

PRODUCCION EXPERIMENTAL DE MELANOMAS CUTANEOS EN EL PEZ ESPADA, *Xiphophorus helleri* (HECKEL) Y EL PEZ PLATIS, *Xiphophorus maculatus* (GUNTHER) (PISCES POECILIIDAE)

Luis Alberto Romano y Fernando Oscar Cueva

Laboratorio de Patología Comparada y Experimental
Servicio de Patología del Hospital Israelita "Ezrah"
Terrada 1164 (1416) Buenos Aires
República Argentina

RESUMEN

Romano, L.A. y F.O. Cueva. 1987. Producción experimental de melanomas cutáneos en el pez espada, *Xiphophorus helleri* (Heckel) y el pez platis, *Xiphophorus maculatus* Günther) (pisces Poeciliidae). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 18 (2): 185 - 192

Se presenta un trabajo experimental donde se han producido melanomas cutáneos por hibridación en peces del género *Xiphophorus*. Se estudiaron 52 animales con hiperpigmentación, 21 con melanosis grado I, 25 con melanosis grado II y 6 con melanomas. Estos tumores se transmiten genéticamente por genes co-dominantes ligados al sexo. Se considera la posibilidad de que estas neoplasias sean homologables a melanomas producidos en mamíferos y humanos y se concluye que tienen similitudes, inclusive mayores que las observadas en otros modelos experimentales de melanomas. Los genes reguladores de las células melánicas están relacionados al sexo femenino, pero se manifiestan fenotípicamente, más frecuentemente en animales machos (3:1). La inclusión de una hembra albina *Xiphophorus* aumentó la incidencia de melanomas en sus hijos (de 13,3 % al 44,4 %). El crecimiento anormal de células pigmentadas en *Xiphophorus* representa un problema de regulación genética.

ABSTRACT

Romano, L.A. F.O. Cueva. 1987. Experimental production of cutaneous melanomas in swordtail fish, *Xiphophorus helleri* (Heckel) and platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Günther) (Pisces Poeciliidae). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 18 (2): 185 - 192

This is an experimental work in which we produced cutaneous melanomas by hybridization in fish pertaining to the *Xiphophorus* genus. We studied 52 animals with hyperpigmentation, 21 with grade I melanosis, 25 with grade II and 6 with melanomas. These tumors are genetically transmitted through co-dominant genes linked to sex. We considered the possibility that these neoplasias could be homologous to melanomas produced in mammals and human beings. We concluded that they are more similar than the neoplasias observed in other experimental models of melanomas. The genes regulating melanical cells are related to the female sex, but phenotypically, they are much more frequently observed in male animals (3:1). The inclusion of an albino female *Xiphophorus* increased the incidence of melanomas in her young (from 13,3 % to 44,4 %). The abnormal growing of pigmented cells in *Xiphophorus* is basically a problem of genetic regulation.

INTRODUCCION

La abundancia de células pigmentadas en la piel de los peces, determina que tengan un considerable número de tumores pigmentados como eritroforomas, xantoforomas, guanoforomas y melanomas, éstos últimos los de más alta incidencia^{8,13}.

Reed y Gordon describieron melanomas malignos producidos experimentalmente en híbridos de *Xiphophorus helleri* (pez espada verde) y *Xiphophorus maculatus* (pez platis) pertenecientes a la familia Poeciliidae, demostrando la transmisión genética ligada al sexo de estas neoplasias¹⁴.

Nuestro principal objetivo consiste en reproducir los modelos experimentales mencionados anteriormente. Incluimos una variedad albina de *Xiphophorus* lo que determina un significativo aumento de lesiones pigmentadas en sus hijos (de 13,3 0/o al 44,4 0/o).

La facilidad con que se obtuvo este modelo de melanoma, las connotaciones genéticas y la similitud morfológica y biológica con melanomas de mamíferos y humanos nos ha motivado a realizar esta comunicación que puede inducir estudios posteriores sobre la biología de los melanocitos y su crecimiento tanto normal como patológico.

MATERIAL Y METODOS

En un acuario de 160x30x40 cm que contenía agua a una temperatura de 24 ± 2 °C, equipado con filtro biológico se realizaron las siguientes cruzas:

- 1) *X. helleri* rojo hembra con *X. helleri* verde macho.
- 2) *X. helleri* verde hembra con *X. helleri* rojo macho.
- 3) *X. maculatus* con puntos hembra con *X. helleri* verde macho.
- 4) *X. helleri* verde hembra con *X. maculatus* con puntos negros macho.
- 5) Híbrido hembra de la primera generación de 4 (con melanosis grado II) con *X. helleri* verde macho.
- 6) Híbrido hembra con híbrido macho de la primera generación de 4, ambos con melanosis grado II.
- 7) *X. helleri* albino hembra con *X. maculatus* con puntos negros macho.

Cuadro 1

Número y porcentaje de lesiones pigmentadas en los diferentes lotes. *X. h. r*: *Xiphophorus helleri* rojo; *X. h. v*: *X. helleri* verde; *X. m pn*: *X. maculatus* con puntos negros; Hibr. G 1: híbridos de la primera generación; *X. h. al*: *X. helleri* alveino; Ma: macho; He: hembra; Hiperpig: hiperpigmentación.

CUADRO 1

Nº	Hembra	Macho	Alevinos	Hiperpig.	Melanomas
1	<i>X.h.r</i>	<i>X.h.v</i>	10	0	0
2	<i>X.h.v</i>	<i>X.h.r</i>	14	0	0
3	<i>X.m.pn</i>	<i>X.h.v</i>	10	5 (50 0/o)	0
4	<i>X.h.v</i>	<i>X.m.p.n</i>	15	15 (100 0/o)	2 Ma (13,3 0/o)
5	Hibr.GI	<i>X.h.v</i>	9	5 (55 0/o)	0
6	Hibr.GI	Hibr.GI	18	18 (100 0/o)	0
7	<i>X.h.al</i>	<i>X.m.pn</i>	9	9 (100 0/o)	4 3 Ma + 1 He (44,4 0/o)

Los hijos de las diferentes cruza denominados lotes N° 1-2-3-4-5-6-7, respectivamente, fueron alojados en acuarios individuales y observados hasta los 6 meses de edad. Todos los peces se alimentaron con productos balanceados convencionales.

Los animales se sacrificaron previa anestesia con benzocaína al 0,5 0/o; las muestras tisulares se fijaron en formol al 10 0/o, se incluyeron en parafina y se colorearon con hematoxilina y eosina. Algunos preparados histológicos se trataron con una solución de permanganato de potasio al 0,3 0/o con ácido sulfúrico al 0,3 0/o durante media hora y con ácido oxálico al 1 0/o durante 20 minutos para remover el pigmento melánico. Según Gordon⁴, las lesiones cutáneas hiperpigmentadas se clasificaron en: *Melanosis grado I*, macroscópicamente se observó una acentuada pigmentación de la aleta caudal sin destrucción de tejido; microscópicamente, una proliferación de células con abundante pigmento (macromelanóforos) ocupaban toda la dermis; *Melanosis grado II*, macroscópicamente además de la hiperpigmentación caudal se observó destrucción parcial o total de la aleta correspondiente sin tumoración evidente, la histología reveló una producción de macromelanóforos, melanocitos y aislados melanoblastos que infiltraban la dermis, hipodermis con incipiente infiltración muscular; *Melanoma*, macroscópicamente se observó una verdadera lesión tumoral caudal, pigmentada con destrucción de la aleta respectiva. La microscopía mostró una proliferación de macromelanóforos, melanoblastos y melanocitos atípicos que destruían la epidermis e infiltraban en profundidad hasta el tejido óseo.

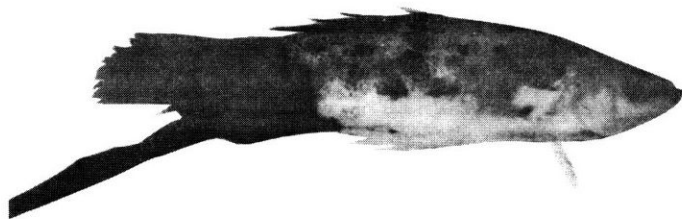


Fig. 1: Ejemplar macho del lote 7 con melanoma en región caudal que destruye e infiltra la aleta homónima extendiéndose a la espada.

RESULTADOS

En toda la experiencia se obtuvieron 52 animales con hiperpigmentación (21 con melanosis grado I, 25 con melanosis grado II y 6 con melanomas).

En los lotes 1 y 2, (Cuadro 1) no se realizó hibridación y no se hallaron lesiones cutáneas hiperpigmentadas (cruza testigo, ninguno de los animales de estas variedades de *Xiphophorus* presentaba fenotípicamente macromelanóforos).

En los animales pertenecientes al lote 3, se encontraron melanosis grado I en el 50 0/o. En el 4, 13 peces mostraron melanosis grado II y 2 machos evidenciaron melanomas (13,3 0/o).

En el 5, el 55 0/o de los peces mostraron melanosis grado I y ninguna melanosis grado II ni melanomas. En el 6, el 100 0/o de los hijos presentó melanosis, 7 de grado II y 11 de grado I, sin ningún melanoma. Por último en el 7 donde se introdujo una hembra de *X. helleri* albina, el 100 0/o de sus hijos mostraron hiperpigmentación cutánea, 5 melanosis grado II y 4 melanomas (44,4 0/o), en 3 machos y una hembra.

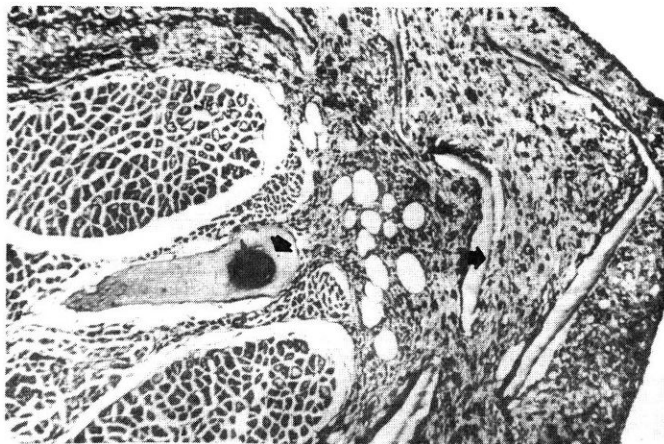


Fig. 2: Proliferación de células melánicas que destruye la epidermis e infiltran en profundidad hasta las vértebras caudales (fecha corta). Obsérvese las escamas incluidas en la masa tumoral (flecha larga) (HE 70 x).

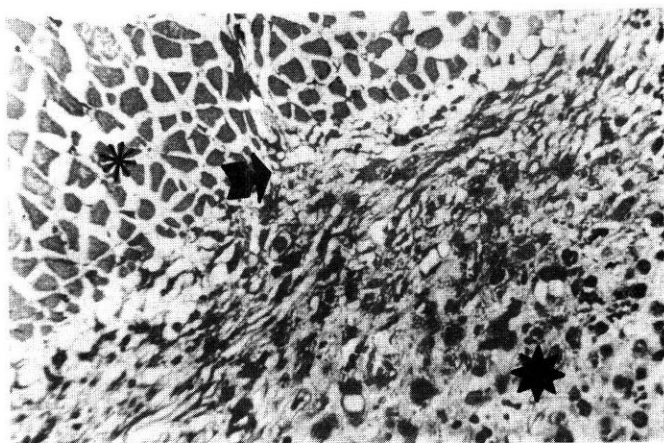


Fig. 3: Proliferación de células melánicas atípicas que ocupan en su totalidad la dermis e hipodermis infiltrando el músculo esquelético. Estrella: células neoplásicas que ocupan la dermis. Asterisco: músculo. Flecha: zona de infiltración muscular por células neoplásicas. (HE 170 x).

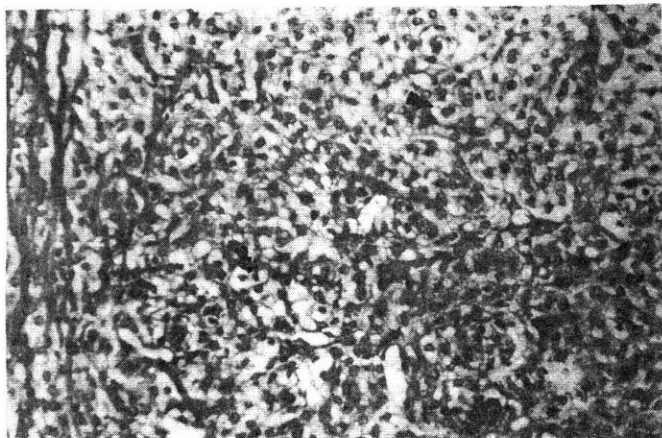


Fig. 4: Células melánicas atípicas (flecha) donde el pigmento ha sido removido. (HE 170 x).

Los peces que presentaron hiperpigmentación cutánea, lo hicieron desde su nacimiento, sin embargo los melanomas se desarrollaron después del tercer mes de vida.

Los melanomas se presentaron en todos los casos macroscópicamente, como lesiones tumorales hiperpigmentadas ubicadas en el pedúnculo caudal con infiltración y destrucción de la aleta (Fig. 1).

La observación histológica reveló un tumor constituido por una marcada proliferación de melanocitos atípicos, melanoblastos y macromelanóforos que destruían la epidermis e infiltraban la dermis, hipodermis, el músculo esquelético y en algunos casos las vértebras caudales (Figs. 2 y 3). En las áreas de menor cantidad de pigmento melánico así como en los preparados donde el pigmento fue removido, se pudo observar con mayor claridad los núcleos celulares redondos, hiper cromáticos, con cromatina densa sin nucléolos evidentes y con aisladas figuras mitóticas (Fig. 4). La mayor parte de las células fueron epitelioides, redondas u ovales, en algunos sectores se observaron células de aspecto fusiforme.

DISCUSION

La clasificación y definición de las células que contienen melanina en los diferentes vertebrados fue realizada en 1953 por Gordon y reforzada por los estudios de Fizpatrick *et al.* 1966^{3,5}. Las mencionadas células se clasificaron en melanoblastos, melanocitos, melanóforos y melanomacrófagos.

Los melanóforos son células efectoras (observadas en vertebrados inferiores) derivadas de melanocitos que contienen gran cantidad de melanosomas y pigmento melánico.

En peces del género *Xiphophorus* se encuentran todos los tipos de células antes mencionadas, la pigmentación del animal es el resultado de la presencia de 2 tipos de melanóforos. Los micromelanóforos son células estrelladas de aproximadamente 100 micrones de diámetro, se encuentran normalmente en la dermis, meninges, peritoneo, retina y rodeando estructuras vasculares y los macromelanóforos, son células mucho más grandes (300 micrones de diámetro) ubicadas solamente en la dermis⁴. La distribución de los macromelanóforos está controlada por uno a cinco genes ligados al sexo. Uno de los puntos que se discuten es si estas neoplasias representan verdaderos melanomas homologables a los observados en mamíferos, incluso en humanos, ya que la presencia de melanóforos en peces hace confundir su interpretación.

En cultivos de tejidos, los melanóforos, aparecen como un estado terminal de la maduración del melanocito⁷. Los trasplantes y la observación de regeneración de melanomas demostraron que los melanóforos son formados por melanocitos que envejecen y que luego de un tiempo se desintegran siendo su contenido eliminado por macrófagos (melanomacrófagos)^{2,11}.

En melanomas de *Xiphophorus*, se ha podido comprobar, que la mayor actividad metabólica corresponde a los melanocitos, que, además, presentan un significativo aumento de la síntesis de ADN, lo que indica que son éstas las células que marcan el comportamiento biológico de la neoplasia^{9,10}.

Los melanomas presentan una población más rica en melanocitos y melanoblastos que las melanosis donde las células que predominan son macromelanóforos. Por otra parte, la actividad mitótica es privativa de los melanocitos y melanoblastos y nunca se observan macromelanóforos en mitosis.

En *Xiphophorus* se han descrito casos de melanomas amelanóticos donde no se observan macromelanóforos y la lesión está constituida exclusivamente por melanocitos y melanoblastos¹⁷.

Los estudios ultraestructurales demuestran similitud morfológica entre melanomas de *Xiphophorus* y humanos¹⁵.

Los cultivos de tejidos demuestran semejanza entre melanomas de peces, ratones y humanos⁶.

Por último, los estudios comparados entre melanomas de *Xiphophorus*, inducidos por DMBA en hamster, transplantados del ratón Cloudman S91 y humanos, demostraron gran similitud, inclusive el de los peces resultó tener mayor parecido morfológico al humano que el de los otros modelos experimentales¹⁶.

Por los trabajos mencionados creemos que estas lesiones pueden ser catalogadas como verdaderos melanomas, posiblemente producidos por una desdiferenciación de los macromelanóforos en melanocitos y/o por una multiplicación rápida de melanocitos que no permiten que se diferencien en melanóforos.

Los factores genéticos son de importancia fundamental en el comportamiento biológico de las células pigmentadas en peces del género *Xiphophorus*. Algo similar puede ocurrir en los casos de melanomas familiares observados en el hombre^{1,12}.

De las 8 especies conocidas de *Xiphophorus*, 5 (*X. helleri*, *X. maculatus*, *X. montesumae*, *X. milleri* y *X. variatus*) poseen macromelanóforos y tienen una variedad de genes co-dominantes ligados al sexo, que determinan la forma de distribución de los mismos. De estos factores genéticos depende la pigmentación de la aleta y pedúnculo caudal, las bandas pigmentadas de los flancos y el tamaño y número de puntos negros del cuerpo. Cuando por hibridación, los genes que controlan los macromelanóforos de *X. maculatus* se introducen en el genoma del *X. helleri*, el crecimiento de las células pigmentadas se altera, determinando la producción de melanosis y melanomas.

Nosotros utilizamos la variedad *X. maculatus* con puntos negros y notamos una marcada diferencia de pigmentación según el sexo del animal cruzado. Cuando *X. maculatus* fue hembra se produjo solamente melanosis grado I en el 50 0/o de sus hijos (lote 3); cuando utilizamos un macho (lote 4), hallamos un 13,3 0/o de melanomas y el resto de los hijos mostraron melanosis grado II; los melanomas se hallaron en 2 machos. Por lo observado, podemos deducir que el factor genético regulador de los macromelanóforos está relacionado al sexo femenino, pero se manifiesta con predominancia, al menos fenotípicamente, en machos.

La hibridación con *X. helleri* albino hembra fue realizada por Gordon⁴. Nosotros, al igual que en el trabajo de éste autor, incrementamos cuanti y cualitativamente las lesiones pigmentadas utilizando en la crua una hembra albina (lote 7). Encontramos hiperpigmentación en el 100 0/o de sus hijos y melanomas en el 44,4 0/o, con predomino 3:1 en machos. No encontramos una explicación satisfactoria para este fenómeno. Lo que sabemos, es que el *X. helleri* albino, fenotípicamente no presenta ningún tipo de melanóforo, sin embargo genotípicamente tiene un factor dominante para micromelanóforos, la falta de expresión fenotípica de estas células se debe a la presencia de un factor recesivo homocigoto inhibidor de la melanina. Los híbridos de la crua de *X. helleri* albino hembra y *X. maculatus* con puntos negros tienen tanto macro como micromelanóforos. La introducción de factores genéticos reguladores de los macromelanóforos de *X. maculatus* en su genoma, aumentaría la actividad proliferativa melanocítica.

REFERENCIAS

1. Anderson, D.E. 1971. Clinical characteristics of the genetic variety of cutaneous melanoma in man. *Cancer*, 21:721-725.
2. Ermin, R. & M. Gordon. 1955. Regeneration of melanomas in fishes. *Zoologica* (New York) 40:53-58.
3. Fitzpatrick, T.B., W.C. Quevedo, A.L. Levene, V.J. McGovern, I. Miyama & A.G. Oettle, 1966. Terminology of vertebrate melanin containing cells. *Science*, 152:88-95.
4. Gordon, M. 1941. Genetics of Melanomas in Fishes. V The Reappearance of Ancestral micromelanophores in offspring of parents lacking these cells. *Cancer Res.* 1:656-659.
5. Gordon, M. 1959. The melanoma cell as an incompletely differentiated pigment cell (p.215). En: Gordon, M. (Ed.): Pigment Cell Biology. New York and London, *Academic Press* 825p.
6. Grand, C.G., M. Gordon & G. Cameron, 1941. Neoplasm studies VIII. Cell types in tissue culture of fish melanotic tumors compared with mammalian melanomas. *Cancer Res.* 1:660-666.
7. Greenberg, S.S., M.J. Kopac & M. Gordon, 1956. Cytology and Cytochemistry of melanoma cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 67:55-58.
8. Haddow, A. & I. Blake, 1933. Neoplasms in fish: A report of six cases with a summary of literature. *J. Pathol. Bacteriol.* 36:41-46.

9. Humm, D.G. & E.E. Clark, 1955. The metabolism of melanomas in Platyfish-Swordtail hybrids. *J. Nat. Cancer Inst.* 16:741-757.
10. Ishikawa, T., K. Sakakibara, K. Kuramado, H. Shimada & K. Yamaguchi, 1975. Morphologic and microspectrophotometric studies on spontaneous melanomas in *Xiphophorus helleri*. *J. Nat. Cancer Inst.* 54:1773-1776.
11. Kallman, K.D. & M. Gordon, 1957. Transplantation of potentially and definitive melanomatous fins in hybrid fishes of strain. *Sd. Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2:220-224.
12. Kopf, A.W., M. Mintzis, W.R.N. Grier, D.N. Silvers & R.S. Bart, 1976. Familial malignant melanoma. *Cutis* 17:873-876.
13. Mawdesley-Thomas, L.E. 1969. Neoplasia in fish—A bibliography. *J. Fish Biol.* 1:187-191.
14. Redd, H.D. & M. Gordon, 1931. The morphology of melanotic overgrowths in hybrids of Mexican killifishes. *Am. J. Cancer* 15:1524-1537.
15. Riehl, R. y M. Scharl, 1984. Evaluation of freeze-etching for the investigation of malignant melanoma in fish. *Men* 3:41-44.
16. Sobel, H.J., E. Marquet, K.D. Kallman & G.J. Corley, 1975. Melanomas in Platy/Swordtail Hybrids (p.945-981) En: Ribelin, E.V. y G. Migaki (Eds): The Pathology of Fishes *The University of Wisconsin Press.* 1004p.
17. Vielkind, J., U. Vielkind & F. Anders, 1971. Melanotic and amelanotic melanomas in *Xiphophorus* fish. *Cancer Res.* 31:868-875.

Recibido / Received / : 18 febrero 1988