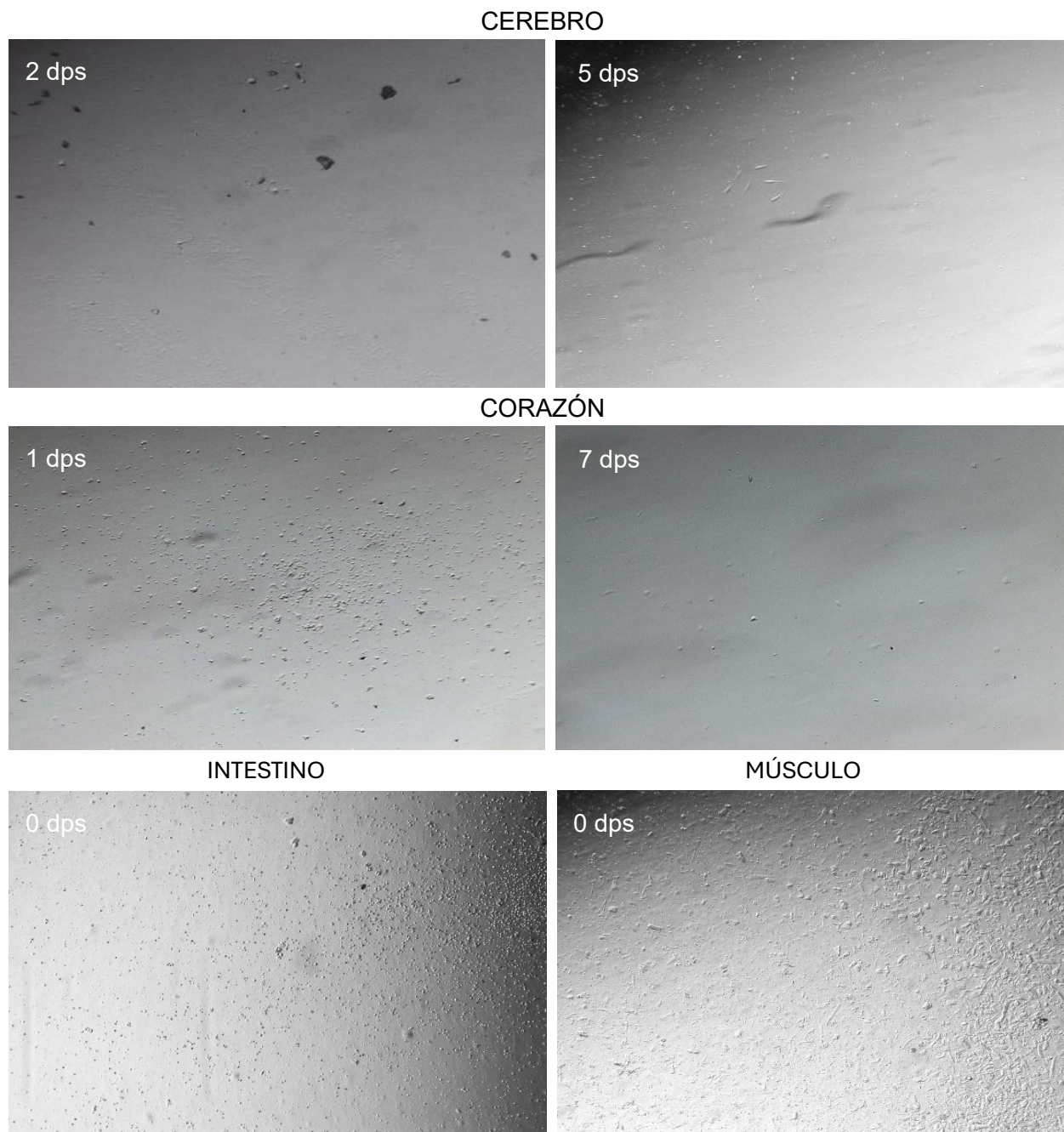
Las células derivadas de cerebro presentaron inicialmente una morfología redondeada, sin adherencia al soporte y con signos de contaminación a los 2 dps (Figura 13, fila 2). Esto se tradujo en una menor cantidad de pocillos con células viables, especialmente en aquellas condiciones con un 25% de FBS sin filtrado previo y en muestras procedentes de organismos mutantes. Sin embargo, a los 5 dps, se observaron pequeños grupos de células en el resto de los pocillos del resto de las condiciones, lo que podría indicar una fase de latencia o adaptación prolongada antes de iniciar su proliferación. A los 7 dps, las células procedentes del corazón mostraron una reducción en su densidad celular presentando pocas células con morfología alargada (Figura 13, fila 3). Finalmente, a los 8 dps, la única línea con células aún viables fue la derivada de ojos sin filtrado previo en adultos salvajes (Figura 12a).

En la Figura 13, fila 4 se puede evidenciar cómo se veían los cultivos de las células derivadas de intestino y músculo al momento inicial de la siembra, presentando ambos una gran cantidad de estructuras distribuidas a lo largo del soporte.

Aunque no se observaron diferencias concluyentes entre peces salvajes y mutantes en cuanto a viabilidad celular y respuesta al filtrado, se observó que las únicas líneas viables a largo plazo correspondían a los ejemplares salvajes.

#### OJOS



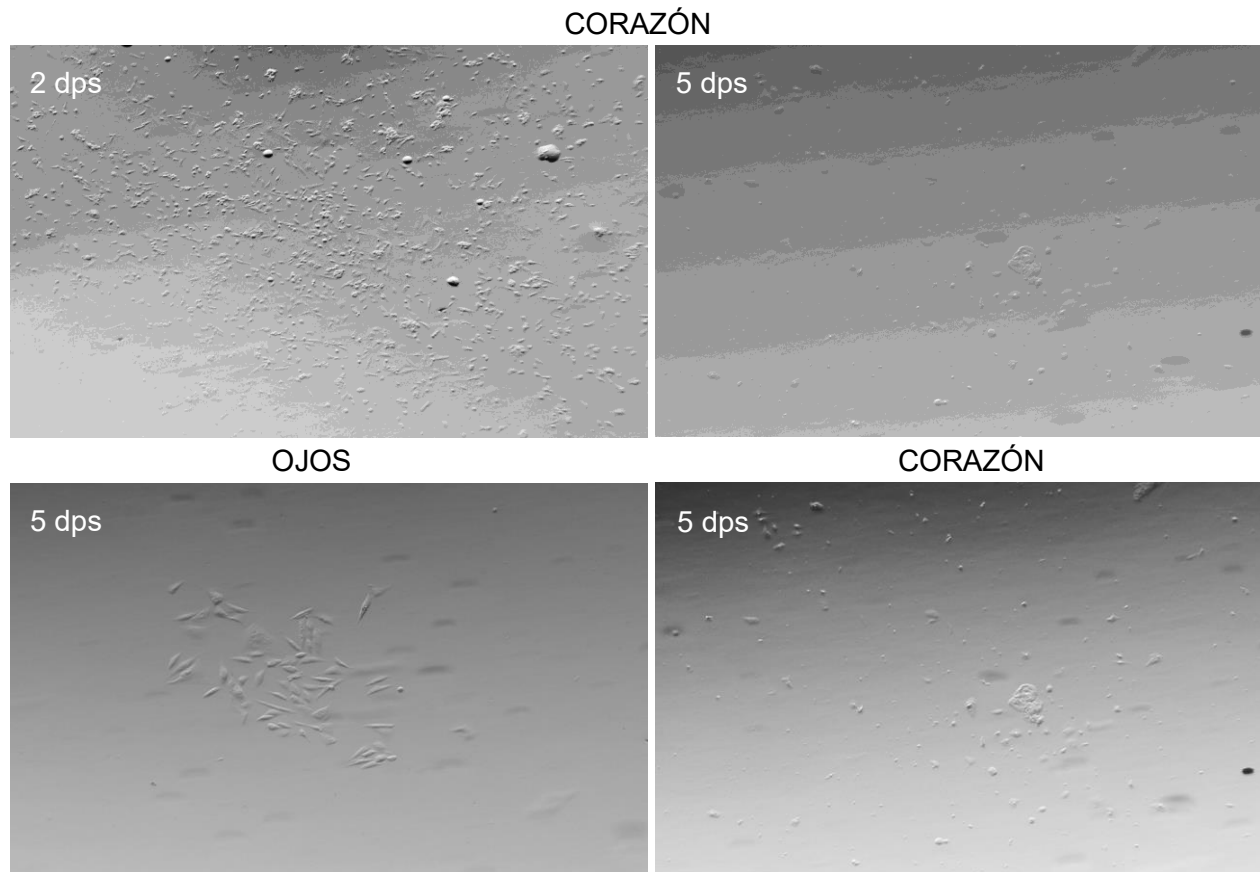


**Figura 13. Cultivo celular derivado de corazón, ojos, cerebro, intestino y músculo de peces cebra adultos mutantes (izquierda) y salvajes (derecha) a 0, 1, 2, 5 y 7 dps.** Los órganos fueron cultivados en un medio Leibovitz L-15 con un 20% de FBS y filtrados con un colador de células Corning® de 40  $\mu\text{m}$ , en placas de 24 pocillos. Se observan abundantes melanocitos en las líneas celulares derivadas de ojos, mientras que en los demás cultivos la morfología varió en función del tiempo transcurrido desde la siembra.

#### **4.2.2. Morfología y contaminación bajo condiciones de 25% de FBS**

Las líneas celulares cultivadas en medio L-15 suplementado con un 25% de FBS derivadas de corazón y ojos, a los 2 y 5 dps, fueron las únicas que presentaron células alargadas en

comparación con el resto de tejidos (Figura 14). Como en todos los experimentos realizados, antes de los 2 dps, las líneas derivadas de músculo e intestino mostraron signos de contaminación temprana. A los 5 dps, la proporción de pocillos contaminados fue de 2:3 para la línea celular de cerebro y de 1:3 para la de ojos; el resto de las poblaciones continuaron en crecimiento hasta los seis días (Figura 12a).



**Figura 14. Cultivo celular derivado de ojos y corazón de peces cebra adultos salvajes a los 2 y 5 dps.** Los órganos fueron cultivados en un medio Leibovitz L-15 con un 25% de FBS en placas de 24 pocillos. La morfología observada es indicativa de adherencia y estabilidad de los cultivos.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Evaluación de condiciones enzimáticas y medios suplementarios

Con el objetivo de generar herramientas *in vitro* que reflejen las características celulares y moleculares propias del pez cebra, en este trabajo se evaluaron distintas condiciones experimentales para identificar las más adecuadas en el establecimiento de líneas celulares derivadas de embriones y órganos de peces cebra adultos, incluyendo individuos de tipo salvajes y mutantes. Aunque ninguna de las líneas logró establecerse de forma continua más allá del segundo pase, el análisis detallado de los cultivos reveló patrones consistentes y diferencias marcadas en función del estadio del desarrollo y del tratamiento enzimático aplicado. Estos resultados ayudan a

entender mejor qué condiciones favorecen el asentamiento celular y podrían servir de base para mejorar futuros protocolos de cultivo en pez cebra.

Aunque al principio las condiciones con pronasa parecían favorecer a una mayor contaminación que las que utilizaban tripsina, la implementación de ajustes en el protocolo, como un mayor control de la esterilidad y una manipulación más cuidadosa, permitió reducir notablemente este problema. En particular, en las líneas derivadas de embriones en estadio de 30% de epibolia y tratadas con pronasa, se observó un mayor número de células adheridas y en menor tiempo que las tratadas con tripsina, lo que sugiere inicialmente una mayor estabilidad del cultivo y una posible prolongación de su viabilidad. Esta mejor adhesión podría deberse al menor efecto citotóxico de la pronasa en comparación con la tripsina, lo que preservaría mejor la integridad celular durante la disociación. Sin embargo, esta ventaja inicial no se tradujo en una mayor duración del cultivo, ya que la viabilidad del cultivo fue similar a la de las líneas tratadas con tripsina en este mismo estadio, con una media de tres 3 días dps. Esto podría indicar que, aunque la adhesión inicial podría ser un parámetro determinante, no es suficiente para garantizar una mayor vida útil del cultivo.

Respecto a la composición del medio de cultivo, el medio L-15 suplementado con FBS se utilizó para el desarrollo de los sistemas celulares, ya que ha sido ampliamente aceptado para sostener mejor las líneas celulares de peces que otros medios (Meena *et al.*, 2020; Arana *et al.*, 2025). En el presente trabajo se evaluó el efecto de incrementar la concentración de FBS, pasando de medios menos concentrados a otros con 30% de FBS y 2% de penicilina/estreptomicina. El aumento de la concentración de antibiótico se planteó con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación en las fases iniciales del cultivo; sin embargo, los resultados mostraron que estas condiciones extremas fueron perjudiciales, especialmente en las líneas tratadas con tripsina, donde se observó una notable reducción en el crecimiento y la expansión celular. Por este motivo, se descartó rápidamente el uso del 2% de penicilina/estreptomicina y se volvió a emplear el 1% habitual.

Se identificó que una concentración superior o igual al 20% pero inferior al 30% fue más favorable para el cultivo. En concreto, las condiciones óptimas, en este estadio, se lograron con medio de cultivo Leibovitz L-15 suplementado con 25% de FBS y un 1% de penicilina/estreptomicina, al tener el mayor número de días de viabilidad, como podemos ver representado en la [Figura 3a](#). Demostrando así un mejor aspecto morfológico sobre todo en las líneas de ojos y corazón ([Figura 14](#)).

En uno de los primeros estudios dedicados al establecimiento de líneas celulares embrionarias de pez cebra, Ghosh y Collodi (1994) lograron el establecimiento de líneas celulares derivadas de embriones en estadio de blástula mediante el uso de extracto de embrión y suero de trucha, lo que pone de manifiesto el potencial de estos suplementos para favorecer un entorno nutricional más propicio. No obstante, su aplicación presenta limitaciones prácticas, como la disponibilidad y el coste, por lo que se optó por el uso de FBS, una alternativa más accesible y

estandarizada (Arana *et al.*, 2025). Sin embargo, la evaluación comparativa entre distintos suplementos, incluyendo factores exógenos específicos, podría ser interesante en futuras investigaciones dirigidas a mejorar la viabilidad y la estabilidad de cultivos primarios derivados de embriones en estadios tempranos.

Otra opción que se plantea para mejorar los cultivos es recurrir a la exposición de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del inglés *basic Fibroblast Growth Factor*), para dirigir la diferenciación de los cultivos primarios en estadio de blástula hacia líneas celulares musculares, como reflejan Ciarlo *et al.* (2016). A diferencia de las células pluripotentes murinas y humanas, que están ampliamente caracterizadas utilizando puntos de referencia moleculares y funcionales como *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, las líneas celulares de pez cebra aún carecen de criterios estandarizados de pluripotencia (Arana *et al.*, 2025), lo que representa una oportunidad para continuar esta investigación hacia el desarrollo de nuevos enfoques en biología molecular y bioquímica.

### **5.1.1. Ajustes técnicos y viabilidad en líneas celulares derivadas de embriones**

Con el objetivo de mejorar la esterilidad y viabilidad del proceso, durante el desarrollo de las líneas celulares derivadas de embriones en estadio de 50% de epibolia, se implementaron varios ajustes técnicos. Entre ellos se incluyó el uso de un colador de células de 70  $\mu\text{m}$  en lugar del habitual de 40  $\mu\text{m}$  durante el proceso de *bleaching*, el precalentamiento de la disolución de pronasa en estufa de calor seco para optimizar su actividad catalítica, y el cambio del soporte de vidrio a uno de plástico durante la decorionización. Aunque no se evaluó el impacto individual de cada modificación, estos ajustes podrían haber influido de manera sinérgica que esta condición diera lugar a la línea celular con mayor viabilidad observada a lo largo del estudio (Figura 3a). El estadio de 50 % de epibolia podría ser más adecuado para iniciar cultivos celulares, ya que tiene más células que los estadios anteriores y estas siguen estando poco diferenciadas en comparación con estadios más avanzados (Arana *et al.*, 2025; Kimmel *et al.*, 1995; Kimmel & Warga, 1987). Esto, junto con los ajustes técnicos aplicados, podría haber favorecido el asentamiento celular. Aun así, serían necesarios más ensayos para confirmar qué factores influyeron en la mejora de la viabilidad.

A pesar de estos buenos resultados iniciales, uno de los factores que pudo limitar el éxito del cultivo fue el momento en el que se realizó el primer pase celular. El pase del cultivo celular se realizó cuando alcanzó un 70% de confluencia. Este nivel de confluencia fue relativamente bajo, por lo que la eficiencia de la adhesión celular tras el pase pudo haberse visto comprometida en los nuevos matraces, así como la formación de colonias estable. Se recomienda realizar el pase celular cuando los cultivos hayan alcanzado un estadio de confluencia más avanzado, tal y como demuestran Meena *et al.* (2020), idealmente superior al 90%, con el fin de maximizar tanto la densidad celular inicial como la viabilidad del cultivo en las siguientes condiciones ensayadas de transformación vírica.

En las líneas celulares derivadas de embriones en fase faringular Prim-5 se detectó contaminación en la mayoría de los pocillos antes del segundo día de cultivo, atribuida a un lavado insuficiente durante la esterilización, especialmente en el paso de *bleaching*. La alta incidencia de contaminación observada sugiere que los tiempos de lavado empleados (3 minutos) fueron insuficientes, posiblemente debido a la elevada carga de materia orgánica. Aunque, en este estadio, el número de células obtenidas de un solo embrión con nuestro procedimiento fue consistente con lo descrito previamente en la literatura, la baja viabilidad inicial sugiere la necesidad de reforzar aún más las condiciones de esterilización (Ge, 2018; Kimmel *et al.*, 1995; Meyers, 2018).

En este sentido sugerimos que lo más adecuado sería ajustar el protocolo aumentando el tiempo entre lavados a 5 minutos y, asegurando que todos los embriones permanezcan completamente sumergidos durante el procedimiento. Si bien, el número total de células derivadas de embriones en este estadio es elevado, la eficiencia real del método de disociación se ve comprometida por la fragilidad de las células, la alta incidencia de contaminantes y la baja capacidad de establecimiento en las condiciones de cultivo ensayadas.

## **5.2. Inmortalización vírica y limitaciones en cultivos embrionarios**

En este estudio no se fue posible comprobar la inserción del retrovirus en el genoma de las células hospedadoras, ya que los cultivos no mostraron un crecimiento sostenido ni signos claros de inmortalización, como una alta confluencia o características morfológicas compatibles con células pluripotentes. Además, tampoco se alcanzó un estado de confluencia adecuado que permitiese realizar dicha comprobación. Esto impide asegurar que el crecimiento observado se deba a la acción del agente vírico y no exclusivamente a las condiciones nutricionales del medio. Si los cultivos hubiesen alcanzado un mayor nivel de confluencia, habría sido posible confirmar la inmortalización mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Morcillo *et al.*, 2017; Ruiz-Palacios *et al.*, 2020; Srila *et al.*, 2024).

## **5.3. Desafíos y estrategias en líneas celulares derivadas de órganos adultos**

El cultivo de líneas celulares derivadas de órganos de peces cebras adultos, —como el corazón, intestino, músculo, ojos y cerebro— presenta retos metodológicos y biológicos específicos que difieren notablemente de los observados en las líneas embrionarias. Estos desafíos están estrechamente relacionados con las características intrínsecas de cada tejido, su grado de exposición al ambiente, la microbiota asociada (en el caso del intestino y músculo) y su sensibilidad a los procedimientos enzimáticos.

En las líneas celulares derivadas del corazón, se observó que una exposición prolongada a tripsina en las primeras horas tras la siembra provocó una pérdida significativa de células. Esta situación se explica por el desbalance entre el volumen de tripsina empleado y la escasa cantidad de tejido disponible, ya que el corazón del pez cebrado mide apenas 1 milímetro de diámetro (Koth *et al.*, 2017). Esto trajo como resultado un daño excesivo en las células, dificultando el establecimiento del cultivo. Una alternativa interesante que pudiera contribuir al asentamiento del

cultivo sería realizar la primera parte de disgregación como si fuese un explante primario, es decir, dejando un trozo de tejido para que de él pudieran derivar la mayoría de las células, tal como proponen Zeng *et al.* (2022) en cultivos celulares derivados de corazón de lubina.

Por otro lado, las líneas celulares derivadas del intestino mostraron un alto índice de contaminación a 1 dps en todos los ensayos realizados. En general, estas líneas tienen un porcentaje de asentamiento bajo, menor del 50%, lo cual se reflejó en el reducido número de pocillos con células viables. Este resultado puede explicarse por la presencia natural de bacterias y otros microorganismos en este órgano, que afectan negativamente a la integridad del cultivo tras la disgregación celular. La ruptura de las biopelículas intestinales promueve la proliferación de agentes contaminantes, sobre todo de bacterias. En el caso del músculo, aunque no contiene microbiota propia, su proximidad a la piel y su exposición durante la disección lo hacen especialmente vulnerable a contaminaciones externas si no se aplican medidas de esterilización estrictas. Por ello, ambos tejidos, al ser órganos externos y estar en contacto con la microbiota, presentan un mayor riesgo de contaminación en condiciones de cultivo.

Ante esta problemática, sería importante explorar estrategias alternativas de cultivo. En futuros ensayos, la viabilidad celular podría optimizarse mediante lavados más rigurosos que incluyan una mayor variedad de antibióticos de amplio espectro. Además de penicilina y estreptomina, podría considerarse el uso de otros compuestos como doxiciclina y gentamicina, así como de otros compuestos, como enzimas proteolíticas (por ejemplo, la colagenasa) que favorezcan la ruptura de biopelículas, contribuyendo así a reducir la carga microbiana antes de la siembra (Iwamoto *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2016; Srila *et al.*, 2024).

También, el desarrollo de los cultivos celulares a partir de tejido adulto, como el de músculo, podría haberse favorecido mediante el uso de factores de crecimiento como el bFGF, tal como proponen Kumar y sus colaboradores (2016). Una línea celular muscular establecida en estas condiciones podría constituir un modelo *in vitro* útil para la identificación de genes clave en mecanismos reguladores, con aplicaciones relevantes en la investigación biomédica y en la biología regenerativa (Arana *et al.*, 2025).

Las células derivadas de cerebro mostraron inicialmente una morfología redondeada, sin adherencia al soporte y con signos de contaminación a los 2 dps (Figura 13, fila 2), lo que resultó en una baja viabilidad, especialmente bajo condiciones con 25 % de FBS sin filtrado y en muestras mutantes (Figura 12a). A los 5 dps, en algunos pocillos no contaminados aún se observaban algunas células aisladas, aunque en muy baja cantidad y sin signos claros de proliferación (Figura 13, fila 2). Por este motivo, se decidió descartar esos cultivos. Este resultado contrasta con lo descrito por Gilbert *et al.* (2025) en cultivos de células cerebrales de ratón, donde se indica que estos tipos celulares pueden tardar varios días en adherirse y expandirse, siempre que cuenten con medios suplementados con factores neurotróficos. En este estudio, la ausencia de esos factores podría haber limitado la supervivencia y desarrollo de las células neuronales (Davaa *et al.*, 2025).

La línea celular derivada de ojos fue la única que mantuvo células viables hasta los 8 dps en cultivos sin filtrado, en ejemplares adultos salvajes. Este comportamiento podría estar relacionado con la diversidad celular del tejido ocular o con la presencia de melanocitos, que podrían ofrecer cierta protección frente al estrés del cultivo (Goswami et al., 2012). Sin embargo, las únicas colonias que lograron establecerse estaban formadas por células con morfología similar a fibroblastos (Figura 14), lo que sugiere una posible selección de tipos celulares más resistentes, pero poco representativos del tejido original. Esto plantea la necesidad de evaluar condiciones más específicas para mantener otros tipos celulares del ojo en cultivo, como células pigmentarias, que podrían tener mayor interés biológico o biomédico.

El medio de cultivo L-15 suplementado con un 20% de FBS y el filtrado de células podrían representar una combinación más favorable para mejorar la viabilidad de los cultivos celulares adultos, especialmente en las líneas celulares de cerebro y ojos (Figura 12a).

En conjunto, estos resultados sugieren que, en futuros estudios se debería considerar la identificación y uso de medios específicos y optimizados para cada tejido, enriquecidos con factores y reactivos adecuados para que favorezcan la proliferación celular y ayuden a evitar el crecimiento indeseado de agentes contaminantes. Estas mejoras podrían permitir la expansión sostenida de líneas celulares primarias derivadas de tejido cardíaco, muscular, cerebral, intestinal y ocular para aplicaciones posteriores más específicas y duraderas en cuanto a la investigación biomédica y biotecnológica.

#### **5.4. Hacia líneas celulares homogéneas en pez cebra**

Uno de los principales retos en la obtención de líneas celulares a partir de embriones de pez cebra es garantizar la uniformidad genética. En el caso de los embriones, existen métodos para el cultivo celular primario de blastómeros, pero suelen requerir grandes cantidades de embriones, resultando en cultivos celulares genéticamente heterogéneos. Esta variabilidad impide generar líneas clonales y limita su aplicación en estudios que exigen homogeneidad genética (Myhre & Pilgrim, 2010).

En este trabajo, se propuso una metodología basada en la descripción de Geyer *et al.* (2023), para generar cultivos celulares a partir de un único embrión en los distintos estadios, lo que representa un avance hacia el establecimiento de líneas celulares genéticamente homogéneas y trazables. Complementariamente, se evaluó también la obtención de cultivos a partir de órganos adultos de un solo individuo, lo que abre nuevas posibilidades para generar líneas celulares primarias que conserven la carga genética del animal de origen. Este tipo de líneas tiene un gran potencial en estudios de farmacogenómica, al permitir analizar la influencia del genoma en la respuesta individual a fármacos. Además, resultan útiles en investigaciones biomédicas para evaluar la expresión génica, su relación con enfermedades hereditarias y alteraciones celulares a lo largo del tiempo en cultivo (Arana *et al.*, 2025; He *et al.*, 2006).

En general, los cultivos celulares derivados de embriones de pez cebra presentan un bajo coste económico en sus fases iniciales, ya que requieren equipamiento básico y pocos reactivos. Además, se ajustan a los principios éticos de las 3R (sustitución, reducción y refinamiento). Su obtención a partir de embriones en estadios tempranos, su compatibilidad con formatos multipocillo y su escalabilidad para ensayos de alto rendimiento contribuyen a reducir el uso de animales vivos en la investigación científica (Arana *et al.*, 2025).

## 6. CONCLUSIONES

Este trabajo ha permitido establecer y evaluar múltiples condiciones experimentales para la generación de líneas celulares derivadas de órganos y embriones de pez cebra, con especial atención a la variabilidad según el estadio de desarrollo, el tipo de tejido y el protocolo de cultivo aplicado. A continuación, se presentan conclusiones específicas para las condiciones ensayadas:

1. Ninguna de las líneas celulares generadas logró establecerse de forma continua, ya que ninguna superó el segundo pase, lo que indica que las condiciones ensayadas no fueron suficientes para obtener cultivos celulares estables.

2. Los estadios de 50% de epibolia y yema fueron los más adecuados para el desarrollo de líneas celulares viables, alcanzando hasta 18 dps en condiciones óptimas.

3. El tratamiento enzimático con pronasa favoreció la adhesión celular inicial, aunque no se tradujo en una mayor viabilidad a largo plazo en comparación con la tripsina.

4. La fase faringular Prim-5 y los tejidos de intestino y músculo no fueron adecuados para el establecimiento de cultivos celulares debido a su alta probabilidad de contaminación en las etapas iniciales.

5. Las células derivadas del ojo fueron las más idóneas para el establecimiento de cultivos celulares adultos, manteniéndose viables durante más tiempo (8 dps) en comparación con las provenientes de otros tejidos.

6. El medio Leibovitz L-15 suplementado con 20–25% de FBS y el uso de filtrado celular favorecieron la viabilidad, tanto en líneas embrionarias como adultas. En contraste con los cultivos derivados de órganos extraídos de peces adultos, en los cultivos embrionarios se observa una proliferación mucho más eficiente y rápida, llegando a formar una monocapa bien establecida.

7. Los protocolos desarrollados son aplicables tanto a embriones como a tejidos adultos de pez cebra, independientemente de si son ejemplares salvajes y mutantes, aunque se observó una ligera ventaja en la viabilidad de las líneas derivadas de individuos salvajes.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Ablain, J., & Zon, L. I. (2013). Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 584–586. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.09.009>

Arana, Á. J., González-Llera, L., Barreiro-Iglesias, A., & Sánchez, L. (2025). Emerging Frontiers in Zebrafish Embryonic and Adult-Derived Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/ijms26094351>

Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., Price, P., Reid, Y. A., & Simione, F. (2017). Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 53(8), 669–672. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>

Bilodeau, A. R. (2024, January 1). The Pros and Cons of Adherent Versus Suspension Cell Culture. *BioPharm International*, 37, 18–22. <https://www.biopharminternational.com/view/the-pros-and-cons-of-adherent-versus-suspension-cell-culture>

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, 279(5349), 349–352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>

Chen, J. (2016). The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(3), a026104.

Ciarlo, C. A., & Zon, L. I. (2016). Embryonic cell culture in zebrafish. *Methods in Cell Biology*, 133, 1–10. <https://doi.org/10.1016/BS.MCB.2016.02.010>

Davaa, G., Kim, D. I., Buitrago, J. O., & Hong, J. Y. (2025). Optimized Protocols for the Isolation and Culture of Primary Neurons from Rat Cortex, Hippocampus, Spinal Cord, and Dorsal Root Ganglia. *Perspectives on Integrative Medicine*, 4(1), 16–27.

Driever, W., & Rangini, Z. (1993). Characterization of a cell line derived from zebrafish (*brachydanio rerio*) embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 29(9), 749–754. <https://doi.org/10.1007/BF02631432>

Fan, L., Crodian, J., & Collodi, P. (2004). Culture of Embryonic Stem Cell Lines from Zebrafish. *Methods in Cell Biology*, 76(76), 151–160. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)76009-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)76009-4)

Freshney, R. I. (2006). Basic principles of cell culture. *Culture of Cells for Tissue Engineering*, 3–22.

Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.

Ge, W. (2018). Zebrafish. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 704–710). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20618-3>

Geyer, N., Kaminsky, S., Confino, S., Livne, Z., Gothilf, Y., Foulkes, Nicholas S, & Vallone, D.. (2023). Establishment of cell lines from individual zebrafish embryos. *Laboratory Animals*, 57(5), 518–528. <https://doi.org/10.1177/00236772231157162>

Ghosh, C., & Collodi, P. (1994). Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) blastula-stage embryos. *Cytotechnology*, 14(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF00772192>

Glibert, H., Bridoux, L., Palate, M., Piget, C., Ahn, M.-T., Gualdani, R., Domínguez-Bajo, A., Clotman, F., Rijli, F. M., & Gofflot, F. (2025). Primary Cell Cultures in Neurobiology: Optimized Protocol for Culture of Mouse Fetal Hindbrain Neurons. *Cells*, 14(11), 758.

Goswami, M., Sharma, B. S., Tripathi, A. K., Yadav, K., Bahuguna, S. N., Nagpure, N. S., Lakra, W. S., & Jena, J. K. (2012). Development and characterization of cell culture systems from *Puntius (Tor) chelynooides* (McClelland). *Gene*, 500(1), 140–147. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2012.03.016>

Hasegawa, E. H., Farr III, G. H., & Maves, L. (2023). Comparison of pronase versus manual dechoriation of zebrafish embryos for small molecule treatments. *Journal of Developmental Biology*, 11(2), 16.

He, S., Salas-Vidal, E., Rueb, S., Krens, S. F. G., Meijer, A. H., Snaar-Jagalska, B. E., & Spaink, H. P. (2006). Genetic and transcriptome characterization of model zebrafish cell lines. *Zebrafish*, 3(4), 441–453.

Helmrich, A., & Barnes, D. (1998). Chapter 3 Zebrafish Embryonal Cell Culture. In H. W. Detrich, M. Westerfield, & L. I. Zon (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 59, pp. 29–37). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61818-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61818-X)

Hickman, D. L., Johnson, J., Vemulapalli, T. H., Crisler, J. R., & Shepherd, R. (2017). Chapter 7 - Commonly Used Animal Models. In M. A. Suckow & K. L. Stewart (Eds.), *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students* (pp. 117–175). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish

reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Huang, H., Lindgren, A., Wu, X., Liu, N.-A., & Lin, S. (2012). High-Throughput Screening for Bioactive Molecules Using Primary Cell Culture of Transgenic Zebrafish Embryos. *Cell Reports*, 2(3), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.015>

Iwamoto, T., Yamada, K., Shimizu, M., & Totsuka, M. (2011). Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 925–929.

Jin, Y. L., Chen, L. M., Le, Y., Li, Y. L., Hong, Y. H., Jia, K. T., & Yi, M. S. (2017). Establishment of a cell line with high transfection efficiency from zebrafish *Danio rerio* embryos and its susceptibility to fish viruses. *Journal of Fish Biology*, 91(4), 1018–1031.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

Kimmel, C. B., & Warga, R. M. (1987). Indeterminate cell lineage of the zebrafish embryo. *Developmental Biology*, 124(1), 269–280.

Koth, J., Maguire, M. L., McClymont, D., Diffley, L., Thornton, V. L., Beech, J., Patient, R. K., Riley, P. R., & Schneider, J. E. (2017). High-resolution magnetic resonance imaging of the regenerating adult zebrafish heart. *Scientific Reports*, 7(1), 2917.

Kumar, A., Singh, N., Goswami, M., Srivastava, J. K., Mishra, A. K., & Lakra, W. S. (2016). Establishment and characterization of a new muscle cell line of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vitro model for gene expression studies. *Animal Biotechnology*, 27(3), 166–173.

Lepage, S. E., & Bruce, A. E. E. (2010). Zebrafish epiboly: mechanics and mechanisms. *International Journal of Developmental Biology*, 54(8–9), 1213–1228.

Linder, S., & Marshall, H. (1990). Immortalization of primary cells by DNA tumor viruses. *Experimental Cell Research*, 191(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(90\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(90)90027-8)

Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>

Meena, L. L., Goswami, M., Chaudhari, A., Nagpure, N. S., Gireesh-Babu, P., Dubey, A., & Das, D. K. (2020). Development and characterization of a new DRCF cell line from Indian wild

strain zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1337–1347. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00792-x>

Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpet.19>

Morcillo, P., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2017). Establishment of a new teleost brain cell line (DLB-1) from the European sea bass and its use to study metal toxicology. *Toxicology in Vitro*, 38, 91–100. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2016.10.005>

Myhre, J. L., & Pilgrim, D. B. (2010). Cellular Differentiation in Primary Cell Cultures from Single Zebrafish Embryos as a Model for the Study of Myogenesis. *Zebrafish*, 7(3), 255–266. <https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0665>

Nishizawa, T., Kokawa, Y., Wakayama, T., Kinoshita, S., & Yoshimizu, M. (2008). Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(1), 19–25. <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v79/n1/p19-25/>

Orr, H. C., Baker, J., & Cheesman, J. O. (1973). Survival of animal tissue cells in primary culture in the absence of serum. *Applied Microbiology*, 25(1), 49–54. <https://doi.org/10.1128/aem.25.1.49-54.1973>

Peng, F., Liao, M., Qin, R., Zhu, S., Peng, C., Fu, L., Chen, Y., & Han, B. (2022). Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 286. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01110-y>

Peterson, R. T., & MacRae, C. A. (2012). Systematic Approaches to Toxicology in the Zebrafish. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52(1), 433–453. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134751>

Pistello, M., & Antonelli, G. (2016). Integration of the viral genome into the host cell genome: a double-edged sword. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4), 296–298. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.022>

Ruiz-Palacios, M., Almeida, M., Martins, M. A., Oliveira, M., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2020). Establishment of a brain cell line (FuB-1) from mummichog (*Fundulus heteroclitus*) and its application to fish virology, immunity and nanoplastics toxicology. *Science of The Total Environment*, 708, 134821. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134821>

Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(7), 2337–2343. <https://doi.org/10.1172/JCI60434>

Sassen, W. A., Lehne, F., Russo, G., Wargenau, S., Dübel, S., & Köster, R. W. (2017). Embryonic zebrafish primary cell culture for transfection and live cellular and subcellular imaging. *Developmental Biology*, *430*(1), 18–31. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2017.07.014>

Srila, W., Pangjantuk, A., Kunhorm, P., Chaicharoenaudomrung, N., & Noisa, P. (2024). Establishment and characterization of hTERT-immortalized porcine muscle stem cells, and their prospective uses. *Food Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10068-024-01785-9>

Stainier, D. Y. R., Lee, R. K., & Fishman, M. C. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development*, *119*(1), 31–40.

Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, *21*(1), A-3B.

Sun, L., Bradford, C. S., Ghosh, C., Collodi, P., & Barnes, D. W. (1995). ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *4*(3), 193–199. <http://europemc.org/abstract/MED/7670594>

Vallone, D., Santoriello, C., Gondi, S. B., & Foulkes, N. S. (2007). Basic Protocols for Zebrafish Cell Lines. In E. Rosato (Ed.), *Circadian Rhythms: Methods and Protocols* (pp. 429–441). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1\\_35](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1_35)

Yeh, H., De Cruz, M. A., You, Y., Ikezu, S., & Ikezu, T. (2025). Development and characterization of in vitro inducible immortalization of a murine microglia cell line for high throughput studies. *Scientific Reports*, *15*(1), 3207. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87543-1>

Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D., & Knöspel, F. (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(15), 1684–1698. <https://doi.org/10.1177/1535370216657448>

Zeng, W., Dong, H., Chen, X., Bergmann, S. M., Yang, Y., Wei, X., Tong, G., Li, H., Yu, H., & Chen, Y. (2022). Establishment and characterization of a permanent heart cell line from largemouth bass *Micropterus salmoides* and its application to fish virology and immunology. *Aquaculture*, *547*, 737427.

Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(5), a001883.