

UCH-FC
MAB-BMCN
P 349
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y
FARMACOLÓGICA DE LA INFLAMACIÓN AGUDA EN
EL PEZ CEBRA**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología
Molecular, Celular y Neurociencias

Por
Oscar Andrés Peña Cabello
Septiembre, 2012
Santiago – Chile
Director de Tesis: Dr. Miguel Allende C.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

Oscar Andrés Peña Cabello

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de Tesis, como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 13 de junio de 2012.

Director de Tesis

Dr. Miguel Allende Connelly

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian González

Dra. Verónica Palma





Adoro su amor porque es una incertidumbre, porque se decide cada segundo, porque sus besos saben a convicción y en su seno late la libertad inmarcesible. Adoro su amor porque elige quedarse, porque escoge amar, porque arriesga todo y no escatima nada. Amo su amor porque mira el riesgo y decide seguir adelante, aspira el aire frío y ya es incapaz de temer, porque se arroja sin dudar a lo desconocido, porque se bate antes y después de la frontera, porque es ingenuo y no ciego, inocente y no insulso, apasionado y no irracional, porque es hermoso y a la vez aterrador.

A Paula, por la (e)lección de la libertad

AGRADECIMIENTOS

Uno quisiera decir simplemente “¡gracias totales!”, pero ante el riesgo de enterrar en el olvido a quienes hicieron tal vez más que yo por mi tesis, intentaré aquí hacer lo que muchas veces hice en los pastos con cervezas: agradecer.

Al Dr. Allende por la (injustificada) confianza que depositó en mí y en especial, la paciencia cuyos límites (pese a nuestros esfuerzos) no hemos visto aún. Y más aún, por la enseñanza permanente de su ejemplo, que ocupa la mayor parte de mis apuntes.

A mis compañeros de laboratorio, los de ayer y los de hoy. En particular, a Nicole que (conscientemente o no) confió en ese proyecto; y al Dr. Glavic, que me permitió llevar mi ignorancia a su laboratorio (y se bancó las preguntas, claro), y que deliberadamente o no, me empujó a ir por más.

Finalmente, a Paula, con la que comparto mis sueños y proyectos, que escuchó cada una de mis elucubraciones sobre la inmunidad, y que sugirió varios de estos experimentos. Pero por sobre todo, por la lección viva de la perseverancia, de la observación y el análisis; por el modelo de la convicción, la consecuencia y la responsabilidad totales.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	v
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xii
Resumen	xv
Abstract	xvii
I. Introducción	1
1.1.1 La inflamación inducida por daño tisular	1
1.1.2 El pez cebra como modelo de estudio de la inflamación	2
1.1.3 Antecedentes de la inducción de inflamación en larvas expuestas a CuSO ₄	4
1.2 La resolución de la inflamación	6
1.3 Señalización PI3K/Akt en la inflamación	9
1.4 La metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación	12
II. Hipótesis y Objetivos	16
2.1 Hipótesis	16
2.2 Objetivos	16
III. Materiales y Métodos	17
3.1 Material biológico	17
3.2 Reactivos	18
3.3 Protocolo de daño a los neuromastos con CuSO ₄	19
3.4 Ensayos con drogas	20
3.5 Metodología automatizada de inflamación	22
3.6 Tinción Sudan Black	23
3.7 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	23
3.8 Hibridación <i>in situ</i>	25
3.9 Irradiación de embriones	27
3.10 Adquisición y Procesamiento de Imágenes	28





3.11 Análisis estadístico	29
IV. Resultados	30
4.1 Inflamación provocada por daño con CuSO ₄	30
4.1.1 Migración de leucocitos mieloides a los neuromastos dañados con CuSO ₄	30
4.1.2 Cuantificación del reclutamiento de células inmunes a la línea lateral	35
4.1.3 Evaluación del efecto de moléculas de actividad antiinflamatoria	42
4.1.4 Metodología automatizada de detección de actividad antiinflamatoria	52
4.2 Resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	60
4.2.1 Migración de leucocitos mieloides desde los neuromastos dañados con CuSO ₄ durante la resolución de la inflamación	60
4.2.2 Curso temporal de la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	63
4.3 Rol de PI3K/Akt en la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	70
4.3.1 Efecto de la inhibición farmacológica de PI3K durante la inflamación	70
4.3.2 Activación de Akt inducida por daño con CuSO ₄	73
4.3.3 Efecto de la inhibición farmacológica de Akt durante la inflamación	80
4.3.4 Efecto de la inhibición farmacológica de PI3K durante la resolución de la inflamación	81
4.4 Metaloproteinasas de matriz 9 (MMP9) en la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	84
4.4.1 Inducción de la expresión de <i>mmp9</i> en larvas expuestas a CuSO ₄	84
4.4.2 Inducción de MMP9 en los neuromastos de larvas expuestas a CuSO ₄	86
4.4.3 Inducción de MMP9 en neutrófilos de larvas expuestas a CuSO ₄	89

4.4.4 Inhibición farmacológica de MMP9 durante la inflamación inducida con CuSO ₄	90
V. Discusión	95
5.1 Modelo de inflamación inducida por daño con CuSO ₄ a los neuromastos	96
5.1.1 Aspectos mecanísticos de la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	98
5.1.1.1 Rol del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	98
5.1.1.2 Rol de las ciclooxigenasas (COX)	99
5.1.1.3 Rol de <i>c-met</i> en la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	101
5.1.1.4 Otras proteínas involucradas en el proceso de inflamación	103
5.1.2 La inflamación inducida por daño con CuSO ₄ entre otros modelos de inflamación en pez cebra	104
5.1.3 Metodología automatizada de detección de actividad antiinflamatoria	106
5.1.4 Otras aplicaciones del ensayo de inflamación inducido por daño con CuSO ₄	108
5.2 Resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	111
5.3 Rol de PI3K/Akt en la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	117
5.4 Rol de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	122
VI. Conclusiones	130
VII. Bibliografía	132
VIII. Material Suplementario	143
8.1 Figuras Suplementarias	143
8.2 Tabla Suplementaria	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Suplementaria I. Detección de actividad antiinflamatoria.

160



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de la vía de señalización PI3K/Akt y sus efectos en células inmunes.	11
Figura 2. Distribución espacial de las células inmunes en larvas expuestas a CuSO ₄	31
Figura 3. Colocalización de leucocitos reclutados y neuromastos dañados con CuSO ₄	33
Figura 4. Cuantificación de leucocitos reclutados a la línea lateral después de distintos tratamientos con CuSO ₄	39
Figura 5. Cuantificación de leucocitos infiltrados en la línea lateral después de tratamientos con metales pesados y neomicina	42
Figura 6. Efecto de inhibidores de COX en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO ₄	46
Figura 7. Efecto de inhibidores de <i>c-met</i> en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO ₄	48
Figura 8. Efecto de moléculas moduladoras de GR y JNK en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO ₄	50
Figura 9. Efecto de moléculas moduladoras de PPAR γ y HIF-1 α en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO ₄	52
Figura 10. Metodología de evaluación automatizada de actividad antiinflamatoria	55
Figura 11. Comparación entre las metodologías manual y automatizada de detección de actividad antiinflamatoria	58
Figura 12. Resolución de la inflamación inducida por daño a los neuromastos con CuSO ₄	61
Figura 13. Curso temporal del número de leucocitos en el miosepto de larvas expuestas a CuSO ₄ durante la resolución	65
Figura 14. Comparación del reclutamiento de leucocitos cuantificado en larvas transgénicas <i>BACmpx::GFP</i> y <i>lysC::EGFP</i>	66
Figura 15. Comparación de leucocitos de larvas transgénicas <i>Tg(lysC::DsRED2;</i>	69

<i>BACmpx::GFP</i>) en distintas fases de la resolución	
Figura 16. Disminución del reclutamiento de leucocitos por inhibición farmacológica de PI3K en larvas expuestas a CuSO ₄	72
Figura 17. Activación de Akt en larvas expuestas a CuSO ₄ en presencia de inhibidores de PI3K y <i>c-met</i>	76
Figura 18. Activación de Akt en neutrófilos	79
Figura 19. La inhibición farmacológica de Akt no tiene efecto sobre el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO ₄	81
Figura 20. Efectos de la inhibición farmacológica de PI3K en la resolución de la inflamación	83
Figura 21. Inducción de la expresión de <i>mmp9</i> en larvas expuestas a CuSO ₄	86
Figura 22. Inducción de la expresión de MMP9 en neuromastos de larvas expuestas a CuSO ₄	88
Figura 23. Inducción de MMP9 en neutrófilos	90
Figura 24. Disminución del reclutamiento de neutrófilos por inhibición farmacológica de MMP9 en larvas expuestas a CuSO ₄	92
Figura 25. Efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en la sensibilidad de las células ciliadas a CuSO ₄	94
Figura Suplementaria 1. Migración de los leucocitos hacia los neuromastos dañados con CuSO ₄	143
Figura Suplementaria 2. Infiltración de los leucocitos en los neuromastos dañados con CuSO ₄	143
Figura Suplementaria 3. Muerte de células ciliadas inducida por daño con CuSO ₄	143
Figura Suplementaria 4. Cuantificación de leucocitos reclutados en larvas expuestas a H ₂ O ₂	144
Figura Suplementaria 5. Cuantificación por <i>Sudan Black</i> del reclutamiento de leucocitos al miosepto	145
Figura Suplementaria 6. Número de neutrófilos reclutados al miosepto en función de la concentración de CuSO ₄	146

Figura Suplementaria 7. Efecto de la inhibición farmacológica de COX-2 en el reclutamiento de leucocitos a la línea lateral inducido por daño con CuSO ₄	147
Figura Suplementaria 8. Efecto de la inhibición farmacológica de <i>c-met</i> en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO ₄	148
Figura Suplementaria 9. Resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO ₄ por migración de neutrófilos	149
Figura Suplementaria 10. Decaimiento exponencial del número de células inmunes en el miosepto durante la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO ₄	149
Figura Suplementaria 11. Expresión diferencial de proteínas reporteras en leucocitos.	150
Figura Suplementaria 12. Dependencia lineal del número promedio de leucocitos reclutados y la concentración de LY294002	151
Figura Suplementaria 13. Efecto de la inhibición farmacológica de PI3K en la migración del primordio	152
Figura Suplementaria 14. Disminución del reclutamiento de neutrófilos en larvas preincubadas con inhibidores farmacológicos de PI3K	153
Figura Suplementaria 15. Activación de Akt en neutrófilos	154
Figura Suplementaria 16. Inducción de la expresión de <i>mmp9</i> en larvas expuestas a CuSO ₄ 50 μM por 2 horas	155
Figura Suplementaria 17. Inducción de la expresión de <i>mmp9</i> en embriones expuestos a radiación ionizante	156
Figura Suplementaria 18. Expresión de MMP9 en las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral posterior	157
Figura Suplementaria 19. Efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en el reclutamiento de neutrófilos tras 40 minutos de exposición a CuSO ₄	158
Figura Suplementaria 20. Evaluación del efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en la angiogénesis	159

LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME, 2-metoxiestradiol
ADAM, *a disintegrin and metalloproteinase*
Akt, *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*
ALL, *anterior lateral line*
ANOVA, *analysis of variance*
ASK1, *apoptosis signal-regulating kinase 1*
BAD, *Bcl-2 antagonist of cell death*
BSA, *bovine serum albumin*
CAM, *computer aided microscopy*
CHT, *caudal hematopoietic tissue*
COX, *ciclooxigenasa*
CTAP-III, *connective tissue activating peptide III*, también conocida como CXCL7
CXCL6, *chemokine (C-X-C motif) ligand 6*, también conocida como GCP-2
CXCL8, *chemokine (C-X-C motif) ligand 8*, también conocida como IL-8
DiOC6, *ioduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina*
DMSO, *dimetilsulfóxido*
DPI, *diphenyleneiodonium*
Duox, *dual oxidase*
EGFP, *enhanced green fluorescent protein*
GCP-2, *granulocyte chemotactic protein 2*, también conocida como CXCL6
GFP, *green fluorescent protein*
GR, *glucocorticoid receptor*
GRO- α , también conocida como CXCL1
GSK3, *glycogen synthase kinase 3*
HGF, *hepatocyte growth factor*
hpf, *horas post fertilización*
hpt, *horas post tratamiento*
ICM, *intermediate cellular mass*

IL-8, *interleukin-8*, también conocida como CXCL8
ISV, *intersegmental vessels*
JNK, *c-Jun N-terminal kinase*
MAPK, *mitogen activated protein kinase*
Mkp-1, *MAPK phosphatase 1*
MMP13, *matrix metalloproteinase 13*
MMP9, *matrix metalloproteinase 9*
MMPs, *matrix metalloproteinases*
mpx, *peroxidasa mioide*
mTOR, *mammalian target of rapamycin*
NADPH, *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido*
NE, *neutrophil elastase*
NF- κ B, *nuclear factor κ B*
NK, *natural killer*
NOS, *nitric oxide synthase*
PDK, *phosphoinositide-dependent kinase*
PF-4, *platelet factor 4*, también conocida como CXCL4
PFK2, *6-phosphofructo-2 kinase*
PG, *prostaglandina*
PH, *Pleckstrin Homology domain*
PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*
PIP₃, *fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato*
PKB, *protein kinase B*, también conocida como Akt.
PLL, *posterior lateral line*
PPAR- γ , *peroxisome proliferator –activated receptor- γ*
PTEN, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*
RAC-PK, *protein kinase related to protein kinases A and C*
RFP, *red fluorescent protein*
ROS, *reactive oxygen species*
S6K, *S6 kinase*

TGF- β 1, *transforming growth factor – β 1*

TIMPs, *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*

TLR, *Toll-like receptor*

VEGF, *vascular endothelial growth factor*

RESUMEN

La inflamación es una respuesta del sistema inmune al daño tisular y a la presencia de patógenos, muy importante para mantener la homeostasis del tejido. La inflamación se caracteriza por la infiltración de leucocitos en el tejido dañado que son reclutados por moléculas proinflamatorias, como el peróxido de hidrógeno, citoquinas y quimioquinas. Sin embargo, es necesario detener la respuesta inflamatoria para restaurar las funciones normales del tejido y restringir el daño tisular. La resolución de la inflamación es un proceso activo en el que mediadores endógenos detienen el reclutamiento de leucocitos al tejido dañado, revierten la vasodilatación y la permeabilidad celular. Los leucocitos apoptóticos son removidos por células fagocíticas y el tejido es reparado o regenerado, según la magnitud del daño.

Usando el pez cebra, mostramos un modelo de inflamación inducida por daño a los neuromastos de la línea lateral. La exposición de larvas a concentraciones subletales de CuSO_4 daña las células ciliadas de los neuromastos, induciendo el reclutamiento de leucocitos a la línea lateral, que migran intersticialmente desde la ICM a los neuromastos dentro de los primeros 20 minutos. Este modelo de inflamación permitió desarrollar un ensayo de inflamación capaz de detectar efectos inmunomodulatorios de moléculas, aplicable también a la detección de mutantes. En esta dirección, desarrollamos una metodología automatizada basada en este ensayo de inflamación que adquiere imágenes de las larvas y cuantifica la respuesta inflamatoria automáticamente.

A continuación estudiamos el proceso de resolución de la inflamación, que se prolonga por varias horas, en el que neutrófilos y otros leucocitos reclutados a la línea lateral migran retrógradamente hacia la ICM y el borde dorsal, abandonando paulatinamente los neuromastos.

El modelo de inflamación inducida por daño con CuSO_4 permitió estudiar el rol de PI3K y MMP9 en la inflamación. PI3K participa en la migración de los leucocitos durante la inflamación. Durante la inflamación se produce la activación de Akt en los neutrófilos, posiblemente dependiente de PI3K, pero su actividad no parece ser necesaria para el reclutamiento. Finalmente, estudiamos el rol de MMP9 en la inflamación, que es inducida a nivel de transcrito y de proteína durante la inflamación en neutrófilos y otros tipos celulares. Experimentos de inhibición farmacológica muestran que MMP9 está involucrada en el reclutamiento de neutrófilos a los neuromastos dañados.

ABSTRACT

Inflammation is a response by the immune system to tissue damage and the presence of pathogens, which is critical for maintaining tissue homeostasis. Inflammation is characterized by the infiltration of leukocytes into damaged tissue that are recruited by pro-inflammatory molecules such as hydrogen peroxide, cytokines and chemokines. However, it is necessary to arrest the inflammatory response to restore normal tissue function and restrict tissue damage. Resolution of inflammation is an active process in which endogenous mediators stop the recruitment of leukocytes to the damaged tissue, reverse vasodilation and restore cell permeability. Apoptotic leukocytes are removed by phagocytic cells and tissue is repaired or regenerated, depending on the extent of damage.

Using zebrafish, we introduce a new model of inflammation induced by damage to the lateral line neuromasts. Larval exposure to sublethal concentrations of CuSO_4 damages the hair cells of the neuromasts, inducing the recruitment of leukocytes to the lateral line, which migrate interstitially from the ICM to neuromasts within 20 minutes. This model allowed the development of an inflammation assay capable of detecting effects of immunomodulatory molecules, also applicable to the detection of mutants. In this direction, we developed an automated methodology based on this inflammation assay that acquires images of the larvae and automatically quantifies the inflammatory response.

We also studied the process of resolution of inflammation, which lasts for several hours, in which neutrophils and other leukocytes recruited to the damaged lateral line migrate retrogradely to the ICM and the dorsal ridge, gradually abandoning the neuromasts.

The model of inflammation induced by damage with CuSO₄ allowed the study of the role of PI3K and MMP9 in inflammation. PI3K is involved in leukocyte migration during inflammation. During inflammation, Akt activation in neutrophils occurs, possibly dependent on PI3K, but its activity does not appear to be necessary for recruitment. Finally, we studied the role of MMP9 in inflammation, which is induced at the levels of both transcript and protein during inflammation in neutrophils and other cell types. Pharmacological experiments show that MMP9 participates in the recruitment of neutrophils to damaged neuromasts.

I. INTRODUCCIÓN

1.1.1 La inflamación inducida por daño tisular

La inflamación es una respuesta beneficiosa que contribuye a la mantención de la homeostasis de los tejidos. El daño tisular, la muerte celular y la presencia de patógenos detonan la respuesta inflamatoria, que se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos (o células polimorfonucleadas) y macrófagos al sitio del daño, vasodilatación y cambios en la permeabilidad celular (McDonald and Kubes, 2011). La generación de un gradiente de peróxido de hidrógeno (Niethammer et al., 2009), la liberación de componentes celulares de las células dañadas (McDonald and Kubes, 2011), y la presencia de citoquinas y quimioquinas (Eming et al., 2007; McDonald and Kubes, 2011) contribuyen al reclutamiento de leucocitos al tejido dañado. Atraídos por estas señales, los neutrófilos de la circulación extravasan y migran intersticialmente al sitio del daño, allí se agregan con plaquetas y liberan moléculas que refuerzan aún más el reclutamiento de neutrófilos e inician la coagulación (Kobayashi et al., 2005; Eming et al., 2007; McDonald and Kubes, 2011). Posteriormente, los neutrófilos reclutados liberan moléculas antimicrobianas, entre ellas ROS, péptidos catiónicos, proteasas y eicosanoides (Kobayashi et al., 2005; Eming et al., 2007) que eliminan patógenos y además parte del tejido. En este sentido, se ha mostrado que en algunos casos de lesión, la eliminación de parte de los neutrófilos acelera la reparación del tejido (McDonald and Kubes, 2011), lo que podría explicarse por la disminución del daño tisular como consecuencia del reducido número de neutrófilos. En la mayor parte de los casos, los neutrófilos son posteriormente fagocitados por macrófagos residentes en el tejido, sin

embargo, en los casos en que el daño persiste, se reclutan macrófagos desde la circulación (Eming et al., 2007; Mosser and Edwards, 2008). Los macrófagos son atraídos por moléculas quimioattractantes liberadas en el sitio del daño por plaquetas atrapadas, queratinocitos en estado de proliferación al borde de la herida, fibroblastos y los leucocitos reclutados (Eming et al., 2007; Mosser and Edwards, 2008). Tras la extravasación, los macrófagos se activan, adquieren un fenotipo totalmente maduro (Mosser and Edwards, 2008) y migran hacia el tejido dañado donde fagocitan patógenos, células necróticas, y también otros leucocitos (Eming et al., 2007).

1.1.2 El pez cebra como modelo de estudio de la inflamación

El pez cebra (*Danio rerio*) ofrece diversas ventajas como modelo de estudio. Se trata de un vertebrado de tamaño reducido, de corto tiempo de generación, cuyos embriones y larvas son transparentes (Aleström et al., 2006). Además, con una sola pareja de adultos es posible obtener aproximadamente 200 huevos en un día, y el desarrollo temprano ha sido muy bien caracterizado (Kimmel et al. 1995). De especial importancia en la aplicación del pez cebra como modelo al estudio de la inmunidad innata, es la presencia de un sistema inmune innato desarrollado durante los primeros estadios larvales, de modo que es posible estudiar el sistema inmune innato en ausencia del sistema inmune adaptativo, que se desarrolla posteriormente (Carradice and Lieschke, 2008). La transparencia de las larvas, combinada con la existencia de un gran número de líneas transgénicas que en las que diversos tipos de células inmunes expresan

proteínas reporteras, permite realizar análisis *in vivo* de la respuesta inmune (Renshaw & Trede 2012).

Existen diversos estudios del proceso de inflamación inducido por daño tisular realizados en pez cebra (Renshaw et al. 2006; Mathias et al. 2006; Hall et al. 2007; Yoong et al. 2007; Zhang et al. 2008; Cvejic et al. 2008; Yoo et al. 2010; Loynes et al. 2010; Yoo & Huttenlocher 2011), en los que se muestra el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos a tejidos dañados mediante diversas técnicas de inducción de daño. Se ha utilizado un corte del segmento distal de la aleta caudal posterior con un escalpelo como método de inducción de la inflamación (Renshaw et al. 2006; Yoong et al. 2007; Loynes et al. 2010; Elks et al. 2011). De hecho, el corte en la cola de las larvas induce la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al borde de la herida por la enzima Duox, que genera un gradiente de H_2O_2 requerido para el reclutamiento de leucocitos a la herida (Niethammer et al., 2009). En su mayoría, los leucocitos salen de la circulación cercana, en la punta de la cola, y migran con alta direccionalidad al área dañada. Alrededor de 6 horas después de realizado el corte, se observa un máximo de leucocitos infiltrados en el sitio dañado (Renshaw et al. 2006; Zhang et al. 2008), que gradualmente disminuyen en número durante el proceso de resolución que procede después (Renshaw et al. 2006; Loynes et al. 2010). También se han utilizado como modelos de inflamación, una incisión en la zona ventral de la aleta caudal (Mathias et al., 2006) y heridas realizadas con un láser en células pigmentadas en la CHT (Yoo et al., 2010). En todos los casos, las metodologías descansan en el principio de que un daño tisular localizado, induce una respuesta inflamatoria en la que se reclutan células inmunes. En términos de

magnitud del daño tisular causado, los modelos utilizados van desde la amputación de grandes porciones del tejido de la cola (Renshaw et al. 2006; Yoong et al. 2007; Zhang et al. 2008) a lesiones de unas pocas células (Yoo et al., 2010). No obstante las diferencias de magnitud en el daño causado, en todos los casos se observa un rápido reclutamiento de células inmunes.

1.1.3 Antecedentes de la inducción de inflamación en larvas expuestas a CuSO₄

En nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo de daño a los neuromastos de la línea lateral, basado en la exposición a CuSO₄, como modelo de estudio de la regeneración de órganos sensoriales. La línea lateral es un sistema mecanosensorial presente en peces y anfibios, involucrado en una serie de comportamientos, como la detección de presas y la conducta sexual (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2007). La línea lateral se compone órganos discretos, los neuromastos, que se disponen alrededor de la cabeza, formando la línea lateral anterior (ALL), y a lo largo del tronco y la cola, formando la línea lateral posterior (PLL) (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2007). Los neuromastos son grupos de células embebidos en la epidermis en cuyo centro hay células ciliadas que extienden sus cilios hasta el exterior (Chitnis et al., 2011). Las células ciliadas de los neuromastos del pez cebra son muy similares a las células ciliadas del oído de los mamíferos. Sin embargo, mientras las células ciliadas de los neuromastos del pez cebra son capaces de regenerar tras ser dañadas (Harris et al. 2003; Hernández et al. 2006), las del oído de los mamíferos, no. Como parte del estudio de la regeneración

de los órganos sensoriales, en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo de daño a los neuromastos (Hernández et al. 2006; Olivari et al. 2008) para el estudio de su regeneración posterior (Hernández et al. 2006; Hernández et al. 2007), basado en la exposición de las larvas a concentraciones subletales de CuSO_4 . Las larvas expuestas a CuSO_4 muestran edemas en los neuromastos, muerte de las células ciliadas y desorganización de la estructura de los neuromastos (Hernández et al. 2006). A mayores concentraciones de CuSO_4 los efectos de la exposición son aún más graves, al punto que no se observa regeneración de las células ciliadas (Olivari et al., 2008).

Estos antecedentes sugieren que el protocolo de daño a los neuromastos con CuSO_4 podría ser a la vez un modelo de daño tisular localizado, en el que probablemente se induce una respuesta inmune, como se ha observado en otros modelos de inflamación basados en el daño tisular. En este sentido, se ha reportado la presencia de macrófagos en el miosepto de larvas de pez cebra (Mathias et al., 2009), y además, evidencia preliminar obtenida en larvas de medaka (*Oryzias latipes*) sugiere que tras la exposición a CuSO_4 se produce el reclutamiento de macrófagos a los neuromastos de la línea lateral posterior (Pedro Hernández, comunicación personal). En el nivel de la expresión génica, experimentos de microarreglos muestran que numerosos genes relacionados a la inmunidad son expresados específicamente por las células de la línea lateral posterior (Gallardo et al., 2010), lo que sugiere la posibilidad de que la línea lateral sea un órgano relevante en términos inmunes, o bien es frecuentado por células inmunes en una suerte de “monitoreo”. Por otro lado, experimentos de microarreglos realizados en larvas expuestas a CuSO_4 muestran un significativo enriquecimiento en genes relacionados a la

inmunidad entre los genes sobreexpresados en las larvas expuestas a CuSO₄ (Viviana Gallardo, comunicación personal; Peña, 2011). Además de la sobreexpresión de un grupo significativo de genes relacionados a la inmunidad en larvas expuestas a CuSO₄, el patrón de expresión de algunos genes, como *mmp9*, que se expresa en grupos de células a lo largo del miosepto (Peña, 2011), sugiere que ante la exposición a CuSO₄ el daño a los neuromastos induce una respuesta inmune.

1.2 La resolución de la inflamación

Por mucho tiempo se pensó que una vez que una respuesta inflamatoria neutraliza los patógenos o el estímulo que la inició, la inflamación decae lentamente como consecuencia del catabolismo de los mediadores proinflamatorios que la iniciaron (Gilroy et al., 2004; Serhan et al., 2007). Por el contrario, la resolución de la inflamación es un proceso activo y altamente coordinado controlado por señales “pro-resolución” endógenas que detienen el reclutamiento de leucocitos al sitio inflamado, revierten la vasodilatación y la permeabilidad celular, llevando paulatinamente a la restitución de la función fisiológica del tejido (Gilroy et al., 2004). En este sentido, el proceso de resolución de la inflamación es de gran importancia porque limita el daño tisular e impide la inflamación crónica. En los casos en los que el daño tisular es ligero, las células necróticas son reemplazadas por otras células del mismo tipo en un proceso conocido como regeneración, mientras que en los casos en que el daño es extenso, se produce la reparación del tejido. En el proceso de reparación, se produce un tejido

inicialmente vascularizado con capilares, fibroblastos y leucocitos, conocido como tejido de granulación. Con el tiempo, los fibroblastos depositan colágeno y los capilares desaparecen, dejando una matriz extracelular densa no vascularizada con muy pocas células (una cicatriz), proceso conocido como fibrosis (Gilroy et al., 2004). Así, mientras la regeneración lleva a la restitución de la función fisiológica del tejido inflamado, la reparación por granulación y fibrosis conduce a la formación de una cicatriz, un tejido no vascularizado en el que no se restituye la totalidad de las funciones del tejido antes de la inflamación. Así, en enfermedades en las que existen defectos en el proceso de resolución de la inflamación o bien se producen focos de inflamación aguda anormalmente frecuentes, como la artritis reumatoide y el asma, el proceso de resolución de la inflamación es de vital importancia (Gilroy et al., 2004).

En mamíferos, el programa celular de la resolución de la inflamación es iniciado por los neutrófilos (células polimorfonucleadas) que entran en apoptosis. Los neutrófilos apoptóticos son reconocidos y fagocitados por macrófagos, en un proceso conocido como esferocitosis, lo que además de permitir la remoción de los neutrófilos gatilla cambios en la señalización inflamatoria en los macrófagos, que empiezan a abandonar el sitio de la inflamación migrando hacia el drenaje linfático, el destino más frecuente de los macrófagos inflamatorios (Serhan and Savill, 2005; Filep and El Kebir, 2009; Kebir and Filep, 2010). Además, la fagocitosis de células apoptóticas estimula en los macrófagos la liberación de mediadores que suprimen la respuesta inflamatoria, como en el caso de TGF- β 1 (*transforming growth factor - β 1*), cuya secreción es capaz de suprimir la señalización proinflamatoria de los receptores tipo Toll (TLR) (Serhan and

Savill, 2005). Los estudios de la resolución de la inflamación realizados en pez cebra muestran similitudes y diferencias respecto de la resolución en mamíferos. Si bien se ha reportado la apoptosis de neutrófilos durante la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra (Loynes et al., 2010; Elks et al., 2011), el comportamiento más frecuente de los neutrófilos durante la resolución parece ser la migración retrógrada (Mathias et al. 2006; Hall et al. 2007). Este comportamiento parece estar relacionado con la magnitud del daño tisular que indujo la condición de inflamación. Así, en un modelo de inflamación en el que se realiza una incisión en la zona ventral de la aleta caudal no se observó apoptosis de leucocitos (Hall et al. 2007), mientras que en un modelo de inflamación en el que se corta la parte distal de la aleta caudal de las larvas, se observó apoptosis en un 4,4 % de los neutrófilos durante la inflamación (Loynes et al., 2010). Así, la migración retrógrada de los neutrófilos durante la resolución es mucho más frecuente en pez cebra, y ha sido observada en todos los modelos de inflamación mencionados (Mathias et al. 2006; Hall et al. 2007; Loynes et al. 2010; Elks et al. 2011). En todos los trabajos citados en que se estudia la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra se induce la inflamación por un daño tisular provocado mecánicamente. Esto trae algunas desventajas de reproducibilidad y ha mantenido restringido el tipo de tejido en el que se induce la inflamación a los tejidos de las aletas. La inducción de daño tisular con CuSO_4 supone la posibilidad de estudiar la resolución de la inflamación en un tejido en el que hay órganos sensoriales, los neuromastos, cuya regeneración depende, como se ha visto en los mamíferos (Gilroy et al., 2004), de la detención oportuna de la señalización proinflamatoria y la retirada de las células inmunes reclutadas.

1.3 Señalización PI3K/Akt en la inflamación

Las PI3Ks (*phosphoinositide 3-kinases*) conforman una familia de kinasas evolutivamente conservadas que usan lípidos como sustrato. Las PI3Ks regulan un gran número de respuestas celulares fundamentales, como la proliferación, protección de la apoptosis, producción de superóxido, migración celular, y adhesión (Lindemans and Coffey, 2004). Las proteínas Akt (también conocidas como PKB, *protein kinase B*, y RAC-PK, *protein kinase related to protein kinases A and C*) son serina/treonina kinasas que comparten una estructura común que consiste en un dominio regulatorio en el extremo N-terminal (PH), una región bisagra que conecta el dominio PH y el dominio de actividad kinasa con especificidad serina/treonina y una región en el extremo C-terminal requerida para la inducción y mantenimiento de la actividad kinasa (Franke et al., 2003).

PI3K (ver Figura 1) regula numerosas respuestas celulares a través de la producción de PIP3 (fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato), que activa proteínas como las PDKs (*phosphoinositide-dependent kinases*), Akt y las S6Ks (*S6 kinases*). Se genera fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato a partir de fosfatidilinositol (4, 5)-bisfosfato a través de fosforilación en la posición 3' por PI3Ks que se encuentran en la membrana unidas a receptores asociados a proteína G o a receptores tirosina-kinasa (Sasaki et al., 2000). Una vez producido PIP3 (fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato), Akt se le une a través de su dominio PH (*pleckstrin homology domain*) ubicándose así en la membrana celular (Zhu et al. 2006). Ya en la membrana, Akt puede ser activada por fosforilación por otras kinasas, entre ellas PDK1 (*phosphoinositide dependent kinase 1*) y mTOR, para luego fosforilar sus numerosos blancos celulares (Franke et al., 2003). Tras la activación, Akt

fosforila gran número de proteínas, incluyendo varias asociadas con las vías de muerte/sobrevivida celular como BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*), caspasa 9, ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) y NF- κ B (*nuclear factor κ B*), disminuyendo la muerte celular por apoptosis (Zhu et al. 2006). La activación de Akt también modifica la actividad de algunas enzimas, como las isoformas de GSK3, que son inhibidas, y por otro lado, PFK2 (*6-phosphofructo-2 kinase*) y NOS (*nitric oxide synthase*), que son activadas tras la activación de Akt (Franke et al., 2003).

PI3K tiene múltiples roles tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Respecto del sistema inmune innato, experimentos en mamíferos han mostrado que pese a que ratones *knock-out* para diversas subunidades de PI3K no muestran problemas de desarrollo en las células inmunes, PI3K juega un rol en la funcionalidad de neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK (Koyasu, 2003). En los neutrófilos, PI3K participa en la migración inducida por quimioattractantes (Sasaki et al., 2000), además, sus productos son necesarios para la polarización celular durante la migración (Koyasu, 2003; Yoo et al., 2010; Rickert et al., 2010). Numerosos receptores de superficie de los neutrófilos están acoplados a procesos dependientes de PI3K, como la quimiotaxis, fagocitosis, extravasación, generación de protrusiones, y la generación de ROS (Koyasu, 2003; Kulkarni et al., 2011). Además, se ha establecido que PI3K y Akt participan en la inhibición del programa apoptótico en los neutrófilos, y que la desactivación de Akt, a causa de una reducción en los niveles de PIP3, induce la apoptosis de los neutrófilos (Zhu et al. 2006; Xu et al. 2010). Estos resultados permiten

sugerir un rol para la desactivación de la señalización PI3K/Akt en la apoptosis de los neutrófilos durante la resolución de la inflamación (Figura 1).

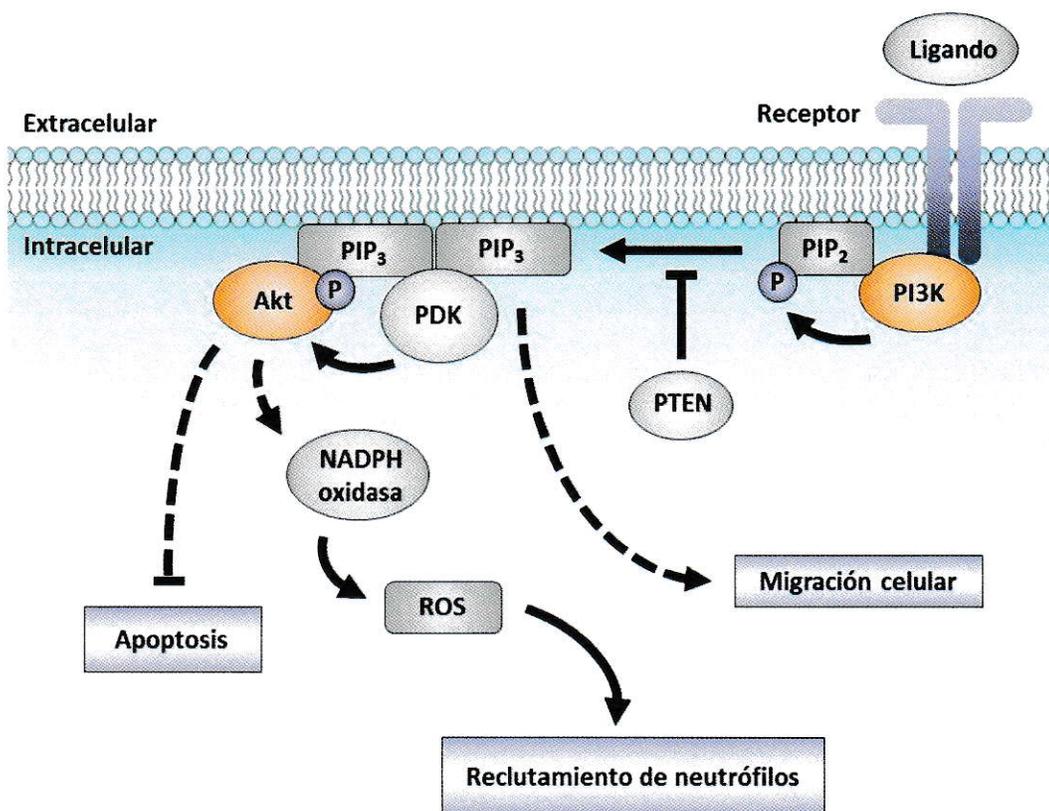


Figura 1. Esquema simplificado de la vía de señalización PI3K/Akt en neutrófilos y sus efectos en células inmunes. Los óvalos anaranjados representan componentes de la vía estudiados en este trabajo, los óvalos grises representan componentes de la vía que no fueron estudiados, y los recuadros morados representan procesos relacionados a la respuesta inmune regulados por la vía PI3K/Akt. Akt, proteína kinasa B; P, fosforilación; PDK, *phosphoinositide-dependent kinase*; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; PIP₂, fosfatidilinositol (4, 5)-bifosfato; PIP₃, fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato; PTEN, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; y ROS, *reactive oxygen species*. Basado en Sasaki et al., 2000 y Rickert et al., 2010.

Evidencia de experimentos de microarreglos realizados en nuestro laboratorio muestra la sobreexpresión de genes que codifican varias subunidades de PI3K, Akt y también otras proteínas río abajo de PI3K y Akt en larvas expuestas a CuSO₄ (Viviana Gallardo, comunicación personal; Peña, 2011). Estos datos sugirieron la activación de la señalización vía PI3K/Akt en respuesta a la exposición a CuSO₄. En este sentido, los antecedentes mencionados antes que sugieren una respuesta inflamatoria inducida por el daño tisular ocasionado por la exposición a CuSO₄, abren la posibilidad de plantear la hipótesis de una activación de la señalización PI3K/Akt en el contexto de una respuesta inflamatoria. Así, durante el curso de este trabajo se reportó en experimentos en pez cebra la participación de PI3K en la migración de los neutrófilos, en particular en la extensión de protrusiones y la polarización celular (Yoo et al., 2010).

1.4 La metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación

Las metaloproteinasas de matriz o matrixinas (MMP) forman una familia de enzimas relacionadas, probablemente producto de duplicación génica (Opdenakker et al., 2001), que son un subgrupo de la superfamilia de las metaloproteinasas, la cual también incluye, entre otras, a las proteinasas ADAM (Parks, 1999). La familia de las metaloproteinasas de matriz incluye 25 productos génicos en los vertebrados, de los cuales 24 están presentes en mamíferos (Parks et al., 2004). Todas las metaloproteinasas de matriz comparten una estructura básica que consiste en un pro-dominio de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos con la secuencia consenso PRCXXPD, y

un dominio catalítico con la secuencia HEXXHXXGXXH cuyos residuos histidina coordinan un ion zinc (Zn^{2+}) (Parks et al., 2004).

La metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9, también conocida como gelatinasa B) es la metaloproteínasa de matriz más compleja en términos de estructura: posee además un péptido señal que la destina al espacio extracelular, un dominio similar a fibronectina y un dominio similar a colágeno tipo V rico en serina, prolina y treonina que probablemente es el sitio de unión para múltiples oligosacáridos (Opdenakker et al., 2001). MMP9 es también una de las metaloproteínasas de matriz cuya actividad está más estrictamente controlada. La transcripción del gen *mmp9* está controlada por diversas citoquinas e interacciones celulares; la activación de la pro-enzima está regulada por una cascada de enzimas que comprende serin-proteasas y otras metaloproteínasas de matriz; y la actividad de la enzima activa es regulada por inhibidores tisulares específicos de las MMPs (TIMPs) e inhibidores inespecíficos, como la α_2 -macroglobulina, y por glicosilaciones (Opdenakker et al., 2001; Parks et al., 2004). El principal sustrato de MMP9 (EC 3.4.24.35) es el colágeno degradado, por eso se la denomina también gelatinasa B, sin embargo se han descrito otros sustratos, como TGF- β 1 latente, la forma latente de VEGF, fibrina, α 1-antiproteínasa, GRO- α , CTAP-III, PF-4 y GCP-2 (Van Den Steen et al. 2000; Opdenakker et al. 2001; Van den Steen et al. 2003; Parks et al. 2004).

En condiciones normales, MMP9 es expresada principalmente por neutrófilos, sin embargo, en condiciones de inflamación y en diversas patologías es expresada por otros tipos celulares, como monocitos, linfocitos, células dendríticas, fibroblastos y

células tumorales (Opdenakker et al., 2001). Mientras en los neutrófilos la expresión de MMP9 es constitutiva, en los otros tipos celulares mencionados su expresión es inducible por moléculas bacterianas (como lipopolisacáridos), virales (como el RNA de doble hebra), vegetales (como lectinas y forbol ésteres), y citoquinas (como IL-8) (Opdenakker et al., 2001). En los neutrófilos, que maduran desde células troncales de la médula, la expresión de MMP9 es un marcador tardío y específico dentro de la maduración de los neutrófilos. MMP9 es almacenada en gránulos en el citoplasma de los neutrófilos maduros. En condiciones de inflamación, los neutrófilos degranulan rápidamente liberando al espacio extracelular la MMP9 almacenada en el espacio de pocas horas (Opdenakker et al., 2001).

En pez cebra, se mostrado la expresión de transcritos de *mmp9* en neutrófilos (Yoong et al., 2007; Mathias et al., 2009) y también se ha reportado la inducción de la expresión de *mmp9* en condiciones de inflamación (Yang et al. 2007; Yoong et al. 2007; Yoshinari et al. 2009; Volkman et al. 2010; D'Alençon et al. 2010¹). Además, evidencia de nuestro laboratorio procedente de experimentos de microarreglos realizados con larvas expuestas a CuSO₄ muestran una significativa sobreexpresión de *mmp9*. Estos datos permiten sugerir la inducción de *mmp9* en respuesta a la exposición a CuSO₄ y además un rol conservado de MMP9 en la inflamación en pez cebra, tal como se ha reportado en mamíferos (Parks, 1999; Opdenakker et al., 2001; Parks et al., 2004).

¹ Parte de los resultados de esta tesis se han publicado en el artículo de d'Alençon *et al.* (2010).

Por lo tanto, los antecedentes hasta aquí presentados en relación a la inducción de una respuesta inflamatoria por daño tisular en diferentes modelos y los efectos de la exposición a sulfato de cobre en larvas de pez cebra, nos permiten plantear la siguiente hipótesis.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

“La exposición de larvas de pez cebra a CuSO_4 induce una respuesta inmune innata que puede aplicarse al desarrollo de un método de *screening* de moléculas inmunomoduladoras y al estudio de proteínas involucradas en la inflamación, como PI3K/Akt y MMP9”

2.2 Objetivos

1. Estudiar la inflamación en el sistema de la línea lateral.
2. Desarrollar un ensayo para evaluar la inhibición de esta inflamación con moléculas.
3. Estudiar la activación de la vía de señalización PI3K/Akt durante la inflamación
4. Estudiar el rol de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

En todos los experimentos descritos se utilizaron larvas de pez cebra (*Danio rerio*, *Telostei*, *Cyprinidae*) obtenidas de forma natural, realizando cruces de peces adultos. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28 °C, pH y conductividad regulados, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (Westerfield, 2000). Para realizar cruces, se separaron los machos de las hembras una noche antes y se reunieron la mañana siguiente en el momento en que la luz del vivero se enciende. De esta manera, es posible controlar el momento aproximado de la fertilización. Los estadios de las larvas fueron determinados como se ha descrito previamente (Kimmel et al. 1995) y se expresan en horas post fertilización (hpf) o días post fertilización (dpf). Las larvas se mantuvieron en incubadoras a 28 °C, en placas Petri en medio E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13 mM; MgSO₄ 0,33 mM). Todos los animales sujetos a experimentación fueron anestesiados con MS - 222 (tricaina; A5040; Sigma, Saint Louis, MO, USA).

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas de peces: AB (silvestre), *casper* (White et al. 2008), Tg(*fli1::EGFP*) (Lawson and Weinstein, 2002), Tg(*cldnB::GFP*) (Haas and Gilmour, 2006), Tg(*cxcr4b::RFP*) (Gamba et al., 2010), Tg(*BACmpx::GFP*) (Renshaw et al. 2006), Tg(*Brn3c::mGFP*) (Xiao et al., 2005), *SqET4* (Parinov et al., 2004), Tg(*lyz::EGFP*)*nz117* y Tg(*lyz::DsRED2*)*nz50*, llamadas aquí *lysC::EGFP* y *lysC::DsRED2*, respectivamente (Hall et al. 2007).

3.2 Reactivos

Para las incubaciones en CuSO_4 , una solución *stock* 10 mM de CuSO_4 (sulfato de cobre II pentahidrato, 102780; Merck) fue preparada antes de cada experimento en agua bidestilada. Del mismo modo se prepararon soluciones *stock* de CdCl_2 (CB236; Matheson, Coleman & Bell) de concentración 10 mM. Adicionalmente, se utilizó ZnSO_4 (ZI-1705, Winkler S.A.), NiSO_4 (72280, Sigma), AgNO_3 (101512, Merck), neomicina (N1876, Sigma), y ioduro de 3,3'- dihexiloxacarbocianina, o DiOC_6 , comprado a Interchim, Montluçon, Francia (FP-46764A).

Se probaron las siguientes moléculas antiinflamatorias: de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA), *ibuprofen* (70280), *diclofenac* (70680), *aspirin* (70260), *indomethacin* (70270), *trans-resveratrol* (70675), *rosiglitazone* (71740), *mifepristone* o RU-486 (10006317), *sulindac* (10004386), NS – 398 (70590) y SP600125 (10010466). De Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): *dexamethasone* (D1756) e hidrocortisona (H4001). Se utilizaron también inhibidores de *c-met*: K252a (420297, Calbiochem), *Met inhibitor I* (448101, Calbiochem) y *Met inhibitor II* (448102, Calbiochem). Además se utilizaron inhibidores de PI3K, *wortmannin* (9951S, Cell Signaling) y LY294002 (9901S, Cell Signaling); de Akt, *Akt inhibitor X* (124020, Calbiochem); y de MMP9, *MMP-9 inhibitor I* (444278, Calbiochem). También se utilizó la droga antitumoral 2-Metoxiestradiol, 2-ME, gentilmente proporcionado por el Dr. Gareth Owen.

3.3 Protocolo de daño a los neuromastos con CuSO₄

Se utilizaron larvas transgénicas *BACmpx::GFP*, *lysC::EGFP* y *lysC::DsRED2* cuyos leucocitos expresan proteínas reporteras fluorescentes. Las larvas fueron mantenidas en grupos de 50 en placas de Petri (10 cm) hasta el momento indicado en cada caso (en general, 56 hpf en los ensayos de inflamación, y 72 hpf en los de resolución de la inflamación). En los ensayos se utilizaron sólo aquellas larvas que eclosionaron espontáneamente, ya que el uso de pinzas y enzimas para decorionar causa inflamación espontánea en una fracción de las larvas. Además, para los ensayos se descartaron todas las larvas aparentemente atrasadas en su desarrollo o con anomalías morfológicas. Las larvas así seleccionadas fueron transferidas en grupos de 15-20 larvas a placas de 6 pocillos (M8562; Sigma) en un volumen de 6 mL de solución de E3 (500 µL en el caso de los experimentos de las Figuras 24 y 25, y las Figuras Suplementarias 19 y 20). El CuSO₄ fue agregado directamente desde la solución *stock* a los pocillos, y se realizaron incubaciones de entre 20 minutos y 2 horas, todas a 28 °C.

En los experimentos de inflamación, se realizaron conteos o se fijaron las larvas inmediatamente después del período de incubación en CuSO₄. Mientras que en los experimentos de resolución de la inflamación (sección 4.2), tras la incubación en CuSO₄ las larvas fueron sometidas a lavados exhaustivos con E3, para eliminar todo rastro del CuSO₄, y luego fueron incubadas en E3 a 28 °C por tiempos variables en cada caso. En los experimentos en los que se realizaron conteos *in vivo*, las larvas fueron anestesiadas con MS – 222, y montadas en un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus) en

medio E3. En el caso de los experimentos en que se realizaron conteos en larvas fijadas, se transfirieron las larvas a tubos de microcentrífuga y se incubaron por 1 hora en paraformaldehído 4% (v/v) (1.04005.1000, Merck) a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST (PBS+Tween-20 0,1% (v/v)), y se realizaron los conteos en un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus) dentro de las 24 horas siguientes, para evitar errores provenientes de la disminución de la señal fluorescente. Durante todo el proceso de fijación, las larvas fueron mantenidas en oscuridad para evitar la pérdida de la señal de las proteínas fluorescentes. Las células marcadas fueron contadas dentro de una franja de 10 diámetros celulares centrada en el miosepto horizontal, desde el primer somito hasta el final de la cola (ver Figura 4a) por uno de los costados en cada larva.

3.4 Ensayos con drogas

Todos los fármacos e inhibidores utilizados en este trabajo fueron preparados de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes en soluciones *stock* de acuerdo a su solubilidad en etanol o DMSO (317275, Merck). Para evitar la oxidación de los compuestos, el DMSO usado fue purgado con nitrógeno gaseoso durante 2 minutos. Las soluciones *stock* de los inhibidores fueron guardadas a -20 °C en oscuridad hasta su uso, para lo cual fueron descongeladas inmediatamente antes de ser agregadas al medio de las larvas (E3). Los controles positivos y negativos de los experimentos con inhibidores

contenían DMSO a la mayor concentración usada en las condiciones experimentales con inhibidor.

En los ensayos de inflamación con inhibidores, se realizó una preincubación de 30 minutos a 1 hora según se indica en cada experimento, y luego se agregó el CuSO_4 directamente a los pocillos con las larvas control y experimentales. La incubación con CuSO_4 se extendió por 40 minutos, tras lo cual se anestesiaron las larvas y se contó el número de leucocitos *in vivo* en una lupa de fluorescencia o, en otros casos, las larvas fueron fijadas en paraformaldehído 4% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente directamente después de la exposición a CuSO_4 . Luego las larvas fueron sometidas a 3 lavados de 5 minutos con PBST y se contó el número de leucocitos a lo largo del miosepto (ver Figura 4a) usando un estereoscopio de fluorescencia. Durante todo el proceso de fijación y los lavados siguientes larvas fueron mantenidas en oscuridad para evitar la disminución de la señal de las proteínas fluorescentes.

En los ensayos de resolución con inhibidores, las larvas fueron expuestas a CuSO_4 por 2 horas, luego fueron lavadas con E3 exhaustivamente para eliminar las trazas de CuSO_4 y finalmente fueron incubadas con los inhibidores por períodos de hasta 6 horas. Cada 2 horas se anestesió un grupo de larvas y se contó el número de leucocitos en un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus).

3.5 Metodología automatizada para la cuantificación de la inflamación

Para los ensayos automatizados de inflamación, se utilizaron larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; cldnB::GFP)*, de 56 hpf. Las larvas fueron anestesiadas con MS – 222 0.02 % y dispuestas individualmente en placas de 384 pocillos. Luego se inició la preincubación reemplazando el medio por una solución de E3, MS – 222 y DMSO o la molécula a estudiar (E3 + MS – 222 0.02 % + DMSO 1 %), y la placa se incubó a 28 °C durante 30 minutos. Después de la preincubación en las moléculas en estudio, se inició la inducción de la inflamación añadiendo CuSO_4 a una concentración final de 10 μM , y se incubó la placa por 40 minutos a 28 °C. A continuación se realizó la adquisición de imágenes en un microscopio *Olympus Scan^R high-content screening* (Olympus Biosystems, Munich, Alemania) equipado con una cámara digital DB-1, Olympus Biosystems. Las imágenes fueron procesadas usando LabView Vision AI (National Instruments, Munich, Alemania). El procesamiento de imágenes, identificación de neuromastos, generación de las imágenes de superposición de canales y cuantificación fueron realizados usando módulos del programa LabView especialmente desarrollados para ese propósito en el laboratorio del Dr. Urban Liebel (Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe, Alemania). Brevemente, el programa para identificar los neuromastos recibía la fotografía de un neuromasto de una larva transgénica *cldnB::GFP* y la utilizaba como modelo para buscar neuromastos en las imágenes en el canal verde adquiridas en el experimento. Todas zonas de las imágenes adquiridas que compartían un alto porcentaje de identidad con el neuromasto modelo

eran identificadas como neuromastos. Luego se cuantificaba la intensidad de fluorescencia en el canal rojo (leucocitos) dentro de las áreas previamente identificadas.

3.6 Tinción Sudan Black

En los experimentos con tinción Sudan Black (380B, Sigma) se utilizaron larvas mutantes *casper* (White et al. 2008), un doble mutante *nacre* y *roy*, que no exhiben pigmentación superficial. A las 56 hpf, las larvas fueron incubadas, como se describe anteriormente (sección 3.3), en presencia o no de CuSO_4 10 μM durante 2 horas. Luego fueron fijadas en paraformaldehído 4% por 2 horas a temperatura ambiente, incubadas por 20 minutos en el reactivo Sudan Black, y después lavadas 3 veces en etanol 70% (v/v) a temperatura ambiente con agitación suave. Tras una incubación en etanol 70% (v/v) por toda la noche, las células marcadas fueron contadas como se describe anteriormente (sección 3.3), observando en campo claro con un estereoscopio (MVX10, Olympus).

3.7 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunohistoquímica las larvas fueron fijadas en paraformaldehído 4% en PBS por 45 minutos a temperatura ambiente, y luego deshidratadas en metanol 100% a -20 °C por al menos una noche. Luego las larvas fueron rehidratadas con 2 lavados de 15 minutos con PBST, e incubadas por 15 minutos

en proteinasa K (30 µg/mL). A continuación, las larvas fueron fijadas con paraformaldehído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente y después sometidas a 4 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente las larvas fueron incubadas por 1 hora en agua destilada, para luego ser incubadas por 7 minutos en acetona a -20 °C y después sometidas a 4 lavados de 5 minutos con PBST. Tras esto se agregó la solución de bloqueo (DMSO 1 %(v/v); BSA 1%(p/v); y tritón X-100 0,1 %(v/v) en PBS), en la que las larvas fueron incubadas de 3 a 5 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación en solución de bloqueo, ésta fue descartada y se agregó el anticuerpo primario anti-Akt fosforilado (9271S, Cell Signaling) disuelto en solución de bloqueo (1:50) y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave. Después, se descartó la solución con anticuerpo primario y se lavaron las larvas 4 veces con PBST por 20 minutos, tras lo cual se agregó el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo (1:200 para *anti-rabbit IgG - peroxidase*) y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave. Una vez terminada la incubación en anticuerpo secundario, se realizaron 4 lavados de 20 minutos con PBST, luego se utilizó el kit ImmPACT DAB (SK-4105, Vector) para realizar la tinción con DAB siguiendo las indicaciones de los fabricantes. La adquisición de imágenes se realizó en un estereoscopio (MVX10, Olympus) en campo claro provisto de una cámara (Micropublisher 3.3, QImaging).

En el caso de los experimentos de inmunofluorescencia, las larvas fueron fijadas con paraformaldehído 4% por 2 horas a temperatura ambiente, lavadas 3 veces en PBST por 5 minutos e incubadas en solución de bloqueo durante 3 a 5 horas a temperatura ambiente. Luego se descartó la solución de bloqueo, se agregaron los anticuerpos

primarios en solución de bloqueo (1:200 para anti-MMP-9, 95131, AnaSpec; anti-Tubulina Acetilada, T7451, Sigma; 1:200 para *anti-GFP Mouse*, MAB 3580, Chemicon; y 1:50 para anti-Akt fosforilado, 9271S, Cell Signaling) y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave. A continuación, se descartó la solución con anticuerpos primarios y se realizaron 4 lavados con PBST de 30 minutos cada uno a temperatura ambiente. Luego se agregaron los anticuerpos secundarios (Alexa 488, A11029, Invitrogen; y Alexa 546, A11010, Invitrogen) disueltos en solución de bloqueo y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave en oscuridad. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 30 minutos en PBST, tras lo cual se realizó la adquisición de imágenes en un microscopio invertido de epifluorescencia (Zeiss Axiovert 200M).

3.8 Hibridación *in situ*

Se fijaron larvas de 58 hpf controles y tratadas con CuSO₄ 10uM por 2 horas, en solución de PFA al 4 %(p/v) en PBS a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, las larvas se deshidrataron en metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un cambio de metanol 100% y se incubaron a -20 °C durante toda la noche. Luego se rehidrataron durante 5 minutos en 75% metanol/25% PBS, 5 minutos en 50% metanol/50% PBS, 5 minutos en 25% metanol/75% PBS y 4 veces durante 5 minutos en PBST. Se eliminaron los pigmentos tratando las larvas con solución de blanqueo (SSC 0,5 X, formamida 5 %(v/v), y peróxido de hidrógeno al 10 %(v/v)). Las larvas se incubaron en esta solución 10 - 30 minutos expuestas a la luz, de modo que el peróxido

de hidrógeno reacciona y decolora los pigmentos de las larvas. Luego se realizaron tres lavados con PBST durante 5 minutos cada uno. Las larvas se trataron luego durante 20 minutos a temperatura ambiente con 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteinasa K en PBS. Después se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBST para detener la digestión. Para volver a fijar los tejidos, las larvas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% (p/v) en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una en PBST. A continuación las larvas se incubaron con solución de hibridación (formamida, SSC 5 X; heparina 50 $\mu\text{g/mL}$; RNA de Tórula 500 $\mu\text{g/mL}$; Tween-20 0,1 %(v/v)) a 70 °C durante 30 minutos y luego de hacer un recambio de la solución, se incubó toda la noche con las ribosondas-DIG. Éstas fueron previamente denaturadas durante 30 minutos a 70 °C para luego incubar las larvas con las sondas toda la noche a 70 °C.

Para el lavado de las sondas todas las soluciones se precalentaron a 70 °C y luego se incubaron las larvas 10 minutos en formamida/SSC 2X al 75%, luego durante 10 minutos en formamida/SSC 2X al 50% y 10 minutos en formamida/SSC 2X al 25%, 10 minutos en SSC 2X y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2X. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos, las larvas se incubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (DMSO 1 %(v/v); BSA 1%(p/v); y tritón X-100 0,1 %(v/v) en PBS), a temperatura ambiente y luego de un recambio de la solución se dejó durante dos horas a 4 °C. En forma independiente, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:2000) debe incubarse a 4°C mientras las larvas se están bloqueando a 4°C, para luego incubar las larvas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Mannheim, Alemania). El lavado del anticuerpo se realizó 5 veces durante 20 minutos

cada una con PBST y 3 veces durante 5 minutos cada una en solución AP (MgCl_2 50 mM; NaCl 100 mM; Tris 100 mM; Tween-20 0,2 % (v/v); pH 9,5). Finalmente, la tinción de las larvas se realizó con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP BM, Purple AP Substrate en oscuridad y durante el tiempo necesario para que apareciera la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión del mRNA. Finalmente, se eliminó el exceso de tinción lavando las larvas 3 veces durante 5 minutos en PBST. También en este caso, la adquisición de imágenes se realizó en un estereoscopio (MVX10, Olympus) en campo claro provisto de una cámara (Micropublisher 3.3, QImaging).

3.9 Irradiación de embriones

En los experimentos de irradiación de embriones, se utilizó una fuente de cobalto (^{60}Co) de la Fundación Arturo López Pérez, modelo Theratron Phoenix 127 de Theratronics, previamente calibrada usando dosímetros termoluminiscentes TEF-100. Embriones de 3 hpf fueron dispuestos en placas de Petri e irradiados simultáneamente, en tiempos ascendentes, de modo que una vez cumplida la dosis de cada grupo de embriones, era retirado de la sala de irradiación. En todos los casos, el campo de irradiación fue de $35 \times 35 \text{ cm}^2$, la distancia de fuente de superficie de 80 cm y la profundidad de cálculo de 1 cm. Las dosis administradas a los embriones variaron de 4 Gy a 20 Gy, y fueron calculadas con un 0.1% de error usando el programa Theraplan Plus versión 3.5.

3.10 Adquisición y Procesamiento de Imágenes

Para la adquisición de imágenes *in vivo* se utilizó un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus) provisto de una cámara (Micropublisher 3.3, QImaging) o un microscopio confocal Leica SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). En el caso de las imágenes obtenidas *in vivo* con estereoscopio de fluorescencia (Figuras 2a-d, 12, y Figuras Suplementarias 8, 11, 13, y 20), las larvas fueron anestesiadas con MS – 222 y montadas en E3. Para las imágenes obtenidas *in vivo* con microscopio confocal (Figura 2, e-j), las larvas fueron anestesiadas con MS – 222 y montadas en agarosa de bajo punto de fusión 1,5 %(v/v) (peqGOLD 35-2099; PEQ-LAB Biotechnologie, Erlangen, Alemania) disuelta en E3.

En los experimentos de microscopía de tiempo extendido se utilizó un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus), un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiovert 200M), y un microscopio confocal Leica SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). En los experimentos de microscopía en tiempo extendido realizados en un estereoscopio de epifluorescencia (Figura Suplementaria 9) las larvas fueron anestesiadas y montadas en E3 con MS – 222 1 %(v/v), concentración establecida como la menor dosis a la que se obtiene un bloqueo significativo de los movimientos de las larvas. En el caso de los experimentos realizados en microscopio de epifluorescencia (Figura Suplementaria 1) y microscopio confocal (Figuras Suplementarias 2 y 3), las larvas fueron anestesiadas y montadas en agarosa de bajo punto de fusión 1,5 %(v/v) disuelta en medio E3. En el caso de la Figura Suplementaria 1, antes de ser montadas para la adquisición de imágenes, las larvas fueron incubadas en DiOC₆ (1:3000, de una

solución *stock* 1 mg/mL) por 5 minutos y luego sometidas a 3 lavados de 5 minutos en E3, en oscuridad.

Todas las imágenes fueron procesadas usando el programa Image J (versión 4.2, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) con el *plugin* TurboReg (Thévenaz et al., 1998), Zeiss Axiovision (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Alemania) y Adobe Photoshop (San José, CA, USA).

3.11 Análisis estadístico

Los datos son presentados como promedios \pm error estándar, y el número de replicados de cada experimento se indica en la leyenda de cada figura. El análisis estadístico fue realizado usando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). El nivel de probabilidad para la significación estadística fue $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Inflamación provocada por daño con CuSO₄²

4.1.1 Migración de leucocitos mieloides a los neuromastos dañados con CuSO₄

Con el objetivo evaluar la hipótesis de que el daño a los neuromastos ocasionado por la exposición a CuSO₄ (Olivari et al. 2008; Hernández et al. 2006) ocasiona una respuesta inmune, se observó, usando líneas transgénicas de pez cebra, el comportamiento de los leucocitos mieloides de larvas expuestas a CuSO₄. Se utilizaron larvas transgénicas que portan el promotor de peroxidasa mieloides o lisozima C dirigiendo la expresión de GFP o DsRED2 en leucocitos mieloides, *BACmpx::GFP* (Renshaw et al. 2006) y *lysC::DsRED2* (Hall et al. 2007), respectivamente. En la Figura 2 se muestran larvas transgénicas expuestas a 10 μM CuSO₄ durante 2 horas a partir de las 56 hpf (Figura 2c y Figura 2d) junto a larvas no tratadas (Figura 2a y Figura 2b). En las larvas control, las células inmunes se concentran en la masa celular intermedia (ICM, *Intermediate Cell Mass*) y en el tejido hematopoyético caudal (CHT, *Caudal Hematopoietic Tissue*), las áreas donde reside la mayor parte de los leucocitos mieloides (Bennett et al. 2001; Davidson & Zon 2004). En las larvas expuestas a CuSO₄, en cambio, se observa que los leucocitos ya no se encuentran concentrados exclusivamente en la ICM o CHT, sino que se han dispersado, ocupando el miosepto horizontal a lo largo de la cola y el tronco. Más interesante aún resulta el hecho que los leucocitos marcados se encuentren en grupos regularmente espaciados a lo largo del miosepto horizontal. Esto sugiere, por un lado, que en respuesta a la exposición a CuSO₄ los

² Los resultados expuestos en la sección 4.1 fueron obtenidos en colaboración con Claudia d'Alençon.

leucocitos migran activamente desde la ICM o CHT hacia la zona media del tronco y la cola. En la Figura 2 (e-j) se muestran las agrupaciones de leucocitos (ver Figura 2g y 2h, flechas), en larvas *BACmpx::GFP* (Figura 2, e, g, i) y *lysC::DsRED2* (Figura 2, f, h, j) tras ser expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas.

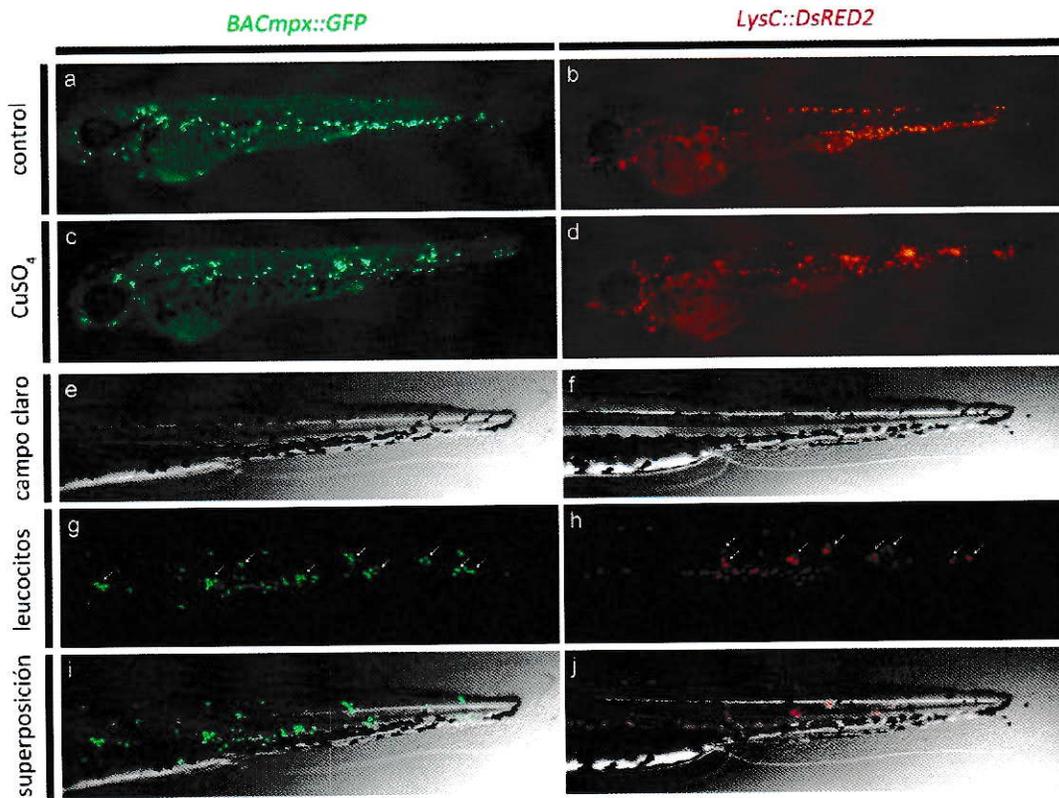


Figura 2. Distribución espacial de las células inmunes en larvas expuestas a CuSO_4 . En **a** y **b**, larvas control *BACmpx::GFP* y *lysC::DsRED2*, respectivamente, muestran los leucocitos a lo largo de la zona ventral de la cola; **c** y **d**, larvas expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 h, muestran agrupaciones periódicas de leucocitos a lo largo del miosepto; **e-j**, microscopía confocal de larvas *BACmpx::GFP* y *lysC::DsRED2* tratadas con CuSO_4 10 μM por 2 h.

Las agrupaciones periódicas de leucocitos observadas a lo largo del miosepto horizontal de las larvas tratadas con CuSO_4 10 μM por 2 horas sugieren que las células inmunes se ubican alrededor de los neuromastos dañados por la exposición a CuSO_4 (Hernández et al. 2006; Olivari et al. 2008). Para probarlo, se generaron larvas dobles transgénicas cruzando adultos *lysC::DsRED2*, donde los leucocitos expresan DsRED2 (Hall et al. 2007), y adultos *cldnB::GFP*, en el que las células de los neuromastos están marcadas en verde (Haas and Gilmour, 2006). Al exponer larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; cldnB::GFP)* a CuSO_4 10 μM por 2 horas (ver Figura 3) observamos que los leucocitos se agrupan específicamente alrededor de neuromastos dañados por el CuSO_4 . Mientras los neuromastos de larvas no expuestas (Figura 3, a-d) muestran una organización de roseta característica (Figura 3b) y muy esporádicamente hay leucocitos a su alrededor (Figura 3c); en los neuromastos de larvas expuestas a CuSO_4 observamos una alta desorganización (Figura 3f), y un gran número de leucocitos concentrados alrededor del neuromasto dañado (Figura 3g).

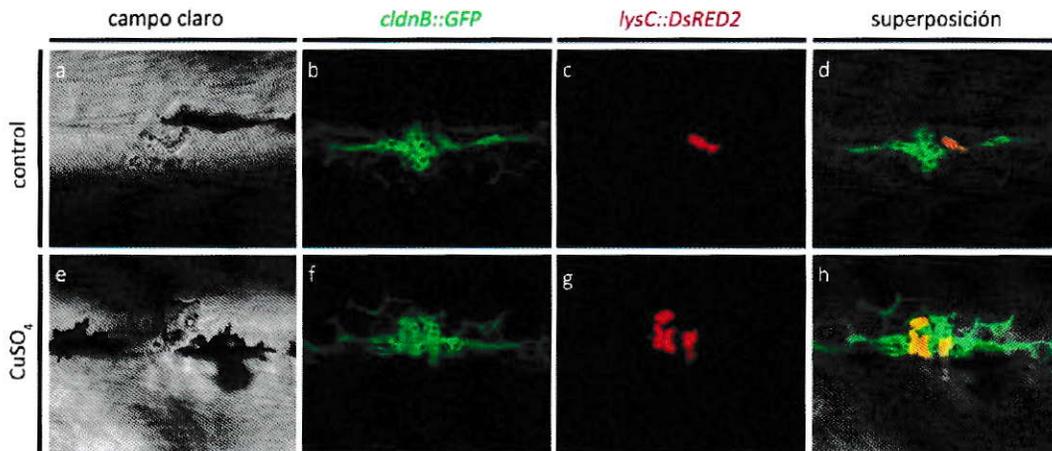


Figura 3. Colocalización de leucocitos reclutados y neuromastos dañados con CuSO_4 . Microscopía confocal de larvas dobles transgénicas *cldnB::GFP* (línea lateral) y *lysC::DsRED2* (leucocitos). En **a-d**, se muestra un neuromasto de una larva no tratada, y en **e-h**, un neuromasto de una larva expuesta a CuSO_4 10 μM por 2 horas. En ambos casos se muestra un neuromasto de la línea lateral posterior, con anterior hacia la izquierda y dorsal arriba. **a** y **e**, campo claro; **b** y **f**, canal GFP, en el que se observa la organización de roseta del neuromasto control (**b**), y la desorganización del neuromasto de la larva expuesta a CuSO_4 (**f**); **c** y **g**, canal DsRED2, en el que se observa un leucocito cerca del neuromasto control (**c**) y un grupo de leucocitos alrededor del neuromasto tratado con CuSO_4 (**g**); **d** y **h**, superposición de los canales. Nótese la colocalización del daño en el neuromasto y la presencia de las células inmunes, en **h**.

La observación *a posteriori* de larvas transgénicas expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas sugiere que los leucocitos mieloides migran activamente hacia los neuromastos dañados. Con el propósito de observar *in vivo* el comportamiento de las células inmunes en las larvas expuestas a CuSO_4 , se realizaron experimentos de microscopía de tiempo extendido (*time lapse*) de larvas *BACmpx::GFP* durante la exposición a CuSO_4 (Figura Suplementaria 1). Larvas *BACmpx::GFP*, cuyos neutrófilos están marcados en verde (Renshaw et al. 2006) (Figura Suplementaria 1, recuadro azul), fueron teñidas con DiOC_6 para mostrar la ubicación de los neuromastos (Figura Suplementaria 1, triángulos

azules), luego expuestas a CuSO_4 50 μM e inmediatamente después fueron montadas para la adquisición de imágenes. La Figura Suplementaria 1 muestra la migración de numerosas células inmunes desde la ICM o CHT hacia los neuromastos más cercanos (especialmente hacia el neuromasto más posterior, hacia la derecha) y la contracción del tejido alrededor del neuromasto al principio de la secuencia (segundo triángulo azul, de izquierda a derecha). Como se observa, los primeros leucocitos llegan a los neuromastos alrededor de 20 minutos después de agregar CuSO_4 al medio y durante el resto del tiempo de adquisición se mantienen realizando movimientos circulares alrededor de los neuromastos dañados.

Los neuromastos, compuestos básicamente de un grupo central de células ciliadas rodeadas de células del manto en la superficie y células de soporte en la base (Ghysen and Dambly-chaudie, 2004), experimentan una clara desorganización al ser expuestos a CuSO_4 (Hernández et al. 2006; Olivari et al. 2008) que es simultánea a la llegada de las células inmunes (ver Figura Suplementaria 2). En la Figura Suplementaria 2 se muestra una larva doble transgénica *Tg(lysC::DsRED2; cldnB::GFP)* cuyos neuromastos expresan GFP (Haas and Gilmour, 2006) y sus leucocitos DsRED2 (Hall et al. 2007), que fue expuesta a CuSO_4 50 μM e inmediatamente después montada para la adquisición de imágenes, y en la Figura Suplementaria 3 se observa una larva *Brn3c::mGFP*, cuyas células ciliadas expresan GFP (Xiao et al., 2005), sometida al mismo tratamiento y seguida por microscopía confocal durante aproximadamente 30 minutos. Mientras en la Figura Suplementaria 3 se observa la rápida muerte de las células ciliadas expuestas a CuSO_4 , tal como se ha descrito previamente (Hernández et

al. 2006; Olivari et al. 2008), en la Figura Suplementaria 2 se observa (en verde) la progresiva desorganización del neuromasto, desde su forma de roseta característica (primeros cuadros de la secuencia) hasta un estado comparable al de la Figura 3f (últimos cuadros). Además, se observa que simultáneo a la desorganización del neuromasto, ocurre el movimiento de los leucocitos (en rojo) alrededor y entre las células que lo conforman. Esto sugiere que la desorganización de los neuromastos de larvas expuestas a CuSO_4 es producto de una combinación de muerte celular (Hernández et al. 2006) y de la invasión de células inmunes que, como muestra la Figura Suplementaria 2, atraviesan continuamente los espacios entre las células de los neuromastos, en apariencia, separándolas unas de otras.

4.1.2 Cuantificación del reclutamiento de células inmunes a la línea lateral

La inflamación inducida por daño con CuSO_4 a los neuromastos, en tanto es observable *in vivo* y ocurre muy rápido (es visible en 2 horas o menos), constituye un modelo muy práctico para el estudio de la inflamación. Con el propósito de evaluar el efecto de diversas variables en el grado de reclutamiento de leucocitos a la línea lateral dañada con CuSO_4 , se desarrolló a partir de este modelo un ensayo cuantitativo en el que básicamente, larvas transgénicas *BACmpx::GFP*, *lysC::EGFP* o *lysC::DsRED2* son expuestas a CuSO_4 , y 2 horas después, cuando las células inmunes ya han migrado a la línea lateral, las larvas son fijadas para detener el proceso y luego contar en cada larva el número de leucocitos marcados en el miosepto horizontal. Ya que en los estadios de

desarrollo usados (56 – 72 hpf) la línea lateral primaria se encuentra a lo largo del miosepto, no es necesario marcar los neuromastos para realizar los conteos, sino asegurar la reproducibilidad del experimento estableciendo un área arbitraria dentro de la cual contar. Como muestra la Figura 4a, se estableció arbitrariamente una franja de aproximadamente 5 diámetros celulares por sobre y por debajo el miosepto horizontal, que va desde el primer somito hasta el final de la cola para realizar los conteos. A continuación se presenta un experimento (ver Figura 4b) en el que larvas *BACmpx::GFP* de 56 hpf fueron expuestas por 2 horas a CuSO_4 10 y 50 μM , y CdCl_2 50 μM , que no daña los neuromastos a esta dosis y tiempo (Hernández et al. 2006), y luego se contó el número de leucocitos infiltrados en el miosepto dentro del área señalada en la Figura 4a. Los resultados de la Figura 4b muestran que los números promedios de neutrófilos en el miosepto de larvas tratadas por 2 horas con CuSO_4 10 μM ($19,38 \pm 0,9818$; $n = 45$) y 50 μM ($17,67 \pm 1,006$; $n = 45$) son significativamente mayores ($p < 0,001$, en ambas comparaciones) que el de las larvas control no expuestas ($4,156 \pm 0,3271$; $n = 45$). Por otro lado, el número de promedio de neutrófilos en el miosepto de las larvas tratadas con CdCl_2 50 μM por 2 horas ($5,089 \pm 0,5833$; $n = 45$) no presenta diferencia significativa en comparación con el de las larvas no tratadas ($p > 0,05$). Estos resultados no son replicados por exposiciones similares a H_2O_2 (Figura Suplementaria 4), lo que sugiere que no se deben a la mera generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Utilizando *Sudan Black*, una tinción para la actividad peroxidasa que permite teñir específicamente los leucocitos, se replicaron estos resultados, mostrando que es posible realizar estas cuantificaciones, prescindiendo del uso de transgénicos, valiéndose de técnicas histoquímicas (Figura Suplementaria 5). Es interesante notar la similitud de los

resultados obtenidos en las cuantificaciones con larvas transgénicas (Figura 4b) y las realizadas con la técnica histoquímica *Sudan Black* (Figura Suplementaria 5b). Estos resultados muestran que la inflamación inducida por daño con CuSO_4 a la línea lateral permite realizar un ensayo cuantitativo de inflamación basado en el número de leucocitos infiltrados en el miosepto. Utilizando una variación de este ensayo (Figura 4c), en la que larvas *BACmpx::GFP* de 56 hpf fueron expuestas por 2 horas a concentraciones de CuSO_4 desde $0,1 \mu\text{M}$ a $50 \mu\text{M}$, se determinó el efecto de la concentración de CuSO_4 utilizada en el número de leucocitos infiltrados en la línea lateral. Los resultados obtenidos (Figura 4c) muestran que el número promedio de neutrófilos infiltrados al miosepto tras la inflamación es dependiente de la concentración de CuSO_4 a la que las larvas fueron expuestas (para más detalles, ver Figura Suplementaria 6). En las larvas tratadas con CuSO_4 $0,5 \mu\text{M}$ y concentraciones mayores, el número promedio de neutrófilos en el miosepto es significativamente mayor ($0,01 < p < 0,001$, en el caso de CuSO_4 $0,5 \mu\text{M}$; y $p < 0,001$, en el caso de CuSO_4 $1, 10$ y $50 \mu\text{M}$) al de las larvas control. Una regresión no lineal de los resultados (ver Figura Suplementaria 6) muestra que el número promedio de neutrófilos infiltrados en el miosepto de las larvas tratadas aumenta rápidamente con el aumento de la concentración de CuSO_4 en el rango $0 - 1 \mu\text{M}$, sin embargo a mayores concentraciones, el aumento en la concentración de CuSO_4 a la que se exponen las larvas tiene un efecto proporcionalmente menor en el número promedio de neutrófilos infiltrados a la línea lateral, a tal punto que no existe diferencia significativa entre el número promedio de neutrófilos infiltrados en el miosepto de larvas tratadas con CuSO_4 $10 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($p > 0,05$ en la Figura 4c y en la Figura 4b).

A continuación, se probó el ensayo cuantitativo con larvas de distintos estadios de desarrollo, realizando incubaciones en CuSO_4 $10 \mu\text{M}$ de grupos de 15 larvas de distintos estadios y fijando grupos de larvas cada 20 minutos durante 2 horas para luego contar el número de neutrófilos infiltrados en el miosepto de cada larva. Los resultados de este experimento, mostrados en la Figura 4d, indican que la respuesta a CuSO_4 es similar en todos los estadios estudiados, observándose un aumento significativo en el número de neutrófilos infiltrados en la línea lateral entre 20 y 40 minutos después de iniciada la exposición a CuSO_4 .

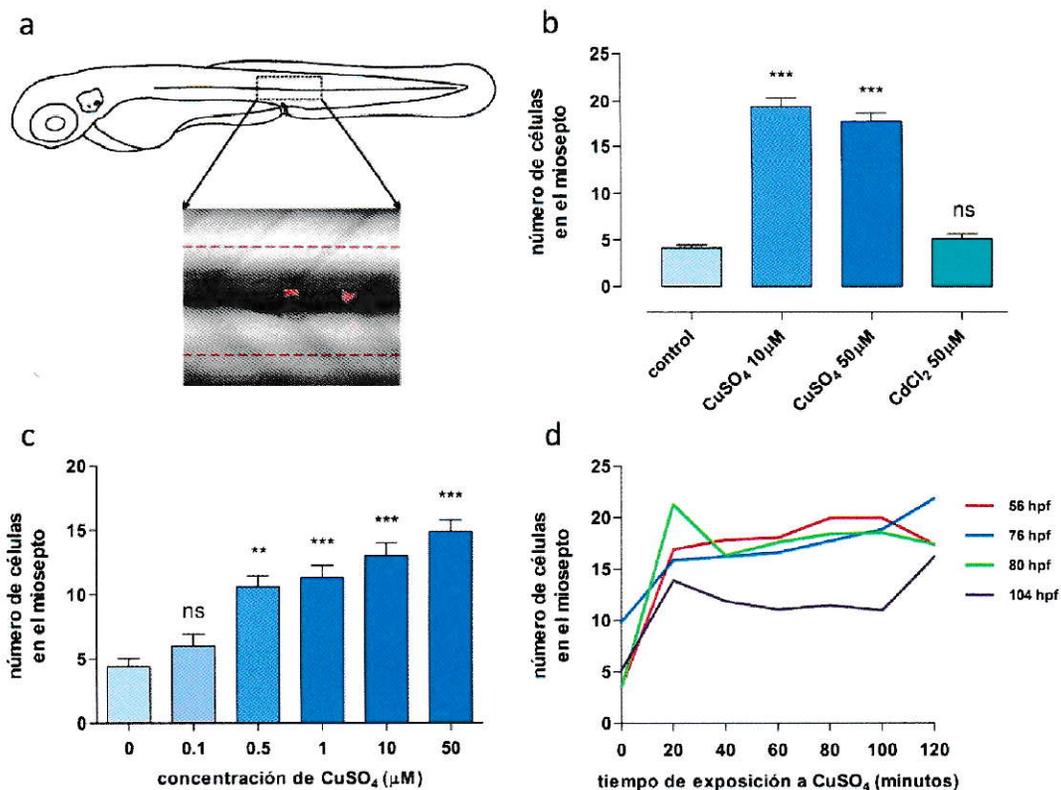


Figura 4. Cuantificación de leucocitos reclutados a la línea lateral después de distintos tratamientos con CuSO₄. **a**, muestra un diagrama esquemático del área donde los leucocitos son contados en el resto de las cuantificaciones. **b**, cuantificación del número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas *BACmpx::GFP* control y tratadas con las concentraciones indicadas de CuSO₄ o CdCl₂ por 2 horas a partir de las 56 hpf. Los resultados corresponden, para cada condición, al promedio ± error estándar de los conteos hechos en un total de 45 larvas en 3 experimentos independientes. **c**, cuantificación del número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas *BACmpx::GFP* tratadas con concentraciones crecientes de CuSO₄ por 2 horas a partir de las 56 hpf. Los resultados corresponden al promedio ± error estándar de los conteos hechos en 15 larvas para cada condición. **d**, cuantificación del número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas *BACmpx::GFP* expuestas a CuSO₄ por distintos tiempos a partir de distintos estadios. Los resultados corresponden al promedio de los conteos realizados en 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles negativos no tratados por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

Se ha reportado que las células ciliadas de los neuromastos son sensibles a otros metales pesados además del cobre (Hernández et al. 2006), entre ellos el zinc y la plata, lo que sugiere que la exposición a ellos también ocasiona una respuesta inmune en la que leucocitos migran hacia la línea lateral. La Figura 5a muestra, medido como el número promedio de neutrófilos en el miosepto, el efecto de la exposición de larvas transgénicas *BACmpx::GFP* a diversos metales pesados durante 2 horas a contar de 56 hpf. Los resultados muestran que, en efecto, otros metales pesados capaces de dañar células ciliadas, como el zinc y la plata, provocan también una respuesta inmune similar a la inducida por CuSO_4 , si bien, a dosis mayores. La exposición a AgNO_3 provoca un incremento significativo del número promedio de neutrófilos en el miosepto de las larvas tratadas a $1 \mu\text{M}$ ($0,01 < p < 0,001$) y $50 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$), mientras que el ZnSO_4 induce un aumento significativo a concentraciones aún mayores: $500 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$). Así, comparados con el CuSO_4 , tanto el AgNO_3 como el ZnSO_4 no son buenos candidatos para usarse en un modelo de inflamación, ya que necesitan dosis mucho más altas para generar efectos similares a los producidos por el CuSO_4 (sólo una concentración de ZnSO_4 50 veces más alta que la de CuSO_4 produce efectos similares), y además, se ha reportado que tales dosis producen efectos tóxicos y disminuyen la viabilidad de las larvas (Hernández et al. 2006). En contraposición a los efectos generados por CuSO_4 , ZnSO_4 y AgNO_3 , el NiSO_4 no incrementa de modo significativo el número promedio de neutrófilos en el miosepto de las larvas tratadas (Figura 5a), de modo similar al CdCl_2 (Figura 4b).

Por otro lado, numerosa evidencia muestra que las células ciliadas de los neuromastos son sensibles a la exposición a antibióticos aminoglicósidos (Froehlicher et al., 2009), como la neomicina (Harris et al., 2003), lo que nuevamente sugiere que es posible una respuesta inmune provocada por el daño a los neuromastos. En la Figura 5b se muestra el número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas tratadas por 2 horas con distintas concentraciones de neomicina, comparadas con larvas tratadas con CuSO_4 10 μM durante el mismo período. La exposición a neomicina causa un aumento significativo del número promedio de neutrófilos en el miosepto a 50 μM y 500 μM ($0,01 < p < 0,001$, en ambos casos), pero en todos los casos la respuesta provocada por la neomicina es significativamente menor (aproximadamente 3 veces menor) a la inducida por exposición a CuSO_4 10 μM .

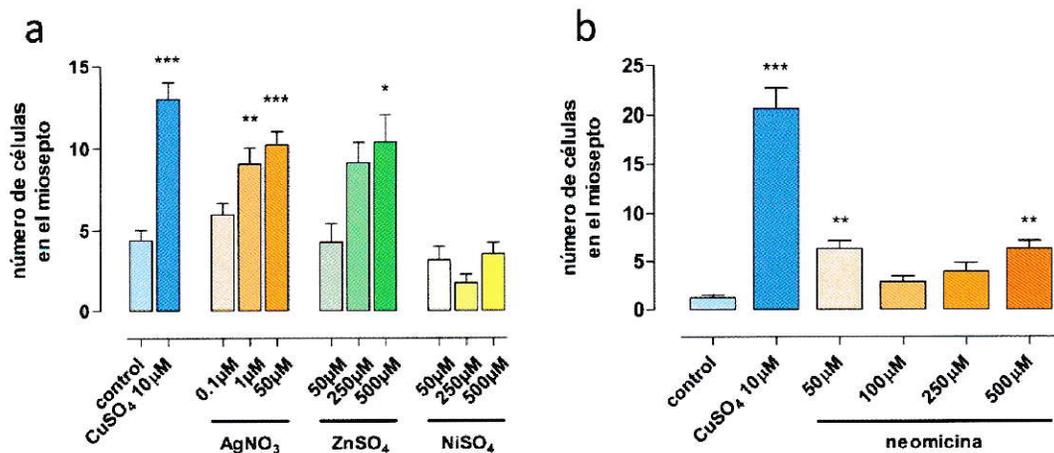


Figura 5. Cuantificación de leucocitos infiltrados en la línea lateral después de tratamientos con metales pesados y neomicina. **a**, cuantificación del número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas *BACmpx::GFP* control y tratadas con las concentraciones indicadas de CuSO₄, AgNO₃, ZnSO₄ o NiSO₄ por 2 horas a partir de las 56 hpf. **b**, cuantificación del número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas *BACmpx::GFP* tratadas con concentraciones crecientes de neomicina por 2 horas a partir de las 56 hpf. En ambos casos los resultados corresponden al promedio ± error estándar de los conteos hechos en 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles negativos no tratados por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,001 < p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.1.3 Evaluación del efecto de moléculas de actividad antiinflamatoria

La cuantificación antes descrita del número de leucocitos infiltrados en la línea lateral en respuesta al daño ocasionado por la exposición a CuSO₄, ofrece la posibilidad de realizar un análisis cuantitativo del efecto de moléculas de actividad antiinflamatoria o antioxidante. Para mostrar la capacidad de este ensayo como método de búsqueda de tales moléculas, se realizaron pruebas con un grupo de moléculas de probada actividad antiinflamatoria, a diversos niveles del proceso (ver Tabla Suplementaria I, para mayores detalles). Para probar si este ensayo es capaz de detectar la actividad de moléculas de

efecto antiinflamatorio ya descrito, se utilizó una versión modificada de los experimentos anteriores, en la que las larvas son preincubadas durante 30 o 60 minutos en diluciones de la molécula a probar o su solvente, para luego ser expuestas a CuSO_4 10 μM por 40 minutos y luego fijadas para realizar los conteos de células en el miosepto. La preincubación permite la entrada de las moléculas en los tejidos de las larvas, y el tiempo de 40 minutos de exposición a CuSO_4 , en vez de las 2 horas usadas en otros experimentos, permite evitar falsos negativos del ensayo producidos por moléculas que retardan la migración de los leucocitos sin abolirla del todo, de modo que tras una incubación prolongada en CuSO_4 los números promedio de leucocitos en el miosepto de las larvas tratadas y de los controles positivos podrían ser indistinguibles.

A continuación se muestran los resultados de una serie de ensayos realizados con diversas moléculas, en la mayor parte de los casos, de probada actividad antiinflamatoria. El primer grupo de moléculas corresponde a inhibidores de las ciclooxigenasas (COX). Las ciclooxigenasas catalizan la formación de prostaglandina (PG) D_2 a partir del ácido araquidónico en una gran variedad de tipos celulares, que incluyen en el sistema inmune a las células dendríticas, plaquetas, linfocitos T y macrófagos (Grosser et al., 2002; Gilroy et al., 2004). Existen dos isoformas de las ciclooxigenasas, COX-1 y COX-2, ambas expresadas en una gran variedad de tejidos en común y ambas ubicadas, a nivel intracelular, en el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear (Prescott and Yost, 2002). COX-1 se expresa constitutivamente y mantiene niveles basales de prostaglandinas que participan de procesos ‘benignos’, como la protección del epitelio gástrico (Prescott and Yost, 2002). Por otro lado, COX-2 es inducible y permite la

generación de grandes cantidades de prostaglandinas, que participan en procesos ‘malignos’, como la carcinogénesis y la inflamación (Gilroy et al., 2004; Prescott and Yost, 2002). En la Figura 6 se muestra el efecto de 6 inhibidores de las ciclooxigenasas (COX), 4 de ellos son inhibidores generales de las COXs, y 3 corresponden a inhibidores específicos de una de la isoforma COX-1 (para más detalles, ver Tabla Suplementaria I). Larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 56 hpf fueron preincubadas en DMSO (en el caso de los controles) o soluciones con las moléculas inhibidoras a las concentraciones indicadas por períodos de 30 a 60 minutos, se agregó CuSO_4 a una concentración final de $10 \mu\text{M}$, y se incubó por 40 minutos. Tras la incubación con CuSO_4 , se fijaron las larvas y se contó el número promedio de células GFP^+ en el miosepto.

Los resultados de la Figura 6 muestran que, en general, la inhibición farmacológica de la actividad de las ciclooxigenasas disminuye significativamente el número promedio de leucocitos reclutados a la línea lateral tras la exposición a CuSO_4 . Este hecho corrobora las probadas propiedades antiinflamatorias de algunas de estas moléculas, como *diclofenac* (Figura 6a), *ibuprofen* (Figura 6b), *indomethacin* (Figura 6c) y *sulindac* (Figura 6e), además de sugerir que al igual que en otros modelos, la actividad de las ciclooxigenasas participa de la síntesis de mediadores proinflamatorios en pez cebra. En la mayoría de los casos se observa una relación inversamente proporcional entre la dosis de inhibidor usado y el número promedio de leucocitos observado en el miosepto (ver Figura 6, paneles a, c, e y f). Si bien en algunos casos la exposición al inhibidor disminuye el número de células reclutadas a la línea lateral a

niveles comparables al de las larvas control no expuestas a CuSO_4 (ver Figura 6a, *diclofenac* 3 μM ; Figura 6c, *indomethacin* 100 μM ; Figura 6e, *sulindac* 10, 50 y 100 μM), en varios casos el efecto del inhibidor no logra abolir por completo la migración de leucocitos a la línea lateral, y a pesar de ello, la cuantificación de leucocitos en el miosepto es capaz, aún en algunos de esos casos, de detectar un efecto significativo sobre la inflamación inducida por daño con CuSO_4 (ver Figura 6, paneles a, b, c y f). En la Figura 6, paneles a-d, se observan los resultados obtenidos utilizando inhibidores generales de COX, es decir, tanto de COX-1 como de COX-2, y con excepción de *aspirin*, todos los inhibidores tienen un efecto significativo y robusto sobre el grado de inflamación de las larvas expuestas a CuSO_4 . En la Figura 6, paneles e y f, sin embargo, se observan los resultados de experimentos en los que se utilizaron inhibidores específicos de la actividad de COX-1, la isoforma constitutivamente expresada de las ciclooxigenasas. En este caso también se observa una disminución significativa del grado de reclutamiento de leucocitos alcanzado tras la exposición a CuSO_4 , lo que permite sugerir un rol de COX-1 en este modelo de inflamación. Dados los resultados obtenidos con inhibidores específicos de la actividad de COX-1, se realizó un experimento similar utilizando un inhibidor específico de COX-2, NS-398, cuyos resultados no son concluyentes, al parecer a causa de una disminución de la efectividad del CuSO_4 al ser puesto en presencia de BSA (para más detalles, ver Figura Suplementaria 7).

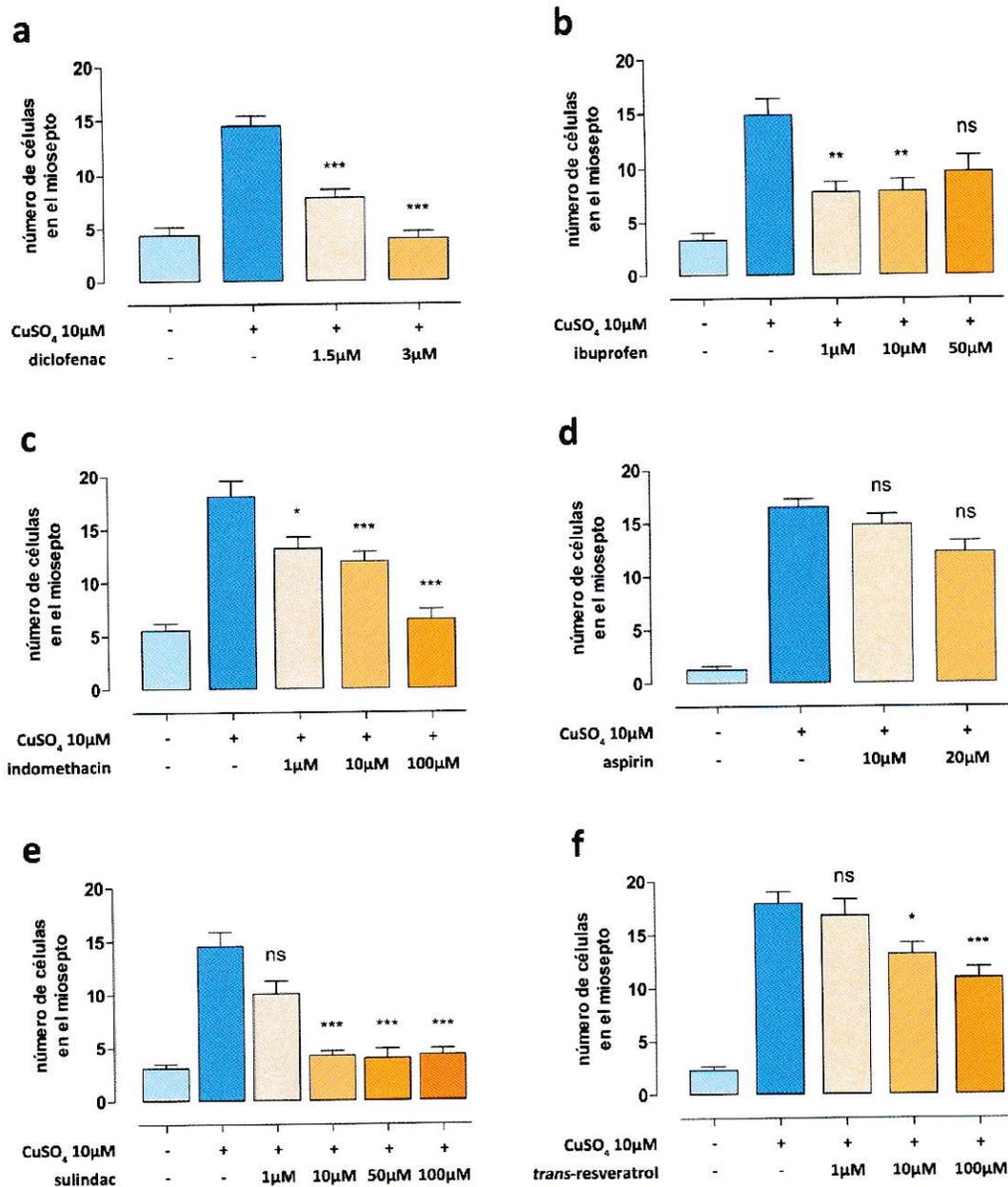


Figura 6. Efecto de inhibidores de COX en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO₄. Cuantificación del número promedio de leucocitos reclutados al miosepto de larvas preincubadas con inhibidores de COX y luego expuestas a CuSO₄ 10 µM por 40 minutos. **a – d**, inhibidores generales de las ciclooxigenasas: **a**, *diclofenac*; **b**, *ibuprofen*; **c**, *indomethacin*; **d**, *aspirin*. **e** y **f**, inhibidores específicos de COX-1: **e**, *sulindac*; y **f**, *trans-resveratrol*. Los resultados corresponden al promedio ± error estándar de conteos hechos en 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles positivos, tratados con CuSO₄ y preincubados en DMSO,

por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,001 < p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

El siguiente grupo de moléculas estudiado corresponde a inhibidores de *c-met*, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). *c-met* es un receptor heterodimérico, de actividad tirosina kinasa, cuyas subunidades son originadas del mismo péptido por corte proteolítico. Todos los efectos biológicos conocidos de HGF son mediados por *c-met*, en particular, se ha reportado que HGF induce la trans migración de neutrófilos (Skibinski, 2003). A continuación se muestran los resultados de ensayos de reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO_4 en presencia de 3 inhibidores de *c-met* (ver Figura 7). Se procedió de modo similar al de experimentos anteriores con algunas modificaciones: se utilizaron larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 72 hpf que fueron preincubadas en inhibidor o solvente (DMSO 1% v/v) durante 30 minutos y luego se agregó CuSO_4 a una concentración final de $10 \mu\text{M}$, y se incubó por 40 minutos. Finalmente, se fijaron las larvas y se contó el número de células GFP^+ en el miosepto. Como se muestra en la Figura 7, los inhibidores *Met inhibitor I* y *II* no produjeron cambios estadísticamente significativos en el promedio de leucocitos reclutados al miosepto tras la exposición a CuSO_4 . Concentraciones mayores de estas moléculas (50 y $100 \mu\text{M}$ en ambos casos) fueron letales para todas las larvas tras los 70 minutos de exposición ($n = 15$, en ambos casos). En el caso del inhibidor K252a, sin embargo, se observa un efecto dependiente de la concentración sobre el número de leucocitos reclutados al miosepto. La inhibición de *c-met* con el inhibidor K252a produce una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,001$, para K252a 1

μM y $10 \mu\text{M}$) del número promedio de leucocitos reclutados al miosepto por daño con CuSO_4 al punto que en la mayor concentración estudiada la inhibición de *c-met* parece haber abolido casi por completo el reclutamiento de leucocitos a la línea lateral (como ejemplo, en la Figura Suplementaria 8 se muestran fotografías de larvas representativas de cada tratamiento con K252a). Estos resultados sugieren un rol de *c-met*, y potencialmente HGF, en la inflamación inducida por daño tisular en pez cebra.

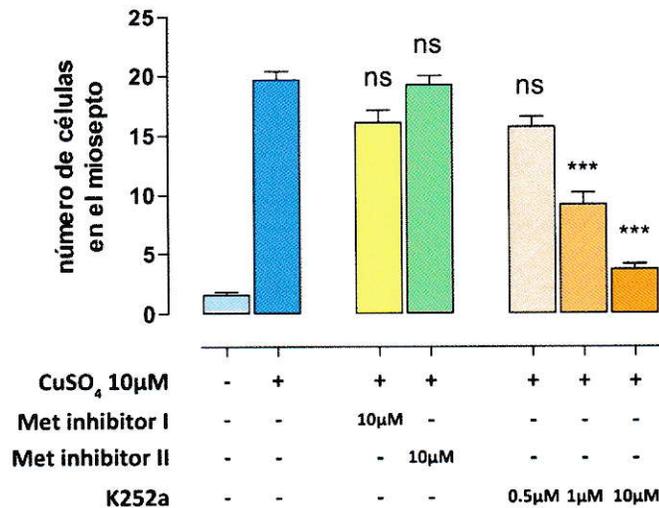


Figura 7. Efecto de inhibidores de *c-met* en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO_4 . Cuantificación del número promedio de leucocitos reclutados al miosepto de larvas preincubadas con inhibidores de *c-met* y luego expuestas a CuSO_4 $10 \mu\text{M}$ por 40 minutos. Los resultados, que corresponden a uno de 2 experimentos representativos, se presentan como promedio \pm error estándar de conteos hechos en 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles positivos, tratados con CuSO_4 y preincubados en DMSO, por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,001 < p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

A continuación (ver Figura 8) se muestran los resultados de ensayos de inflamación realizados en presencia de moléculas que modulan la actividad del receptor de glucocorticoides (GR), hidrocortisona, *dexamethasone* y *mifepristone* (también llamado RU-486), y de un inhibidor de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Los glucocorticoides y JNK tienen un ampliamente documentado rol en la regulación de la respuesta inmune (Parrillo and Fauci, 1979; Lawrence et al., 2002; Gilroy et al., 2004; Perretti and D'Acquisto, 2009) del que también hay evidencia en pez cebra (Zhang et al., 2008). En la Figura 8a se muestra el efecto de hidrocortisona, un agonista esteroide del GR, que no produce cambios estadísticamente significativos en el número de leucocitos reclutados al miosepto tras el daño tisular provocado con CuSO_4 . Otro agonista del GR, *dexamethasone*, un glucocorticoide sintético, produjo una reducción estadísticamente significativa ($0,05 < p < 0,01$) del número de leucocitos reclutados al miosepto tras el daño con CuSO_4 (ver Figura 8b). Por otro lado, *mifepristone*, un antagonista específico del GR, produjo una reducción estadísticamente significativa del número de leucocitos reclutados (ver Figura 8c). Lo anterior sugiere un rol antiinflamatorio para los glucocorticoides (ver Figura 8c) en este modelo de inflamación, además de su ya documentada acción proinflamatoria (ver Figuras 8a y 8b), tal vez mediada a través de una acción inhibitoria sobre JNK (Zhang et al., 2008). De hecho, los resultados de la Figura 8d muestran una disminución del número de leucocitos reclutados al miosepto en larvas expuestas a SP600125, un inhibidor específico de JNK, lo que indica un posible rol de JNK en el reclutamiento de leucocitos en este modelo de inflamación.

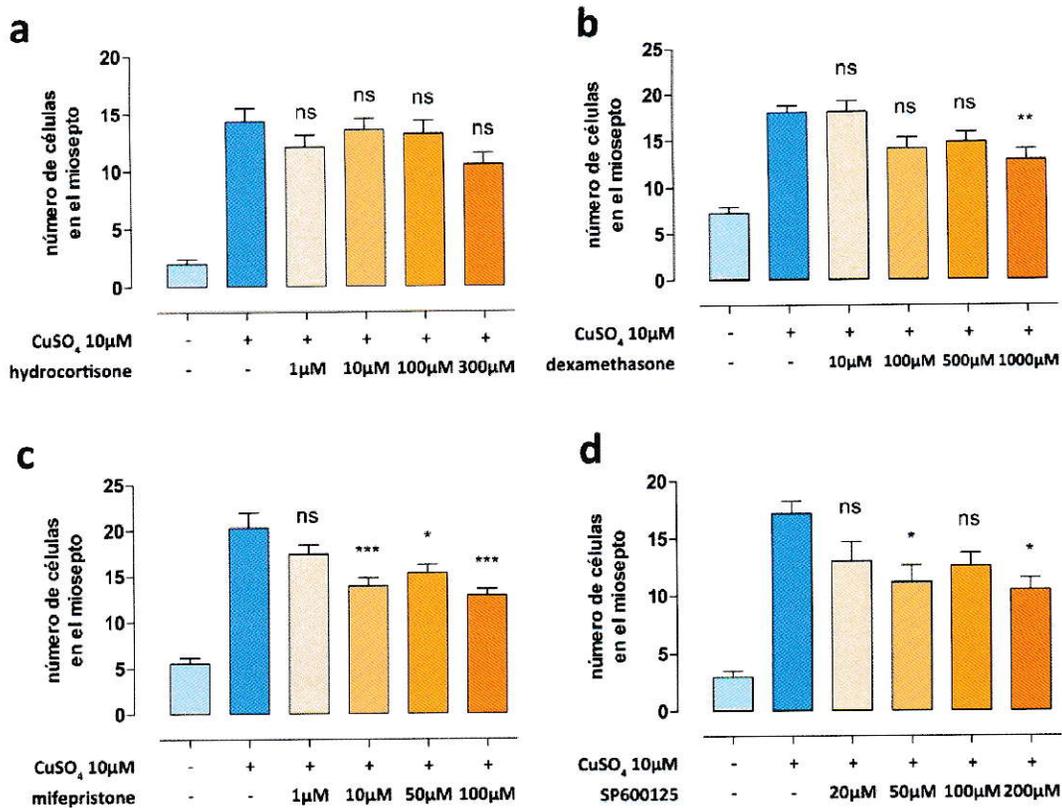


Figura 8. Efecto de moléculas moduladoras de GR y JNK en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO₄. Cuantificación del número promedio de leucocitos reclutados al miosepto de larvas preincubadas por 30 minutos con moduladores de GR y JNK, y luego expuestas a CuSO₄ 10 μM por 40 minutos. **a**, hidrocortisona, un agonista esteroidal del receptor de glucocorticoides; **b**, *dexamethasone*, un glucocorticoide sintético; **c**, *mifepristone* (RU-486), un antagonista del receptor de glucocorticoides; y **d**, SP600125, un inhibidor de JNK. Los resultados corresponden al promedio ± error estándar de conteos hechos en 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles positivos, tratados con CuSO₄ y preincubados en DMSO, por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,001 < p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

En experimentos similares se estudió el rol de PPAR γ y HIF-1 α en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO₄, utilizando moléculas moduladoras de ambas vías. Los PPARs (*peroxisome proliferator – activated receptors*)

son una familia de receptores nucleares, que regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, la homeostasis energética y también la diferenciación celular (Gilroy et al., 2004). PPAR γ , en particular, parece ser el receptor de la serie de prostaglandinas J₂, por lo que se ha propuesto que modula negativamente la inflamación a través de varios mecanismos (Lawrence et al., 2002). En la Figura 9a se muestra un ensayo de inflamación realizado preincubando las larvas por 30 minutos en *rosiglitazone*, un agonista de PPAR γ , en el que no se observan cambios estadísticamente significativos en el número promedio de leucocitos reclutados a la línea lateral.

En la Figura 9b se muestra un ensayo de inflamación realizado preincubando larvas por 30 minutos en 2-metoxiestradiol (2-ME), un inhibidor de HIF-1 α , y luego exponiendo a CuSO₄ 10 μ M por 40 minutos. El 2-metoxiestradiol es un metabolito derivado del estradiol que se produce en bajas cantidades, de probadas propiedades antiproliferativas en células oncogénicas (Mueck and Seeger, 2010). Se ha propuesto que el 2-ME actúa inhibiendo la traducción de HIF-1 α , produciendo así un bloqueo de la angiogénesis e induciendo apoptosis (Mueck and Seeger, 2010). Los resultados de la Figura 9b muestran que la exposición a 2-ME disminuye significativamente el número promedio de leucocitos reclutados al miosepto tras el daño con CuSO₄ ($p < 0,001$, para 2-ME 10, 20 y 40 μ M), llegando a niveles comparables a los de los controles no expuestos a CuSO₄.

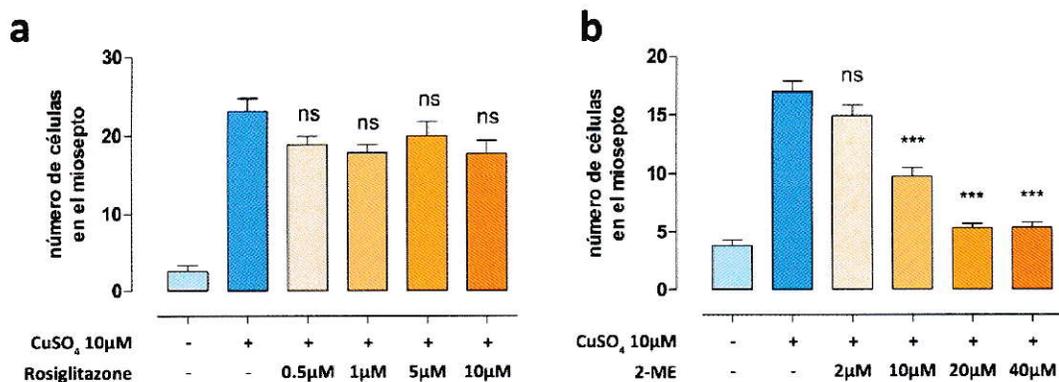


Figura 9. Efecto de moléculas moduladoras de PPAR γ y HIF-1 α en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO₄. Cuantificación del número promedio de leucocitos reclutados al miosepto de larvas preincubadas por 30 minutos con *rosiglitazone*, un inhibidor de PPAR γ , y 2-metoxiestradiol (2-ME), un inhibidor de HIF-1 α , y luego expuestas a CuSO₄ 10 μ M por 40 minutos. En **a**, se muestran los resultados usando *rosiglitazone*, un agonista de PPAR γ (*peroxisome proliferator - activated receptor- γ*); y en **b**, 2-metoxiestradiol, un inhibidor de la producción de HIF-1 α . Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar de conteos hechos en 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles positivos, tratados con CuSO₄ y preincubados en DMSO, por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,001 < p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.1.4 Metodología automatizada de detección de actividad antiinflamatoria

El protocolo de evaluación de actividad antiinflamatoria hasta ahora descrito, presenta varias ventajas respecto a otros protocolos reportados basados en el daño mecánico a las larvas (Mathias et al., 2006; Loynes et al., 2010; Elks et al., 2011), pero la necesidad de cuantificación manual del número de leucocitos reclutados al miosepto de cada larva impone restricciones a la aplicación de esta metodología en un *screening* a gran escala sobre un gran número de moléculas. Por esta razón, en colaboración con el laboratorio del Dr. Urban Liebel (Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe), se

desarrolló una metodología automatizada de cuantificación de la infiltración de leucocitos que permite aumentar el número de larvas evaluadas por ensayo.

El problema principal de la cuantificación automatizada de la inflamación no se encuentra precisamente en la cuantificación, ya que el grado de inflamación en este modelo puede ser estimado tanto por el número de células infiltradas como por la fluorescencia total de los leucocitos reclutados, sino en la identificación automática de la zona de interés donde realizar esta cuantificación. Para resolver este problema, se utilizaron larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; cldnB::GFP)* cuyos neuromastos expresan GFP (Haas and Gilmour, 2006) y sus leucocitos expresan DsRED2 (Hall et al. 2007), en los que un programa especialmente desarrollado para esta aplicación permite la identificación, en el canal verde, de los neuromastos a través de la comparación de las imágenes adquiridas con una imagen preestablecida de un neuromasto del mismo transgénico. En la Figura 10 se muestran larvas controles y experimentales cuyos neuromastos (marcados con flechas blancas, Figura 10a y Figura 10c) deben ser identificados para realizar la cuantificación. Para esto el programa superpone la imagen del neuromasto modelo en cada una de las imágenes del experimento y las rota hasta encontrar todos los neuromastos que se parecen al modelo sobre un nivel mínimo de identidad entre ambas (ver Figura 10b y Figura 10d con los neuromastos identificados por el programa). Una vez identificados los neuromastos, el programa mide en el canal rojo, donde se pueden ver los leucocitos que expresan DsRED2, la fluorescencia promedio dentro del área identificada, y se calcula la intensidad de fluorescencia promedio por neuromasto, que luego es promediada con los

otros neuromastos de cada larva, y con las demás larvas. De esta forma, el método permite la identificación de las áreas dañadas por el tratamiento con CuSO_4 (los neuromastos) que son foco del reclutamiento de células inmunes y la posterior cuantificación de la respuesta a través de la intensidad de fluorescencia de los leucocitos en el tejido dañado. Nótese que el programa es capaz de detectar la gran mayoría, pero no todos los neuromastos (ver Figura 10); este inconveniente es superado utilizando más larvas que en la metodología manual lo que fortalece la evaluación estadística de los efectos. Así, utilizando 24 larvas, en triplicado, se logra un promedio de 50 larvas analizadas exitosamente de las que es posible extraer resultados confiables.

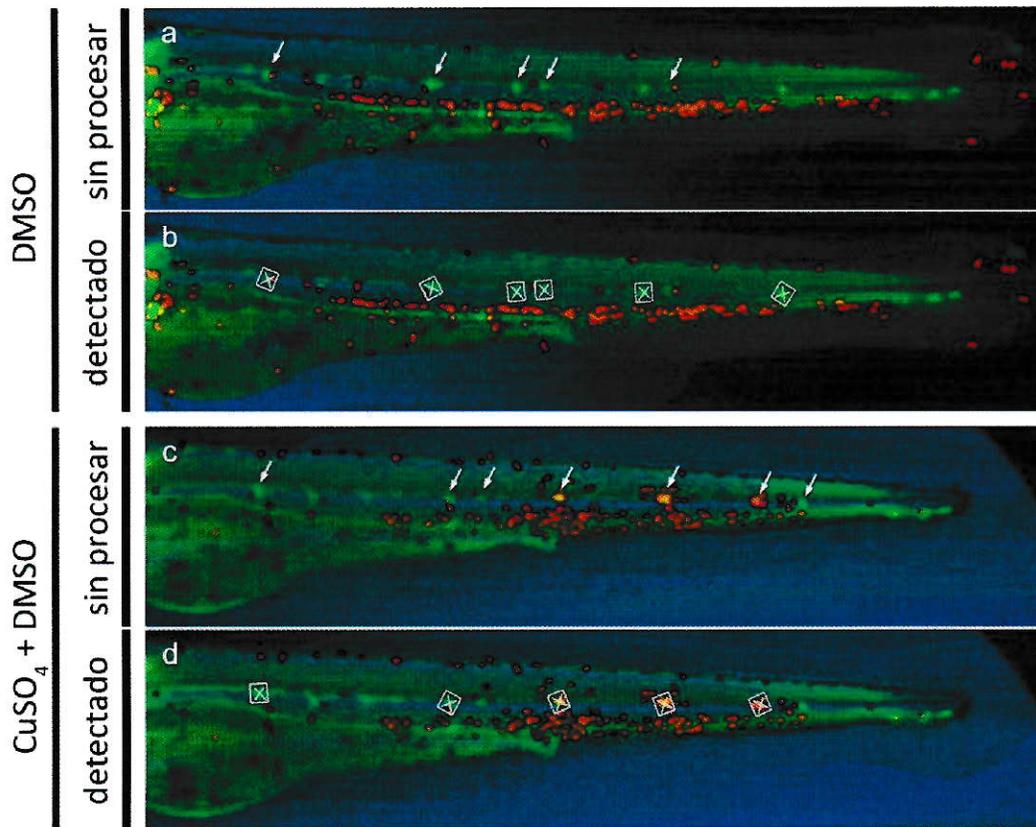


Figura 10. Metodología de evaluación automatizada de actividad antiinflamatoria.

Se muestra el método de detección de los neuromastos, y de cuantificación de la infiltración de leucocitos, en larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; cldnB::GFP)*, en las que los leucocitos expresan DsRED2 (en rojo), y las células de la línea lateral expresan GFP (en verde). **a**, larva control sin procesar, los neuromastos se indican con flechas blancas; **b**, larva mostrada en **a** después de la detección de los neuromastos, que se señalan con un cuadrado blanco; **c**, larva expuesta a CuSO_4 sin procesar, los neuromastos se indican con flechas blancas; y **d**, larva mostrada en **c** después de la detección de los neuromastos, que se señalan con cuadrados blancos. Nótese que una vez identificados los neuromastos en el canal verde, el programa de análisis mide la intensidad de fluorescencia en el canal rojo dentro del área delimitada por los cuadrados blancos para cada larva en cada condición.

Encontramos adicionalmente que es posible aplicar esta metodología a larvas transgénicas que sólo tienen los leucocitos marcados. En particular, usando larvas

transgénicas *lysC::DsRED2* en combinación con DiOC₆, una tinción vital de membranas, es posible realizar ensayos similares sin necesidad de larvas dobles transgénicas. Ya que la tinción con DiOC₆ permite visualizar fácilmente los neuromastos en el canal verde (ver Figura Suplementaria 1, triángulos azules, como ejemplo de esta tinción), sólo basta realizar la tinción en larvas transgénicas *lysC::DsRED2*, mantenerlas en oscuridad, y utilizar en el programa de análisis una fotografía apropiada como modelo para la identificación de los neuromastos marcados con DiOC₆.

Una vez establecida la metodología automatizada se buscó validar sus resultados llevando a cabo un experimento control con distintas concentraciones de CuSO₄ y CdCl₂, idéntico al que se muestra en la Figura 4b. En la Figura 11b se muestran los resultados de este experimento llevado a cabo con la metodología automatizada descrita más arriba. En breve, larvas dobles transgénicas Tg(*lysC::DsRED2*; *cldnB::GFP*) de 56 hpf fueron expuestas a CuSO₄ 10 µM ó 50 µM, o CdCl₂ 50 µM por 2 horas y luego se cuantificó la infiltración de leucocitos. La metodología automatizada, al igual que los ensayos realizados manualmente (comparar Figura 11a y Figura 11b), permite detectar un significativo reclutamiento de leucocitos alrededor de los neuromastos en larvas expuestas a CuSO₄ ($p < 0,001$ en el caso de CuSO₄ 10 µM, y $0,05 < p < 0,01$ en el caso de CuSO₄ 50 µM) con respecto a los controles no tratados o expuestos a CdCl₂ 50 µM. Una vez establecido que mediante la metodología automatizada es posible detectar y cuantificar la infiltración de leucocitos en este modelo de inflamación, se realizó un experimento de prueba con un grupo seleccionado de moléculas de actividad antiinflamatoria (Figura 11d) que se comparó con un experimento similar realizado

manualmente (Figura 11c), en el que las larvas fueron preincubadas 30 minutos en los inhibidores y expuestas a CuSO_4 por 40 minutos. De la comparación entre las Figuras 11c y 11d se observa que la metodología automatizada arroja los mismos resultados obtenidos en un ensayo realizado manualmente, lo que sugiere que el método automatizado es suficientemente robusto como para ser llevado a experimentos a gran escala para *screening* de gran cantidad de moléculas.

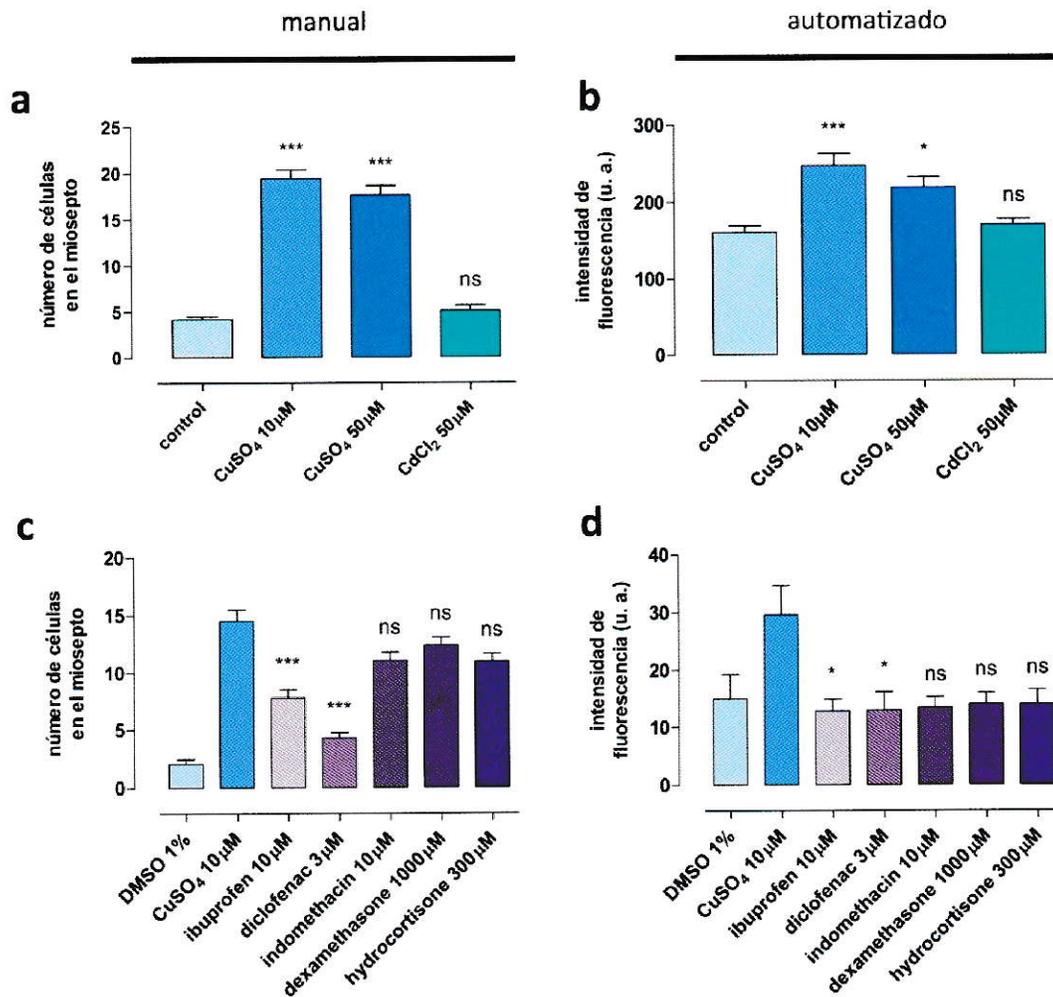


Figura 11. Comparación entre las metodologías manual y automatizada de detección de actividad antiinflamatoria. a-b, experimentos control en los que las larvas fueron tratadas con las concentraciones indicadas de CuSO₄ o CdCl₂ por 2 horas a partir de las 56 hpf. a, (extraída de la Figura 4b, con fines de comparación) el grado de inflamación se cuantifica manualmente como el número promedio de neutrófilos en el miosepto de las larvas. Los resultados corresponden, para cada condición, al promedio ± error estándar de los conteos hechos en un total de 45 larvas en 3 experimentos independientes. b, cuantificación automática del grado de inflamación medido como la intensidad de fluorescencia promedio de los leucocitos por neuromasto por larva. Los resultados corresponden, para cada condición, al promedio ± error estándar de los conteos hechos en un total de 35-54 larvas en 3 experimentos independientes. c-d, experimentos con moléculas antiinflamatorias seleccionadas. A partir de las 56 hpf las larvas fueron preincubadas en los inhibidores por 30 minutos y luego expuestas a CuSO₄

10 μ M por 40 minutos. **c**, cuantificación manual del número promedio de neutrófilos en el miosepto. Los resultados corresponden, para cada condición, al promedio \pm error estándar de los conteos hechos en un total de 16-29 larvas. **d**, cuantificación automática del grado de inflamación medido como la intensidad de fluorescencia promedio de los leucocitos por neuromasto por larva. Los resultados corresponden, para cada condición, al promedio \pm error estándar de los conteos hechos en un total de 13-17 larvas. En **a** y **b**, las comparaciones se realizaron contra los controles negativos no tratados, y en **c** y **d**, contra los controles positivos expuestos a CuSO_4 . Todas las comparaciones se realizaron por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. u. a., unidades arbitrarias. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

4.2 Resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄³

4.2.1 Migración de leucocitos mieloides desde los neuromastos dañados con CuSO₄ durante la resolución de la inflamación

A continuación, nos interesó estudiar el proceso de resolución que sigue al de inflamación. En modelos murinos de resolución de la inflamación se ha observado que las células polimorfonucleadas (equivalentes a los neutrófilos) entran en apoptosis y luego son fagocitadas por macrófagos (proceso denominado eferocitosis) muchos de los cuales después migran alejándose de la zona del daño (Lawrence et al., 2002; Gilroy et al., 2004). Para estudiar este proceso en el modelo de inflamación inducida por daño con CuSO₄, hicimos una leve modificación al protocolo de inflamación, en la que una vez lograda la inflamación, incubamos en ausencia de CuSO₄. En la Figura 12 se observan fotografías de una larva doble transgénica Tg(*cxcr4b::RFP*; *BACmpx::GFP*) cuya línea lateral expresa RFP y cuyos neutrófilos expresan GFP. En condiciones control (ver Figura 12a), los neutrófilos (en verde) se agrupan en la zona ventral del tronco y la cola de las larvas (ICM y CHT), como se muestra en la figura. Tras 2 horas de tratamiento con CuSO₄ 10 μM, los neutrófilos se han desplazado al miosepto, donde se agrupan en torno a los neuromastos dañados (Figura 12b, triángulos blancos). Para permitir que proceda la resolución de la inflamación, se descartó la solución con CuSO₄ y se realizaron numerosos lavados con el fin de eliminar cualquier traza de cobre. Y tras incubar en ausencia de CuSO₄ por 6 horas se observa (ver Figura 12c) que el número de neutrófilos en el miosepto se ha reducido considerablemente y que sus niveles son casi

³ Los resultados expuestos en la sección 4.2 fueron obtenidos en colaboración con Nicole Reynaert.

comparables a los de la larva control antes de ser expuesta a CuSO_4 (Figura 12a). Esta significativa reducción en el número de leucocitos cerca del tejido dañado sugiere un proceso activo de resolución de la inflamación inducida por CuSO_4 .

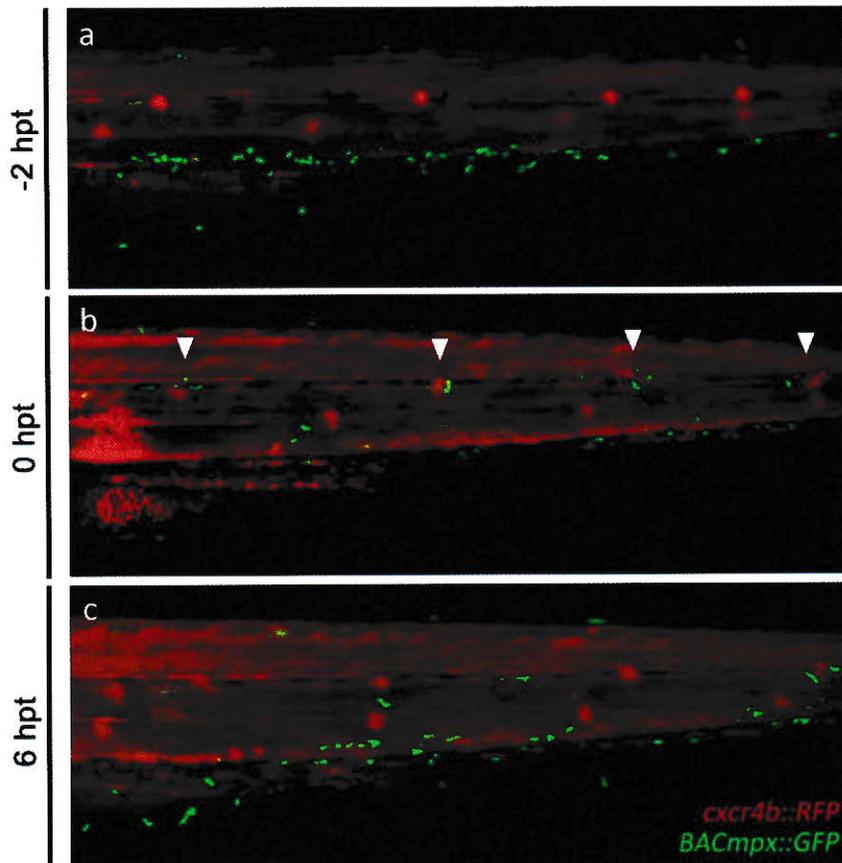


Figura 12. Resolución de la inflamación inducida por daño a los neuromastos con CuSO_4 . Fotografías de una larva doble transgénica $\text{Tg}(cxcr4b::RFP; BACmpx::GFP)$ cuya línea lateral expresa RFP (en rojo) y cuyos neutrófilos expresan GFP (en verde). **a**, larva de 72 hpf fotografiada antes de ser expuesta a CuSO_4 . Nótese los neuromastos regularmente espaciados marcados en rojo y el escaso número de neutrófilos (en verde) cerca de ellos. Los neutrófilos se concentran en la zona ventral (ICM). **b**, larva de 74 hpf fotografiada luego de ser expuesta a CuSO_4 10 μM por 2 horas. En esta condición de inflamación, numerosos neutrófilos se hayan agrupados alrededor de cada neuromasto (señalados con triángulos blancos). **c**, larva de 80 hpf que tras ser expuesta a CuSO_4 10 μM por 2 horas fue puesta en medio libre de CuSO_4 e incubada por 6 horas. En esta condición se observa un número muy menor de neutrófilos cerca de los neuromastos en comparación al de **b**, casi comparable al de **a**. hpt, horas post tratamiento.

Los resultados muestran que tras la inflamación inducida por daño con CuSO_4 ocurre un proceso activo de resolución, en el que tras algunas horas la agrupación de neutrófilos en el miosepto de las larvas es resuelta. En experimentos en mamíferos, se ha mostrado que los neutrófilos entran en apoptosis, y que los macrófagos fagocitan neutrófilos apoptóticos para luego abandonar el área del daño o infección migrando activamente (Lawrence et al., 2002; Gilroy et al., 2004). En trabajos en pez cebra también se ha reportado la apoptosis de neutrófilos (Loynes et al., 2010; Elks et al., 2011) durante la resolución de la inflamación, si bien el proceso por el que la mayoría de los neutrófilos abandonan el foco de inflamación es la migración retrógrada (Mathias et al., 2006). Para observar el comportamiento de los neutrófilos durante la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 , se realizaron experimentos de microscopía de tiempo extendido (*time lapse*) de larvas transgénicas *BACmpx::GFP*. Brevemente, las larvas fueron expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas a partir de las 72 hpf y luego fueron sometidas a lavados intensivos para descartar todo el CuSO_4 , tras los cuales fueron anestesiadas para la adquisición de imágenes en un estereoscopio de fluorescencia. En la Figura Suplementaria 9 se observan las 4 primeras horas de la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 . En los primeros cuadros de la secuencia es posible observar los grupos sucesivos de neutrófilos alrededor de los neuromastos a lo largo del tronco y la cola (Figura Suplementaria 9, triángulos azules). Luego se observa un activo proceso de migración de los neutrófilos, entre los cuales algunos abandonan el miosepto migrando hacia la zona ventral y parecen quedarse en la ICM, otros migran hacia la zona dorsal, y otra parte de ellos permanece en el miosepto, relativamente inmóviles o realizando movimientos a lo largo del miosepto. Al final de la secuencia

(Figura Suplementaria 9) se muestra una comparación entre el primer cuadro de la secuencia (arriba) y el último (abajo), y se observa una robusta disminución en el número de neutrófilos en el miosepto de la larva, indicando el progreso de la resolución.

4.2.2 Curso temporal de la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄

Con el propósito de investigar a lo largo del tiempo el proceso de resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄, se determinó el número promedio de neutrófilos o leucocitos en el miosepto de larvas *BACmpx::GFP* o *lysC::EGFP*, respectivamente, a distintos tiempos a lo largo de la inflamación y la resolución posterior (Figura 13). Se tomaron grupos de 30 larvas transgénicas *BACmpx::GFP* o *lysC::EGFP* (mezcla $\frac{1}{3}$ homocigota y $\frac{2}{3}$ heterocigota, proveniente de un cruce entre adultos heterocigotos) de 72 hpf y se los expuso a CuSO₄ 10 μ M durante 2 horas, luego fueron lavados repetidamente con E3 a fin de eliminar cualquier rastro de CuSO₄ y se los incubó en ausencia de CuSO₄ por tiempos variables. A intervalos de 2 horas, se contó en un estereoscopio de fluorescencia el número de células GFP⁺ en el miosepto de cada larva de un grupo. Cada tiempo representa un grupo distinto de larvas, todas expuestas a CuSO₄ e incubadas en paralelo. En la Figura 13a se muestra el promedio de neutrófilos en el miosepto durante la inflamación (justo después de -2 hpt hasta 0 hpt) y las primeras 10 horas de la resolución. Pero dado que las larvas homocigotas y heterocigotas para cada transgén no tienen exhiben el mismo número de células

marcadas, los promedios de células no pueden ser considerados como estimaciones del número absoluto de células en cada situación, sino como un indicador de las variaciones del número de células en cada situación. Teniendo esto en cuenta, se observa en la Figura 13a que tras 2 horas de exposición a CuSO_4 $10 \mu\text{M}$, el número promedio de neutrófilos en el miosepto se eleva aproximadamente 7 veces. Se muestra además que a partir las 0 hpt (momento de término de la incubación en CuSO_4) el número promedio de neutrófilos en el miosepto de las larvas desciende constantemente durante las 8 horas siguientes. Una regresión no lineal de los números promedio de neutrófilos en el miosepto desde 0 a 8 hpt nos muestra que el número promedio de neutrófilos en el miosepto decae exponencialmente (ver Figura Suplementaria 10a) con una vida media de aproximadamente 1 hora. La Figura 13a muestra además que, a pesar de disminuir sustancialmente durante las 10 horas de resolución de la inflamación que fueron estudiadas, el número de neutrófilos en el miosepto de las larvas experimentales permaneció significativamente más alto que el de las larvas control no tratadas. En un experimento similar realizado con larvas transgénicas *lysC::EGFP*, cuyos leucocitos expresan EGFP, se observan resultados similares (ver Figura 13b). Después del tratamiento con CuSO_4 , el número de células EGFP^+ (al tiempo 0 hpt) es aproximadamente 8 veces mayor al de los controles no tratados. También se observa que el número de células EGFP^+ en el miosepto de las larvas experimentales se mantiene significativamente mayor al de las larvas control durante las primeras 8 horas de resolución, pese a disminuir considerablemente. En este caso también se realizó una regresión, que sugiere que el número de células EGFP^+ en el miosepto decae exponencialmente (Figura Suplementaria 10b).

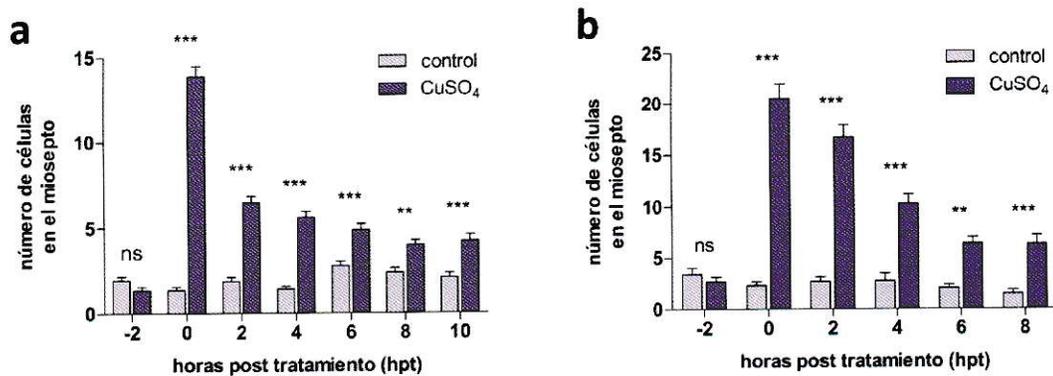


Figura 13. Curso temporal del número de leucocitos en el miosepto de larvas expuestas a CuSO₄ durante la resolución. **a**, número promedio de neutrófilos en el miosepto durante la inflamación (justo después de -2 hpt hasta 0 hpt) y las primeras 10 horas de resolución (0 hpt en adelante), cuantificado en larvas transgénicas *BACmpx::GFP*. Los resultados son promedios \pm error estándar del promedio de 55 a 60 larvas en 3 experimentos independientes. **b**, número promedio de leucocitos en el miosepto de larvas transgénicas *lysC::EGFP* durante la inflamación y las primeras 8 horas de resolución de la inflamación. Los resultados son promedios \pm error estándar del promedio de 15 larvas. Todas las comparaciones se realizaron por ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

La observación cuidadosa de los resultados mostrados en la Figura 13 y de su análisis en la Figura Suplementaria 10, muestra diferencias entre las cuantificaciones de células inmunes durante la resolución de la inflamación realizadas en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP* (o *lysC::DsRED2*) derivadas probablemente del hecho ya documentado que las poblaciones celulares marcadas en ambos transgénicos no son idénticas (Hall et al. 2007). Sin embargo, los datos sugieren además que los distintos tipos celulares no se comportan idénticamente durante la resolución de la inflamación, a pesar del hecho que en el análisis de la inflamación inducida por CuSO₄ no se hallaron diferencias significativas. Por esta razón, se realizó un experimento en el que se

compararon los números de células inmunes en el miosepto de larvas de ambos transgénicos (*BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP* en este caso) a lo largo de la resolución de la inflamación (ver Figura 14). Los resultados muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número de células inmunes en el miosepto de ambos transgénicos a partir de las 2 hpt, que se mantiene hasta las 8 hpt. La Figura 14 muestra que ya a las 10 hpt las diferencias entre ambos transgénicos no son estadísticamente significativas.

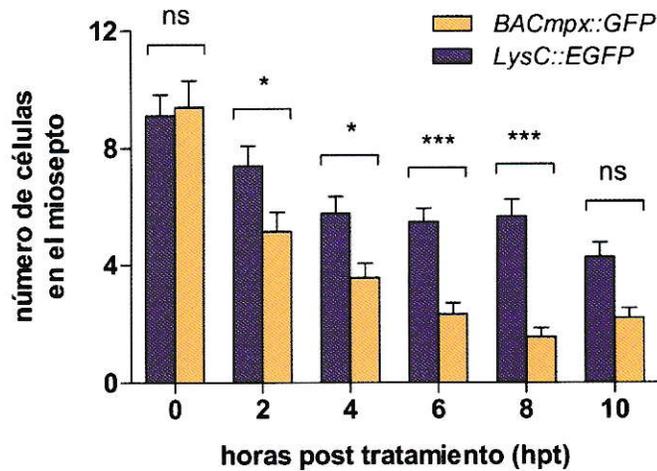


Figura 14. Comparación del reclutamiento de leucocitos cuantificado en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP*. Se compara el número promedio de células inmunes reclutadas al miosepto de larvas transgénicas *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP* tras ser expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas desde las 72 hpf. Los resultados se muestran como el promedio \pm error estándar de 21 larvas para cada tiempo y condición. Las comparaciones se realizaron por ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

Estos resultados (Figura 14) sugieren que un grupo de células que expresan GFP en el transgénico *lysC::EGFP* (distinto de los neutrófilos, probablemente) se comportan distinto de las células que expresan GFP en el transgénico *BACmpx::GFP*, y en particular, permanecen más tiempo en el miosepto de las larvas durante la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 . Sin embargo, al observar el doble transgénico $\text{Tg}(\textit{lysC}::\textit{DsRED2}; \textit{BACmpx}::\textit{GFP})$, observamos que prácticamente todas las células marcadas son positivas para ambos marcajes, y que no se observan células GFP^+ ; DsRED2^- o GFP^- ; DsRED2^+ (Figura Suplementaria 11). Este hecho descarta la posibilidad de que los resultados de la Figura 14 puedan explicarse en términos de células $\textit{BACmpx}::\textit{GFP}^+ ; \textit{lysC}::\textit{EGFP}^-$ y $\textit{BACmpx}::\textit{GFP}^- ; \textit{lysC}::\textit{EGFP}^+$. Además, esto elimina también la posibilidad de realizar conteos en larvas dobles transgénicas $\text{Tg}(\textit{lysC}::\textit{DsRED2}; \textit{BACmpx}::\textit{GFP})$ y luego comparar los números de células en el canal GFP y DsRED2. Por esta razón, se realizó un experimento en el que se midió la fluorescencia promedio en cada canal de larvas dobles transgénicas $\text{Tg}(\textit{lysC}::\textit{DsRED2}; \textit{BACmpx}::\textit{GFP})$ en distintas fases de la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 . Se utilizaron larvas dobles transgénicas $\text{Tg}(\textit{lysC}::\textit{DsRED2}; \textit{BACmpx}::\textit{GFP})$ que a las 72 hpf fueron expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas, y luego se realizaron lavados con E3 para descartar el CuSO_4 . Entre las 0 hpt y 1 hpt se fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia las células en el miosepto de 5 larvas, y luego, entre las 5 hpt y 6 hpt, se fotografiaron las células en el miosepto de 7 larvas. Luego se midió el promedio de intensidad de fluorescencia en cada canal para todas las células fotografiadas y se calculó la razón entre el promedio de intensidad de fluorescencia en el canal GFP y el promedio de intensidad de fluorescencia en el canal DsRED2. En la

Figura 15 se grafica la razón entre la intensidad de fluorescencia en ambos canales para cada célula de ambos grupos, y se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de las razones de intensidad de fluorescencia de ambos a distintos tiempos de resolución de la inflamación ($p = 0,0013$). En el gráfico (Figura 15), los puntos rojos representan células cuya razón GFP/DsRED2 es menor a 1, es decir, en ellas la intensidad de DsRED2 es mayor a la de GFP, comparables a las células rojizas en la Figura Suplementaria 11 (triángulos blancos). Y los puntos verdes representan células cuya razón GFP/DsRED2 es mayor a 1, en las que la intensidad de GFP es mayor a la de DsRED2, como la célula verdosa en la Figura Suplementaria 11 (flecha blanca). La línea discontinua señala la razón GFP/DsRED2 igual a 1, en que las intensidades en ambos canales son iguales. En la Figura 15 se observa que al inicio de la resolución (0-1 hpt), hay células de razón GFP/DsRED2 mayor a 1 (puntos verdes, 15 de 56 totales, ~26%), mientras que en una fase más avanzada de la resolución (5-6 hpt), sólo se observan células de razón GFP/DsRED2 menor a 1 (puntos rojos). Este resultado sugiere que, en larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; BACmpx::GFP)*, las células que expresan mayores niveles de DsRED2 en comparación a GFP, están presentes en mayor proporción en las fases avanzadas de la resolución, que las células que expresan mayores niveles de GFP.

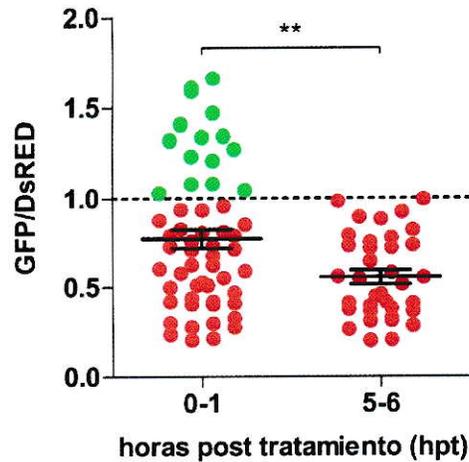


Figura 15. Comparación de leucocitos de larvas transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; BACmpx::GFP)* en distintas fases de la resolución. Se grafica la razón entre el promedio de intensidad de fluorescencia en el canal GFP y el promedio de intensidad de fluorescencia en el canal DsRED2 de leucocitos en el miosepto de larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; BACmpx::GFP)* en dos momentos distintos de la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 10 μM por 2 horas a partir de las 72 hpf. Se muestra que los promedios de las razones de intensidad de fluorescencia entre ambos canales son significativamente distintos en distintas fases de la resolución ($p = 0,0013$). En particular, se observa que a 0-1 hpt, hay algunas células cuya razón GFP/DsRED2 es mayor a 1 (puntos verdes), mientras que a 5-6 hpt, todas las células medidas tienen una razón GFP/DsRED2 menor a 1 (puntos rojos). Los resultados se muestran como el promedio \pm error estándar (líneas negras) de las mediciones realizadas en 56 células en el miosepto de larvas de 0-1 hpt y 36 células en el miosepto de larvas de 5-6 hpt. Se muestra además cada dato de ambos grupos coloreado según su razón GFP/DsRED2 sea mayor a 1 (puntos verdes), lo que indica que la intensidad de GFP es mayor a la de DsRED2 en esa célula; o menor a 1 (puntos rojos), lo que indica que la intensidad de GFP es menor a la de DsRED2 en esa célula. Los resultados fueron analizados por prueba de t de Student de dos colas con corrección de Welch, ya que las varianzas de ambos grupos son significativamente distintas ($p < 0,0012$, prueba F). La línea discontinua señala la razón GFP/DsRED2 = 1, en que las intensidades en ambos canales son iguales. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

4.3 Rol de PI3K/Akt en la inflamación inducida por daño con CuSO₄

A continuación nos concentramos en el estudio de la vía de señalización PI3K/Akt en la inflamación, de la que se ha reportado está involucrada en la migración intersticial de las células inmunes y en el control de la apoptosis de los neutrófilos (Franke et al., 2003; Koyasu, 2003; Vanhaesebroeck et al., 2007; Yoo et al., 2010). Además, evidencia de nuestro laboratorio muestra que los genes sobreexpresados en larvas expuestas a CuSO₄ están significativamente enriquecidos en genes que codifican proteínas que forman parte de esta vía de señalización (Viviana Gallardo, comunicación personal), sugiriendo la activación de PI3K y Akt en larvas expuestas a CuSO₄.

4.3.1 Efecto de la inhibición farmacológica de PI3K durante la inflamación

Para estudiar el posible rol de PI3K en la inflamación inducida por daño con CuSO₄, se realizaron experimentos de inflamación inducida por daño con CuSO₄ en presencia de inhibidores de PI3K, en los que se contó el número de leucocitos reclutados en cada condición (ver Figura 16). En la Figura 16a se muestra el efecto de la inhibición farmacológica de PI3K usando el inhibidor LY294002. En este experimento se utilizaron larvas *lysC::EGFP* de 56 hpf preincubadas durante 30 minutos a 28,5 °C en LY294002 o DMSO 0,2 %(v/v), y luego fueron expuestas a CuSO₄ 10 μM por 40 minutos. Al término de la exposición las larvas fueron anestesiadas y se contó el número de leucocitos a lo largo del miosepto en cada condición. Los resultados de estos conteos (ver Figura 16a) muestran que tanto controles negativos (sin CuSO₄) y positivos (con

CuSO₄) no varían con la adición de DMSO 0,2 %(v/v). Además, se muestra que hay una disminución estadísticamente significativa del número promedio de leucocitos reclutados al miosepto de las larvas al ser incubadas en LY294002 50 μM (0,01 < *p* < 0,001) y 100 μM (*p* < 0,001), sugiriendo que la respuesta inflamatoria es dependiente de PI3K en algún nivel. Es interesante notar además que el número promedio de leucocitos en el miosepto de las larvas disminuye linealmente ($R^2 = 0,98$) con la concentración de LY294002 usada (ver Figura Suplementaria 12) en el rango de 0 μM a 100 μM.

Usando otro inhibidor de PI3K, *wortmannin*, se obtienen resultados similares de disminución del reclutamiento de leucocitos al miosepto en condiciones de inhibición farmacológica de PI3K (ver Figura 16b). En este caso, se utilizaron larvas *BACmpx::GFP* (mezcla 1/3 homocigota y 2/3 heterocigota, proveniente de un cruce entre adultos heterocigotos) de 57 hpf preincubadas durante 30 minutos en *wortmannin* o DMSO 0,25 %(v/v), que luego fueron expuestas a CuSO₄ 10 μM por 40 minutos y finalmente fueron anestesiadas para contar el número de células reclutadas a lo largo del miosepto. En la Figura 16b se muestran los resultados de los conteos, que indican que a las concentraciones probadas *wortmannin* inhibe robustamente el reclutamiento de neutrófilos al miosepto (*p* < 0,001) de modo consistente con los resultados obtenidos con LY294002 (Figura 16a). De modo análogo, en otros experimentos se mostró que la inhibición farmacológica de PI3K afecta la migración del primordio de la línea lateral (Figura Suplementaria 13), lo que sugiere un rol más general para PI3K en la migración celular, y no restringido al movimiento de células inmunes.

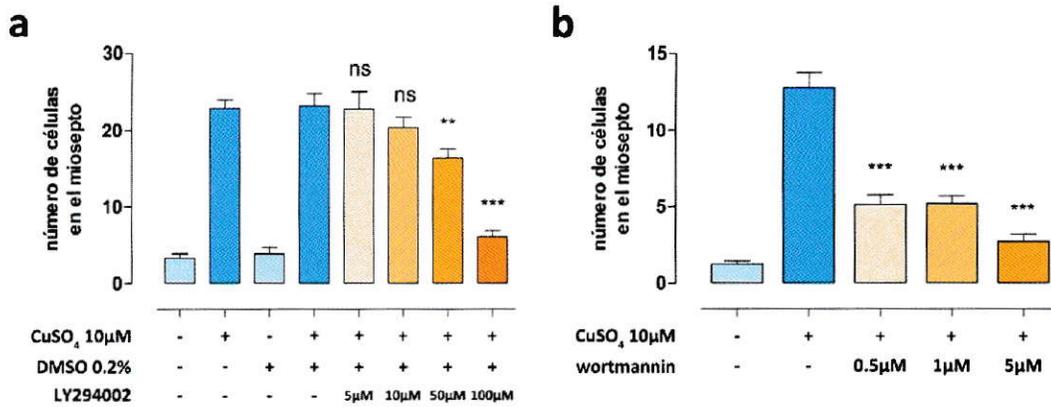


Figura 16. Disminución del reclutamiento de leucocitos por inhibición farmacológica de PI3K en larvas expuestas a CuSO₄. **a**, número de leucocitos reclutados al miosepto de larvas *lysC::EGFP* preincubadas por 30 minutos en LY294002 y luego expuestas por 40 minutos a CuSO₄ 10 μM. Los resultados se muestran como promedio ± error estándar de 15 larvas para cada tratamiento. **b**, número de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas *BACmpx::GFP* preincubadas durante 30 minutos en *wortmannin* y luego expuestas a CuSO₄ 10 μM por 40 minutos. Los resultados se muestran como promedio ± error estándar de 17 - 21 larvas para cada tratamiento. Todas las comparaciones se realizaron contra los controles positivos expuestos a CuSO₄ por ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

A causa de la posibilidad de que los resultados mostrados en la Figura 16 se debiesen a interacción entre los inhibidores y el CuSO₄, y no a un efecto directo de éstos sobre la actividad de PI3K, se desarrolló un experimento en el que la exposición a CuSO₄ se llevó a cabo en ausencia de inhibidores (Figura Suplementaria 14). Para descartar que los inhibidores interfirieran con el daño provocado por el CuSO₄, y con ello produzcan menor reclutamiento de células inmunes, se desarrolló un experimento en el que larvas *BACmpx::GFP* fueron preincubadas por 1 hora en inhibidores de PI3K (*wortmannin* 5 μM y LY294002 50 μM), luego puestas en medio libre de inhibidores y expuestas a CuSO₄ 10 μM por 40 minutos. Finalmente, se contó el número de

neutrófilos reclutados al miosepto. Los resultados, en la Figura Suplementaria 14, muestran que en estas condiciones también se reduce significativamente el número de leucocitos reclutados al miosepto tras el daño ocasionado por CuSO_4 , lo que sugiere que los resultados antes obtenidos (Figura 16) se deben a la inhibición de la actividad de PI3K y refuerzan la hipótesis de que PI3K tiene un rol en la infiltración de los leucocitos.

4.3.2 Activación de Akt inducida por daño con CuSO_4

Una vez establecido que PI3K tiene un papel en el reclutamiento de leucocitos en la inflamación inducida por daño con CuSO_4 a los neuromastos, nos concentramos en uno de sus blancos, Akt. La activación de Akt depende por un lado de la unión de PIP_3 , sintetizado por PI3K, y por el otro, de la fosforilación por otras kinasas. Sin embargo, las fosforilaciones activadoras de Akt sólo se producen cuando Akt se ha ubicado en la membrana a través de la unión a PIP_3 , y cuando Akt ya ha sido fosforilado, es capaz de fosforilar a su vez a sus numerosos blancos (Cantley, 2009). Teniendo en cuenta que PI3K parece estar activo durante la inflamación inducida por daño con CuSO_4 , ya que la inhibición farmacológica de su actividad reduce significativamente el reclutamiento de células inmunes (Figura 16), estudiamos la posible activación de Akt durante la inflamación mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo contra Akt fosforilado (serina 473) en larvas preincubadas en inhibidores de PI3K (*wortmannin* 5 μM y LY294002 100 μM) y luego expuestas a CuSO_4 10 μM por 40 minutos (ver Figura 17). Además, dado que existe evidencia de que *c-met* podría actuar río arriba de

PI3K, también se estudió la activación de Akt en presencia de inhibidores de *c-met* (K252a 10 μ M y *Met inhibitor I* 10 μ M). La Figura 17a muestra una larva incubada en DMSO en la que se observan algunas células marcadas en la ICM (Figura 17a') que eventualmente podrían ser leucocitos. En línea con esta idea, en la Figura 17b vemos una larva preincubada en DMSO y luego expuesta a CuSO_4 en la que se observan grupos de células marcadas a lo largo del miosepto (triángulos negros) y también células marcadas en la ICM (Figura 17b'). Este resultado sugiere que leucocitos reclutados a los neuromastos tras el daño con CuSO_4 tienen altos niveles de Akt fosforilado, en comparación con células de los tejidos circundantes. El hecho que todas las larvas observadas muestren distintas distribuciones de células marcadas, a pesar de compartir el patrón común de tener grupos de células a lo largo del miosepto, sugiere también que se trata de células en movimiento. Por otro lado, la presencia de células marcadas 'a medio camino' (Figura 17b', flechas negras), es decir, células marcadas que no se encuentran ni en la ICM (como se observó en los controles negativos, Figura 17a') ni agrupadas cerca de los neuromastos (como en el control positivo, Figura 17b', triángulo negro) sugiere que la activación de Akt no se da solamente en los neuromastos producto del daño con CuSO_4 (cosa que no se descarta), sino que también en otras células. En la Figura 17c se muestra una larva preincubada en *wortmannin* 5 μ M, un inhibidor de PI3K, y luego expuesta a CuSO_4 . No se observan los grupos de células marcadas presentes en el control positivo (Figura 17b), y si nos concentramos en la ICM, se observa un reducido número de células marcadas en la ICM (Figura 17c'). Del mismo modo, en larvas preincubadas en LY294002 100 μ M, otro inhibidor de PI3K (Figura 17d), no se observan grupos de células marcadas a lo largo del miosepto, y en la ICM

hay un número aparentemente reducido de células marcadas (Figura 17d'). Estos resultados en conjunto sugieren que la activación de Akt observada en el control positivo (Figura 17b) es dependiente de PI3K, cuya inhibición farmacológica reduce el número de células positivas para Akt fosforilado (Figura 17c y Figura 17d). En el caso de las larvas preincubadas en inhibidores de *c-met* (Figura 17e y 17f), se observan resultados similares. En la Figura 17e se muestra una larva preincubada en K252a 10 μ M, un inhibidor de *c-met*, en la que no se distinguen grupos de células marcadas a lo largo del miosepto, pero sí un número reducido de células marcadas en la ICM. En la magnificación (Figura 17e') es posible distinguir algunas de las células marcadas en la ICM, y la ausencia de células marcadas en el miosepto. Utilizando otro inhibidor de *c-met*, *Met inhibitor I* 10 μ M, se observa un efecto más leve (Figura 17f), en el que el número de grupos de células marcadas en el miosepto (Figura 17f, triángulos negros) de las larvas expuestas al inhibidor es menor al de los controles positivos (Figura 17b, triángulos negros). Se observa también un número reducido de células marcadas en la ICM (Figura 17f'). Es interesante relacionar este resultado de inhibición parcial de la activación de Akt por *Met inhibitor I* 10 μ M con los experimentos de efecto de la inhibición farmacológica de *c-met* en el reclutamiento de neutrófilos (Figura 7), que muestran que *Met inhibitor I* 10 μ M no produce cambios significativos en el número promedio de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas expuestas a CuSO_4 . Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una activación de Akt durante la inflamación de modo dependiente de PI3K y *c-met*.

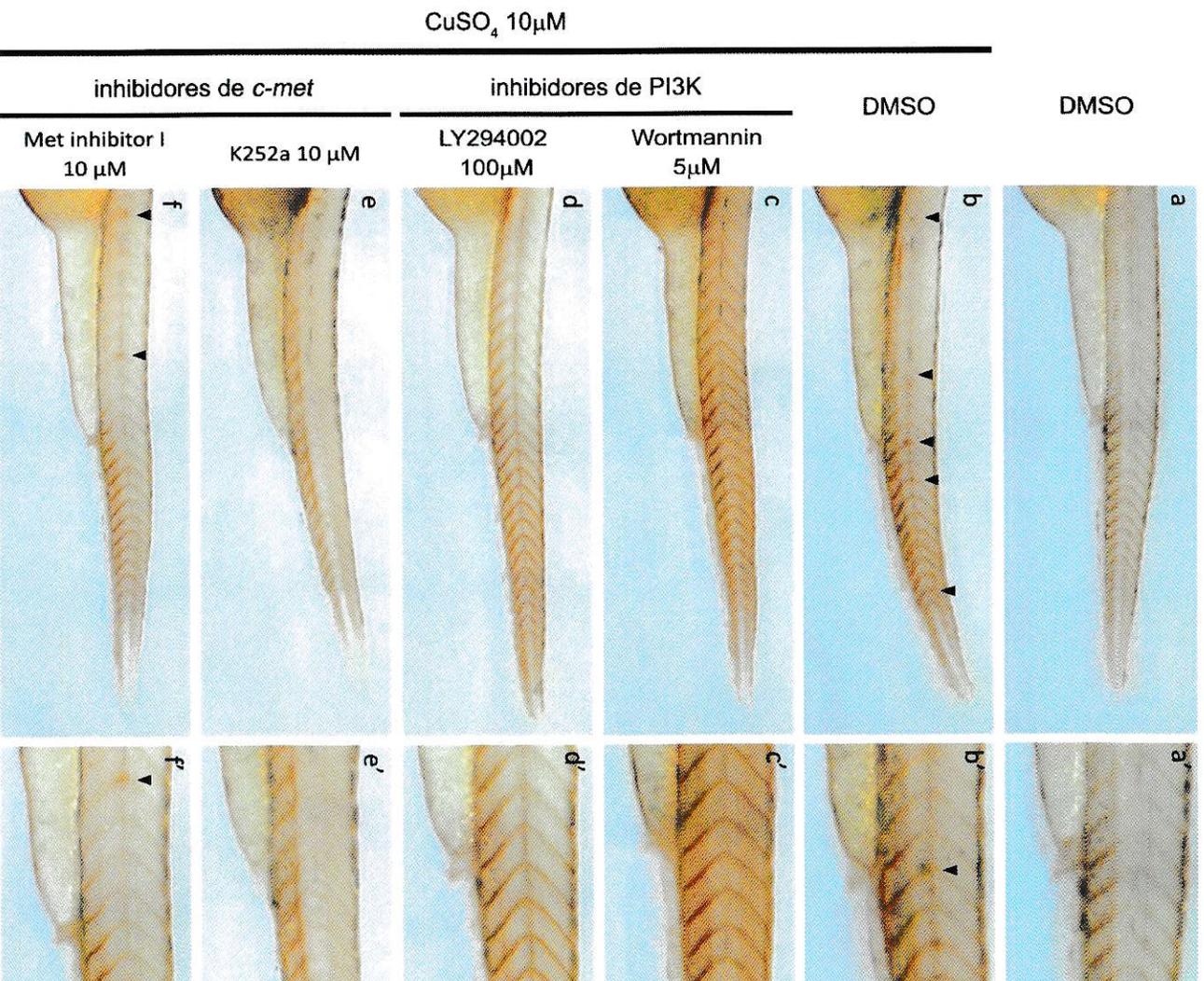


Figura 17. Activación de Akt en larvas expuestas a CuSO₄ en presencia de inhibidores de PI3K y *c-met*. Immunohistoquímica de Akt fosforilado (serina 473) en larvas preincubadas en inhibidores de PI3K y *c-met* y luego expuestas a CuSO₄ 10 μM por 40 minutos. **a**, larva control expuesta al solvente (DMSO). En la magnificación, **a'**, se pueden apreciar células marcadas en la ICM; **b**, larva preincubada en solvente y expuesta a CuSO₄. Se observan grupos de células marcadas a lo largo del miosepto

(triángulos negros). En la magnificación (**b'**) se observa un grupo de células marcadas en el miosepto (triángulo negro) además de otras células en la ICM. **c**, larva preincubada en *wortmannin* 5 μM y expuesta a CuSO_4 . Sólo en la magnificación, **c'**, se observan algunas células marcadas en la ICM, pero ninguna en el miosepto. **d**, larva preincubada en LY294002 100 μM y expuesta a CuSO_4 . No se observan células marcadas en el miosepto, y en la magnificación en **d'**, es posible ver algunas células marcadas en la ICM. **e**, larva preincubada en K252a 10 μM y expuesta a CuSO_4 . No es posible observar células marcadas en el miosepto, y la magnificación en **e'**, permite ver algunas células marcadas en la ICM. En **f**, se muestra una larva preincubada en *Met inhibitor I* 10 μM y expuesta a CuSO_4 , con grupos de células marcadas a lo largo del miosepto (triángulos negros), aunque menos frecuentes que en la larva control positivo en **b**. En la magnificación, en **f'**, se muestra uno de estos grupos (triángulo negro), además de algunas células marcadas en la ICM.

Dado que los resultados de inmunohistoquímica de Akt fosforilado en larvas expuestas a CuSO_4 (Figura 17) sugieren una activación de Akt en células inmunes, realizamos experimentos de inmunofluorescencia doble contra Akt fosforilado (serina 473) y GFP en larvas transgénicas *BACmpx::GFP*, cuyos neutrófilos expresan GFP, expuestas a CuSO_4 (Figura 18). En general, no fue posible observar Akt fosforilado en neutrófilos en la ICM en larvas control (Figura Suplementaria 15, primera columna), sin embargo, sí se observa activación de Akt en neutrófilos ocasionales que se observan en el miosepto de las larvas control (Figura 18a-c). En el caso de las larvas expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas, los neutrófilos reclutados en un neuromasto presentan mayores niveles de Akt fosforilado (Figura 18d) en comparación con los controles no tratados (Figura 18a). Y en el caso de las larvas expuestas a CuSO_4 50 μM por 2 horas, se observa además de activación de Akt en un neutrófilo, que otros tipos celulares en el neuromasto dañado presentan activación de Akt (Figura 18g). En estas condiciones es posible observar además activación de Akt en neutrófilos que no están agrupados

alrededor de los neuromastos, como en la aleta caudal (Figura Suplementaria 15, segunda columna).

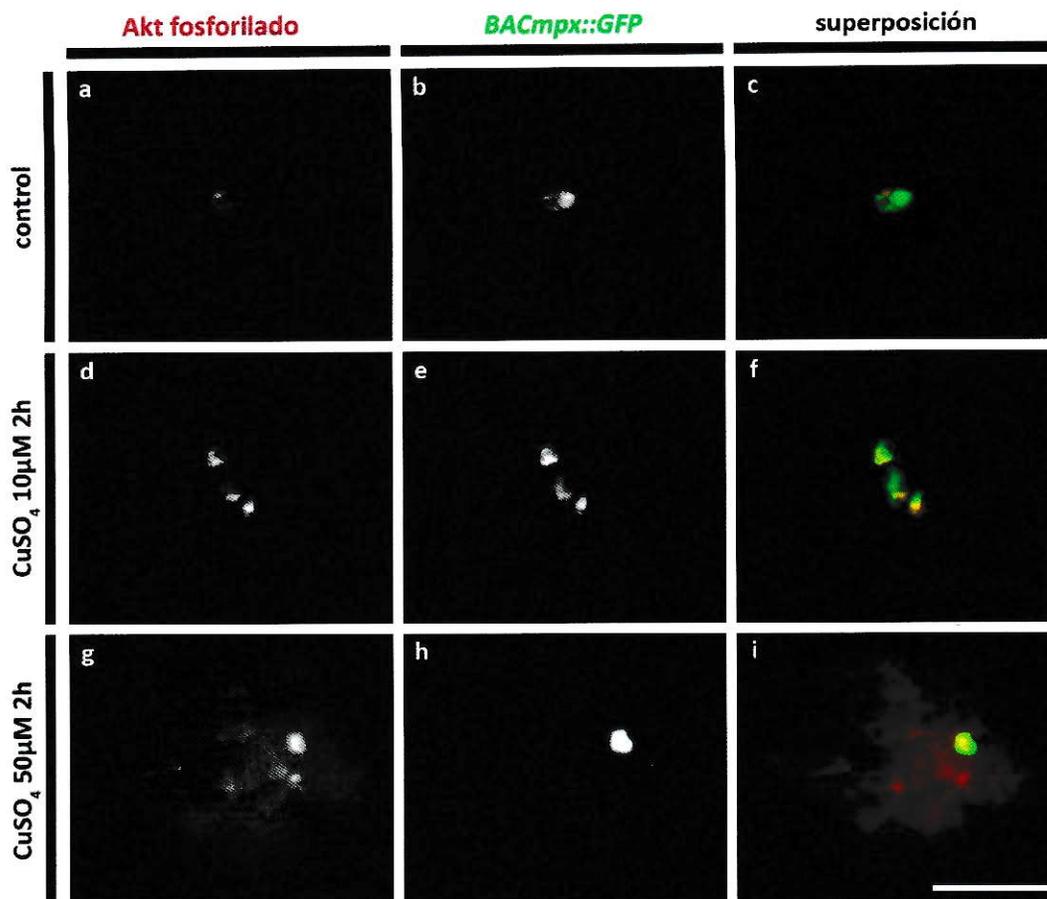


Figura 18. Activación de Akt en neutrófilos. Inmunofluorescencia doble de Akt fosforilado (serina 473, columna izquierda) y GFP (columna central) en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 72 hpf control (primera fila, **a-c**) y expuestas a CuSO₄ 10 µM (segunda fila, **d-f**) y 50 µM (tercera fila, **g-i**) por 2 horas. En la columna derecha se muestra la superposición de los dos canales. En **a-c**, se muestra un neutrófilo ocasional en el miosepto de una larva control que muestra bajos niveles de Akt fosforilado. En **d-f**, se muestran 3 neutrófilos reclutados a un neuromasto de una larva expuesta a CuSO₄ 10µM. Obsérvese que los 3 neutrófilos tienen niveles mayores de Akt fosforilado (en **d**) que el neutrófilo de la larva control (en **a**), y que la marca está polarizada en todas las células. En **g-i**, se muestra un neutrófilo reclutado a un neuromasto de una larva expuesta a CuSO₄ 50 µM. Nótese que el neutrófilo tiene altos niveles de Akt fosforilado y que además, existe gran número de otras células en el neuromasto con niveles considerables de activación de Akt. Todas las imágenes se muestran a la misma magnificación, indicada por la barra blanca en la esquina inferior derecha, que representa 50 µm.

4.3.3 Efecto de la inhibición farmacológica de Akt durante la inflamación

Los resultados de activación de Akt dependiente de PI3K, en parte en células inmunes, sugieren que Akt podría tener un papel en la inflamación, para evaluar esta hipótesis realizamos un experimento en el que cuantificamos el reclutamiento de neutrófilos inducido por daño con CuSO_4 en presencia de un inhibidor de Akt. En la Figura 19 se muestran los resultados de este experimento, en el que se usaron larvas transgénicas *BACmpx::GFP* (producto de un cruce entre adultos heterocigotos) preincubadas 30 minutos con inhibidor de Akt o solvente (etanol 0,5 % v/v) y luego con CuSO_4 10 μM por 40 minutos. Los conteos de neutrófilos reclutados al miosepto muestran que la inhibición farmacológica de Akt no produce efectos estadísticamente significativos en el reclutamiento de neutrófilos (Figura 19), por lo que, si bien se produce la activación de Akt durante la inflamación inducida por daño con CuSO_4 (Figura 17b), los resultados sugieren que Akt no tiene un rol en la infiltración de los neutrófilos en el tejido dañado.

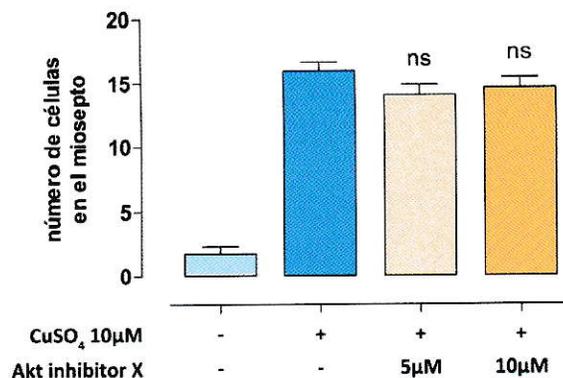


Figura 19. La inhibición farmacológica de Akt no tiene efecto sobre el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO₄. Cuantificación del número promedio de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas transgénicas *BACmpx::GFP* preincubadas 30 minutos con inhibidor de Akt y luego expuestas a CuSO₄ 10 µM por 40 minutos. Los resultados corresponden al promedio ± error estándar de conteos en un total de 40 larvas para cada condición, de 2 experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron contra los controles positivos, tratados con CuSO₄ y preincubados en etanol, por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo.

4.3.4 Efecto de la inhibición farmacológica de PI3K durante la resolución de la inflamación

A continuación estudiamos el rol de PI3K durante la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄. Los resultados obtenidos de los experimentos de inhibición farmacológica de PI3K durante la inflamación inducida por daño con CuSO₄ (Figura 16) sugieren que PI3K tiene un rol en el reclutamiento de células inmunes al sitio de daño. De hecho, existe numerosa evidencia del papel de PI3K en la migración celular, en especial de neutrófilos (Sasaki et al., 2000; Rickert et al., 2010; Iglesias, 2009), y también en pez cebra (Yoo et al., 2010). Estos datos sugieren que en el proceso de resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄ PI3K podría tener un rol

importante debido a que, como se muestra en la Figura Suplementaria 9, gran parte de los neutrófilos migran hacia la ICM y al borde dorsal durante la resolución. En la Figura 20 se muestran los resultados de experimentos de inhibición farmacológica de PI3K, usando *wortmannin* 5 μM en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* o *lysC::EGFP* inmediatamente después de descartar el CuSO_4 . Los resultados en la Figura 20a muestran que tras 4 horas de resolución, el número promedio de neutrófilos en el miosepto de las larvas expuestas al inhibidor es significativamente mayor ($p < 0,001$) que el de los controles positivos, lo que sugiere que la inhibición de PI3K está retardando la resolución (en términos del número de neutrófilos). Por otro lado, la Figura 20b muestra el efecto de la inhibición de PI3K en las mismas condiciones, sobre la resolución en larvas transgénicas *lysC::EGFP*. Los resultados muestran que después de 2 horas de resolución, las larvas expuestas al inhibidor de PI3K tienen en promedio significativamente menos leucocitos en el miosepto comparadas con los controles positivos ($0,01 < p < 0,05$), lo que sugiere que la inhibición de PI3K está acelerando la resolución (en términos del número de leucocitos).

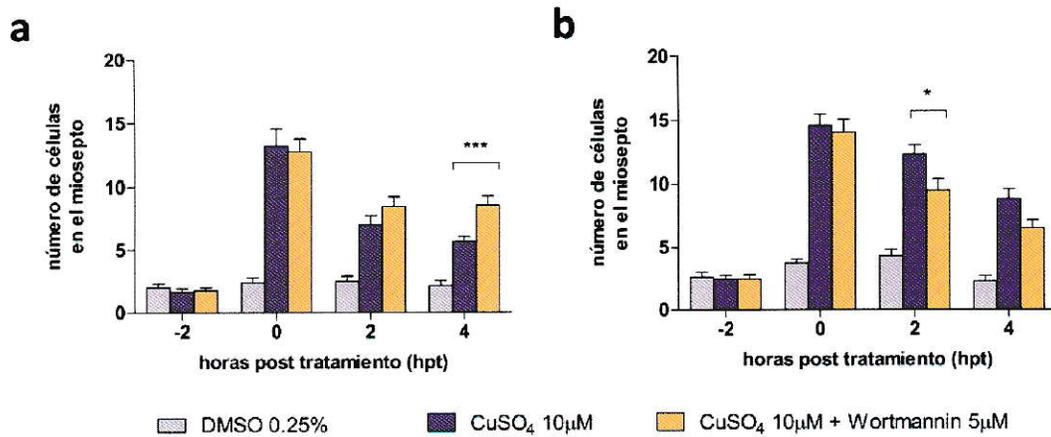


Figura 20. Efectos de la inhibición farmacológica de PI3K en la resolución de la inflamación. **a**, número promedio de neutrófilos en el miosepto durante la inflamación y las primeras 4 horas de resolución, cuantificado en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* expuestas a CuSO₄ 10 μM por 2 horas y luego incubadas en inhibidor de PI3K (*wortmannin* 5 μM) o su solvente (DMSO 0,25%). Los resultados son promedios ± error estándar del promedio de 20 larvas para cada tiempo en cada condición. **b**, número promedio de leucocitos en el miosepto durante la inflamación y las primeras 4 horas de resolución, cuantificado en larvas transgénicas *lysC::EGFP* expuestas a CuSO₄ 10 μM por 2 horas y luego incubadas en inhibidor de PI3K (*wortmannin* 5 μM) o su solvente (DMSO 0,25%). Los resultados son promedios ± error estándar del promedio de 20 larvas para cada tiempo en cada condición. Todas las comparaciones se realizaron por ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

4.4 Metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación inducida por daño con CuSO₄

Finalmente, estudiamos el rol de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación. Evidencia proveniente de trabajos realizados en mamíferos muestra que MMP9 se expresa constitutivamente en neutrófilos y es inducible en muchos otros tipos celulares (Opdenakker et al., 2001). Se ha observado la inducción de MMP9 en procesos de inflamación, infección y en tumores (Opdenakker et al., 2001; Parks et al., 2004) y también durante la regeneración de tejidos (Parks, 1999). En el pez cebra, también se ha mostrado su inducción en tejidos dañados y en regeneración (Yoong et al., 2007; Yoshinari et al., 2009). Además, evidencia de nuestro laboratorio muestra la inducción de *mmp9* en larvas expuestas a CuSO₄, en experimentos de microarreglos (Viviana Gallardo, comunicación personal), en células en grupos a lo largo del miosepto horizontal, en experimentos de hibridación *in situ* (Peña, 2011), lo que sugiere un rol para MMP9 en la inflamación inducida por daño con CuSO₄.

4.4.1 Inducción de la expresión de *mmp9* en larvas expuestas a CuSO₄

Mediante hibridación *in situ* se determinó el patrón de expresión de *mmp9* en larvas de 58 hpf expuestas a CuSO₄ 10μM por 2 horas y larvas no tratadas del mismo estadio (Figura 21). Las larvas control tienen bajos niveles de expresión de *mmp9*, que se concentra en algunas células ubicadas en el CHT (ver Figura 21a), donde reside la mayor parte de los leucocitos mieloides en este estadio de desarrollo (Lieschke et al.,

2001). En el caso de las larvas expuestas a CuSO_4 , además de la expresión ya observada en el CHT de las larvas no tratadas, se observa expresión de *mmp9* en células en el miosepto horizontal a lo largo del tronco y la cola (ver Figura 21b) y en particular alrededor de los neuromastos de la línea lateral posterior (ver Figura 21b, triángulo negro), lo que sugiere que *mmp9* es expresado en las larvas expuestas a CuSO_4 por células inmunes alrededor de los neuromastos (ver Figura 21b, recuadro). En larvas expuestas a CuSO_4 50 μM por 2 horas se obtienen resultados similares, aunque aparentemente la inducción de *mmp9* es más robusta en estas condiciones (Figura Suplementaria 16). Más aún, en larvas expuestas a radiación ionizante⁴, también es posible observar la inducción de *mmp9*, aparentemente de modo dependiente de la dosis (Figura Suplementaria 17).

⁴ Los resultados que se muestran en la Figura Suplementaria 17 fueron obtenidos en colaboración con Pamela Mena.

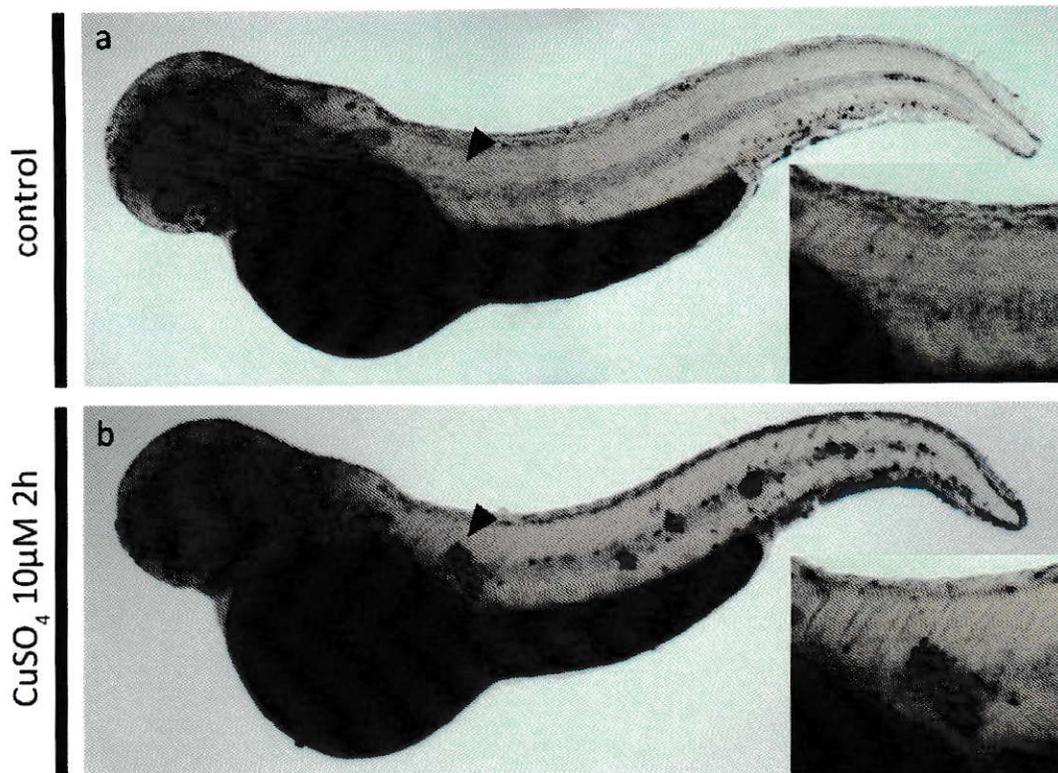


Figura 21. Inducción de la expresión de *mmp9* en larvas expuestas a CuSO₄. Hibridación *in situ* de *mmp9* en larva control de 58 hpf, **a**, y en una larva de 58 hpf tratada con CuSO₄ 10μM por 2 horas, **b**. En los recuadros se muestra en detalle el área del primer neuromasto de la línea lateral posterior (triángulos negros). Nótese que en ambos casos se observa expresión en el CHT, mientras que sólo en la larva expuesta a CuSO₄ se observa inducción de la expresión de *mmp9* en células alrededor de los neuromastos y en células a lo largo del miosepto.

4.4.2 Inducción de MMP9 en los neuromastos de larvas expuestas a CuSO₄

Los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación *in situ* muestran un aumento sustancial en los niveles de transcrito de *mmp9*, que sugieren un posible aumento de los niveles de MMP9 alrededor de los neuromastos de las larvas tratadas con CuSO₄. Mediante inmunofluorescencia se detectó la expresión de MMP9 en larvas de 58

hpf expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas y en larvas control no tratadas (Figura 22). En la larva control se observan bajos niveles de expresión de MMP9, distribuida de forma difusa (consistente con una proteína secretada al medio extracelular) hacia la zona ventral (Figura 22, panel superior izquierdo), sin embargo, un análisis detallado muestra que existen niveles bajos, pero detectables, de MMP9 en las células ciliadas de los neuromastos (Figura Suplementaria 18). En la larva expuesta a CuSO_4 , en cambio, se observa mayor expresión de MMP9 (Figura 22, panel superior derecho). La tinción de núcleos con DAPI (Figura 22, canal azul, tercera fila) permite distinguir la posición de dos de los neuromastos terminales de la cola, tanto en la larva control (en la que además es posible observar los cilios marcados con tubulina acetilada) como en la tratada con CuSO_4 (en la que no se observan cilios, reflejo del daño causado por la exposición a CuSO_4). Se observa en la superposición de los canales (Figura 22, última fila) que el daño con CuSO_4 induce un aumento sustancial de la expresión de MMP9 en el área de los neuromastos.

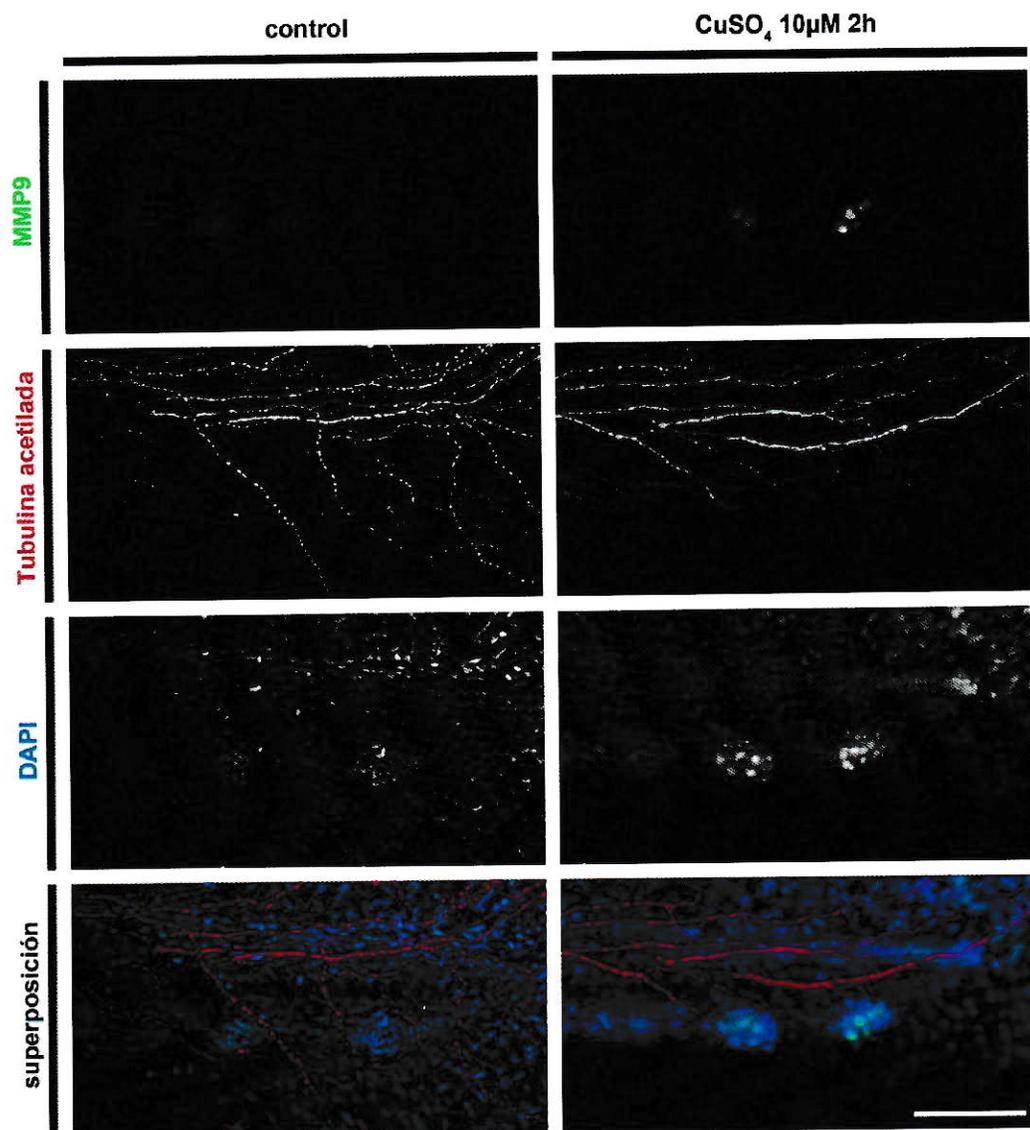


Figura 22. Inducción de la expresión de MMP9 en neuromastos de larvas expuestas a CuSO₄. Inmunofluorescencia doble de MMP9 (primera fila) y tubulina acetilada (segunda fila), y tinción de núcleos con DAPI (tercera fila) que muestran la inducción de MMP9 en neuromastos de una larva expuesta a CuSO₄ 10 μM por 2 horas (columna derecha) en comparación con el control no tratado (columna izquierda). En la última fila se muestran los canales, MMP9 (verde), tubulina acetilada (rojo) y DAPI (azul) superpuestos. En todas las imágenes, anterior se muestra a la izquierda, posterior, a la derecha; dorsal, arriba; y ventral, abajo. Todas las imágenes tienen la misma magnificación. La barra blanca en la esquina inferior derecha representa 100 μm.

4.4.3 Inducción de MMP9 en neutrófilos de larvas expuestas a CuSO₄

La inducción de MMP9 observada en los experimentos de inmunofluorescencia (Figura 22) en células en los neuromastos de larvas expuestas a CuSO₄ sugiere la posibilidad de que células inmunes reclutadas al tejido dañado induzcan MMP9. En la Figura 23 se muestran experimentos de inmunofluorescencia contra MMP9 y GFP en larvas transgénicas *BACmpx::GFP*, que expresan GFP en los neutrófilos, en los que se observan neutrófilos que expresan MMP9 en condiciones de inflamación inducida por daño con CuSO₄. En las larvas control la expresión de MMP9 es significativamente menor a la observada en larvas expuestas a CuSO₄ (véase también Figura 22). Sin embargo, es posible observar que algunos neutrófilos esporádicos observados normalmente en el miosepto de larvas control expresan niveles bajos de MMP9 (Figura 23a, triángulos blancos). Además, en las larvas control se observa expresión de MMP9 distribuida de forma difusa por el tejido (Figura 23a), tal como se observó antes (Figura 22). En las larvas expuestas a CuSO₄ 10 μM por 2 horas se observa, tal como se observó antes (Figura 22), inducción de MMP9 en el área de los neuromastos (Figura 23d). Es posible además, observar 4 neutrófilos reclutados a las cercanías de un neuromasto (Figura 23e) que expresan MMP9 (Figura 23d, triángulos blancos), aparentemente en mayores niveles a los de los neutrófilos de la larva control. Se observa también que otros tipos celulares expresan MMP9, posiblemente otros leucocitos y células adyacentes al tejido dañado.

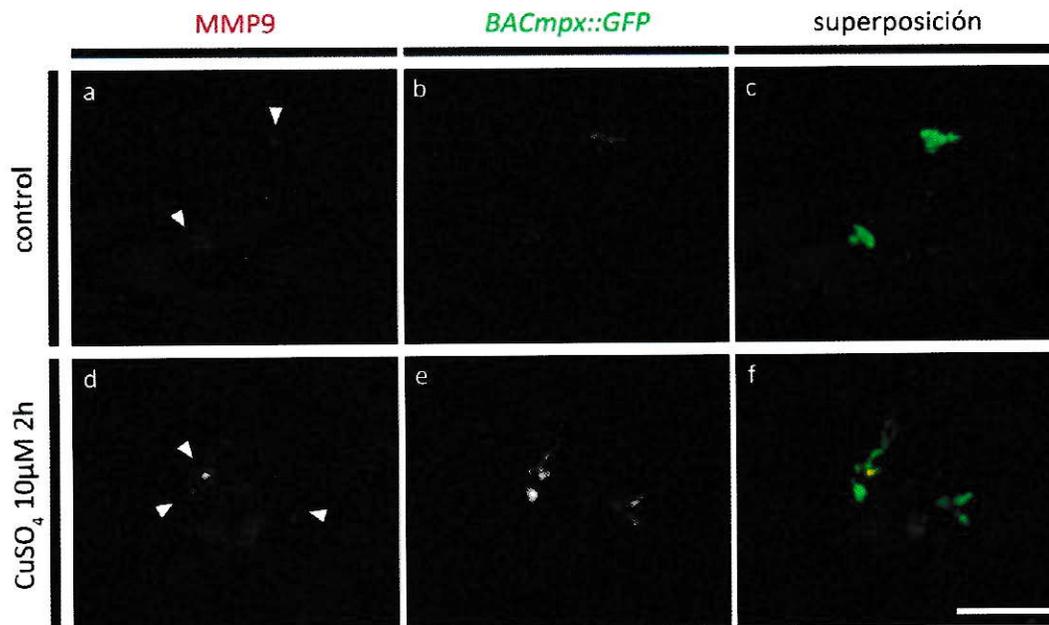


Figura 23. Inducción de MMP9 en neutrófilos. Inmunofluorescencia doble de MMP9 (columna izquierda, **a** y **d**) y GFP (columna central, **b** y **e**) en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 72 hpf control (primera fila, **a-c**) y expuestas a CuSO_4 10 μM por 2 horas (segunda fila, **d-f**). En la columna derecha (**c** y **f**) se muestra la superposición de los dos canales. En **a-c**, se muestran 2 neutrófilos en el miosepto de una larva control en los que es posible detectar bajos niveles de MMP9 (**a**, triángulos blancos). En **d-f**, se muestran 4 neutrófilos reclutados a un neuromasto de una larva expuesta a CuSO_4 10 μM . Los neutrófilos tienen niveles mayores de MMP9 (**d**, triángulos blancos), y se observan además otras células que expresan MMP9 en el área del neuromasto. Todas las imágenes se muestran a la misma magnificación, indicada por la barra blanca en la esquina inferior derecha, que representa 50 μm .

4.4.4 Inhibición farmacológica de MMP9 durante la inflamación inducida con

CuSO_4

Una vez demostrada la inducción, tanto del transcrito *mmp9* como de la proteína MMP9, se estudió el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad gelatinasa de MMP9 en el reclutamiento de neutrófilos al miosepto de larvas expuestas a CuSO_4 (ver

Figura 24). Básicamente, en estos experimentos se aplicó el mismo procedimiento mostrado en la sección 4.1.3 (Figuras 6, 7 y 8) con algunas modificaciones, en que se preincubaron larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 56 hpf con distintas concentraciones del inhibidor de MMP9 (1 μ M y 10 μ M) durante 1 hora, luego fueron expuestas a CuSO_4 10 μ M por 20 minutos, y finalmente se contó el número de neutrófilos en el miosepto para ser comparado después con el número de neutrófilos en el miosepto de larvas control preincubadas en el solvente del inhibidor (DMSO 0,1 %(v/v), en este caso) y luego expuestas a CuSO_4 . En la Figura 24 se observa que la inhibición de la actividad gelatinasa con *MMP9 inhibitor I* disminuye significativamente el número promedio de neutrófilos reclutados al miosepto tras una exposición de 20 minutos a CuSO_4 10 μ M ($0,01 < p < 0,05$, ANOVA de una vía). Experimentos similares en los que se evaluó el número de neutrófilos reclutados tras 40 minutos de exposición a CuSO_4 no muestran diferencias significativas entre los promedios de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas control y de larvas expuestas al inhibidor de MMP9 (ver Figura Suplementaria 19).

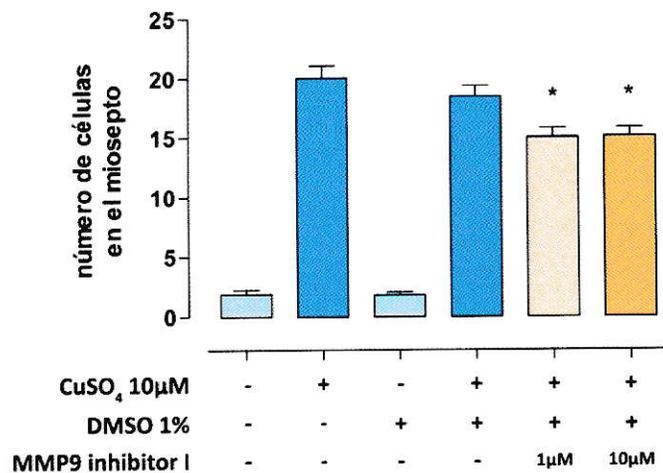


Figura 24. Disminución del reclutamiento de neutrófilos por inhibición farmacológica de MMP9 en larvas expuestas a CuSO₄. Número de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas preincubadas durante 1 hora en inhibidor de MMP9 o DMSO y luego expuestas a CuSO₄ 10 µM por 20 minutos. Los resultados se muestran como el promedio ± error estándar de 2 experimentos independientes, cada uno realizado con 15 larvas por tratamiento. Las comparaciones se realizaron por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. *, $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos con el inhibidor de MMP9 (Figura 24) podrían deberse tanto a efectos directos de inhibición de la actividad gelatinasa de MMP9 como a una inhibición indirecta de la muerte de células ciliadas por la exposición a CuSO₄. En este último caso, la disminución del número de neutrófilos reclutados al miosepto sería consecuencia de una disminución en la intensidad de la señal inflamatoria, la magnitud del daño en el tejido, y no sería consecuencia de la inhibición de la actividad de MMP9. Por esta razón se estudió el efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en la sensibilidad de los neuromastos, y las células ciliadas en particular, a la exposición a CuSO₄. Brevemente, se usaron larvas transgénicas *SqET4*, cuyas células ciliadas expresan GFP (Parinov et al., 2004), de 56 hpf, preincubadas en distintas

concentraciones de inhibidor de MMP9 (1 μM y 10 μM), y luego expuestas a CuSO_4 10 μM por 40 minutos. Al término de esta incubación, las larvas fueron anestesiadas y examinadas en un microscopio de epifluorescencia. En la Figura 25 se grafica el porcentaje de larvas que tras las incubaciones tenía marca GFP en el primer neuromasto de la línea lateral posterior. Los resultados muestran que el 100% de las larvas control incubadas en E3 y de las expuestas a E3 + DMSO 1 %(v/v) tienen marca GFP en el primer neuromasto de la línea lateral posterior, mientras que en las larvas tratadas con CuSO_4 10 μM y DMSO 0.1 %(v/v) + CuSO_4 10 μM , esta proporción disminuyó a $55,6 \pm 4,4$ % y $62,6 \pm 2,1$ %, respectivamente, lo que sugiere que la adición de DMSO a esta concentración no perturba la acción del CuSO_4 sobre las células ciliadas del primer neuromasto de la línea lateral posterior. En los dos grupos de larvas tratadas con el inhibidor de MMP9, los porcentajes de larvas con marca GFP en el primer neuromasto de la línea lateral posterior ($57,8 \pm 12,4$ % para 1 μM , y $74,0 \pm 3,3$ % para 10 μM del inhibidor de MMP9) no fueron significativamente distintos de la fracción de larvas con marca GFP en los controles positivos ($62,6 \pm 2,1$ %). Estos resultados sugieren que el inhibidor de MMP9 no interfiere con el daño a los neuromastos causado por el CuSO_4 por lo que los resultados de disminución del reclutamiento de neutrófilos en presencia del inhibidor no se deben a una reducción del daño tisular que induce tal reclutamiento.

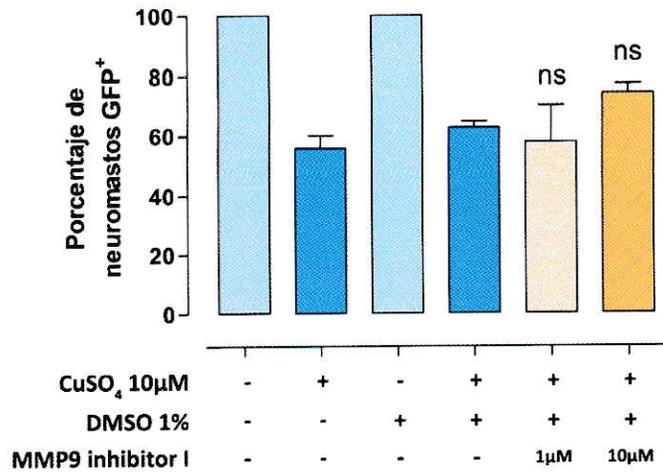


Figura 25. Efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en la sensibilidad de las células ciliadas a CuSO₄. Porcentaje de larvas *SqET4* con marca GFP en el primer neuromasto de la línea lateral posterior después de ser preincubadas por 1 hora en E3, E3 + DMSO 1 %(v/v), o E3 + DMSO 1 %(v/v) + *MMP9 inhibitor I* (1 µM ó 10 µM), y luego expuestas a CuSO₄ 10 µM por 40 minutos. Los resultados se muestran como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con 15 larvas por tratamiento. Las comparaciones se realizaron contra los controles positivos expuestos a CuSO₄ por ANOVA no paramétrica. ns, $p > 0,05$, no significativo.

V. DISCUSIÓN

Una gran parte del conocimiento actual sobre la respuesta inmune ha sido adquirida mediante estudios realizados en animales vertebrados y sistemas *in vitro*, en su mayoría modelos murinos y cultivos primarios de células inmunes (Renshaw and Trede, 2012). Sin embargo, para evitar algunas de las limitaciones de estos modelos se han introducido otros animales, modelos de estudio de la inmunidad. Entre ellos, el pez cebra combina una serie de ventajas, ya que se trata de un vertebrado pequeño, de rápido desarrollo, muy apropiado para el desarrollo de *screenings* de compuestos y mutantes. Además, existen numerosas líneas transgénicas que permiten monitorear el comportamiento de diversas poblaciones de células inmunes y también otros tejidos, lo que combinado a la transparencia del pez cebra y a la disponibilidad de variadas herramientas genéticas, permiten el estudio *in vivo* de procesos difíciles de observar en mamíferos (Carradice and Lieschke, 2008; Renshaw and Trede, 2012). Los peces representan la clase más temprana de vertebrados que poseen inmunidad innata y adquirida, y su sistema inmune es similar al de los mamíferos en muchos aspectos (Plouffe et al., 2005). El pez cebra en particular, posee linfocitos B y T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, y sistema del complemento. Además, a nivel molecular, existe una alta conservación de moléculas de histocompatibilidad, TLRs, péptidos antimicrobianos, y citoquinas proinflamatorias (Plouffe et al., 2005; Carradice and Lieschke, 2008; Renshaw and Trede, 2012).

Hemos descrito aquí un nuevo modelo de inflamación, inducida por daño tisular generado químicamente, exponiendo larvas de pez cebra a concentraciones subletales de

CuSO₄, que puede ser de gran utilidad en la detección de nuevas moléculas capaces de modular la respuesta inmune innata y en el estudio de genes involucrados en las distintas fases de la inflamación. Además, hemos mostrado roles importantes para la vía PI3K/Akt y para la metaloproteínasa de matriz 9 en el proceso inflamatorio usando la metodología desarrollada en este proyecto.

5.1 Modelo de inflamación inducida por daño con CuSO₄ a los neuromastos

En trabajos anteriores, se ha mostrado que la exposición de larvas de pez cebra por períodos cortos a bajas concentraciones de CuSO₄ daña las células ciliadas de los neuromastos y es capaz también de dañar otros tipos celulares de los neuromastos a mayores concentraciones o en exposiciones más prolongadas (Hernández et al. 2006; Olivari et al. 2008). Los resultados muestran que concomitante al daño ocurre la migración de leucocitos mieloides, entre ellos neutrófilos, al miosepto de las larvas que se agrupan alrededor de los neuromastos dañados. En las condiciones estudiadas, las células ciliadas de los neuromastos mueren en los primeros minutos de exposición a CuSO₄ (Figura Suplementaria 3), y tras ello se produce una progresiva desorganización de la estructura de roseta del neuromasto (Figura Suplementaria 2), como se ha descrito anteriormente (Hernández et al. 2006; Olivari et al. 2008). Dentro de este cuadro, la migración de los primeros leucocitos desde la ICM a los neuromastos (Figura 3) parece comenzar tras los primeros 10 minutos de exposición (Figura Suplementaria 2) de modo que al cabo de 2 horas de exposición a CuSO₄ encontramos un número

significativamente mayor de células inmunes en el miosepto de las larvas tratadas en comparación con los controles no expuestos (Figura 4b y Figura Suplementaria 5c).

Un aspecto interesante de este modelo de inflamación, es el hecho que las células inmunes llegan directamente desde la ICM por migración intersticial y no se observaron casos en que lo hicieran a través de la circulación. Mientras en mamíferos (Nourshargh et al., 2010) y otros modelos de inflamación en pez cebra (Mathias et al. 2006; Renshaw et al. 2006) es posible observar la llegada de los neutrófilos a través de la circulación, la extravasación, y posterior migración hasta el sitio del daño, en la inflamación inducida por daño con CuSO_4 no se observó que células provenientes de la circulación salieran de ella para luego migrar a los neuromastos dañados. Al contrario que en mamíferos, en la inflamación inducida por daño con CuSO_4 la mayor parte de las células realiza migración intersticial desde la ICM. Es posible pensar que estas diferencias se deban a la distancia entre la ICM y el foco del daño; sin embargo, la comparación de distintos modelos de inflamación no apoya esta idea. Por un lado, en el modelo de corte de cola en pez cebra, se ha observado que algunos neutrófilos llegan a través de la circulación (Renshaw et al. 2006), lo que podría explicarse porque la circulación está mucho más próxima al sitio de daño que la ICM. En otro modelo, en cambio, en el que se realiza una pequeña incisión en la zona ventral de la aleta caudal, justo bajo la ICM, también se ha reportado la llegada de neutrófilos a través de la circulación (Mathias et al., 2006), sin embargo en este caso tanto la circulación como la ICM se encuentran igualmente próximas al lugar del daño, por lo que este factor parece no ser relevante. Más aún, en experimentos en los que se realizaron pequeñas heridas con un láser en la CHT, no se

observó llegada de neutrófilos a través de la circulación sino sólo por migración intersticial (Yoo et al., 2010), lo que sugiere que la magnitud del daño podría explicar las diferencias en los comportamientos de las células inmunes en los distintos modelos de inflamación. Así, en los modelos de corte de cola (Renshaw et al. 2006) y de incisión en la aleta caudal (Mathias et al., 2006) se realiza un daño físico en que resulta en la amputación de una zona considerable de tejido, y ambos exhiben extravasación de neutrófilos desde la circulación; mientras que en el modelo de daño con láser en la CHT (Yoo et al., 2010) y en el modelo de inflamación inducida por daño con CuSO₄ se realiza un daño que implica unas pocas células, células del pigmento en el primer caso, y las células de los neuromastos en el segundo, y en ambos casos no se observa extravasación de neutrófilos. Esta correlación aparente entre la magnitud del daño con que se induce la inflamación y el comportamiento de los neutrófilos también se observa en la resolución de la inflamación (ver sección 5.2).

5.1.1 Aspectos mecanísticos de la inflamación inducida por daño con CuSO₄

5.1.1.1 Rol del peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La migración intersticial de los neutrófilos en respuesta al daño de los neuromastos ante la exposición a CuSO₄ probablemente es inducida, como en otros modelos, por la liberación de citoquinas y otras moléculas de señalización, como H₂O₂ (Niethammer et al., 2009). Se ha reportado en pez cebra que tras una herida, la enzima Duox (*dual oxidase*) es capaz de generar gradientes de H₂O₂ en el tejido a gran escala

(hasta a ~200 μm del foco de daño) en unos pocos minutos, comenzando a los 3 minutos de inferido el daño y con un punto máximo de generación de H_2O_2 en el margen de la herida 20 minutos después de realizada (Niethammer et al., 2009). Esta descripción del gradiente de H_2O_2 generado por un corte de cola parece coincidir muy bien con temporalidad con que se desarrolla la inflamación neutrofílica tras la exposición a CuSO_4 . Así, la distancia del miosepto a la ICM se encuentra aproximadamente entre 50 y 150 μm , y como se observa en la Figura 4d, el número máximo de neutrófilos en el miosepto se alcanza tras los primeros 20 minutos de exposición a CuSO_4 . De hecho, en experimentos llevados a cabo en este modelo de inflamación se mostró que en larvas preincubadas en un inhibidor de las oxidasas NADPH, DPI (*diphenyleneiodonium*), el número de neutrófilos reclutados en respuesta al daño con CuSO_4 se reduce significativamente (D'Alençon et al., 2010), mientras que la sola incubación de larvas en H_2O_2 no produce reclutamiento de neutrófilos en absoluto (Figura Suplementaria 4). Estos datos sugieren que la señalización por H_2O_2 es crucial para la migración de los neutrófilos a los neuromastos dañados con CuSO_4 .

5.1.1.2 Rol de las ciclooxigenasas (COX)

Las ciclooxigenasas son enzimas que catalizan la formación de prostaglandinas, principalmente a partir de ácido araquidónico. Durante la inflamación, diversos estímulos (entre ellos el daño tisular, la fagocitosis y algunas inmunoglobulinas) inducen la síntesis de ácido araquidónico por la fosfolipasa A_2 (Bertolini et al., 2001). El ácido araquidónico es el sustrato principal de las ciclooxigenasas que generan

endoperóxidos, entre ellos las prostaglandinas de las series D, E, F, e I (Bertolini et al., 2001; Gilroy et al., 2004).

Tanto en humano como en pez cebra, existen dos isoformas de las ciclooxigenasas, las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), ambas codificadas por 2 genes en regiones sinténicas del genomas de humano y pez cebra (Prescott and Yost, 2002). Pese a que existen ligeras diferencias en las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas en humano y pez cebra, los perfiles farmacológicos de las enzimas de pez cebra son prácticamente idénticos a los de las enzimas humanas (Grosser et al., 2002). COX-1 y COX-2 se expresan en general en los mismos tipos celulares y tienen la misma ubicación intracelular, en el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear (Prescott and Yost, 2002). Mientras COX-1 es una enzima expresada constitutivamente que mantiene niveles basales bajos de prostaglandinas, que entre otras funciones ayuda a proteger el epitelio gástrico; COX-2 es inducible, y produce grandes cantidades de prostaglandinas en procesos como la inflamación y la carcinogénesis (Prescott and Yost, 2002).

Los resultados muestran un robusto efecto de los inhibidores generales de las ciclooxigenasas sobre la infiltración de leucocitos en el miosepto de larvas expuestas a CuSO_4 (Figura 6), a excepción de *aspirin*, que no provocó cambios significativos en el número de células inmunes reclutadas (Figura 6d). Utilizando inhibidores específicos de COX-1 se obtuvieron resultados similares de inhibición del reclutamiento de leucocitos (Figura 6, e y f). Estos datos sugieren un rol importante de COX-1 en la inflamación neutrofílica, cuya inhibición farmacológica parece ser suficiente para reducir el número

promedio de células reclutadas al miosepto a niveles similares a los de las larvas control no expuestas a CuSO₄ (Figura 6e). Experimentos similares realizados con el inhibidor específico de COX-2, NS-398, no son concluyentes, ya que la adición de BSA al medio parece interferir con el efecto del CuSO₄ disminuyendo la respuesta de los controles positivos (Figura Suplementaria 7).

5.1.1.3 Rol de *c-met* en la inflamación inducida por daño con CuSO₄

Existe numerosa evidencia que vincula al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y su receptor, *c-met*, con la respuesta inmune (Mine et al., 1998; Skibinski, 2003). HGF, en su forma dimérica, se une a un receptor específico de superficie llamado *c-met* (Bottaro et al., 1991). El receptor *c-met* posee dos subunidades provenientes de un mismo polipéptido por corte proteolítico, denominadas α y β . La subunidad α , de aproximadamente 50 kDa, es completamente extracelular, mientras que la subunidad β , de aproximadamente 145 kDa, atraviesa la membrana plasmática y contiene la actividad tirosina kinasa de *c-met*, en el lado intracelular del receptor (Giordano et al., 1989b, 1989a). Se ha mostrado que la interacción HGF/*c-met* tiene un rol importante en variados procesos, entre ellos la formación y mantención de órganos con epitelios, como el hígado, intestino, pulmón y riñón; también en la migración y crecimiento de músculos, regeneración de neuronas, hematopoiesis, angiogénesis, y adhesión y migración de linfocitos (Skibinski, 2003).

Se ha mostrado que todos los efectos biológicos reportados para HGF son mediados por su interacción con *c-met*, y en particular, se ha mostrado que HGF induce tanto la adhesión de neutrófilos a células endoteliales como la transmigración de neutrófilos (Skibinski, 2003). Estos antecedentes nos llevaron a estudiar el rol de *c-met* en la inflamación inducida por daño con CuSO₄, y los resultados obtenidos (Figura 7 y Figura Suplementaria 8) sugieren un rol para *c-met* en la inflamación neutrofílica en pez cebra. En este sentido, se ha mostrado anteriormente que HGF y *c-met* tienen un rol crucial en la adhesión mediada por integrinas y la transmigración de neutrófilos a través de cambios en el citoesqueleto activados por señalización vía PI3K y tirosina kinasa (Mine et al., 1998). De modo consistente con estos reportes, la inhibición farmacológica de *c-met* reduce considerablemente la infiltración de neutrófilos al miosepto de larvas expuestas a CuSO₄ (Figura 7 y Figura Suplementaria 8), y además parece reducir los niveles de fosforilación de Akt, un blanco de PI3K, en larvas expuestas a CuSO₄ (Figura 17e y 17f). Si bien estos resultados podrían deberse a un bloqueo en la migración de los neutrófilos y no implicar necesariamente un rol de *c-met* en la activación de Akt en neutrófilos, la evidencia muestra consistentemente que *c-met* (y por tanto, probablemente también HGF) tiene un rol en la migración intersticial de los neutrófilos durante la inflamación inducida por daño con CuSO₄ en pez cebra. Evidencia preliminar muestra que la exposición a inhibidores de *c-met* afecta la migración del primordio de la línea lateral (Viviana Gallardo, comunicación personal), lo que sugiere un rol más general para *c-met* que en la migración intersticial, probablemente en la adhesión dependiente de integrinas durante la migración.

5.1.1.4 Otras proteínas involucradas en el proceso de inflamación

Experimentos farmacológicos similares con diversos inhibidores muestran que tanto el receptor de glucocorticoides (GR), JNK, y HIF-1 α tienen un rol en la inflamación inducida por daño con CuSO₄ en larvas de pez cebra (Figuras 8 y 9). En todos los casos, la participación en la inflamación ha sido documentada en otros modelos de inflamación. Existe numerosa evidencia ya de la participación de los glucocorticoides en la inflamación (Parrillo and Fauci, 1979; Lawrence et al., 2002; Gilroy et al., 2004; Perretti and D'Acquisto, 2009), y también evidencia sugiere que la expresión de *mmp9* está controlada por glucocorticoides (Hillegass et al. 2008). También se ha mostrado un rol para JNK, que a través de Mkp-1 sería inhibida por la señalización por glucocorticoides, en la migración intersticial de macrófagos durante la inflamación en pez cebra y en la expresión de la metaloproteinasa de matriz 13 (MMP13) (Zhang et al., 2008). Finalmente, los ensayos de inflamación en presencia de 2-ME sugieren un rol en la inflamación para HIF-1 α . Estos resultados, en conjunto con experimentos similares realizados con 2-ME en la migración del primordio de la línea lateral posterior (Marjorie Álvarez, comunicación personal), sugieren que HIF-1 α está involucrado en la migración celular, lo que explicaría los resultados de su inhibición farmacológica tanto en la inflamación, en la que se reduce significativamente el reclutamiento de neutrófilos (Figura 9b); como en la migración del primordio de la línea lateral posterior, en el que la migración se ve significativamente retrasada (Marjorie Álvarez, comunicación personal). Esto resulta coherente con reportes recientes en los que se describe la

participación activa de HIF-1 α en la movilidad de los neutrófilos durante la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra (Elks et al., 2011).

Los ensayos de inflamación en presencia de moléculas de conocida actividad antiinflamatoria, además de mostrar como controles positivos la capacidad de esta metodología de detectar la inhibición del reclutamiento de células inmunes al miosepto de las larvas, sugieren que existe una amplia conservación entre los mecanismos involucrados en el proceso de inflamación inducida por daño con CuSO₄ en larvas de pez cebra y los ya estudiados antes en otros modelos.

5.1.2 La inflamación inducida por daño con CuSO₄ entre otros modelos de inflamación en pez cebra

Si bien la respuesta inflamatoria en el pez cebra ha sido ampliamente estudiada mediante diversos modelos de inflamación (Renshaw et al. 2006; Hall et al. 2007; Mathias et al. 2007; Cvejic et al. 2008; Niethammer et al. 2009; Mathias et al. 2009; Gray et al. 2011), la gran mayoría de los ensayos usados para estudiar la inflamación se basan en el daño físico (Renshaw et al. 2006; Yoong et al. 2007; Hall et al. 2007; Yoo et al. 2010) o en una condición de inflamación crónica inducida genéticamente (Mathias et al., 2007; Cvejic et al., 2008). En el caso de los ensayos basados en el daño físico, la manipulación de cada larva por separado introduce problemas de reproducibilidad y además limita el número de individuos que puede ser estudiado en cada experimento. A causa de estas dificultades, las metodologías que implican daño físico son poco

aplicables a experimentos de *screening* a gran escala. Por otro lado, las estrategias que utilizan larvas en las que se ha inducido inflamación crónica hacen imposible controlar la inflamación en términos temporales, y en ocasiones, tampoco en términos de extensión espacial en el tejido (Mathias et al., 2007). Además, pese a ser sistemas ideales para estudiar enfermedades causadas por alteraciones genéticas (Walters et al., 2010), implican alteraciones muchas veces desconocidas como modelos generales de inflamación.

El modelo de inflamación inducida por daño con CuSO_4 se distingue principalmente por ser inducido químicamente, lo que implica una serie de ventajas en términos de facilidad de manipulación y reproducibilidad. Ya que el protocolo consiste básicamente en disponer las larvas en placas de Petri o de 6 o más pocillos, y agregar una solución de CuSO_4 de concentración fija, es posible utilizar grandes números de larvas en cada experimento, y en el caso de aplicaciones de *screening* a gran escala, pueden usarse dispositivos automatizados de manejo de líquidos para inducir la inflamación en gran número de larvas simultáneamente. El daño de los neuromastos ocasionado por el CuSO_4 y la posterior infiltración de leucocitos son altamente reproducibles, y la posibilidad de detonar la inflamación en todas las larvas simultáneamente y en grupo reduce la variabilidad entre individuos, y permite evitar diseños experimentales complejos con análisis pareado, como es necesario en los modelos de inflamación que implican alta variabilidad de la respuesta entre individuos (Loynes et al., 2010). Para desarrollar un protocolo automatizado, tomamos ventaja de la transparencia de las larvas de pez cebra y de la existencia de una amplia variedad de

líneas transgénicas, sin embargo, es posible realizar ensayos similares prescindiendo de larvas transgénicas, mediante el uso de tinciones histoquímicas (Figura Suplementaria 5), inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (Figuras 17 y 18), e hibridación *in situ* (Figura 21 y Figura Suplementaria 16).

5.1.3 Metodología automatizada de detección de actividad antiinflamatoria

Como ya se describió, la inducción química de un daño tisular que causa el reclutamiento de leucocitos resuelve problemas de reproducibilidad y limitaciones de número de larvas por experimento, al descartar la necesidad de daño físico a las larvas. Sin embargo, en el desarrollo de una metodología automatizada de *screening* es común a todos los modelos de inflamación la necesidad de una delimitación automática del área de tejido dentro de la cual cuantificar la infiltración de células inmunes. En modelos en los que se realiza daño físico a las larvas, como el corte de cola, la delimitación del área de daño es difícil debido a que existe gran variabilidad entre las heridas inferidas a las larvas, lo que hace cambiar también el área de interés para la cuantificación en cada caso, y además, la gran mayoría de las técnicas basadas en CAM (*computer aided microscopy*) dependen fuertemente de una correcta orientación de las larvas para realizar la identificación, algo muy difícil de conseguir de modo automático. En el modelo de inflamación inducida por daño con CuSO₄, utilizamos la existencia de numerosas líneas transgénicas dar solución a estos problemas. La delimitación automática del área dañada, y de cuantificación de la infiltración de células inmunes, se basa en el uso de larvas

dobles transgénicas Tg(*lysC::DsRED2; cldnB::GFP*) que, como se explica en la sección 4.1.4 (Figura 10), expresan GFP en las células de la línea lateral y DsRED2 en los leucocitos. Esto permite que un programa especialmente diseñado reconozca los neuromastos en el canal verde, los defina como área de interés, y luego realice la cuantificación en el canal rojo. Esta estrategia permite la automatización de la delimitación del área del daño y de la cuantificación de la infiltración de células inmunes en ella. Además, ya que cada neuromasto por separado es una herida en la que es posible medir el grado de infiltración de leucocitos, el sistema depende muy poco de la orientación de las larvas. Básicamente, cualquier larva que quede de lado (mostrando uno de sus costados) puede ser sometida a análisis para la identificación de sus neuromastos. Esta orientación se consigue con facilidad en gran parte de las larvas simplemente centrifugando a baja velocidad la placa, de modo que aproximadamente el 70 % de las larvas quedan en orientaciones que permiten el análisis sin necesidad de ser orientadas manualmente. Así, la metodología automatizada basada en la inflamación inducida por daño con CuSO₄ reproduce los resultados obtenidos en experimentos realizados manualmente, tanto en términos de la respuesta ante otros metales pesados (Figura 11a y 11b) como en la identificación del efecto antiinflamatorio de algunas moléculas (Figura 11c y 11d).

Es importante señalar que en un *screening* automatizado realizado utilizando el ensayo de inflamación inducido por CuSO₄, no se podría distinguir sin experimentos adicionales entre efectos antiinflamatorios específicos, inhibición de la movilidad celular y protección de las células ciliadas de la muerte celular. En todos los casos mencionados

un ensayo de inflamación inducida por daño con CuSO_4 mostraría como resultado una disminución en el reclutamiento de leucocitos a los neuromastos. Las moléculas candidato deberían entonces ser sometidas a experimentos adicionales para determinar el aspecto específico del comportamiento de las células inmunes que está siendo perturbado. A pesar de esto, los resultados de los ensayos de inflamación realizados con preincubaciones con inhibidores de PI3K seguidas de lavados y luego exposición a CuSO_4 en ausencia de los inhibidores (ver Figura Suplementaria 14) sugieren que los resultados obtenidos en ensayos similares sin lavar los inhibidores (ver Figura 16) no son consecuencia de una interferencia de los inhibidores con el daño provocado por la exposición a CuSO_4 , como sucedería en el caso hipotético de que los inhibidores, moléculas orgánicas en general, quelaran los iones Cu^{2+} . Estos resultados además muestran que la posible interferencia de las moléculas orgánicas con la acción de los iones Cu^{2+} no es un evento tan frecuente para afectar los resultados, o la magnitud de su efecto es más bien acotada y no es suficiente para alterar significativamente el reclutamiento de los leucocitos.

5.1.4 Otras aplicaciones del ensayo de inflamación inducido por daño con CuSO_4

Pese a que la más importante aplicación del modelo de inflamación inducida por daño con CuSO_4 es el estudio del proceso de inflamación mismo (ver secciones 4.3 y 4.4) y, a través de la metodología automatizada (descrita en la sección 4.1.4), la identificación de nuevas moléculas de propiedades inmuno-moduladoras, es posible

valerse de las ventajas de este ensayo para estudiar otras áreas estrechamente relacionadas.

La más cercana aplicación de este modelo de inflamación es el estudio de la resolución de la inflamación (sección 4.2). En este sentido, los resultados de experimentos en los que se utilizaron inhibidores de PI3K (Figura 20) constituyen un antecedente para el desarrollo de una metodología de evaluación de actividad antiinflamatoria comparable a la desarrollada en la inflamación. Además, ya que la resolución de la inflamación en este modelo ocurre más rápido que en otros modelos de estudio (Renshaw et al. 2006; Loynes et al. 2010; Elks et al. 2011), existe la posibilidad de realizar observaciones *in vivo* del comportamiento de las células inmunes durante parte importante de la resolución utilizando microscopía de tiempo extendido (Figura Suplementaria 9), lo que permite estudiar *in vivo* el comportamiento de las células inmunes durante la resolución en términos de su movilidad, direccionalidad y otros parámetros cinéticos (Foxman et al., 1999).

La metodología automatizada que se desarrolló para la detección de moléculas de actividad antiinflamatoria puede ser aplicada también para el *screening* de genes involucrados en la inflamación y, eventualmente, en la resolución de la inflamación también. Si bien fue desarrollada para identificar moléculas de propiedades inmuno-moduladoras, las ventajas de reproducibilidad y automatización de esta metodología pueden aplicarse también a *screenings* de ganancia y pérdida de función, usando morfolinós, por ejemplo, y también en peces mutagenizados. En este sentido existe ya

evidencia preliminar de que el ensayo de inflamación inducida por daño con CuSO_4 permite identificar mutantes de inflamación (D'Alençon et al., 2010).

Finalmente, el modelo de inflamación inducida por daño con CuSO_4 puede ser aplicado al estudio de otros procesos relacionados a la inmunidad, como la relación entre la respuesta inmune y la regeneración. Así, el daño con CuSO_4 , reclutamiento de leucocitos, y posterior regeneración de las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral pueden servir como modelo de estudio del efecto que la infiltración de células inmunes en los neuromastos tiene en la regeneración de las células ciliadas.

5.2 Resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄

Una vez caracterizada la inflamación inducida por daño a los neuromastos con CuSO₄ es posible describir el proceso que sucede tras la inflamación, la resolución, realizando cambios mínimos al protocolo experimental. La resolución de la inflamación permite el restablecimiento de la homeostasis tisular, limitando el daño que las células inmunes reclutadas al foco de inflamación pueden ocasionar a otros tejidos. En mamíferos, la resolución de la inflamación es un proceso activo en el que gran parte de los neutrófilos, y en general de las células polimorfonucleadas, entra en apoptosis para ser después fagocitados por macrófagos, proceso denominado esferocitosis. Finalmente, algunos de estos macrófagos entran en apoptosis y otros migran retrógradamente alejándose del foco de inflamación (Lawrence et al., 2002; Gilroy et al., 2004; Serhan et al., 2007). Esto implica que la mayor parte de los neutrófilos reclutados durante el proceso de inflamación son después retirados por macrófagos que los fagocitan una vez que entran en apoptosis, y la migración retrógrada de neutrófilos, es un comportamiento muy poco frecuente en la resolución de la inflamación en mamíferos, que sólo recientemente ha sido observado (Woodfin et al., 2011). En pez cebra, se han observado tanto la apoptosis de neutrófilos (Loynes et al., 2010; Elks et al., 2011), como la migración retrógrada (Mathias et al. 2006; Hall et al. 2007). Sin embargo, en los modelos de inflamación estudiados en pez cebra, la apoptosis de neutrófilos parece ser muy infrecuente: en un modelo en que se hace una incisión en la parte ventral de la aleta caudal de larvas de pez cebra no se reportó apoptosis en absoluto (Hall et al. 2007), y en otro modelo de inflamación en el que se corta la porción más posterior de la aleta caudal

se reportó que aproximadamente el 4,4 % de los neutrófilos entra en apoptosis durante la resolución de la inflamación (Loynes et al., 2010). En contraste con lo reportado en mamíferos, en pez cebra se ha observado que la mayor parte de los neutrófilos abandona el foco de inflamación por migración retrógrada (Mathias et al., 2006; Elks et al., 2011). En la Figura Suplementaria 9 se muestra que en el proceso de resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 la mayoría de los leucocitos abandona el tejido dañado a través de migración intersticial. De las 14 larvas estudiadas por microscopía de tiempo extendido, no se observaron casos de leucocitos que muestren señales de entrar en apoptosis o de entrar a la circulación sanguínea durante las primeras 4 horas de resolución de la inflamación. Pese a que no se descarta la posibilidad de que una fracción de los leucocitos entre en los vasos sanguíneos, sea fagocitado o entre en apoptosis durante la resolución de la inflamación, la migración intersticial es el comportamiento mayoritario de los leucocitos durante la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 . De hecho, tomando en cuenta que se realizaron 8 experimentos de microscopía de tiempo extendido independientes en los que se observaron las primeras horas de resolución de la inflamación en un total de 14 larvas (lo que implica la observación de ~250 neutrófilos), es posible estimar que la apoptosis y fagocitosis de leucocitos suceden en menos del 7 % de las larvas y en menos del 0,4 % de los neutrófilos.

La razón de las diferencias entre los modelos de resolución de la inflamación en pez cebra podría estar relacionada con la magnitud del daño tisular con que se provoca la inflamación inicial. En este sentido, el daño químico a los neuromastos de la línea lateral

con CuSO_4 parece ser mucho más leve que el modelo de corte de la aleta caudal (Renshaw et al. 2006; Loynes et al. 2010). Por un lado, mientras la exposición a CuSO_4 10 μM por 2 horas provoca la muerte de las células ciliadas de los neuromastos y de algunas de las células accesorias (Hernández et al. 2007; Olivari et al. 2008), en el caso del corte de la aleta caudal se está amputando un tejido varias veces más extenso. Como consecuencia de ello, existen también diferencias en las respuestas inflamatorias, que podrían dar cuenta de las diferencias que se observan durante la resolución. En el caso del daño con CuSO_4 , es posible descartar la solución de CuSO_4 tras 2 horas de exposición y observar que el número de neutrófilos en el área del daño comienza a disminuir rápidamente (Figura 13), y en el modelo de corte de la aleta caudal, sin embargo, 6 horas después de realizado el corte el número de neutrófilos recién llega a su punto más alto (Renshaw et al. 2009). Esto podría indicar que la respuesta inflamatoria al corte de la aleta caudal es más aguda que la inducida por el daño con CuSO_4 , de hecho, mientras la primera concentra un gran número de leucocitos en el borde de la cola, el protocolo de daño químico implica la migración de leucocitos a varias heridas distintas (una en cada neuromasto), de modo que los leucocitos se distribuyen entre los neuromastos dañados en números menores por neuromasto (1 – 10), que los que se observan en el corte de aleta caudal (10 – 40) (Loynes et al., 2010).

En términos cuantitativos, se ha reportado en trabajos en mamíferos, que el número de células polimorfonucleadas (equivalentes a los neutrófilos de pez cebra) en el foco de la inflamación decrece exponencialmente durante la resolución (Rossi & Sawatzky 2008). Los resultados de cuantificación de neutrófilos durante la resolución de

la inflamación inducida por daño con CuSO_4 en pez cebra muestran que al igual que en mamíferos, el número de neutrófilos desciende exponencialmente durante la resolución de la inflamación (Figura Suplementaria 10a), pese a que la evidencia indica que en ambos modelos tal proceso no ocurre por los mismos mecanismos, como ya se mencionó. El hecho, aparentemente contradictorio, de que en modelos de resolución de la inflamación en los que los neutrófilos se comportan muy distinto en términos generales (apoptosis en mamíferos y migración retrógrada en pez cebra), sus números evolucionen de modo similar a través del tiempo, podría estar relacionado con la conservación que se ha descubierto de numerosas moléculas y vías de señalización, además de intermediarios lipídicos (Gilroy et al., 2004; Elks et al., 2011), que controlan el desarrollo en el tiempo del proceso. Más aún, a pesar de las diferencias en los comportamientos más frecuentes de los neutrófilos, existen otras similitudes en los procesos de resolución de la inflamación de mamíferos y del pez cebra. Abundante evidencia en mamíferos muestra la llegada de monocitos, que se diferencian en macrófagos, más tarde que los neutrófilos al foco de la inflamación. Esta diferencia se mantiene en la resolución, de modo que el número de neutrófilos comienza a disminuir mucho antes que el de macrófagos (Lawrence et al. 2002; Serhan et al. 2007; Rossi & Sawatzky 2008). En este sentido, los resultados de las Figuras 14 y 15 sugieren que también en la resolución de la inflamación en pez cebra es posible observar este comportamiento, como ya se ha reportado en el caso del modelo de corte de aleta caudal (Ellett et al., 2011), donde al parecer los macrófagos permanecen mucho más tiempo en el sitio del daño que los neutrófilos, que migran alejándose rápidamente de las heridas desde el momento en que se descarta el CuSO_4 del medio de las larvas. Los

experimentos en que se compara el curso de la resolución de la inflamación en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP* (Figura Suplementaria 10 y Figura 14) y en larvas dobles transgénicas *Tg(lysC::DsRED2; BACmpx::GFP)* (Figura 15), sugieren que mientras el número de neutrófilos en el miosepto de las larvas desciende exponencialmente durante las primeras horas de la resolución (Figura Suplementaria 10a), existen otros leucocitos mieloides, que en el doble transgénico *Tg(lysC::DsRED2; BACmpx::GFP)* corresponden a células que expresan mayores niveles de DsRED2 en comparación con GFP (Figura 15, puntos rojos), cuyo número en el miosepto de las larvas durante la resolución desciende también exponencialmente pero con mayor lentitud (Figura Suplementaria 10b), de modo que durante gran parte de la resolución su número en el miosepto de las larvas es mayor al de neutrófilos (Figura 14). Más aún, de modo consistente con las diferencias observadas en los comportamientos de las células marcadas en las larvas transgénicas *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP*, en los experimentos de inhibición farmacológica de PI3K realizados para evaluar un posible rol de PI3K en la resolución, se observa que la presencia de inhibidor de PI3K cambia de modo distinto en cada transgénico el número de células marcadas en el miosepto de las larvas durante la resolución (Figura 20). Este experimento, además de sugerir un rol para PI3K en la resolución (ver sección 5.3), sugiere por una vía distinta que en efecto las células marcadas en los transgénicos *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP* no son iguales, hecho reportado anteriormente (Hall et al. 2007; D'Alençon et al. 2010), ya que sus respuestas ante la inhibición de PI3K son distintas y opuestas. En este sentido, los resultados de inhibición de PI3K durante la resolución sugieren que la exposición a *wortmannin* está interfiriendo con funciones distintas de PI3K en los distintos tipos celulares. Así, a pesar

de que independiente del transgénico usado sólo observamos migración retrógrada durante la resolución, la inhibición de PI3K, que en ambos tipos celulares debiese interferir la movilidad celular (como se discute en la sección 5.3) haciendo aumentar el número promedio de células en el miosepto respecto a las condiciones control (como se observa para los neutrófilos en la Figura 20a), en el transgénico *lysC::EGFP* produce un aumento del número promedio de células en el miosepto. Esto sugiere que en estas células la inhibición de PI3K está afectando otro proceso celular, posiblemente la inhibición de la apoptosis (sin descartar que afecte también la movilidad), indicando otras diferencias de estos leucocitos respecto de los neutrófilos.

5.3 Rol de PI3K/Akt en la inflamación inducida por daño con CuSO₄

La inflamación inducida por daño con CuSO₄ a los neuromastos de pez cebra es un modelo útil de migración intersticial de leucocitos, en la que se postula PI3K tiene un rol central. A pesar de que existe variada evidencia que sugiere un rol de PI3K en la migración intersticial (Sasaki et al., 2000; Ferguson et al., 2007), gran parte de esta evidencia debe ser revisada a la luz de otros reportes que sugieren que PI3K regula la salida de los leucocitos de los vasos sanguíneos en vez de la migración intersticial propiamente tal (Liu et al. 2007; Stephens et al. 2008). En este cuadro, nuestros resultados aportan evidencia que sugiere un rol de PI3K en la migración intersticial, de modo consistente con otros trabajos realizados en pez cebra (Yoo et al., 2010) y medaka (*Oryzias latipes*) (Grabher et al., 2007).

Como muestra la Figura Suplementaria 1, en la que no se observan leucocitos saliendo de la circulación para migrar hacia los neuromastos dañados, la gran mayoría de los leucocitos reclutados a los neuromastos llega por migración intersticial desde la ICM y otros sitios a lo largo del tronco y la cola de las larvas. Por esta razón, pese a que no se puede descartar en absoluto que algunos leucocitos abandonen la circulación para migrar luego a los sitios de daño, asumiremos en base a las observaciones que la mayor parte de los leucocitos reclutados llegan por migración intersticial. Los resultados de experimentos de inhibición farmacológica de PI3K (Figura 16) muestran que es posible abolir casi por completo el reclutamiento de leucocitos con concentraciones crecientes de inhibidores (ver Figura 16a, LY294002 100 μ M y Figura 16b, *wortmannin* 5 μ M). Dado que el reclutamiento de leucocitos se da mayoritariamente por migración

intersticial, la abolición casi completa del reclutamiento de leucocitos sugiere un rol de PI3K en la migración intersticial misma, sin descartar la posibilidad de que PI3K también tenga un papel en la migración transendotelial de los leucocitos. De modo similar, en la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO_4 hemos observado que la mayor parte de los neutrófilos abandonan el tejido dañado por migración intersticial, y, en el caso de los neutrófilos, la inhibición farmacológica de PI3K retarda significativamente la resolución de la inflamación (Figura 20a), medida en términos del número de neutrófilos en el miosepto. Probablemente, el rol de PI3K en la migración intersticial que nuestros resultados indican esté relacionado con la activación de Rac y la polimerización de actina en las protrusiones del *leading edge* de los neutrófilos y con la polarización de las células, tal como se ha reportado antes (Yoo et al., 2010). En este sentido, experimentos similares de inhibición farmacológica de PI3K, realizados en el primordio de la línea lateral, muestran resultados similares (Figura Suplementaria 13), lo que sugiere que mecanismos similares a los descritos en los neutrófilos (Yoo et al., 2010) podrían participar en la migración del primordio.

A continuación, estudiamos Akt (también conocido como PKB), uno de los principales blancos descritos de PI3K (Franke et al., 2003; Juntilla and Koretzky, 2008; Weichhart, 2008). Los resultados muestran un aumento de los niveles de Akt fosforilado, su forma activa, en células alrededor de los neuromastos en larvas expuestas a CuSO_4 (Figura 17b y Figura 18) y también en células relativamente alejadas de los sitios de daño (Figura Suplementaria 15b). Los experimentos de inmunohistoquímica en larvas preincubadas en inhibidores de PI3K y *c-met* sugieren por un lado que la

activación de Akt observada es dependiente de PI3K (Figura 17c y 17d) y de *c-met* (Figura 17e y 17f), sin embargo es necesaria más evidencia para confirmarlo. Por otro lado, estos resultados sugieren también que la activación de Akt se da, al menos en parte, en células inmunes (Figura 17). Experimentos posteriores de inmunofluorescencia doble confirman la activación de Akt en neutrófilos de larvas expuestas a CuSO₄ (Figura 18 y Figura Suplementaria 15, columna derecha). Es interesante notar que la activación de Akt en células de la ICM observada por inmunohistoquímica en larvas control (Figura 17a), no ocurre en los neutrófilos (Figura Suplementaria 15, columna izquierda), sino en otro tipo celular. Los resultados muestran también que en neutrófilos de larvas expuestas a CuSO₄ ocurre una activación de Akt (Figura 18a) aparentemente mayor que la observada en neutrófilos de larvas control (Figura 18d) y que a mayores concentraciones de CuSO₄ es posible observar activación de Akt en otros tipos celulares en los neuromastos dañados (Figura 18g y Figura Suplementaria 15f, triángulo blanco). La activación de PI3K/Akt en los neutrófilos podría estar relacionada también con la inhibición del programa apoptótico, como ya se ha reportado en otros modelos (Tsuruta et al., 2002; Xu et al., 2010).

Los resultados obtenidos sugieren la activación dependiente de PI3K de Akt en los neutrófilos en condiciones de inflamación inducida por daño con CuSO₄. Experimentos de inhibición farmacológica de Akt muestran que el reclutamiento de neutrófilos al miosepto de larvas expuestas a CuSO₄ no es afectado significativamente por la inhibición de Akt (Figura 19). Estos datos sugieren que si bien Akt se activa en neutrófilos durante la inflamación inducida por daño con CuSO₄ (Figura 18 y Figura

Suplementaria 15, columna derecha), no parece tener un rol en la migración intersticial de los neutrófilos hacia los neuromastos dañados (Figura 19).

Dado que se ha reportado que PI3K está implicada tanto en la migración intersticial de leucocitos (Sasaki et al., 2000; Yoo et al., 2010; Rickert et al., 2010) como en el control de la apoptosis (Tsuruta et al., 2002; Franke et al., 2003; Sousa et al., 2009), y ambos son procesos fundamentales en la resolución de la inflamación (Serhan et al., 2007), nos interesó estudiar el rol de PI3K en la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄ (Figura 20). En pez cebra, se ha reportado que la resolución procede principalmente por migración intersticial de los neutrófilos, que abandonan el sitio de la inflamación (Mathias et al., 2006; Loynes et al., 2010), y en menor medida, también por apoptosis de los neutrófilos reclutados (Loynes et al., 2010). En el proceso de resolución que sucede tras la inflamación provocada por el daño a los neuromastos con CuSO₄, hemos observado también una prevalencia de la migración intersticial de neutrófilos (Figura Suplementaria 9) por sobre la apoptosis, no observada, pero tampoco descartada. Los experimentos de inhibición farmacológica de PI3K durante la resolución (Figura 20) muestran respuestas distintas a la inhibición de PI3K en distintos transgénicos. Por un lado, en larvas transgénicas *BACmpx::GFP*, que poseen neutrófilos que expresan GFP, la inhibición de PI3K inmediatamente después de descartar el CuSO₄ provoca un aumento estadísticamente significativo del número promedio de neutrófilos en el miosepto tras 4 horas de resolución (Figura 20a). Este resultado se relaciona posiblemente con la perturbación de la activación de Rac y la polimerización de actina en las proyecciones del *leading edge* de los neutrófilos, causada

por la inhibición de PI3K, como ya ha sido descrito en un modelo de inflamación en pez cebra (Yoo et al., 2010). Por otro lado, el mismo experimento realizado en larvas transgénicas *lysC::EGFP*, cuyos leucocitos mieloides expresan EGFP, muestra una reducción estadísticamente significativa del número de leucocitos en el miosepto de las larvas tras 2 horas de resolución (Figura 20b). Este resultado, en aparente contradicción con el obtenido en larvas *BACmpx::GFP* (Figura 20a), podría ser explicado por el hecho de que ambas líneas transgénicas no marcan exactamente las mismas poblaciones celulares y por la apoptosis de células inmunes durante la resolución. El hecho de que las líneas transgénicas *BACmpx::GFP* y *lysC::EGFP* no marcan los mismos grupos celulares ya ha sido documentado (Hall et al. 2007; D'Alençon et al. 2010), y se ha mostrado además que una parte de las células *lysC::EGFP*⁺ en este transgénico, expresa también el gen de la peroxidasa mielóide (*mpx*) (Hall et al. 2007). Más aún, la observación comparada de la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄ en ambas líneas transgénicas muestra claras diferencias entre ambas (Figuras 14 y 15, ver sección 5.2 para más detalles). Entonces, es posible sugerir que la inhibición farmacológica de PI3K en la Figura 20b afecta a células *lysC::EGFP*⁺/*BACmpx::GFP*, en las que interrumpiría la inhibición de PI3K sobre la apoptosis vía Akt, acelerando la resolución, como se ha reportado en leucocitos, en otros modelos (Lindemans & Coffey 2004; Pinho et al. 2005; Rossi et al. 2007; Sousa et al. 2009; Xu et al. 2010).

5.4 Rol de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación inducida por daño con CuSO₄

Evidencia de nuestro laboratorio de experimentos de microarreglos sugería la inducción de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) en larvas expuestas a CuSO₄ (Viviana Gallardo, comunicación personal; Peña, 2011), concentrada en los neuromastos de la línea lateral (D'Alençon et al., 2010). Estos datos, en conjunto con la abundante evidencia de un rol de MMP9 en la inflamación en mamíferos (Opdenakker et al., 2001; Parks et al., 2004), nos llevaron a estudiar el posible rol de MMP9 en la inflamación inducida por daño con CuSO₄ en larvas de pez cebra. Los experimentos de microarreglos en los que larvas de pez cebra fueron expuestas a CuSO₄ 100 µM durante 6 h muestran que los mensajeros de algunas metaloproteinasas de matriz, entre ellas MMP9, son robustamente sobreexpresados en larvas expuestas a CuSO₄ (Viviana Gallardo, comunicación personal). Análisis posteriores de hibridación *in situ* muestran que en estas condiciones la sobreexpresión de *mmp9* se concentra en células alrededor de los neuromastos de la línea lateral posterior, anterior y en las fosas nasales (D'Alençon et al., 2010). La inflamación inducida por daño con CuSO₄ a los neuromastos de larvas de pez cebra nos sirvió entonces como modelo para el estudio del rol de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) en la inflamación *in vivo*.

Los experimentos de hibridación *in situ* muestran un robusto aumento en los niveles de transcrito de *mmp9* en condiciones de inflamación en células alrededor de los neuromastos a lo largo de la línea lateral (Figura 21 y Figura Suplementaria 16). Si bien no puede descartarse que parte de la expresión de *mmp9* ocurra en células de los

neuromastos o del tejido circundante, hay razones para sugerir que la inducción de la expresión de *mmp9* que vemos en la Figura 21 y la Figura Suplementaria 16 se debe principalmente a células inmunes reclutadas a los neuromastos dañados con CuSO₄. Por un lado, al observar la expresión de *mmp9* en la larva control (Figura 21a) vemos que gran parte de ella se concentra en células distribuidas en la ICM, y ocasionalmente, en el miosepto, un patrón muy similar a la distribución de los leucocitos (comparar con la Figura 2, a y b). En esta misma línea, la expresión de *mmp9* en larvas expuestas a CuSO₄ 10 µM por 2 horas (Figura 21b) muestra que hay células que expresan *mmp9* en la ICM, grupos de ellas alrededor de los neuromastos y algunas aisladas a lo largo del miosepto, de modo similar a la disposición de los leucocitos en las mismas condiciones (comparar con la Figura 2, c y d), lo que sugiere que parte de los leucocitos reclutados a los neuromastos dañados y de los residentes en la ICM expresan *mmp9*. Además, el patrón de células que expresan *mmp9* no es constante a través de distintas larvas. Tal como sucede con los leucocitos reclutados al miosepto de las larvas expuestas a CuSO₄, en que la distribución de los leucocitos alrededor de los neuromastos de la línea lateral posterior justo después del tratamiento con CuSO₄ es variable entre diferentes individuos, la expresión de *mmp9* en condiciones de inflamación es variable entre distintas larvas, lo que sugiere que se trata de células en movimiento.

Los resultados sugieren que *mmp9* se expresa mayoritariamente en leucocitos tanto en la ICM en condiciones normales, como una vez que han migrado a los neuromastos en condición de inflamación. En trabajos realizados en pez cebra y en mamíferos, existe numerosa evidencia que indica que *mmp9* se expresa en células

inmunes. En mamíferos, *mmp9* se expresa principalmente en neutrófilos (células polimorfonucleadas) y eosinófilos (Dahlen et al., 1999), y su expresión se induce en condiciones de inflamación (Opdenakker et al., 2001; Won et al., 2007; Dos Santos et al., 2009). De modo similar, en pez cebra existe evidencia de que *mmp9* se expresa en neutrófilos (Yoong et al., 2007; Mathias et al., 2009) y también de la inducción de la expresión de *mmp9* en condiciones de inflamación (Yang et al., 2007; Yoong et al., 2007; Yoshinari et al., 2009; Volkman et al., 2010). Más aún, experimentos en los que se sometieron larvas de pez cebra a radiación ionizante a las 3 hpf, muestran un significativo aumento de la expresión de *mmp9* (ver Figura Suplementaria 17), aparentemente dependiente de la dosis de radiación. Estos datos sugieren que el daño tisular podría tener un rol importante en la inducción de la expresión de *mmp9* en pez cebra, tal como se ha observado en mamíferos (Parks, 1999; Parks et al., 2004). En este sentido, es interesante el hecho que en mamíferos se ha reportado que la expresión de *mmp9* es constitutiva en los neutrófilos, e inducible en monocitos, linfocitos, células dendríticas y fibroblastos (Opdenakker et al., 2001), lo que coincide con los resultados que se muestran en la Figura 21, en la que por un lado la larva control (Figura 21a) muestra la expresión de *mmp9* en ausencia de inducción por daño tisular (que sería la expresión constitutiva), que se concentra en células en la ICM que podrían ser neutrófilos; y por otro lado, ante un daño tisular (provocado por la exposición a CuSO_4) se observa (Figura 21b) la inducción de la expresión de *mmp9* posiblemente en algunos otros tipos celulares, probablemente macrófagos y células del tejido adyacente a los neuromastos. Es posible observar un comportamiento similar a nivel de proteína, en experimentos de inmunofluorescencia (Figura 23).

A nivel de la expresión de proteína, los experimentos de inmunofluorescencia muestran la inducción de MMP9 en el área de los neuromastos de larvas expuestas a CuSO₄ 10 μM por 2 horas (Figura 22), lo que es parcialmente consistente con los resultados obtenidos respecto de la expresión de mensajeros de *mmp9*. Por un lado, la inducción de MMP9 en el área de los neuromastos en larvas expuestas a CuSO₄ (Figura 22) se correlaciona muy bien con el aumento en los niveles de transcrito de *mmp9* que se muestra en la Figura 21b. Estos datos muestran que la inducción del gen *mmp9* se ve acompañada por la presencia e inducción de la proteína MMP9. Por otro lado, se ha mostrado que los neutrófilos acumulan MMP9 en gránulos (Opdenakker et al., 2001), y los experimentos de hibridación *in situ* muestran que *mmp9* se expresa en células en la ICM en condiciones control (Figura 21a), pero en los experimentos de inmunofluorescencia de MMP9 no se observan células que expresen MMP9 en la ICM (Figura 22). Esto podría explicarse por una deficiente penetración del anticuerpo contra MMP9 en el tejido, cosa que se observa con el anticuerpo contra tubulina acetilada, con el que en algunas larvas no se logró marcar el nervio de la línea lateral posterior. Experimentos posteriores de inmunofluorescencia confirman el hecho, sugerido por los experimentos de hibridación *in situ* (Figura 21 y Figura Suplementaria 16), que parte de la expresión de MMP9 sucede en los neutrófilos (Figura 23). Además, se observa que mientras los neutrófilos expresan MMP9 tanto en condiciones control como de inflamación, en otros tipos celulares que no expresan MMP9 en condiciones control se induce la expresión de MMP9 durante la inflamación, de modo similar a lo que se ha reportado en otros modelos (Opdenakker et al., 2001).

Además, de modo complementario al hecho reportado de que los mensajeros de *mmp9* se expresan en la línea lateral de pez cebra en condiciones control (Gallardo et al., 2010), los experimentos de inmunofluorescencia muestran la presencia de proteína MMP9, en niveles muy bajos, en los cilios de las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral posterior (Figura Suplementaria 18).

A continuación, nos concentramos en el estudio de un posible rol de MMP9 en la inflamación, para lo cual utilizamos un inhibidor de la actividad gelatinasa de MMP9. Los experimentos de inhibición farmacológica de MMP9 muestran un descenso significativo del número de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas expuestas a CuSO_4 10 μM por 20 minutos ocasionado por la presencia del inhibidor (ver Figura 24). Este resultado podría ser explicado como consecuencia de una posible protección que el inhibidor podría estar dando a las células ciliadas de los neuromastos frente al CuSO_4 (quelando iones Cu^{2+} , por ejemplo), de modo que la disminución observada en el reclutamiento de neutrófilos podría ser comparada a la menor respuesta que se observa frente a concentraciones menores de CuSO_4 (ver Figura 4c). Sin embargo, los experimentos realizados con el transgénico *SqET4*, cuyas células ciliadas expresan GFP, muestran que en presencia del inhibidor de MMP9 el daño que la exposición a CuSO_4 causa en las células ciliadas de los neuromastos no es significativamente distinto (ver Figura 25) al causado en ausencia de inhibidor. Estos resultados sugieren un rol para MMP9 en la migración de neutrófilos, hecho ya documentado en otros modelos, sea facilitando la migración intersticial de células inmunes al degradar la matriz extracelular circundante (Khandoga et al. 2006), o en el reclutamiento de los neutrófilos, a través del

procesamiento de citoquinas (Liu et al. 2000). Sin embargo, experimentos similares de inhibición farmacológica en los que las larvas fueron expuestas durante 40 minutos a CuSO_4 (Figura Suplementaria 19) muestran que el número de neutrófilos reclutados tras 40 minutos de exposición no es significativamente distinto del número promedio presente en los controles preincubados con DMSO. Estos resultados muestran que la inhibición de la actividad de MMP9 disminuye el número de neutrófilos reclutados al miosepto, lo que es notorio tras 20 minutos de exposición a CuSO_4 , pero 20 minutos después (a los 40 minutos de exposición a CuSO_4) el efecto ya no es visible. Una explicación posible a esto es que la actividad gelatinasa de MMP9 contribuye a la movilidad de los neutrófilos degradando la matriz extracelular y facilitando así la migración intersticial. En este caso, los resultados obtenidos serían explicados por una disminución de la rapidez con que se desplazan los neutrófilos a través del tejido como consecuencia de una menor capacidad (sea de los mismos neutrófilos, de otras células, o posiblemente de ambos) de degradar la matriz extracelular. El hecho que la inhibición de la actividad de MMP9 no suprima por completo la movilidad de los neutrófilos puede ser explicado por la existencia documentada de otras enzimas que también degradan proteínas de la matriz extracelular en pez cebra (Hillegass et al. 2007; Yoong et al. 2007). En este sentido, es interesante destacar que en un modelo murino de peritonitis se ha mostrado que la elastasa de neutrófilos (NE) es capaz de compensar los efectos de la falta de MMP9, lograda a través de un *knock-out*, en la infiltración de neutrófilos (Kolaczowska et al., 2009), hecho que ejemplifica la redundancia del sistema.

Otra explicación a los resultados de inhibición farmacológica de la actividad de MMP9 es un efecto sobre el procesamiento o degradación de citoquinas y quimioquinas mediado por metaloproteinasas de matriz. Se ha mostrado que MMP9 degrada CXCL6 (GCP-2) (Van den Steen et al. 2003), potencia la señalización vía IL-8 (CXCL8) por procesamiento en su extremo amino terminal, mientras que CTAP-III, PF-4 y GRO- α son degradadas por MMP9 (Van Den Steen et al., 2000). Estos antecedentes permiten sugerir que la inhibición de la actividad gelatinasa de MMP9 podría tener un efecto en el reclutamiento de neutrófilos a través de una modificación en las señales proinflamatorias generadas. Así, la inhibición farmacológica de la actividad de MMP9 disminuiría la potencia de las señales proinflamatorias, disminuyendo por ejemplo la tasa de activación proteolítica de algunas citoquinas, lo que a su vez tendría un impacto en el número de neutrófilos reclutados a lo largo del tiempo. Nuevamente, el hecho que el reclutamiento de neutrófilos no sea abolido del todo por la inhibición de la actividad de MMP9 se explicaría por la presencia de otras proteínas capaces de activar proteolíticamente a las citoquinas procesadas por MMP9 en condiciones normales.

La posibilidad de que MMP9 tenga un papel en el reclutamiento de neutrófilos, a través de una posible acción facilitadora de la migración intersticial degradando la matriz extracelular, junto con evidencia preliminar que indica que la inhibición de MMP9 perturba la migración del primordio de la línea lateral posterior (Viviana Gallardo, comunicación personal) nos llevó a realizar experimentos para evaluar un posible rol de la MMP9 en la migración de las células endoteliales en la formación de los vasos intersegmentales (ISV). Los resultados muestran que la inhibición

farmacológica de la actividad gelatinasa de MMP9 no produce cambios significativos en la formación de los ISV (Figura Suplementaria 20), lo que de modo preliminar descarta que MMP9 participe en la formación de los vasos sanguíneos.

Finalmente, es necesario notar que los experimentos de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia por un lado, y los de inhibición farmacológica, por el otro, son observaciones a distintos tiempos del papel de la metaloproteinasa de matriz 9 en la respuesta inflamatoria inducida por daño con CuSO₄. Esta diferencia, de menos de 2 horas, es relevante a causa de la degranulación de los neutrófilos. Se ha reportado que los neutrófilos humanos, que expresan MMP9 constitutivamente, almacenan MMP9 en gránulos, y que, al ser estimulados *in vitro* por señales proinflamatorias, como la IL-8, se degranulan rápidamente durante la primera hora después de la inducción (Opdenakker et al., 2001). Si suponemos que los neutrófilos de pez cebra se comportan *in vivo* de modo análogo a los neutrófilos humanos *in vitro*, cabría esperar que los resultados de inhibición farmacológica de la actividad de MMP9 impliquen que la MMP9 almacenada en los gránulos, y luego liberada por degranulación de los neutrófilos al medio extracelular (y que por tanto es el blanco de la inhibición), sea la responsable del rol observado de MMP9 en el reclutamiento de los neutrófilos a los neuromastos dañados (Figura 24). Siguiendo esta suposición, la inducción de metaloproteinasa de matriz 9 observada más tarde tanto a nivel de transcrito como de proteína (Figura 21 y Figura 23, respectivamente) no necesariamente tiene un rol en el reclutamiento de neutrófilos y tal vez esté relacionada con el proceso posterior de reparación y regeneración del tejido (Lund et al., 2011).

VI. CONCLUSIONES

- El daño tisular provocado por la exposición de larvas de pez cebra a CuSO_4 induce una respuesta inmune en la que neutrófilos y otros leucocitos migran intersticialmente desde la ICM y se agrupan alrededor de los neuromastos de la línea lateral posterior en pocos minutos. Esta respuesta es mecanísticamente similar a la inflamación en mamíferos, en cuanto es sensible a la inhibición de Duox, COX, JNK, y PI3K, entre otros.
- Se estableció un ensayo cuantitativo basado en la inflamación inducida por daño con CuSO_4 que permite evaluar moléculas con propiedades antiinflamatorias potenciales. Se probó su efectividad con varias moléculas de conocido efecto antiinflamatorio y, en colaboración con el laboratorio del Dr. Urban Liebel, se desarrolló una metodología automatizada basada en este ensayo que permite realizar *screenings* de moléculas.
- Después de la respuesta inflamatoria inicial ocurre un proceso de resolución de la inflamación que se prolonga por varias horas, en el que los neutrófilos y otros leucocitos reclutados migran retrógradamente hacia la ICM y el borde dorsal, de modo que el número de leucocitos en el miosepto horizontal decae exponencialmente.
- Durante la inflamación se produce la activación, dependiente de PI3K, de Akt en neutrófilos y otros tipos celulares, sin embargo, la inhibición farmacológica de Akt no afecta el reclutamiento de neutrófilos durante la inflamación. En

contraste, PI3K tiene un rol en el reclutamiento de los leucocitos al miosepto horizontal durante la inflamación inducida por daño con CuSO_4 y también después, durante la resolución de la inflamación.

- En el curso de la respuesta inflamatoria se induce robustamente la expresión de MMP9 tanto a nivel transcripcional como de proteína, en neutrófilos y en otros tipos celulares, y la inhibición farmacológica de su actividad disminuye el reclutamiento de neutrófilos al miosepto horizontal.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aleström, P., Holter, J. L., Nourizadeh-Lillabadi, R., and Alestro, P. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends in biotechnology* 24, 15–21.
- Barnett, J., Chow, J., Ives, D., Chiou, M., Mackenzie, R., Osen, E., Nguyen, B., Tsing, S., Bach, C., and Freire, J. (1994). Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim. Biophys. Acta* 1209, 130–139.
- Bennett, C. M., Kanki, J. P., Rhodes, J., Liu, T. X., Paw, B. H., Kieran, M. W., David, M., Delahaye-brown, A., Zon, L. I., Fleming, M. D., et al. (2001). Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* 98, 643–651.
- Bertolini, A., Ottani, A., and Sandrini, M. (2001). Dual Acting Anti-Inflammatory Drugs: A Reappraisal. *Pharmacological Research* 44, 437–450.
- Bottaro, D., Rubin, J., Faletto, D., Chan, A., Kmiecik, T., Vande Woude, G., and Aaronson, G. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802–804.
- Cadepond, F., Ulmann, A., and Baulieu, E. E. (1997). RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med* 48, 129–156.
- Cantley, L. C. (2009). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* 1655.
- Carradice, D., and Lieschke, G. J. (2008). Zebrafish in hematology: sushi or science? *Blood* 111, 3331–3342.
- Chitnis, A. B., Nogare, D. D., and Matsuda, M. (2011). Building the posterior lateral line system in zebrafish. *Developmental Neurobiology*.
- Christensen, J. G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., et al. (2003). A Selective Small Molecule Inhibitor of c-Met Kinase Inhibits c-Met-Dependent Phenotypes in Vitro and Exhibits Cytoreductive Antitumor Activity in Vivo. *Cancer Research* 63, 7345–7355.
- Cvejic, A., Hall, C., Bak-maier, M., Flores, M. V., Crosier, P., Redd, M. J., and Martin, P. (2008). Analysis of WASp function during the wound inflammatory response – live-imaging studies in zebrafish larvae. *Journal of Cell Science* 121, 3196–3206.

- Dahlen, B., Shute, J., and Howarth, P. (1999). Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-13 and MMP-9 within the airways in asthma. *Methods* 54, 590–596.
- Davidson, A. J., and Zon, L. I. (2004). The “definitive” (and “primitive”) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* 23, 7233–7246.
- Van Den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96, 2673–2681.
- Duffy, C. P., Elliott, C. J., O’Connor, R. A., Heenan, M. M., Coyle, S., Cleary, I. M., Kavanagh, K., Verhaegen, S., O’Loughlin, C. M., NicAmhlaoibh, R., et al. (1998). Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells in vitro by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Eur J Cancer* 34, 1250–1259.
- D’Alençon, C. A., Peña, O. A., Wittmann, C., Gallardo, V. E., Jones, R. A., Loosli, F., Liebel, U., Grabher, C., and Allende, M. L. (2010). A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biology* 8, 1–16.
- Elks, P. M., van Eeden, F. J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C. C., Ingham, P. W., Whyte, M. K. B., Walmsley, S. R., and Renshaw, S. a (2011). Activation of Hif-1 α delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood* 118, 712–722.
- Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A., and Lieschke, G. J. (2011). mpeg1 Promoter Transgenes Direct Macrophage-Lineage Expression in Zebrafish. *Blood* 117, e49–e56.
- Eming, S. A., Krieg, T., Davidson, J. M., and Hall, R. P. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127.
- Ferguson, G. J., Milne, L., Kulkarni, S., Sasaki, T., Walker, S., Andrews, S., Crabbe, T., Finan, P., Jones, G., Jackson, S., et al. (2007). PI(3)K γ has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nature Cell Biology* 9, 86–91.
- Filep, J. G., and El Kebir, D. (2009). Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *Journal of cellular biochemistry* 108, 1039–1046.
- Foxman, E. F., Kunkel, E. J., and Butcher, E. C. (1999). Integrating Conflicting Chemotactic Signals: The Role of Memory in Leukocyte Navigation. *The Journal of Cell Biology* 147, 577–587.

- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., and Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983–8998.
- Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K. J., Neuhaus, S. C. F., Segner, H., and Eggen, R. I. L. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast : Promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquatic Toxicology* 95, 307–319.
- Gallardo, V. E., Liang, J., Behra, M., Elkahloun, A., Villablanca, E. J., Russo, V., Allende, M. L., and Burgess, S. M. (2010). Molecular dissection of the migrating posterior lateral line primordium during early development in zebrafish. *BMC Developmental Biology* 10, 120.
- Gamba, L., Cubedo, N., Ghysen, A., Lutfalla, G., and Dambly-chaudière, C. (2010). Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *PNAS*, 2–7.
- Ghysen, A., and Dambly-Chaudière, C. (2007). The lateral line microcosmos. *Genes & Development* 21, 2118–2130.
- Ghysen, A., and Dambly-chaudie, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current Opinion in Neurobiology*, 67–73.
- Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., and Rossi, A. G. (2004). Inflammatory Resolution: New Opportunities for Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 401–416.
- Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M., Cooper, C., and Comoglio, P. (1989a). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* 339, 155–157.
- Giordano, S., Di Renzo, M., Narsihan, R., Cooper, C., Rosa, C., and Comoglio, P. (1989b). Biosynthesis of the protein encoded by c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1383–1388.
- Grabher, C., Cliffe, A., Miura, K., Hayflick, J., Pepperkok, R., Rørth, P., and Wittbrodt, J. (2007). Birth and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 263–271.
- Gray, C., Loynes, C. A., Whyte, M. K. B., Crossman, D. C., Renshaw, S. A., and Chico, T. J. A. (2011). Simultaneous intravital imaging of macrophage and neutrophil behaviour during inflammation using a novel transgenic zebrafish. *Thrombosis and Haemostasis*, 1–9.

- Grosser, T., Yusuff, S., Cheskis, E., Pack, M. A., and Fitzgerald, G. A. (2002). Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *PNAS* *99*, 8418–8423.
- Haas, P., and Gilmour, D. (2006). Chemokine Signaling Mediates Self-Organizing Tissue Migration in the Zebrafish Lateral Line Short Article. *Developmental Cell*, 673–680.
- Hall, C., Flores, M. V., Storm, T., Crosier, K., and Crosier, P. (2007). The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Developmental Biology* *17*, 1–17.
- Han, Z., Boyle, D. L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A. M., and Firestein, G. S. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* *108*, 73–81.
- Harris, J. a, Cheng, A. G., Cunningham, L. L., MacDonald, G., Raible, D. W., and Rubel, E. W. (2003). Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* *4*, 219–234.
- Hernández, P. P., Moreno, V., Olivari, F. A., and Allende, M. L. (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing Research* *213*, 1–10.
- Hernández, P. P., Olivari, F. A., Sarrazin, A. F., Sandoval, P. C., and Allende, M. L. (2007). Regeneration in Zebrafish Lateral Line Neuromasts : Expression of the Neural Progenitor Cell Marker Sox2 and Proliferation-Dependent and -Independent Mechanisms of Hair Cell Renewal. *Developmental Neurobiology* *67*, 637–654.
- Hillegass, J. M., Villano, C. M., Cooper, K. R., and White, L. A. (2008). Glucocorticoids Alter Craniofacial Development and Increase Expression and Activity of Matrix Metalloproteinases in Developing Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences* *102*, 413–424.
- Hillegass, J. M., Villano, C. M., Cooper, K. R., and White, L. A. (2007). Matrix Metalloproteinase-13 Is Required for Zebra fish (*Danio rerio*) Development and Is a Target for Glucocorticoids. *Toxicological Sciences* *100*, 168–179.
- Iglesias, P. A. (2009). Spatial regulation of PI3K signaling during chemotaxis. *WIREs Systems Biology and Medicine* *1*, 247–253.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., et al. (1997). Cancer

chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218–220.

Johnson, J. L., Wimsatt, J., Buckel, S. D., Dyer, R. D., and Maddipati, K. R. (1995). Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324, 26–34.

Juntilla, M. M., and Koretzky, G. A. (2008). Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development. *Immunology Letters* 116, 104–110.

Kebir, D. E., and Filep, J. G. (2010). Role of Neutrophil Apoptosis in the Resolution of Inflammation. *TheScientificWorldJournal* 10, 1731–1748.

Khandoga, A., Kessler, J. S., Hanschen, M., Khandoga, A. G., Burggraf, D., Reichel, C., Hamann, G. F., Enders, G., and Krombach, F. (2006). Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *Journal of Leukocyte Biology* 79, 1295–1305.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253–310.

Kloet, E. R. D., Fitzsimons, C. P., Datson, N. A., Meijer, O. C., and Vreugdenhil, E. (2009). Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Research* 1293, 129–141.

Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Burlak, C., and DeLeo, F. R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp* 53, 505–517.

Kolaczowska, E., Grzybek, W., van Rooijen, N., Piccard, H., Plytycz, B., Arnold, B., and Opendakker, G. (2009). Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *Journal of leukocyte biology* 85, 374–381.

Koyasu, S. (2003). The role of PI3K in immune cells. *Science And Technology* 4, 313–319.

Kulkarni, S., Sitaru, C., Jakus, Z., Anderson, K. E., Davidson, K., Hirose, M., Juss, J., Oxley, D., Tamara, A., Chessa, M., et al. (2011). PI3Kb Plays a Critical Role in Neutrophil Activation by Immune Complexes. *Science Signaling* 4, ra23.

Lavista Llanos, S., and Roldán, A. (1999). Effect of dexamethasone on nitric oxide (NO) production by cultured astrocytes. *Biocell* 23, 29–35.

- Lawrence, T., Willoughby, D. A., and Gilroy, D. W. (2002). Anti-Inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2, 787–795.
- Lawson, N. D., and Weinstein, B. M. (2002). In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology* 248, 307–318.
- Lieschke, G. J., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C., and Layton, J. E. (2001). Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98, 3087–3096.
- Lindemans, C. A., and Coffey, P. J. (2004). Regulation of granulocyte apoptosis by phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemical Society Transactions* 32, 480–484.
- Liu, L., Puri, K. D., Penninger, J. M., and Kuberski, P. (2007). Leukocyte PI3K γ and PI3K δ have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo. *Blood* 110, 1191–1198.
- Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S. D., Shipley, J. M., Twining, S. S., Diaz, L. A., Senior, R. M., and Werb, Z. (2000). The Serpin α 1-Proteinase Inhibitor Is a Critical Substrate for Gelatinase B/MMP-9 In Vivo. *Cell* 102, 647–655.
- Loynes, C. A., Martin, J. S., Robertson, A., Trushell, D. M. I., Ingham, P. W., Whyte, M. K. B., and Renshaw, S. A. (2010). Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 203–212.
- Lund, I. K., Nielsen, B. S., Almholt, K., Rønne, B., Hald, A., Illemann, M., Green, K. a, Christensen, I. J., Rømer, J., and Lund, L. R. (2011). Concomitant lack of MMP9 and uPA disturbs physiological tissue remodeling. *Developmental biology*.
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Rhodes, J., Kanki, J. P., Look, A. T., and Huttenlocher, A. (2007). Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish Hai1. *Journal of Cell Science* 120, 3372–3383.
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Ranheim, E. A., Huttenlocher, A., and Kan, S. (2009). Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 1212–1217.
- Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T.-xi, Kanki, J., Look, A. T., and Huttenlocher, A. (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology* 80, 1281–1288.

- McDonald, B., and Kubes, P. (2011). Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*.
- Mine, S., Tanaka, Y., Suematu, M., Aso, M., Fujisaki, T., Yamada, S., and Eto, S. (1998). Hepatocyte growth factor is a potent trigger of neutrophil adhesion through rapid activation of lymphocyte function-associated antigen. *Laboratory Investigation* 78, 1395–1404.
- Mosser, D. M., and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Apoptosis* 8, 958–969.
- Mueck, A. O., and Seeger, H. (2010). 2-Methoxyestradiol—Biology and mechanism of action. *Steroids* 75, 625–631.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., and Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996–1000.
- Nourshargh, S., Hordijk, P. L., and Sixt, M. (2010). Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 367–378.
- Olivari, F. A., Hernández, P. P., and Allende, M. L. (2008). Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Research* 1244, 1–12.
- Opdenakker, G., Steen, P. E. V. D., Dubois, B., Nelissen, I., Coillie, E. V., Masure, S., Proost, P., and Damme, J. V. (2001). Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 851–859.
- Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., and Emelyanov, A. (2004). Tol2 Transposon-Mediated Enhancer Trap to Identify Developmentally Regulated Zebrafish Genes In Vivo. *Developmental Dynamics* 231, 449–459.
- Parks, W. C. (1999). Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and Regeneration* 7, 423–432.
- Parks, W. C., Wilson, C. L., and López-boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 4, 617–629.
- Parrillo, J. E., and Fauci, A. S. (1979). Mechanisms of Glucocorticoid Action on Immune Processes. *Clinical Physiology*, 179–201.

- Perretti, M., and D'Acquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 9, 62–70.
- Peña, O. A. (2011). Respuesta Transcriptómica a la Exposición por Cobre en Larvas de Pez Cebra. Seminario de título Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Chile.
- Pinho, V., Souza, D. G., Barsante, M. M., Hamer, F. P., Freitas, M. S. D., Rossi, A. G., and Teixeira, M. M. (2005). Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo : importance for the resolution of allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 800–810.
- Plouffe, D. A., Hanington, P., Walsh, J. G., Wilson, E. C., and Belosevic, M. (2005). Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 12, 266–277.
- Prescott, S. M., and Yost, H. J. (2002). The COXes of Danio : From mechanistic model to experimental therapeutics. *PNAS* 99, 9084–9086.
- Renshaw, S. A., Loynes, C. A., Trushell, D. M. I., Elworthy, S., Ingham, P. W., and Whyte, M. K. B. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108, 3976–3978.
- Renshaw, S. a, and Trede, N. S. (2012). A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Disease Models & Mechanisms* 5, 38–47.
- Rickert, P., Weiner, O. D., Wang, F., Bourne, H. R., and Servant, G. (2010). Leukocytes navigate by compass: roles of PI3K and its lipid products. *Trends in cell biology* 10.
- Rossi, A. G., Hallett, J. M., Sawatzky, D. A., Teixeira, M. M., and Haslett, C. (2007). Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochemical Society Transactions* 35, 288–291.
- Rossi, A. G., and Sawatzky, D. A. (2008). *The Resolution of Inflammation* A. G. Rossi and D. A. Sawatzky, eds. (Basel: Birkhauser).
- Dos Santos, S., Candi, A., Vansteenbrugge, M., Pignon, M.-rose, Bult, H., Zouaoui, K., Munaut, C., and Raes, M. (2009). Microarray analyses of the effects of NF- κ B or PI3K pathway inhibitors on the LPS-induced gene expression profile in RAW264 . 7 cells Synergistic effects of rapamycin on LPS-induced MMP9-overexpression. *Cellular Signalling* 21, 1109–1122.
- Sasaki, T., Irie-sasaki, J., Jones, R. G., Oliveira-dos-santos, A. J., Stanford, W. L., Kozieradzki, I., Joza, N., Mak, T. W., Ohashi, P. S., Suzuki, A., et al. (2000). Function

of PI3K γ in Thymocyte Development , T Cell Activation , and Neutrophil Migration. *Science* 287, 1040–1046.

Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. a J., Perretti, M., Rossi, A. G., Wallace, J. L., and Neill, L. A. J. O. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB Journal* 21, 325–332.

Serhan, C. N., and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology* 6, 1191–1197.

Skibinski, G. (2003). The Role of Hepatocyte Growth Factor / c-met Interactions in the Immune System. *Arch Immunol Ther Exp* 51, 277–282.

Sousa, P., Carmo, A. F., Rezende, M., Lopes, F., Silva, D. M., and Alessandri, A. L. (2009). Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K / Akt and NF- κ B. *Biochemical Pharmacology* 78, 396–405.

Van den Steen, P. E., Wuyts, A., Husson, S. J., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2003). Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *European Journal of Biochemistry* 270, 3739–3749.

Stephens, L., Milne, L., and Hawkins, P. (2008). Moving towards a better understanding of chemotaxis. *Current Biology* 18, R485–R494.

Tapley, P., Lamballe, F., and Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371–381.

Thévenaz, P., Ruttimann, U. E., and Unser, M. (1998). A Pyramid Approach to Subpixel Registration Based on Intensity. *IEEE Transactions on Image Processing* 7, 27–41.

Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). The Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) -Akt Pathway Suppresses Bax Translocation to Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 14040–14047.

Vanhaesebroeck, B., Okkenhaug, K., and Rommel, C. (2007). PI3K signalling in immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 2007–2007.

Volkman, H. E., Pozos, T. C., Zheng, J., Davis, J. M., Rawls, J. F., and Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous Granuloma Induction via Interaction of a Bacterial Secreted Protein with Host Epithelium. *Science* 327, 466–469.

- Walters, K. B., Green, J. M., Surfus, J. C., Yoo, S. K., and Huttenlocher, A. (2010). Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood* *116*, 2803–2811.
- Weichhart, T. (2008). The PI3K / Akt / mTOR pathway in innate immune cells : emerging therapeutic applications The PI3K / Akt / mTOR pathway in innate immune cells : emerging therapeutic applications. *Annals of the Rheumatic Diseases* *67*, iii70–iii74.
- Westerfield, M. (2000). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* (Eugene, OR: University of Oregon Press).
- White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C. E., et al. (2008). Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell stem cell* *2*, 183–189.
- Willson, T. M., Cobb, J. E., Cowan, D. J., Wiethe, R. W., Correa, I. D., Prakash, S. R., Beck, K. D., Moore, L. B., Kliewer, S. A., and Lehmann, J. M. (1996). The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* *39*, 665–668.
- Won, J., Lee, K.-wook, Sohn, W.-joo, Lee, Y., Jeon, O.-hee, Kwon, H.-joo, and Kim, D.-sik (2007). Regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and cell migration by NF- κ B in response to CpG-oligodeoxynucleotides in RAW 264 . 7 cells. *Molecular Immunology* *44*, 1393–1400.
- Woodfin, A., Voisin, M.-benoit, Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F.-maria, Nash, G. B., Chavakis, T., Albelda, S. M., Rainger, G. E., et al. (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature Immunology* *12*, 761–770.
- Xiao, T., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2005). A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development*, 2955–2967.
- Xu, Y., Loison, F., and Luo, H. R. (2010). Neutrophil spontaneous death is mediated by down- regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3K, ROS, and actin. *PNAS* *107*, 2950–2955.
- Yang, L., Kemadjou, J. R., Zinsmeister, C., Bauer, M., Legradi, J., Müller, F., Pankratz, M., Jäkel, J., and Strähle, U. (2007). Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biology* *8*, 1–17.

- Yoo, S. K., Deng, Q., Cavnar, P. J., Wu, Y. I., Hahn, K. M., and Huttenlocher, A. (2010). Differential Regulation of Protrusion and Polarity by PI(3)K during Neutrophil Motility in Live Zebrafish. *Developmental Cell* 18, 226–236.
- Yoo, S. K., and Huttenlocher, A. (2011). Spatiotemporal photolabeling of neutrophil trafficking during inflammation in live zebrafish. *Journal of leukocyte biology* 89, 661–667.
- Yong, S., Soanes, A., Crowhurst, M. O., Lieschke, G. J., Ward, A. C., and Connell, B. O. (2007). Characterization of the zebrafish matrix metalloproteinase 9 gene and its developmental expression pattern. *Gene Expression Patterns* 7, 39–46.
- Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2009). Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Developmental Biology* 325, 71–81.
- Zhang, Y., Bai, X.-tao, Zhu, K.-yong, Jin, Y., Deng, M., Le, H.-ying, Fu, Y.-fang, Chen, Y., Zhu, J., Look, A. T., et al. (2008). In Vivo Interstitial Migration of Primitive Macrophages Mediated by JNK-Matrix Metalloproteinase 13 Signaling in Response to Acute Injury 1. *The Journal of Immunology* 181, 2155–2164.
- Zhu, D., Hattori, H., Jo, H., Jia, Y., Subramanian, K. K., Loison, F., You, J., Le, Y., Honczarenko, M., Silberstein, L., et al. (2006). Deactivation of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate/Akt signaling mediates neutrophil spontaneous death. *PNAS* 103, 14836–14841.

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

8.1 Figuras Suplementarias

Figura Suplementaria 1. Migración de los leucocitos hacia los neuromastos dañados con CuSO₄. Microscopía en tiempo extendido (*time-lapse*) de larva transgénica *BACmpx::GFP* teñida con DiOC₆, para marcar los neuromastos (señalados con triángulos azules). Se muestra una parte del tronco y la cola, con anterior hacia la izquierda y dorsal arriba. Tras agregar CuSO₄ 50 μM al medio, la larva fue montada en agarosa de bajo punto de fusión y se realizó la adquisición de imágenes en un microscopio de epifluorescencia por 1 hora y 40 minutos, aproximadamente. Se observa una contracción en uno de los neuromastos al comienzo del experimento. Barra blanca, 200 μm. Tiempo, horas:minutos:segundos.

Figura Suplementaria 2. Infiltración de los leucocitos en los neuromastos dañados con CuSO₄. Microscopía en tiempo extendido (*time-lapse*) de larva doble transgénica *Tg(lysC::DsRED2; cldnB::GFP)*, cuyos leucocitos expresan DsRED2 (en rojo) y cuya línea lateral expresan GFP (en verde), expuesta a CuSO₄ 50 μM e inmediatamente montada en agarosa y se realizó la adquisición de imágenes en un microscopio confocal durante 1 hora y 45 minutos, aproximadamente. Se muestra un neuromasto de la línea lateral posterior, con anterior hacia la izquierda y dorsal arriba. Se observa una progresiva desorganización del neuromasto, en el que inicialmente las células se hayan estrechamente unidas, hasta terminar por completo desorganizado a medida los leucocitos se mueven a través y alrededor del neuromasto. Barra blanca, 50 μm. Tiempo, horas:minutos:segundos.

Figura Suplementaria 3. Muerte de células ciliadas inducida por daño con CuSO₄. Microscopía en tiempo extendido (*time-lapse*) de larva transgénica *Brn3c::mGFP*, en la que las células ciliadas de los neuromastos expresan GFP (en verde). Se muestra un neuromasto de la línea lateral posterior, con anterior hacia la izquierda y dorsal arriba. Tras agregar CuSO₄ 50 μM al medio, la larva fue montada en agarosa de bajo punto de fusión y se realizó la adquisición de imágenes en un microscopio confocal por 30 minutos, aproximadamente. Se observa una rápida muerte de las células ciliadas y la desorganización del neuromasto. Barra blanca, 50 μm. Tiempo, horas:minutos:segundos.

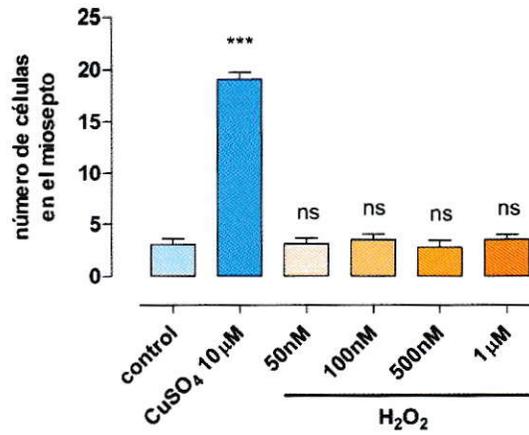


Figura Suplementaria 4. Cuantificación de leucocitos reclutados en larvas expuestas a H₂O₂. Se grafica el número promedio de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 56 hpf expuestas a CuSO₄ o H₂O₂ durante 2 horas. Mientras la exposición a CuSO₄ induce el reclutamiento de neutrófilos en el miosepto de las larvas, la exposición a H₂O₂ en el rango de 50 nM a 1 µM no produce un reclutamiento significativo de células inmunes. Los resultados se muestran como promedio ± error medio estándar de 15 larvas por cada condición. Las comparaciones estadísticas se realizaron contra los controles negativos no expuestos, por ANOVA de una vía no paramétrica con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

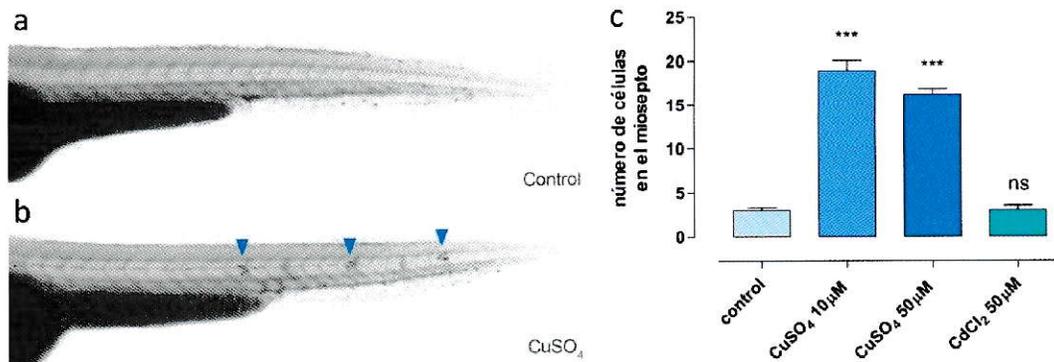


Figura Suplementaria 5. Cuantificación por *Sudan Black* del reclutamiento de leucocitos al miosepto. a y b, fotografías de campo claro de larvas *casper* de 56 hpf en las que los leucocitos fueron marcados con *Sudan Black*. En **a** se muestra una larva control en la que los leucocitos se concentran en la ICM y el CHT. En **b** se muestra una larva expuesta a CuSO₄ 10 μM por 2 horas en que los leucocitos se hallan formando grupos periódicos a lo largo del miosepto (triángulos azules). En **c** se grafica el número de leucocitos en el miosepto de larvas *casper* teñidas con *Sudan Black*, control y tratadas con las concentraciones indicadas de CuSO₄ o CdCl₂ por 2 horas a partir de las 56 hpf (tal como en la Figura 4b). Es importante notar la similitud de los resultados obtenidos mediante esta técnica y los obtenidos realizando conteos en larvas transgénicas (Figura 4b). Los resultados corresponden, para cada condición, al promedio ± error estándar de los conteos hechos en un total de 15 larvas para cada condición. Las comparaciones se realizaron contra los controles negativos no tratados por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

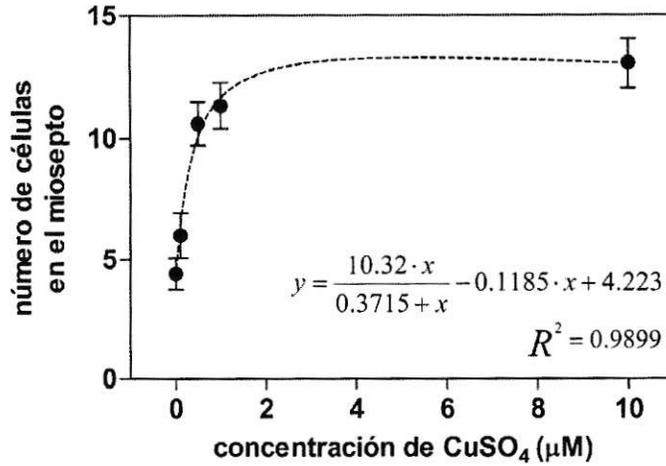


Figura Suplementaria 6. Número de neutrófilos reclutados al miosepto en función de la concentración de CuSO_4 . Se grafica (datos tomados de la Figura 4c) el número promedio \pm error estándar de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 56 hpf expuestas a distintas concentraciones de CuSO_4 durante 2 horas. Se observa que el número de células reclutadas al miosepto aumenta drásticamente en el rango de 0 a 1 μM de CuSO_4 , y sin embargo se mantiene relativamente constante en el rango de 1 a 10 μM de CuSO_4 . Los datos corresponden a los de la Figura 4c (puntos) que han sido sometidos a una regresión no lineal (línea discontinua) con un modelo de unión.

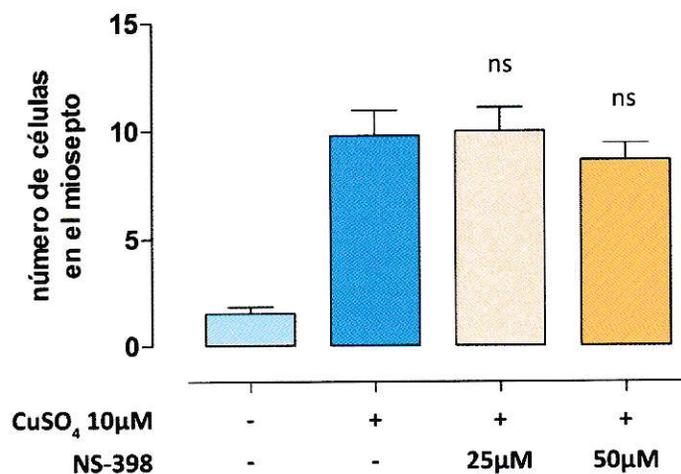


Figura Suplementaria 7. Efecto de la inhibición farmacológica de COX-2 en el reclutamiento de leucocitos a la línea lateral inducido por daño con CuSO₄. Se grafica el número de neutrófilos reclutados en el miosepto en larvas *BACmpx::GFP* de 56 hpf preincubadas durante 1 hora en el inhibidor de la actividad de COX-2, NS-398, y luego expuestas a CuSO₄ 10 µM por 40 minutos en presencia del inhibidor. No se observan diferencias estadísticamente significativas del número promedio de neutrófilos reclutados al miosepto tras la exposición a CuSO₄ en las larvas preincubadas con el inhibidor. La necesidad de añadir BSA junto con el inhibidor parece haber afectado la efectividad del CuSO₄ para inducir reclutamiento, como se puede ver en el control positivo. Se contó el número de neutrófilos a lo largo del miosepto y los resultados son presentados como promedio ± error estándar de 15 larvas para cada tratamiento. Las comparaciones se realizaron contra el control positivo tratado con CuSO₄ por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$.

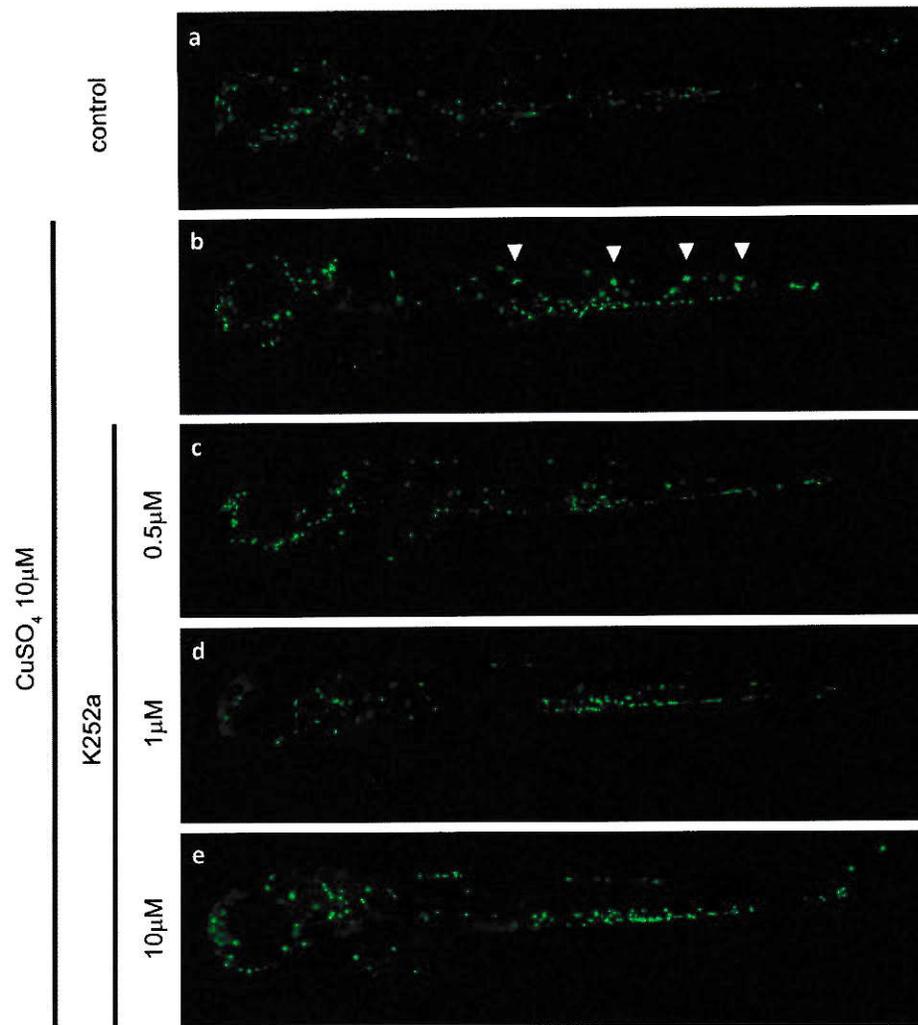


Figura Suplementaria 8. Efecto de la inhibición farmacológica de *c-met* en el reclutamiento de leucocitos inducido por daño con CuSO_4 . Fotografías de larvas representativas de la Figura 7. Larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 72 hpf fueron preincubadas en distintas concentraciones del inhibidor de *c-met*, K252a, o del solvente, se agregó CuSO_4 a una concentración final de $10 \mu\text{M}$, y se incubó por 40 minutos. Tras las incubaciones, las larvas fueron anestesiadas y fotografiadas *in vivo* en un estereoscopio de fluorescencia. En **a**, el control negativo, se observan los leucocitos en la ICM y el CHT, donde residen normalmente, mientras en **b**, el control positivo, parte de los leucocitos se ha desplazado a la línea lateral, alrededor de los neuromastos (triángulos blancos). En **c**, **d** y **e**, se muestran larvas tratadas con concentraciones crecientes de K252a. Nótese la progresiva ausencia de grupos de leucocitos en el miosepto en las larvas expuestas a mayores concentraciones del inhibidor y la similitud de la larva expuesta a K252a $10 \mu\text{M}$ en **e**, con el control negativo, en **a**.

Figura Suplementaria 9. Resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄ por migración de neutrófilos. Microscopía en tiempo extendido (*time-lapse*) de larva transgénica *BACmpx::GFP* expuesta a CuSO₄ 10 μM por 2 horas a partir de las 72 hpf y luego incubada en medio E3 sin CuSO₄. Se muestra una parte del tronco y la cola, con anterior hacia la izquierda y dorsal arriba. Tras descartar el CuSO₄, la larva fue anestesiada y montada en un estereoscopio de fluorescencia para la adquisición de imágenes, que empezó 16 minutos después de ser descartado el CuSO₄ y se prolongó por 4 horas, aproximadamente. Al inicio de la secuencia se observan grupos periódicos de neutrófilos a lo largo del miosepto (triángulos azules). Se observa que los neutrófilos migran activamente, parte de ellos migrando hacia la ICM y el CHT (en la zona ventral, abajo), otros migran hacia el borde dorsal (arriba) y parte de los neutrófilos permanece en el miosepto hasta el final del experimento. Finalmente se compara el cuadro inicial (arriba) y final (abajo) de la secuencia. Se muestra un experimento representativo de un total de 8 experimentos de microscopía de tiempo extendido, en los que se observaron 14 larvas en total. Barra blanca, 250 μm. Tiempo, horas:minutos:segundos.

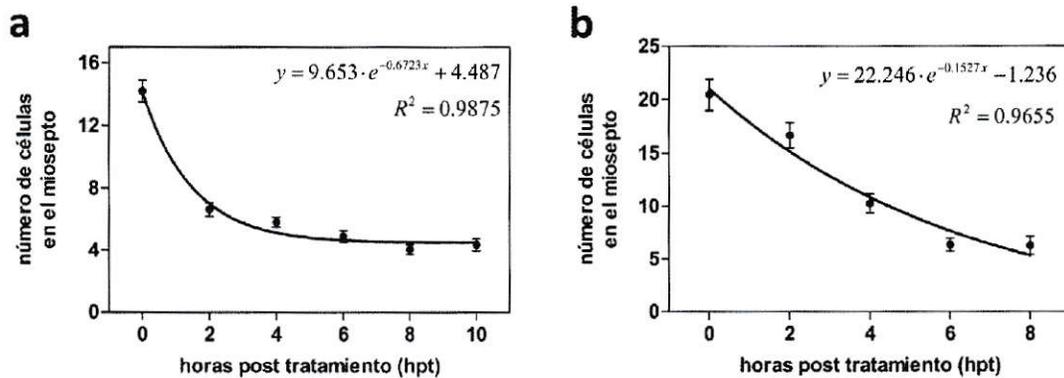


Figura Suplementaria 10. Decaimiento exponencial del número de células inmunes en el miosepto durante la resolución de la inflamación inducida por daño con CuSO₄. **a**, se grafica el número promedio de neutrófilos en el miosepto de larvas transgénicas *BACmpx::GFP* durante las primeras 10 horas de la resolución de la inflamación. Los datos corresponden a los de la Figura 13a (puntos) que han sido sometidos a una regresión no lineal (línea) con un modelo de decaimiento exponencial. **b**, se grafica el número promedio de leucocitos en el miosepto de larvas transgénicas *lysC::EGFP* durante las primeras 8 horas de la resolución de la inflamación. Los datos corresponden a los de la Figura 13b (puntos) que han sido sometidos a una regresión no lineal (línea) con un modelo de decaimiento exponencial. En ambos casos se muestran la ecuación con los parámetros obtenidos de la regresión y la bondad de ajuste (R^2) de la regresión.

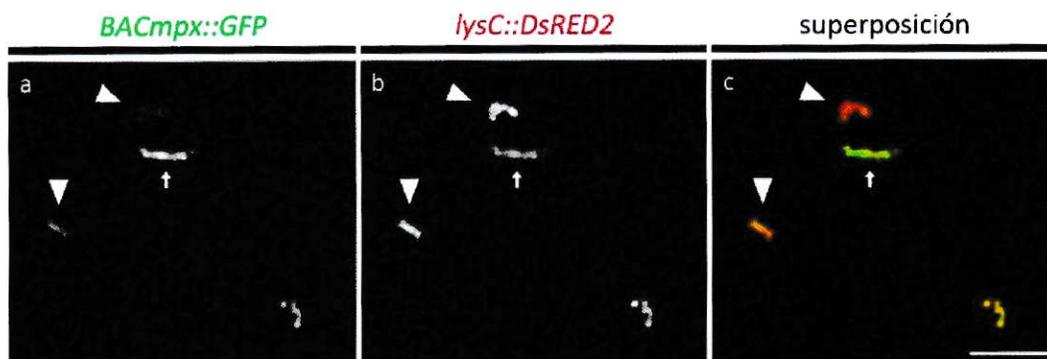


Figura Suplementaria 11. Expresión diferencial de proteínas reporteras en leucocitos. Fotografías de una larva doble transgénica *Tg(lysC::DsRED2; BACmpx::GFP)* que fue expuesta a CuSO_4 10 μM por 2 horas a partir de las 72 hpf. En **a**, se muestra el canal GFP, en el que se observan células con mayor expresión de GFP (**a**, flecha blanca) que otras células (**a**, triángulos blancos). Del mismo modo, en **b** puede verse el canal DsRED2 en el que también se observan células que expresan más DsRED2 (**b**, triángulos blancos) que otras (**b**, flecha blanca). En **c**, la superposición de los canales muestra la heterogeneidad de las células marcadas en las larvas dobles transgénicas (comparar las células señaladas con triángulos y la señalada por una flecha). Todas las imágenes se muestran a la misma magnificación, indicada por la barra blanca en la esquina inferior derecha, que representa 50 μm .

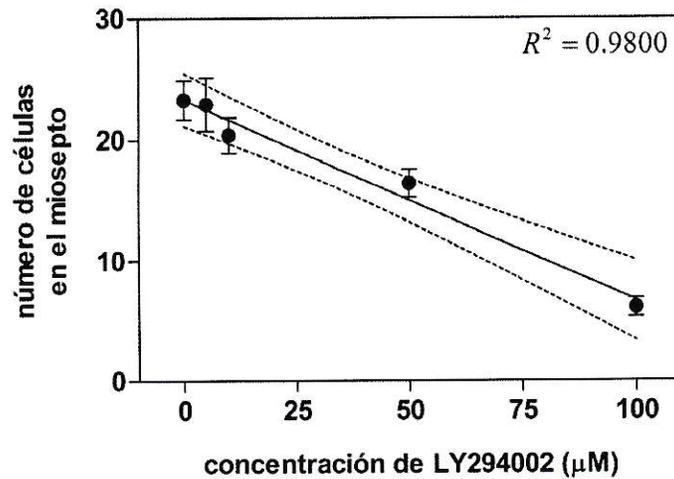


Figura Suplementaria 12. Dependencia lineal del número promedio de leucocitos reclutados y la concentración de LY294002. Se grafica (datos tomados de la Figura 16a) el número de leucocitos reclutados en larvas *lysC::EGFP* de 56 hpf preincubadas en distintas concentraciones del inhibidor de PI3K, LY294002, y luego expuestas por 40 minutos a CuSO_4 10 μM , en función de la concentración de inhibidor usada. Los resultados muestran que existe una relación lineal entre el número promedio de leucocitos reclutados al miosepto en respuesta a CuSO_4 y la concentración de LY294002 a la que son expuestas las larvas, en el rango 0 - 100 μM . Los resultados se muestran como promedio \pm error estándar de 15 larvas para cada tratamiento. La línea continua corresponde a una regresión lineal de los datos y las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza 95% de la regresión. R^2 , bondad de ajuste de la regresión.

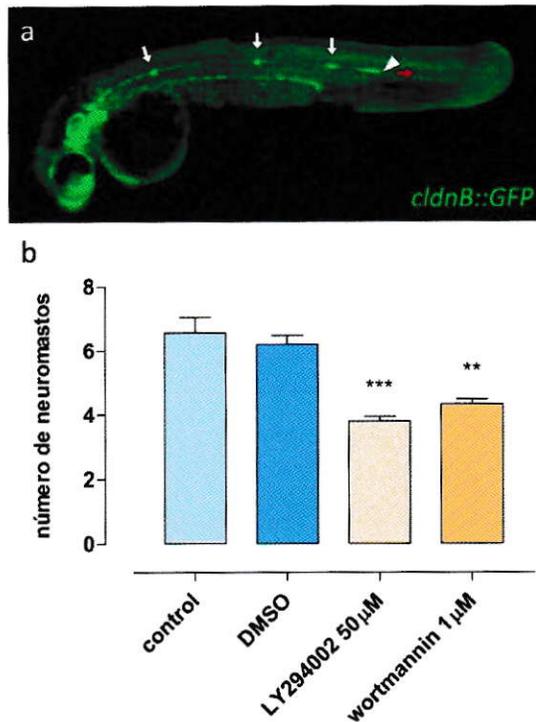


Figura Suplementaria 13. Efecto de la inhibición farmacológica de PI3K en la migración del primordio. Ensayo de migración del primordio de la línea lateral posterior en el que se incubaron larvas transgénicas *cldnB::GFP* en inhibidores de PI3K (LY294002 50 μ M y *wortmannin* 1 μ M) o solvente (DMSO 0,1 % v/v) a partir de las 33 hpf, y se contó en un estereoscopio de fluorescencia el número de neuromastos depositados a las 48 hpf. En **a**, se muestra un esquema de un embrión *cldnB::GFP* de 36 hpf en el que las áreas verdes representan las células que expresan GFP. Se señala con un triángulo blanco el primordio que migra en la dirección indicada por la flecha roja, depositando a su paso los neuromastos (flechas blancas) que se grafican en los conteos en **b**. En **b**, se grafica el número de neuromastos depositados en embriones expuestos a DMSO, E3 o inhibidores de PI3K. Se observa una disminución estadísticamente significativa en el número de neuromastos depositados debido a la inhibición farmacológica de PI3K. Los resultados se muestran como promedios \pm error estándar de 15 embriones para cada tratamiento. Las comparaciones se realizaron por ANOVA no paramétrica de una vía, con una prueba posterior de Dunns contra el control expuesto a DMSO. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

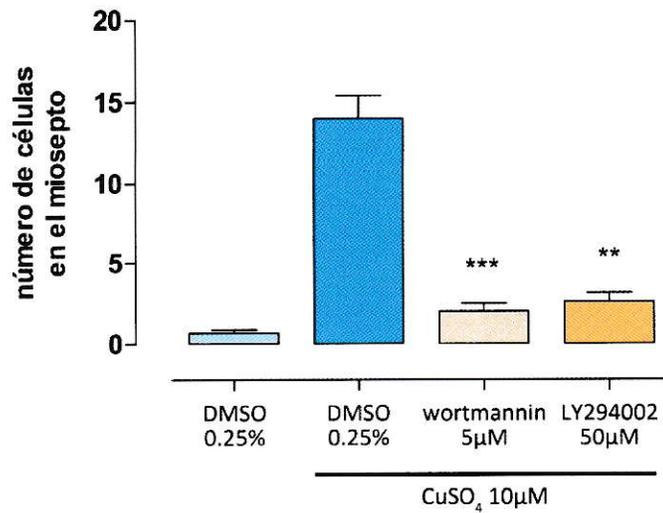


Figura Suplementaria 14. Disminución del reclutamiento de neutrófilos en larvas preincubadas con inhibidores farmacológicos de PI3K. Se grafica el número de neutrófilos reclutados en el miosepto en larvas *BACmpx::GFP* de 56 hpf preincubadas durante 1 hora en inhibidores de PI3K (*wortmannin* 5 µM y LY294002 50 µM) y luego expuestas a CuSO₄ 10 µM por 40 minutos en ausencia de los inhibidores. Se observa una disminución estadísticamente significativa del número promedio de neutrófilos reclutados al miosepto tras la exposición a CuSO₄ en las larvas preincubadas con ambos inhibidores de PI3K. Se contó el número de neutrófilos a lo largo del miosepto y los resultados son presentados como promedio ± error estándar de 15 larvas para cada tratamiento. Las comparaciones se realizaron contra el control positivo tratado con CuSO₄ por ANOVA no paramétrica de una vía con prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

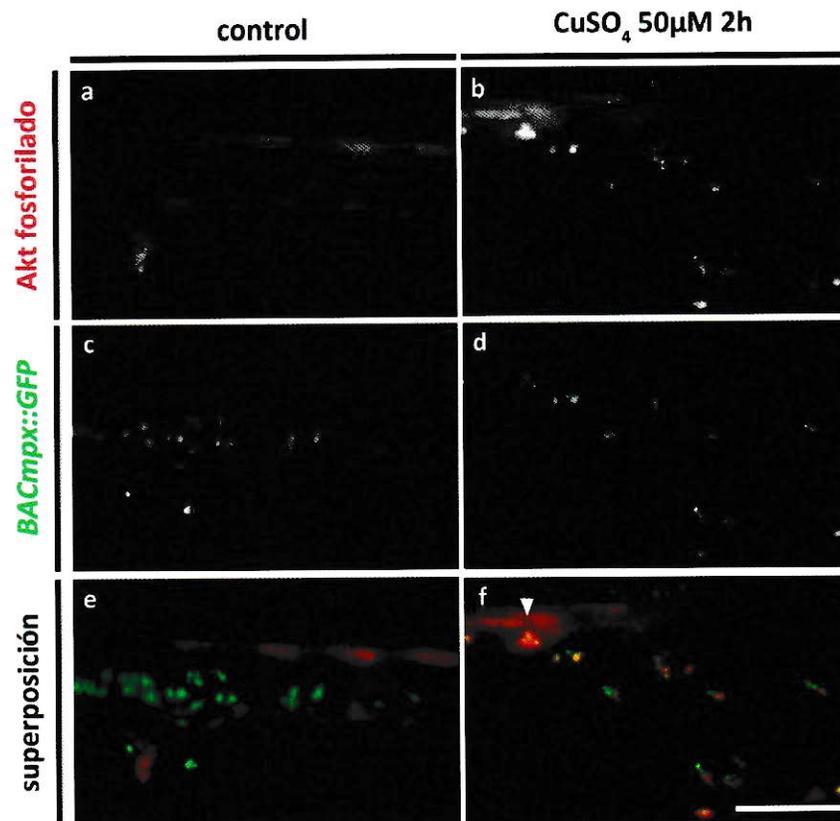


Figura Suplementaria 15. Activación de Akt en neutrófilos. Inmunofluorescencia doble contra Akt fosforilado (serina 473, primera fila) y GFP (segunda fila) en larvas transgénicas *BACmpx::GFP* de 72 hpf control (columna izquierda) y expuestas a CuSO₄ 50 μM (columna derecha) por 2 horas. En la última fila se muestra la superposición de los dos canales. En **a**, **c** y **e**, se muestra la ICM de una larva control de 74 hpf en la que prácticamente no se observa activación de Akt en los neutrófilos. En **b**, **d** y **f**, se muestra la porción ventral de la aleta caudal de una larva de 74 hpf expuesta a CuSO₄ 50μM por 2 horas. Se observa la ya descrita (Figura 18) activación de Akt en el área del neuromastos (**f**, triángulo blanco), y además una robusta activación de Akt en neutrófilos en la aleta bastante alejados del neuromasto (> 250 μm). Todas las imágenes se muestran a la misma magnificación, indicada por la barra blanca en la esquina inferior derecha, que representa 100 μm.

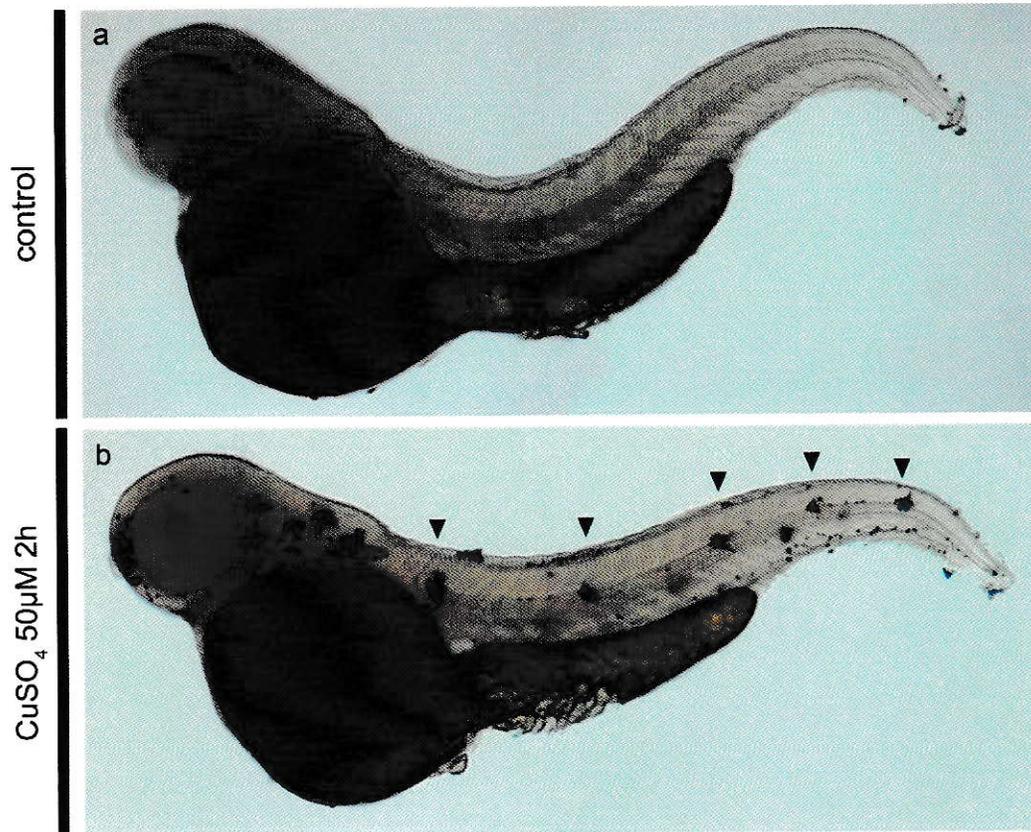


Figura Suplementaria 16. Inducción de la expresión de *mmp9* en larvas expuestas a CuSO₄ 50 μM por 2 horas. Hibridación *in situ* de *mmp9* en larva control de 58 hpf, **a**, y en una larva de 58 hpf tratada con CuSO₄ 50μM por 2 horas, **b**. Mientras en la larva control prácticamente no se observan niveles detectables de transcritos de *mmp9* (con la salvedad de algunas células en la zona anterior), en las larvas expuestas se observan grupos numerosos de células (triángulos negros) que expresan *mmp9* alrededor de los neuromastos de la línea lateral posterior. También se observan células que expresan *mmp9* en el CHT y en la cabeza de la larva.

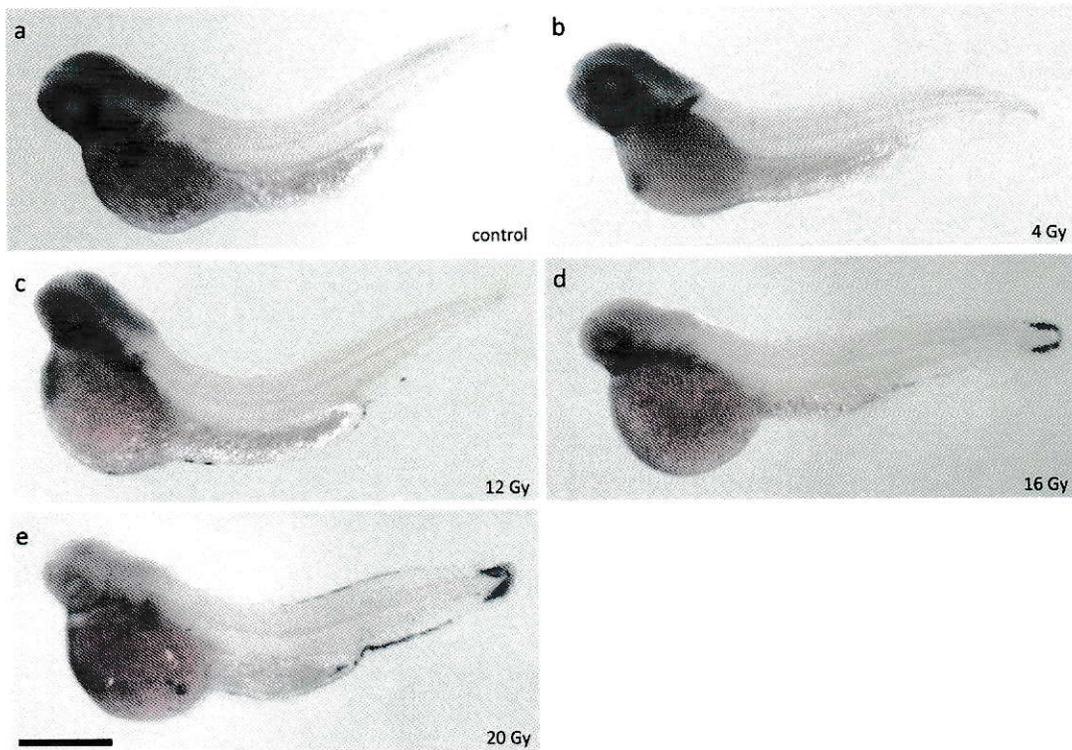


Figura Suplementaria 17. Inducción de la expresión de *mmp9* en embriones expuestos a radiación ionizante. Hibridación *in situ* de *mmp9* en embriones de 24 hpf irradiados con las dosis señaladas a las 3 hpf. En **a**, se muestra un embrión control de 24 hpf no irradiado, en el *mmp9* se expresa principalmente en la cabeza con marca ocasional en células individuales en el vitelo, posiblemente de la sangre. En **b**, se muestra la expresión de *mmp9* en un embrión irradiado con 4 Gy, que no muestra diferencias significativas respecto del control no irradiado. En **c**, se muestra un embrión irradiado con 12 Gy en el que la expresión de *mmp9* en la cabeza es menor que en el control. Nótese que aparecen células individuales marcadas en la aleta caudal y en la prolongación del vitelo. En **d**, se muestra un embrión irradiado con 16 Gy en el que la expresión de *mmp9* disminuye aún más en la cabeza respecto del control y se observan numerosas células que expresan *mmp9* en la punta de la cola. En **e**, se muestra un embrión irradiado con 20 Gy en el que *mmp9* se expresa en numerosas células en la punta de la cola, en la aleta caudal y en la prolongación del vitelo. Se observa además una disminución de la expresión de *mmp9* en la cabeza, respecto del control no irradiado. La barra de escala representa 250 μm .

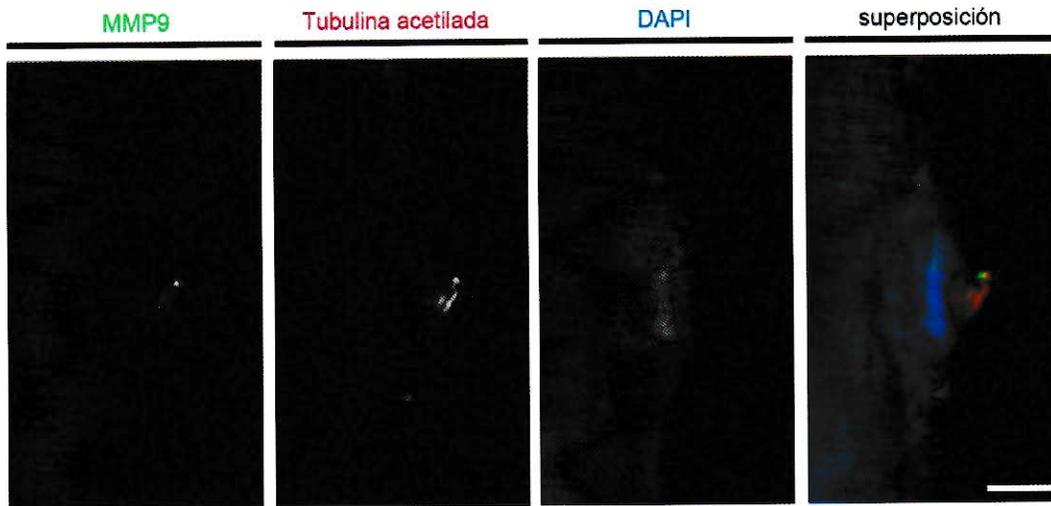


Figura Suplementaria 18. Expresión de MMP9 en las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral posterior. Imágenes de inmunofluorescencia en un neuromasto de la línea lateral posterior de una larva de 58 hpf que muestran la expresión de MMP9 (panel de la izquierda), la expresión de tubulina acetilada (segundo panel de izquierda a derecha), una tinción nuclear con DAPI (tercer panel de izquierda a derecha) y una superposición de todas las imágenes (panel de la derecha, MMP9 en verde, tubulina acetilada en rojo, y DAPI en azul). Todas las imágenes fueron adquiridas desde la zonal dorsal de la larva, anterior se muestra arriba y posterior se muestra abajo. Todas las imágenes se muestran a la misma magnificación. La barra blanca en la esquina inferior derecha representa 50 μm .

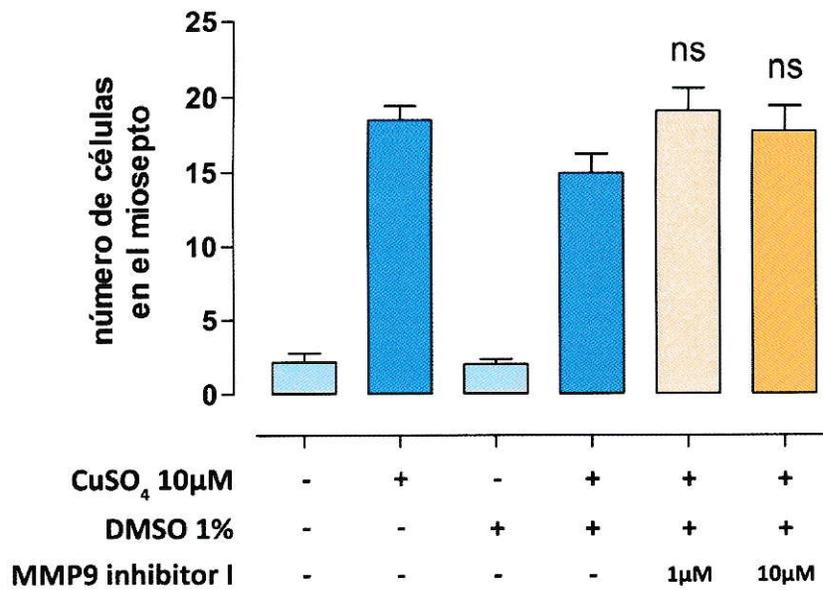


Figura Suplementaria 19. Efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en el reclutamiento de neutrófilos tras 40 minutos de exposición a CuSO₄. Número de neutrófilos reclutados al miosepto de larvas *BACmpx::GFP* preincubadas 1 hora en inhibidor de MMP9 o DMSO 0,1 %(v/v) para después ser expuestas durante 40 minutos a CuSO₄ 10 µM. Se observa que la exposición a inhibidor de MMP9 en el rango de concentraciones 1 µM - 10 µM no afecta significativamente ($p = 0,5061$) el número promedio de neutrófilos reclutados tras 40 minutos de exposición a CuSO₄. Los resultados se muestran como promedio \pm error estándar de 15 larvas para cada tratamiento. Las comparaciones se realizaron por ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni. ns, $p > 0,05$, no significativo.

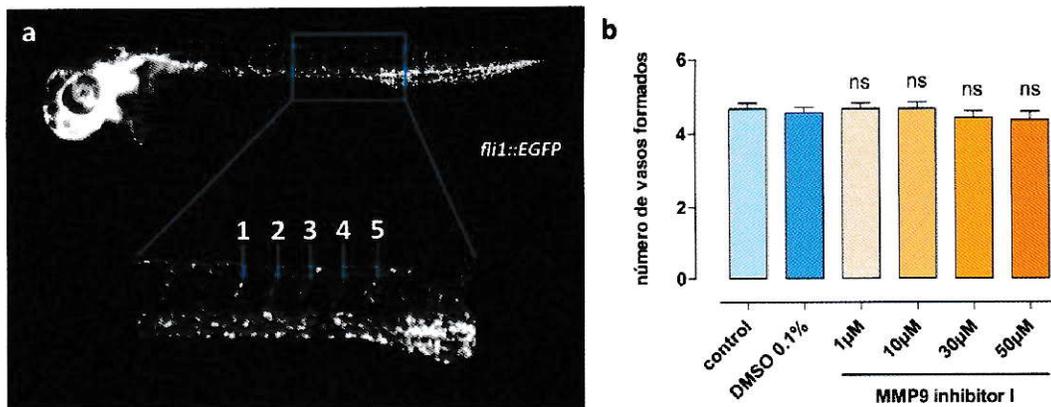


Figura Suplementaria 20. Evaluación del efecto de la inhibición farmacológica de MMP9 en la angiogénesis. Ensayo de angiogénesis en el que se utilizaron larvas transgénicas *fli1::EGFP*, cuyos vasos sanguíneos expresan GFP. Los embriones fueron expuestos desde el estadio de 80% de epibolía (10 hpf) hasta las 32 hpf a inhibidor de MMP9, DMSO o sólo E3. Luego se contó en un estereoscopio de fluorescencia el número de vasos intersegmentales (ISV, *intersegmental vessels*) completamente formados de los 5 vasos más posteriores antes de llegar a la altura del ano. En **a**, se muestra una fotografía de un embrión *fli1::EGFP* de 32 hpf en el que las zonas blancas representan las células que expresan GFP. Se muestra en un recuadro azul el área de 5 vasos intersegmentales en la que se realizaron los conteos que se muestran en **b**, que se muestran abajo, numerados. En **b**, se grafica el número de vasos intersegmentales completamente formados de un total de 5 vasos totales embriones expuestos a inhibidor de MMP9, DMSO o E3. No se observan cambios estadísticamente significativos en el número de vasos intersegmentales debido a la inhibición farmacológica de MMP9. Los resultados se muestran como promedios ± error estándar de 15 embriones para cada tratamiento. Las comparaciones se realizaron contra los controles expuestos a solvente por ANOVA no paramétrica de una vía, con una prueba posterior de Dunns. ns, $p > 0,05$, no significativo.

8.2 Tabla Suplementaria

Tabla Suplementaria I. Detección de actividad antiinflamatoria. Tabla resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de inflamación con moléculas antiinflamatorias, extraídos de las Figuras 6, 7, 8 y Figura Suplementaria 7. Se indica el modo de acción para cada droga, las concentraciones probadas en los ensayos y el grado de significancia del efecto observado en cada caso. ns, $p > 0,05$, no significativo; *, $0,01 < p < 0,05$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$.

Compuesto	Modo de acción	Concentración	Significancia del efecto	Referencia
<i>Diclofenac</i>	Inhibidor de COX	1,5 μ M	***	(Barnett et al., 1994; Johnson et al., 1995)
		3 μ M	***	
<i>Ibuprofen</i>	Inhibidor de COX	1 μ M	**	(Barnett et al., 1994)
		10 μ M	**	
		50 μ M	ns	
<i>Indomethacin</i>	Inhibidor de COX	1 μ M	*	(Johnson et al., 1995)
		10 μ M	***	
		100 μ M	***	
<i>Aspirin</i>	inhibidor de COX	10 μ M	ns	(Johnson et al., 1995)
		20 μ M	ns	
<i>Sulindac</i>	Inhibidor no esteroideal de COX-1	1 μ M	ns	(Duffy et al., 1998)
		10 μ M	***	
		50 μ M	***	
		100 μ M	***	
trans-resveratrol	Inhibidor de COX-1	1 μ M	ns	(Jang et al., 1997)
		10 μ M	*	
		100 μ M	***	
NS398	Inhibidor no esteroideal de COX-2	25 μ M	ns	(Mathias et al., 2007)
		50 μ M	ns	
<i>Met inhibitor I</i>	inhibidor de c-met	10 μ M	ns	(Christensen et al. 2003)
<i>Met inhibitor II</i>	inhibidor de c-met	10 μ M	ns	(Christensen et al. 2003)
K252a	inhibidor de las tirosina kinasas	0,5 μ M	ns	(Tapley et al., 1992)
		1 μ M	***	
		10 μ M	***	
Hidrocortisona	agonista esteroideal de GR	1 μ M	ns	(Kloet et al., 2009)
		10 μ M	ns	
		100 μ M	ns	

		300µM	ns	
<i>Dexamethasone</i>	agonista de GR	10µM	ns	(Lavista Llanos and Roldán, 1999)
		100µM	ns	
		500µM	ns	
		1000µM	**	
<i>Mifepristone</i> (RU486)	antagonista de progesterona y GR	1µM	ns	(Cadepond et al., 1997)
		10µM	***	
		50µM	*	
		100µM	***	
SP600125	Inhibidor de JNK	20µM	ns	(Han et al., 2001)
		50µM	*	
		100µM	ns	
		200µM	*	
<i>Rosiglitazone</i>	agonista de PPARγ	0,5µM	ns	(Willson et al., 1996)
		1µM	ns	
		5µM	ns	
		10µM	ns	
2-ME	inhibidor de la producción de HIF-1α	2µM	ns	(Mueck and Seeger, 2010)
		10µM	***	
		20µM	***	
		40µM	***	

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish

Claudia A d'Alençon^{1,2}, Oscar A Peña¹, Christine Wittmann³, Viviana E Gallardo¹, Rebecca A Jones⁴, Felix Loosli³, Urban Liebel^{3*}, Clemens Grabher^{3*}, Miguel L Allende^{1*}

Abstract

Background: Studies on innate immunity have benefited from the introduction of zebrafish as a model system. Transgenic fish expressing fluorescent proteins in leukocyte populations allow direct, quantitative visualization of an inflammatory response *in vivo*. It has been proposed that this animal model can be used for high-throughput screens aimed at the identification of novel immunomodulatory lead compounds. However, current assays require invasive manipulation of fish individually, thus preventing high-content screening.

Results: Here we show that specific, noninvasive damage to lateral line neuromast cells can induce a robust acute inflammatory response. Exposure of fish larvae to sublethal concentrations of copper sulfate selectively damages the sensory hair cell population inducing infiltration of leukocytes to neuromasts within 20 minutes. Inflammation can be assayed in real time using transgenic fish expressing fluorescent proteins in leukocytes or by histochemical assays in fixed larvae. We demonstrate the usefulness of this method for chemical and genetic screens to detect the effect of immunomodulatory compounds and mutations affecting the leukocyte response. Moreover, we transformed the assay into a high-throughput screening method by using a customized automated imaging and processing system that quantifies the magnitude of the inflammatory reaction.

Conclusions: This approach allows rapid screening of thousands of compounds or mutagenized zebrafish for effects on inflammation and enables the identification of novel players in the regulation of innate immunity and potential lead compounds toward new immunomodulatory therapies. We have called this method the chemically induced inflammation assay, or ChIn assay.

See Commentary article: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/148>.

Background

Inflammation is a reaction of the immune system to tissue damage and infection and represents a key component in normal tissue homeostasis. Consequently, deregulated inflammatory reactions result in severely detrimental chronic conditions. One of the hallmarks of the innate inflammatory response is infiltration of the affected tissue by leukocytes of the innate immune system (that is, granulocytes and macrophages). Inflammatory cells are recruited to the site of wounding or

infection by proinflammatory mediators such as hydrogen peroxide, cytokines and chemokines [1]. Studying the molecular and cellular basis of inflammation *in vivo* is often hampered by the opacity of the tissue, and, to date, most studies have relied on *in vitro* assays or on analysis after tissue fixation. Given the transparency of the zebrafish during early developmental stages, the availability of transgenic fluorescent reporter lines and the conservation of the principal components of the innate immune system, it is now possible to study immunity by following the behavior of infiltrating cells in the living animal. Green fluorescent protein (GFP)-labeled leukocytes can be observed in larval or adult models of inflammation, which involve wounding or exposing fish to infectious agents. In this animal model, it was recently discovered that hydrogen peroxide is an important immediate signaling molecule required for

* Correspondence: urban.liebel@kit.edu; clemens.grabher@kit.edu; allende@uchile.cl

¹Center for Genome Regulation, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

³Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, Hermann von Helmholtz Platz 1, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

the rapid recruitment of leukocytes to wounds [2]. Given the simplicity with which these assays can be carried out in the zebrafish and a limitless and cheap supply of animals, it has been proposed as a useful system for high-throughput small-molecule screens aimed at detecting immunomodulatory activity *in vivo* [3-6] or for genetic screens aimed at identifying key molecular components of the innate immune response [7-9]. The small size of fish larvae offers the added advantage of testing candidate molecules by directly dissolving them in small volumes of fish water; usually dimethyl sulfoxide (DMSO) is added as a solvent to allow penetration of the compounds to all tissues. Previous reports have proposed laser damage directed to the yolk surface of embryos [10] and localized nicks in fin tissue or amputation of the entire tail fin in larvae [3,5,6] to induce inflammation. These treatments are one of the bottlenecks for performing large-scale screens, as the animals have to be manipulated individually prior to distribution into microtiter well plates for phenotypic analysis.

We have been studying the induction of cell death and regeneration in neuromasts of the lateral line system of zebrafish larvae. Neuromasts, small clusters of mechanosensory hair cells enclosed within a compact group of accessory cells, are regularly distributed over the body surface and can be damaged by exposure to physical or chemical insults [11]. We have found that copper sulfate added to the incubation medium rapidly induces cell death in neuromasts [12,13], though they are able to rapidly regenerate and reach full functionality 1 day after the damaging agent is removed [14]. In the present work, we have discovered that damage to neuromasts is followed immediately by migration of cells that express high levels of *matrix metalloproteinase 9* (*mmp9*), a marker of myeloid lineage cell populations [15]. Using transgenic lines that label myeloid leukocytes (neutrophils and/or macrophages) *in vivo*, we observed a specific, extremely rapid and highly reproducible innate immune response to copper-induced neuromast damage. Since the wounds are localized and are elicited chemically, no invasive manipulation of fish is required and the treatment can be applied massively. Exploiting this observation, we developed a quantitative measure for inflammation by counting leukocytes migrating to the lateral line neuromasts in transgenic lines or with immune cell-specific stains upon copper-induced neuromast damage. We further tested the method by using known anti-inflammatory drugs, and we demonstrate detection of their activity as they potently inhibit leukocyte infiltration of the neuromasts. Resolution of the response can also be scored if drugs are added after damage. Furthermore, analysis of fish that are mutant for the *Wiskott-Aldrich syndrome* (*was*) gene [7] exemplifies the power of this approach for recovering

mutations in genes involved in leukocyte migratory behavior. Finally, we show that the procedure can be massively scaled up by automation of distribution of individual larvae in microtiter wells, liquid handling, image acquisition and quantification of the inflammatory response in real time. Thus, we introduce a new method for high-throughput screens aimed at detecting immunomodulatory activity of small molecules. We anticipate that chemically induced inflammation assays (ChIn) will make it possible to achieve different types of high-throughput compound screens as well as genetic screens, focusing on aspects of the wound-induced inflammatory response (initiation and resolution), analyses of various types of infection-induced responses, investigation of tissue regeneration and specific cell subtype migration assays.

Results

Myeloid leukocytes migrate to damaged neuromasts

Zebrafish larvae establish the primary lateral line system by 3 days postfertilization (dpf). Addition of copper sulfate to the water rapidly destroys hair cells of the lateral line system by inducing oxidative stress followed by cell death [12,13]. Among genes induced in larvae by copper exposure, we detected strong stimulation of the *mmp9* gene (VEG, OAP and MLA, unpublished work). When we carried out *in situ* hybridization to detect *mmp9* transcripts in control animals, we detected very low levels of expression in a few cells located within the posterior blood island (PBI) or caudal hematopoietic tissue (CHT), the areas where most myeloid leukocytes reside at this developmental stage. However, the same analysis carried out in copper-exposed larvae showed strong speckled signals in discrete clusters along the flanks of the trunk and tail, a distribution that suggested that immune cells expressing *mmp9* actively migrate toward the damaged neuromasts (Additional file 1).

To visualize the presence of leukocytes of the innate immune system and to follow their behavior *in vivo* after copper treatment, we used fish carrying the myeloperoxidase or lysozyme C promoters driving the expression of GFP or red fluorescent protein in myeloid leukocytes (most likely neutrophils), *BACmpx::GFP* and *lysC::DsRED2*, respectively [5,6]. Both transgenic lines produced identical results in our assays.

We exposed transgenic zebrafish larvae at 56 hours postfertilization (hpf) to 10 μ M CuSO₄ for a period of 2 hours and monitored the behavior of fluorescent leukocytes immediately after beginning the treatment. In control (untreated) fish, most of the immune cells remained in the PBI or CHT (Figures 1a and 1b). In contrast, examination of zebrafish larvae exposed to copper showed a general dispersal of these cells, suggestive of active migration from their initial location. Most striking

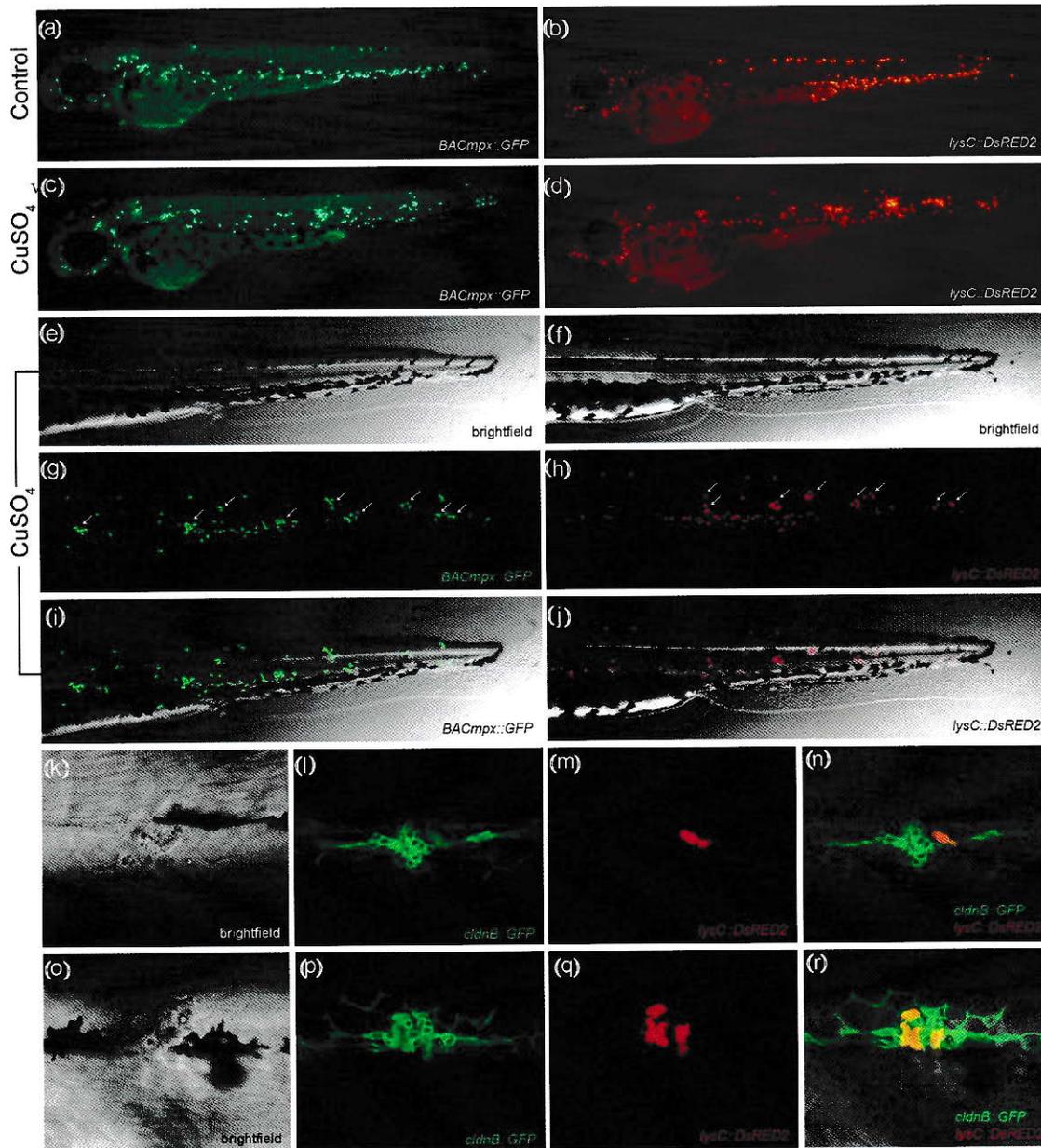


Figure 1 Leukocytes migrate specifically to damaged lateral line neuromasts in zebrafish larvae. **(a-j)** 56-hours postfertilization (56-hpf) *BACmpx::GFP* or *lysC::DsRED2* transgenic zebrafish larvae exhibit green or red fluorescent leukocytes, respectively. **(a and b)** Untreated fish show the normal distribution of labeled cells, mostly localized in the ventral trunk and tail. **(c and d)** In copper-treated siblings, leukocytes become localized preferentially to a few clusters along the horizontal midline of the trunk and tail. **(e-j)** A detailed view of this region in copper-treated animals shows that while many cells disperse throughout the body, other cells congregate in discrete clusters (arrows); no overt tissue damage to the larvae is observed in bright-field images. **(k-r)** A mating cross of *cldnB::GFP* and *lysC::DsRED2* transgenic fish labels neuromasts in green and leukocytes in red. Posterior trunk neuromasts were imaged immediately after adding copper **(k-n)** or 20 minutes after copper treatment **(o-r)** using bright-field red or green fluorescence illumination. Few, if any, leukocytes are seen near neuromasts at the beginning of treatment. **(m and n)** Here a case where a single leukocyte is present is shown. **(q and r)** In contrast, copper-treated fish have numerous red fluorescent leukocytes interspersed within the neuromast cells. Note the extent of damage induced by copper in the neuromast cells (compare Figures 1l and 1p).

was the rapid coalescence of labeled cells to form regularly spaced clusters in the midline of the trunk and tail of treated animals (compare Figures 1a and 1b with Figures 1c and 1d). This cell clustering can be observed for up to 3 hours after removal of copper from the medium (Figures 1e-1j). We next confirmed that migratory immune cells home specifically toward damaged neuromasts. We generated compound transgenic fish by mating the *lysC::DsRed* transgenic zebrafish line, labeling leukocytes in red [6], with the *cldnB::GFP* transgenic zebrafish line, in which neuromast cells are labeled green [16]. In these double-labeled fish, we observed that clustering of leukocytes occurs specifically around neuromasts that have suffered damage (Figures 1k-1r). Whereas in the absence of copper treatment immune cells patrol the area near the neuromasts only occasionally, in treated fish numerous immune cells concentrate in neuromasts and remain in their vicinity for several hours. Similar results have been obtained with red fluorescent or vital dye-labeled neuromasts and GFP-labeled leukocytes (not shown).

To examine the dynamics of the inflammatory process under these conditions, we captured time-lapse images of the trunk and tail of *BACmpx::GFP* fish beginning immediately after the addition of copper (see Additional file 2). The cells began to respond to the damage around 15 minutes after the addition of copper to the medium, and the first labeled cells reached the neuromasts at around 20 minutes. In the presence of copper sulfate, leukocytes remained in the neuromast area, maintaining a circulatory patrolling movement within it for 2-3 hours, after which they began to disperse and no longer concentrated exclusively near neuromasts. Six hours after the removal of copper, treated larvae were indistinguishable from controls, indicating resolution of inflammation.

Neuromasts consist of centrally located hair cells surrounded by mantle cells on the surface and supporting cells at the base, all forming a compact rosette [11]. After the addition of copper, the arrival of macrophages, neutrophils and possibly other immune cells coincided with a progressive disruption of the rosette-like structure (Figures 1k-1r and Additional file 3). This disruption is likely caused by a combination of cell death [12,13] and the invasion of immune cells, which continuously traverse the interstitial space between neuromast cells, separating them from one another.

The two transgenic lines used in this study label myeloid leukocytes, most likely neutrophils. However, up to 48 hpf, the *lysC::DsRED2* line labels early macrophages in addition to neutrophils. To learn whether the cell populations labeled in both lines showed similar dynamics in their response, we used a *lysC::DsRED2/BACmpx::GFP* compound transgenic line. At 48-56 hpf,

most labeled cells expressed both transgenes, but some cells labeled only with DsRED2. However, both double-labeled cells and DsRED2-labeled cells migrated toward the damaged neuromasts (Additional file 4). Thus, it is likely that both neutrophils and macrophages participate in the inflammatory response elicited by copper in neuromasts, and the deciphering of specific roles for either population in real time would require the availability of additional subpopulation-specific transgenic reporter lines.

To determine whether copper-induced damage in other tissues also stimulated an inflammatory response, we exposed *lysC::DsRED2* zebrafish larvae permanently for up to 7 days with 10 μ M CuSO₄. Prolonged exposure resulted in a general dispersal of leukocytes compared to controls and, in addition to lateral line neuromasts, leukocyte infiltration was observed in the gills and nose (Additional file 5). We conclude that waterborne exposure of larvae to copper sulfate causes lesions to superficial tissues followed by specific inflammatory responses at the sites of damage.

Quantification of immune cell infiltration in the lateral line after chemical damage

Taking advantage of our findings, we aimed to develop a simple but robust quantitative method to measure the degree of leukocyte infiltration in damaged neuromasts. Using such a protocol would allow us to reveal the effect of molecules that modulate the inflammatory response elicited by copper exposure, opening the door for chemical or genetic high-throughput inflammation screens. Our first approach (manual quantification) requires only visual inspection of treated and control larvae and can thus be carried out using low-power magnification. It is necessary to have a method for detection of innate immune cells; the optimal way is to use transgenic lines such as *BACmpx::GFP*, *lysC::GFP* or *lysC::DsRED2*, though we have successfully used Sudan Black (Additional file 6) and diaminobenzidine (not shown) staining to label leukocytes histochemically, with identical results in all cases. For quantification, it is not critical to label the neuromasts as the primary lateral line is always localized along the horizontal myoseptum and two or three neuromasts are predictably located above the dorsal aorta, posterior to the cloaca, at the larval stages used (56-72 hpf). Two hours after addition of copper sulfate to the water, immune cells reproducibly and robustly congregate near the neuromasts. Given the highly dynamic nature of the immune cells' behavior, we found it most convenient to fix the larvae at this time to examine all individuals at a similar stage in the response. The GFP or DsRED2 label remains visible for at least 1 day after fixation, allowing sufficient time for quantification of a large sample of larvae. Larvae

were observed under a fluorescence dissecting scope, and we established an arbitrary area of approximately five cell diameters above and below the horizontal myoseptum, which runs from the first somite to the end of the tail (Figure 2a). Fluorescent cells were counted within this area on one side of 15 larvae for each treatment, and averages were calculated. Control fish were either untreated or incubated in DMSO (the solvent used when fish were treated with drugs; see below, in the next section of Results). We first designed an experiment using two concentrations of copper (10 μ M and 50 μ M CuSO₄) that are toxic to neuromast cells after 2 hours of exposure, and one of cadmium chloride (50 μ M CdCl₂), which causes no damage to neuromast cells at that concentration and exposure time [13]. Quantification by two independent observers showed that there was a significant difference in the number of leukocytes localized to the lateral line in copper-treated fish compared to control (untreated or cadmium-exposed) fish (Figure 2b). This experiment provides proof of principle that a quantitative inflammation assay can be carried out using copper-induced damage and leukocyte cell counts in the lateral line. We next carried out a series of experiments to explore variations of the method that would yield improved results. We first determined that the inflammatory effect of copper sulfate is concentration dependent and that significant leukocyte infiltration can be seen beginning at 0.5 μ M CuSO₄ (Figure 2c). Of other metals known to affect the viability of neuromast hair cells, only silver, albeit less effectively, yielded significant infiltration at concentrations comparable to copper. Zinc requires a 25-fold higher concentration to result in a significant effect, while nickel was ineffective at the evaluated dosages (Figure 2d). We had previously determined that these other metals have additional toxic effects and that fish survival is compromised [13]. Therefore, we find that copper sulfate remains the most effective and reproducible damaging agent for neuromasts. Interestingly, neomycin, a potent ototoxic aminoglycoside antibiotic known to ablate hair cells in zebrafish neuromasts [17], generated a significant but modest inflammatory response (Figure 2e). We confirmed that hair cells are eliminated in our neomycin treatments by using a hair cell-specific transgenic line (Additional file 7). Whether this fourfold difference reflects a specific property of metal vs. antibiotic-induced damage or whether neomycin somehow affects immune cell migration remains to be determined.

As treatment with 10 μ M copper for up to 2 hours does not affect the viability of the larvae, we used this concentration of metal as the inflammation-inducing dose for all subsequent experiments. To determine the optimal developmental stage at which to carry out the inflammation assays and the times at which to obtain

the best response after treatment, we exposed fish of different ages (56 hpf to 128 hpf) and performed immune cell counts at the myoseptum between 20 and 120 minutes after the addition of copper. All ages tested showed comparable response curves, whereas significant infiltration of the lateral line by leukocytes was always detected by 20-40 minutes after initiating copper treatment (Figure 2f). However, fish at ages from 56 hpf to 80 hpf yielded slightly more robust responses. We thus established our basic protocol using 56-hpf larvae that spontaneously hatched, incubating the larvae for 40 minutes in 10 μ M copper, followed by fixation and evaluation of leukocyte infiltration into the myoseptum (see Methods). We suggest a 40-minute incubation with copper only as a matter of convenience, as there is no significant difference from a 2-hour long incubation. We have called this method the chemically induced inflammation, or ChIn, assay.

Effect of anti-inflammatory drugs and inhibition of reactive oxygen species

Previous reports have shown that well-established anti-inflammatory drugs behave as predicted in zebrafish inflammation assays that rely on physical wounding [3,18,19]. We wanted to test whether the ChIn assay is also able to detect the activity of these and other molecules that are known to act at different points during inflammation. Selected compounds (see Table 1) were added to fish medium containing 1% DMSO 30 minutes to 1 hour prior to the addition of copper, allowing for effective drug penetration of larval tissues. Of the 11 drugs tested using the manual ChIn assay, 10 of them exhibited statistically significant inhibition of leukocyte infiltration at varying concentrations ranging from 0.5 μ M to 100 μ M (Table 1). For a large-scale, small-molecule screen, we would thus recommend use of a two-concentration standard assay (10 μ M/100 μ M). For the panel of compounds tested in this study, such an experimental setup would identify more than 90% of effective compounds. Only hydrocortisone required a higher concentration (300 μ M) to yield significant inhibition of inflammation. A quantitative analysis for a subset of the drugs tested in the manual ChIn assay is shown in Figure 3.

To further assess the benefit of the ChIn assay for detecting novel mechanisms guiding inflammation, we were curious whether we would be able to identify the recently described role of reactive oxygen species (ROS) in this process. Formation of a gradient of H₂O₂ has been shown to be required for leukocyte recruitment toward wounds inflicted by tailfin transection in zebrafish [2]. To evaluate whether copper-induced wounding also involves ROS signaling and whether such a role can be detected using the ChIn assay, we tested the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI) using the

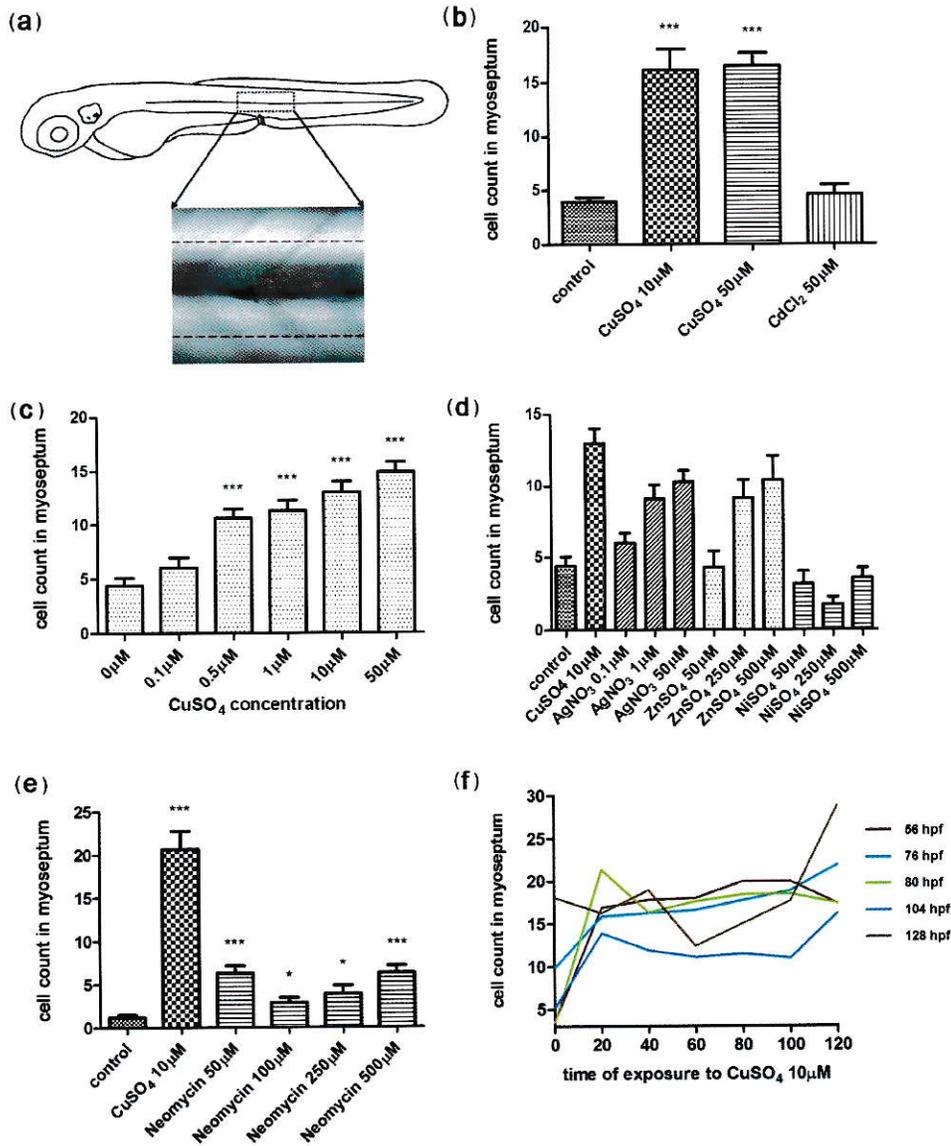


Figure 2 Quantification of infiltrating leukocytes in the lateral line after diverse treatments: the chemically induced inflammation (ChIn) assay. (a) Schematic view of a 3 days postfertilization (dpf) larva. The boxed area corresponds to the horizontal myoseptum (line). An area of approximately 10 cell diameters is delimited around the myoseptum (dotted red lines) and corresponds to the area where leukocytes were counted in all manual quantification experiments. (b) Significant induction of leukocyte recruitment to the lateral line by copper treatment. The graph shows average leukocyte numbers in the lateral line in negative controls (untreated fish or cadmium chloride-treated fish) and in copper-treated fish. (c) The effect of copper on leukocyte recruitment to the lateral line is concentration dependent. (d) Effectiveness of other metals in the ChIn assay. (e) Neomycin, at concentrations that eliminate hair cells, also induces leukocyte recruitment, but less effectively than copper. (f) Larvae of different ages, from 56 to 128 hpf, were exposed to 10 µM CuSO₄ and were monitored for leukocytes present at the myoseptum every 20 minutes thereafter until 120 minutes. Fish at all stages analyzed showed similar behaviors and exhibited increased presence of leukocytes at the lateral line by 20 minutes after initiating exposure to copper. For all experiments, at least 15 larvae were used for each condition. ***P < 0.001.

Table 1 Detection of anti-inflammatory activity using the ChIn assay^a

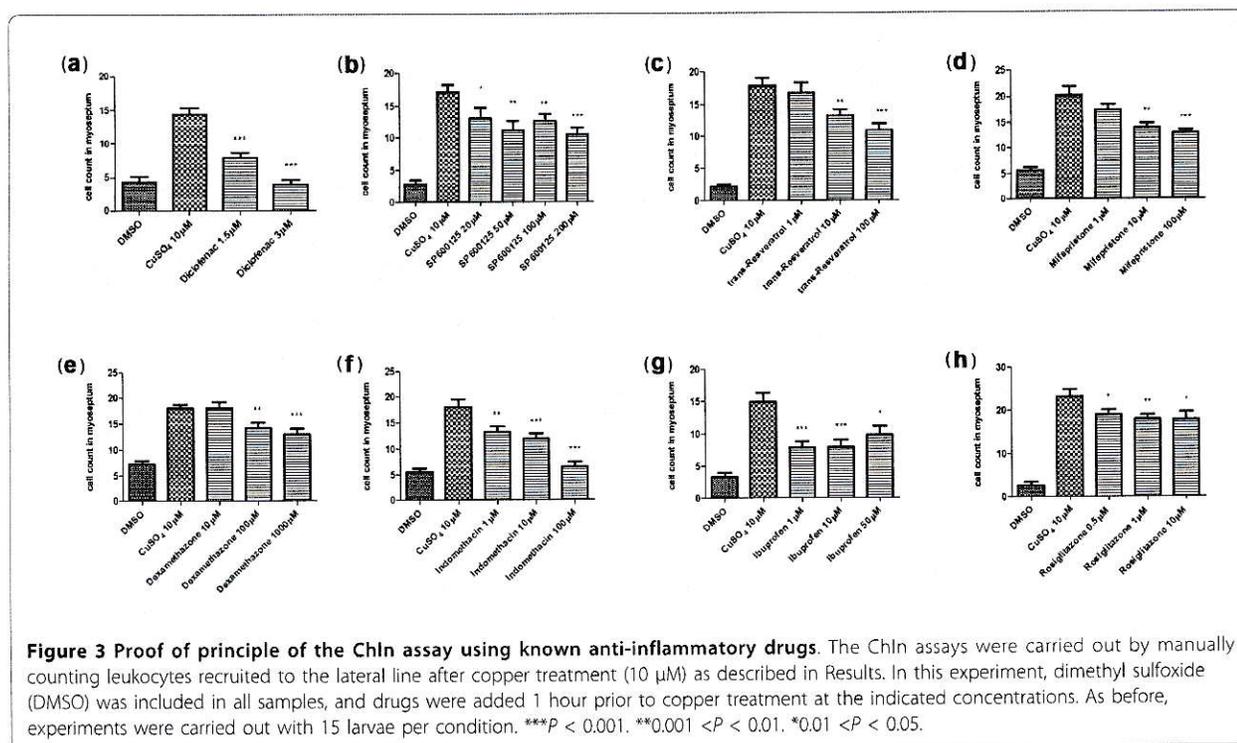
Compound	Mode of action	Concentration (μM)	Significant effect	Reference
Ibuprofen	COX inhibitor	1	***	[38]
		10	***	
		50	*	
Diclofenac	COX inhibitor	1.5	***	[38,39]
		3	***	
SP600125	JNK inhibitor	20	*	[40]
		50	**	
		100	**	
		200	***	
<i>Trans</i> -resveratrol	COX-1 inhibitor	1	-	[41]
		10	**	
		100	***	
Mifepristone (RU486)	Progesterone and GR antagonist	1	-	[42]
		10	**	
		100	***	
Dexamethasone	Steroidal nitric oxide synthase inhibitor	10	-	[43]
		100	**	
		1,000	***	
Indomethacin	COX inhibitor	1	**	[39]
		10	***	
		100	***	
Rosiglitazone	PPAR-γ agonist	0.5	*	[44]
		1	**	
		10	*	
Aspirin	COX inhibitor	10	-	[39]
		20	**	
Hydrocortisone	Steroidal GR agonist	1	-	[45]
		10	-	
		100	-	
		300	*	
Sulindac	NS COX-1 inhibitor	1	**	[46]
		10	***	
		50	***	
		100	***	

^aSelected drugs were added to the incubation medium 1 hour prior to addition of copper and were tested at the indicated concentrations for inhibition of leukocyte migration using *BACmpx::GFP* larvae in chemically induced inflammation assays (ChIn) (10 μM CuSO₄ for 40 minutes). Up to four concentrations were chosen to provide an overview of drug activity in the ChIn assay. We aimed at identifying a concentration yielding significant results with $P < 0.001$. In some instances, this was not possible (rosiglitazone, aspirin, hydrocortisone) as higher concentrations were lethal or showed reduced significance compared to lower concentrations. All drugs were used in medium containing 1% dimethyl sulfoxide, as were control fish. Asterisks indicate significant leukocyte migration inhibition, *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$. Minus sign indicates no significant difference. GR, glucocorticoid receptor; NS, nonsteroidal; COX, cyclooxygenase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; PPAR-γ, peroxisome proliferator-activated receptor-γ.

ChIn assay (Figure 4a). Indeed, pretreatment of larvae with DPI significantly reduced the number of leukocytes infiltrating the lateral line, confirming that ROS gradient formation is also critical for leukocytes to respond to copper-mediated lesions and the potential of the ChIn assay to link unexpected molecules to leukocyte infiltration.

As innate immune leukocytes abandon the wounded neuromast a few hours after the response, we next wished to learn whether it would be possible to also

detect molecules that affected the resolution phase. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (such as diclofenac and ibuprofen) act as nonselective inhibitors of the enzyme cyclooxygenase (COX), inhibiting both the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 isoenzymes (COX1 and COX2, respectively). COX enzymes are proinflammatory during the early phase of inflammation, but aid resolution at the later phase by generating an alternative set of prostaglandins [20]. Resolution of inflammation was analyzed by carrying out copper



damage for 40 minutes as before, adding the drugs immediately after copper removal and scoring for leukocyte infiltration 3 hours after that. Hence, if inflammatory resolution was impaired, we would observe an increase in leukocyte numbers at neuromasts compared to controls. When diclofenac and ibuprofen were added after copper treatment, the number of infiltrating leukocytes after 3 hours was significantly different from control fish, indicating that inflammation was not resolved in these cases (Additional file 8). The number of leukocytes in drug-treated fish was, in fact, almost identical to the number observed immediately after copper removal, suggesting that drug-exposed cells were blocked from exiting the wounded area.

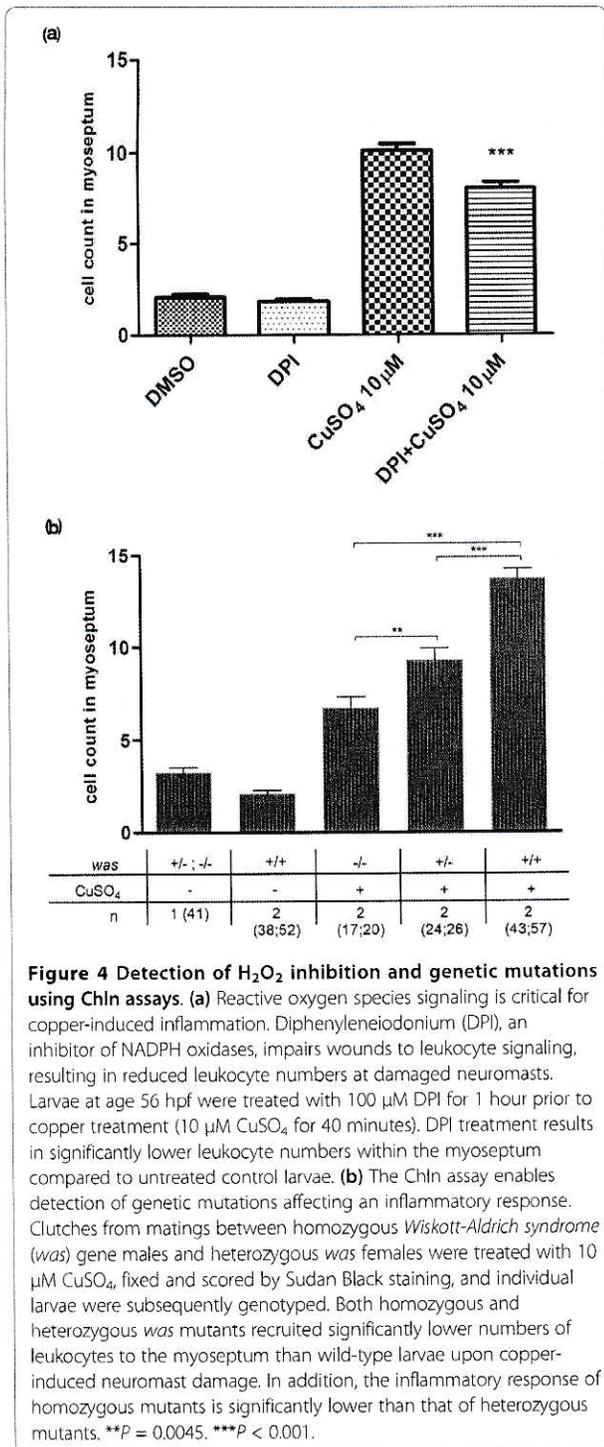
The ChIn assay can detect mutations that affect the inflammatory response

To explore the full versatility of the ChIn assay, we investigated its potential for detecting genetic mutations within critical pathways of an innate immune response. To this end, we used the zebrafish *was* mutant [7]. The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) family of proteins is involved in transduction of signals from receptors on the cell surface to the actin cytoskeleton. WAS protein deficiency underlies a severe human condition characterized by recurrent infections and autoimmunity caused at least in part by perturbed leukocyte migration toward chemotactic cues [21,22]. We exposed larvae obtained

from a cross between homozygous *was* mutant male fish and heterozygous female fish to copper and carried out a ChIn assay; as controls, wild-type fish were used. The sensitivity of the ChIn assay allowed a clear identification of larvae that were either homozygous or heterozygous for the mutation on the basis of infiltration of leukocytes toward neuromasts after copper treatment (Figure 4b). Subsequent genotyping further confirmed our correct phenotypic identification of homozygous mutants from larvae heterozygous for the mutation (not shown). As shown previously, *was* gene dosing correlates with the degree of leukocyte migratory impairment, as heterozygotes show an intermediate effect compared to homozygous mutants and wild-type larvae [7]. The ChIn assay may thus also be used for genetic screens to identify mutations in genes critical for an inflammatory response.

Automated detection of anti-inflammatory activity

While manual quantification of migrating leukocytes using the ChIn assay is an improvement over other methods for analysis of selected molecules or for recovering mutations, it is still unrealistic as a method for high-throughput screening of hundreds to thousands of candidate chemicals or mutants with reasonable efforts and within reasonable time. Therefore, we sought to transform the ChIn assay into a scalable method that could be used in large-format screens. We developed a



custom software script enabling us to map fluorescent expression domains in zebrafish larvae and combined it with automated microscopy. To put the automated system into operation, we used compound transgenic *cldnB::GFP/lysC::DsRED2* larvae, as green fluorescent

neuromasts facilitated computer-aided automatic examination of the area surrounding the damaged tissue for the presence of red fluorescent leukocytes (Figures 5a-5d and Additional file 3). The assay was carried out essentially as described previously, except that the larvae were distributed in 384-well plates and drugs or copper were added directly to the individual wells using multi-channel pipettes. Larvae were preincubated with drugs for 30 minutes and then exposed to copper treatment. Forty minutes after addition of 10 μM CuSO₄, plates were placed under a fluorescence microscope equipped with a ×2.5 lens and three channels per well were automatically captured (bright-field microscope, GFP and DsRED2). Images were then automatically processed using our custom script to first identify the neuromasts (GFP) and subsequently to quantify infiltrated leukocytes in their surrounding area by fluorescence intensity (DsRED2). To validate the automation of the ChIn assay, we first performed a control experiment testing different concentrations of CuSO₄ and CdCl₂ (Figure 5e). As with manual ChIn, the results of the automated assay revealed a significant increase of leukocytes in the vicinity of the neuromasts upon copper treatment as compared to control or cadmium treatment (compare Figures 2b and 5e). Furthermore, automated ChIn evaluation of a selected panel of drugs yielded results identical to those seen using the manual assay. The immunosuppressive effect for all compounds tested was detected with sensitivity comparable, or superior, to manual screening (compare Figures 5f and 5g). These results show that the ChIn assay provides sufficient robustness to be applied to automated detection and evaluation and will thus allow further upscaling by, for example, removing any remaining manual steps, including the introduction of robotic liquid handling.

Discussion

We describe a new method, the ChIn assay, which will be of value for the initial detection of lead compounds exhibiting immunomodulatory activity as well as genes with roles in the different stages of the inflammatory response. In zebrafish, myeloid leukocytes develop during the first day of life, while molecular markers and cellular components of adaptive immunity arise well after the third day [23-25]. Thus, assays carried out in early larvae allow specific analysis of the innate immune system. These assays are facilitated by the transparency of the larvae and the availability of fluorescent tags in specific immune cell types in transgenic fish. However, nontransgenic zebrafish can also be used because histochemical stains (i.e., Sudan Black) are equally useful for ChIn assays.

The inflammatory response in this species has been well characterized [2,6,7,10,26]. However, studies carried

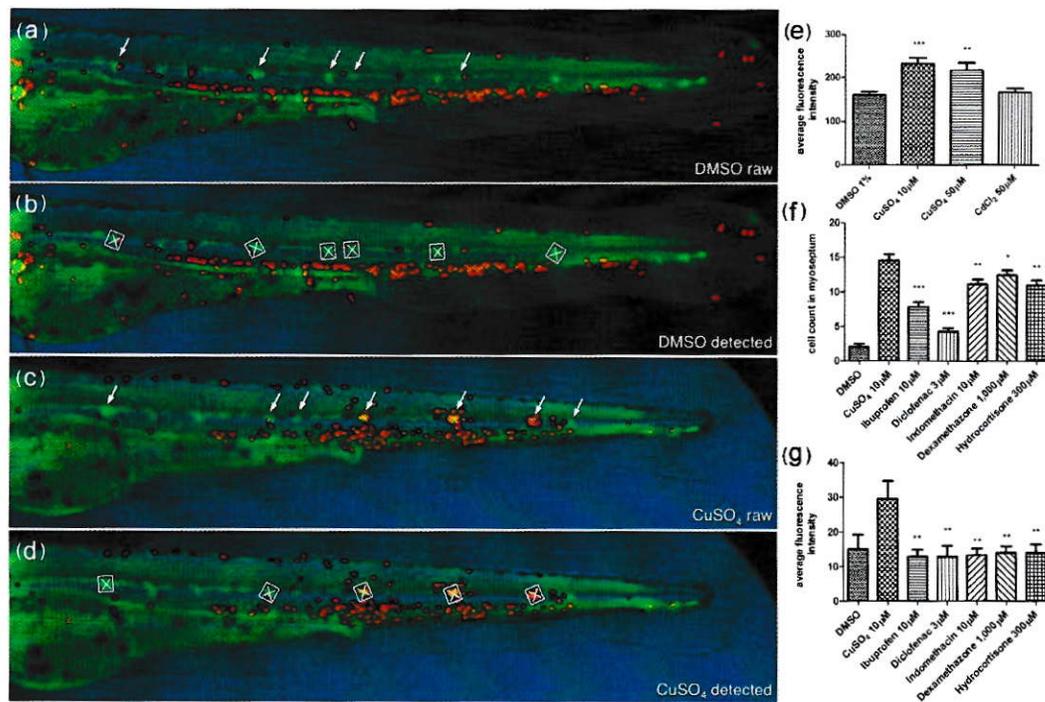


Figure 5 Automated ChIn assay. (a-d) Image acquisition method using compound transgenic larvae *cdnb::GFP* and *lysC::DsRED2*. Images show control (DMSO) (a and b) and treated (CuSO₄) (c and d) fish revealing neuromasts (green, arrows) and leukocytes (red). Shown are the raw images (a and c) and the number and identity of the neuromasts that were automatically detected by the software (b and d) (white squares). The image analysis software determines the average red fluorescence intensity per square (neuromast area) and calculates the data averaged for all squares detected within one larva. Note that the program is able to detect most, but not all, of the visible neuromasts. The variable neuromast detection success is compensated by using more larvae than in the manual method: 24 per plate, in triplicate, averaging around 50 data-producing larvae per condition. (e) A control experiment using the automated ChIn assay. Untreated or metal-exposed double-transgenic fish were imaged, and red fluorescence was averaged from three experiments. Results are comparable to manual ChIn assays. (f and g) Comparison of ChIn assay results between the manual quantification method (f) and automated detection (g) of anti-inflammatory drug activity.

out to date have relied on physical damage [9,10,27] or on a genetically induced chronic inflammatory condition [19] to observe the behavior of myeloid leukocytes. Our approach takes advantage of noninvasive tissue damage and induction of an acute inflammatory response in specific areas of the larva. The principal advantages of this method are its robustness and scalability: Physical manipulation of individual larvae is unnecessary, thus avoiding the introduction of variability and limitations to the number of individuals that can be screened. Using the ChIn assay, larvae are distributed singly into microtiter well plates, but can then be treated simultaneously with automated liquid-handling devices for induction of chemical damage, a procedure that is highly reproducible between individuals. The inflammatory reaction occurs within minutes. Thus, live treated larvae should be analyzed shortly after the addition of copper to the medium. Analysis of live transgenic animals allows for continuous or repeated monitoring of the immune cells' behavior, a useful condition for

examining sequential arrival of different cell types or resolution of inflammation, for example. Alternatively, larvae can be fixed at the desired time point after treatment, allowing analysis of large sets of fish subjected to an identical treatment. In the latter case, the use of transgenic zebrafish lines is optional as it is possible to label leukocytes using histochemical stains, antibodies or *in situ* hybridization (Additional files 1 and 6). Nonetheless, fluorescent lines greatly facilitate the analysis and, in our hands, were essential for automation. We combined transgenic backgrounds that label the neuromasts in one color and immune cells in another (Figure 1r), which made the image recognition software highly efficient in selecting the area to analyze.

We applied several known anti-inflammatory drugs to test the ChIn assay. The selected molecules affect diverse pathways in inflammation such as the COX, c-Jun N-terminal kinase (JNK) or peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ responses. In addition, we confirmed that ROS gradient formation is

critical for leukocyte recruitment upon copper-induced inflammation as chemical inhibition of NADPH oxidase significantly decreased the leukocyte recruitment toward neuromasts. Copper-mediated inflammation thus mechanistically recapitulates classical wounding assays without the need for manual manipulation of larvae. We caution that a primary large-scale, small-molecule screen carried out using the ChIn assay would not distinguish (1) a specific anti-inflammatory effect, (2) an inhibitory effect on general cell motility and (3) protection of hair cells from undergoing cell death, as all of these events would result in the same net effect: Recruitment of leukocytes to neuromasts would be altered. Candidate leads need to be subjected to secondary screens to distinguish the specific aspect of immune cell behavior that is affected.

Using the ChIn assay, we have obtained comparable results with two transgenic lines and two histochemical stains (Sudan Black and 3,3'-diaminobenzidine, or DAB). New tools currently under development that will allow the *in vivo* identification of distinct subpopulations of immune cells will further enhance the benefits of the ChIn assay in the near future. For example, preliminary results using *lck::GFP* transgenic larvae, a lymphocyte reporter line, showed no behavioral change in these cells after copper exposure, as expected given the role of these cells in adaptive immunity (CAD and MLA, unpublished work).

Other types of screens feasible with the ChIn assay

A major application of the ChIn assay will be the identification of immunomodulatory activities of small molecules. However, we foresee additional applications using this strategy. First, mutant screens aimed at detecting genetic components of the inflammatory response will be facilitated with this approach. The high-throughput advantage of the ChIn assay can be used for efficiently screening mutagenized fish, as well as for gain of function screens or antisense screens using morpholino oligonucleotides. Genetic mutations or knockdowns can be identified, given that their phenotypic consequence regarding leukocyte behavior during inflammation lies within the sensitivity threshold of the ChIn assay. Here we provide proof of principle for the identification of mutations using *was* mutant zebrafish as an example. The *was* mutant larvae exhibited a significant reduction of leukocytes infiltrating the lateral line neuromasts upon copper treatment. On top of identifying homozygous mutants, the level of sensitivity of the ChIn assay even allowed for discrimination between heterozygous and homozygous larvae.

Second, the localized damage induced in the superficial neuromasts could be used as a model for inflammation mediated by infection. Most models of bacterial

infection, for example, require injection of the pathogens to study the immune response [[28,29]; reviewed in [8]]. Larvae in which neuromasts have been damaged may be susceptible to infection through the sites of injury with waterborne pathogens, or likewise stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as lipopolysaccharides or viral nucleic acids added to the water. It may even be possible to distinguish the acute inflammatory response induced by wounding from that mediated by infectious agents using the ChIn assay in different transgenic backgrounds.

The highly specific migration of leukocytes to the neuromasts offers an excellent opportunity for a detailed examination of the molecular players involved in directed cell migration and immune cell homing. In this case, immune cells can be imaged *in vivo* before and during the generation of the attractive signal, allowing the monitoring of cell behavior during the key transition between random walk and chemotaxis. Likewise, the path followed by these cells can be observed in living tissue, as well as in the diffusion of signals through interstitial space, for example, using hydrogen peroxide reporters [2]. As opposed to tail wounding or sectioning, damage to the neuromast generates a focal point of chemoattractants with radial diffusion, which could provide a more adequate scenario for analysis of leukocyte homing.

Our laboratory is particularly interested in the regeneration of lateral line hair cells, a model for sensory regeneration in general. The contribution of the immune system to regeneration has been well documented, as has the potential impediment to regeneration caused by prolonged tissue inflammation and fibrosis. We believe that the ChIn assay can be used to investigate the molecular mechanisms of immune system involvement in regeneration. Whether the arrival of immune cells to damaged neuromasts promotes or inhibits regeneration of sensory hair cells is currently under study. Interestingly, time-lapse observation of a neuromast during copper-induced damage shows that patrolling neutrophils and macrophages (and possibly other cell types) provoke disorganization of the surviving cells, separating them from one another (Additional file 3). As migrating leukocytes contain and release matrix-degrading enzymes, such as Mmp9, that diminish adherence and tissue integrity, they could assist in the reconstruction of the damaged organ by facilitating the rearrangement, proliferation and differentiation of regenerating cells. Obviously, hair cell death or the regeneration process itself could be the subject of high-throughput screens (genetic or chemical), as has been done previously with damage induced in hair cells by neomycin [30-32]. Finally, molecules that protect neuromast hair cells against damage by copper would preclude immune cell migration to these organs. Pretreatment of fish with antioxidants protects hair cells

from the effects of waterborne copper [12], and thus this type of activity could also be uncovered in a small-molecule screen using the ChIn assay.

Conclusions

In conclusion, the ChIn assay represents a new tool that will contribute to the understanding of the pathways that lead to homing and migration of innate immune cells, as well as providing a discovery model for molecules that may yield new leads to therapeutic treatment of immune disorders.

Methods

Animals

Zebrafish were maintained and raised in our facility under recommended conditions [33]. The following strains of fish were used in this study: AB (wild type), *casper* [34], *was* [7], *cldnb::GFP* [16], *BACmpx::GFP* [5], *Brn3c::mGFP* [35], *Tg(lyz:EGFP)nz117* and *Tg(lyz:DsRED2)nz50*, herein named *lysC::GFP* and *lysC::DsRED2* [6]. All embryos were collected by natural spawning, staged according to Kimmel *et al.* [36] and raised at 28°C in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, and 0.1% methylene blue, equilibrated to pH 7.0) in Petri dishes, as described previously [37]. Embryonic and larval ages are expressed in hours postfertilization (hpf). All animals subjected to experimentation were anesthetized in MS-222 (tricaine; A5040; Sigma, Saint Louis, MO, USA), and procedures complied with the guidelines of the Animal Ethics Committees of the University of Chile and Karlsruhe Institute of Technology.

Chemicals

A 10 mM stock solution of CuSO₄ (copper II sulfate pentahydrate, catalog no. 102780; Merck, Darmstadt, Germany) was prepared daily in bidistilled water in a glass beaker until dissolved completely. Likewise, CdCl₂ (CB236; Matheson, Coleman & Bell, Cincinnati, OH, USA) was prepared at a stock concentration of 10 mM. Additional chemicals were ZnSO₄ (catalog no. ZI-1705; Winkler S.A., Santiago, Chile), NiSO₄ (72280; Sigma) and AgNO₃ (101512; Merck), neomycin (N1876; Sigma), 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide, or DiOC₆(3), was purchased from Interchim, Montluçon, France (FP-46764A) or AnaSpec, Fremont, CA, USA (catalog number 84715), DPI (D2926; Sigma), DMSO (317275; Merck), paraformaldehyde (catalog no. 1.04005.1000; Merck), Sudan Black (380B; Sigma), and Tween 20 (P5927; Sigma).

The following anti-inflammatory drugs were tested: from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA), ibuprofen (70280), diclofenac (70680), aspirin (70260), indomethacin (70270), *trans*-resveratrol (70675), rosiglitazone (71740), mifepristone (10006317), sulindac

(10004386) and SP600125 (10010466). From Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): dexamethazone (D1756) and hydrocortisone (H4001).

Neuromast damage protocol and the basic ChIn assay (manual quantification)

Zebrafish larvae of the *BACmpx::GFP* and *lysC::DsRED2* strains were grown in E3 medium in groups of 40-50 larvae per 10-cm Petri dish until 56 hpf. Only those larvae that spontaneously hatched were used for the assays as artificial enzymatic dechoriation often damages neuromasts, causing spontaneous inflammation. Any fish that appeared developmentally delayed or otherwise abnormal were also excluded from further analysis.

Selected larvae were transferred to six-well plates (M8562; Sigma) in a volume of 6 ml of E3 solution lacking methylene blue, and 15 larvae were added per well. Stock solutions of CuSO₄ were added directly to the wells, and incubation was carried out for 40 minutes at 28°C. Larvae were then fixed by transferring them to 1.5-ml microfuge tubes and replacing the E3 medium with 4% paraformaldehyde prepared in phosphate-buffered saline (PBS) and incubating for 1 hour at room temperature. During fixation and subsequent handling, the tubes were kept in the dark to avoid bleaching or fading of the fluorescent protein signal. After fixation, larvae were washed three times for 5 minutes each in PBS-Tween20 with gentle agitation. Examination of fluorescent cells and counting was carried out within the next 48 hours after fixation using a Leica (Wetzlar, Germany) MZ-12 fluorescent stereoscope. Labeled cells were counted under fluorescent illumination within 10 cell diameters of the horizontal myoseptum between the first somite and the end of the tail (see Figure 2) on one side of each larva. All experiments were carried out with a minimum of 15 larvae for each condition, and counts were carried out by two observers. For neomycin treatments, *BACmpx::GFP* fish were incubated in the indicated concentration of antibiotic for 1 hour, and cell counts were done as before. In these experiments, we used 96-hpf fish, as neomycin kills only mature hair cells in lateral line neuromasts. We confirmed cell death in these fish by using hair cell-specific markers.

For Sudan Black staining, we used fish of the *casper* mutant strain [34], which lack pigmentation in the body. Larvae at 56 hpf were incubated as before (no metal and 10 mM CuSO₄), fixed, washed and incubated for 20 minutes in 0.5 ml of Sudan Black staining reagent in batches of 30 larvae. Larvae were then washed three times in 70% ethanol at room temperature with mild rocking. Labeled cells were counted as before under bright-field illumination under a dissecting stereoscope. The *was* mutant fish were kept in E3 supplemented with propylthiouracil (from 24 hpf until fixation) to

suppress pigmentation. The *was*^{+/-} fish were mated with *was*^{-/-} fish. Entire clutches were scored prior to genotyping, which was carried out as described previously [7]. AB zebrafish were used as wild-type controls.

Drug assays

All drugs were prepared according to the manufacturer's instructions at a stock concentration of 10 mM by dissolving in 100% DMSO, which was previously purged by gaseous nitrogen for 2 minutes. Drugs were stored at -20°C until use and were diluted immediately prior to being added to larvae medium.

Drugs were added to the required concentration into the wells containing the experimental larvae in E3 containing 1% DMSO. Positive and negative control larvae were incubated only with 1% DMSO. Incubation with drugs was done for 1 hour prior to addition of CuSO₄, which was added directly to the wells containing the experimental and positive control larvae. Incubation after copper addition continued for another 40 minutes before fixation in 4% paraformaldehyde for 1 hour at ambient temperature in the dark. Counting of leukocytes was carried out as before.

Statistical treatment

Data are presented as mean values ± SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The probability level for statistical significance was $P < 0.05$. All statistics regarding leukocyte migration were evaluated with unpaired *t*-tests with Welch's correction.

Image processing

For imaging, larvae were anesthetized and mounted in 1.5% low melting point agarose (peqGOLD 35-2099; PEQ-LAB Biotechnologie, Erlangen, Germany) dissolved in E3. Photographs were taken with a Leica DFC 300-FX camera and Leica SPE confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and processed with Adobe PhotoShop (San José, CA, USA), Zeiss Axiovision (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany) and Image J (version 4.2, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) software. For time lapse imaging, we used a Zeiss Axiovert 200 M microscope equipped with a ×20 lens objective and an Axiocam camera (Additional file 2) or a Leica SPE confocal microscope using a ×40 lens objective (Additional file 3). As described in Additional file 2 larvae were incubated in a 1:3,000 dilution of DiOC₆(3) stock solution (1 mg/ml) in E3 and were then washed three times with E3 for 5 minutes. Larvae were embedded in 1.5% low melting point agarose dissolved in E3 containing 50 μM CuSO₄. Images were captured every 90 seconds for a total of 150 minutes. As described in Additional file 3 compound transgenic fish (*clnB::GFP*, *lysC::DsRED2*) were treated with 50 μM

CuSO₄ for 5 minutes and then mounted in 1.5% low melting point agarose dissolved in E3 containing 50 μM CuSO₄. Images were captured every 60 seconds for a total of 100 minutes.

Automated Chln assay

Individual anesthetized larvae were manually placed in single wells of a 384-well plate in embryo buffer. Subsequently, compound stock solution in DMSO was transferred from a compound source plate to the assay plate containing embryo buffer (E3 + 1% DMSO + 0.02% MS222) and larvae using a multichannel pipette. The assay plate containing larvae and compound was sealed and incubated for 30 minutes at 28°C. Following compound incubation, CuSO₄ solution (0.3 mM) was added to the assay plate, resulting in a final concentration of 10 μM copper sulfate. Assay plates were then incubated for another 40 minutes at 28°C. This procedure yielded a total volume of 120 μl per well and resulted in the respective final compound screening concentrations for this assay (10 μM ibuprofen, 3 μM diclofenac, 10 μM indomethacin, 1 mM dexamethazone, 300 μM hydrocortisone). A volume of 120 μl was empirically identified as the optimal volume for our automated imaging procedure. To achieve an assay sensitivity comparable to manual analysis, we also defined the minimum number of individual larvae analyzed per condition to be 30. In practice, 24 embryos for one condition were imaged per 384-well plate, but experiments were repeated at least in triplicate such that, on average, 50 larvae were analyzed per condition (see below).

Automatic imaging was performed on Olympus Scan^R high-content screening microscope setups (Olympus Biosystems, Munich, Germany) equipped with a ×2.5 lens objective (plan-apochromatic), an Olympus Biosystems DB-1 digital camera (1,300 × 1,024 pixels), filter cubes for GFP excitation filter, 460-480 nm; emission filter, 495-540 nm; dichromatic mirror, 485 nm) and cyanine 3 (Cy3) (excitation filter, 535-555 nm; emission filter, 570-625 nm; dichromatic mirror, 565 nm), and an ultrastable light source MT-20 xenon lamp. Camera image integration times were fixed (20-ms bright-field microscope, 400-ms GFP, 150-ms Cy3). An object detection autofocus algorithm detected the central focal plane of the first-well larva and was applied for the rest of the plate. Image processing was done using the LabView Vision AI rapid prototyping tool (National Instruments, Munich, Germany). Data management, red-green-blue (or RGB) overlay gallery generation and result display were performed using self-made LabView software modules. These scripts enable the detection of GFP-labeled neuromasts on an extended focus projection of five optical sections (two in each direction from the central focal plane) and define

an empirically established surrounding area (see Figure 4) in the GFP channel. Subsequently, the inflammatory response is quantified by the detection of DsRED2-labeled leukocytes within the area surrounding the neuromasts in the red channel. Quantification is based on the average relative fluorescence intensity of leukocytes within this area. For proper image processing, the larvae ideally have to be oriented in a lateral position. However, our image analysis scripts allowed a certain degree of freedom with regard to this requirement. Our procedures yielded more than 70% of larvae positioned in a way that allowed automated image processing without the need for manual orientation of the larvae. However, all plates were manually checked, and larvae in unfavorable positions were corrected. All modules are available on request from the authors.

Additional material

Additional file 1: Supplementary Figure 1. Induction of matrix metalloproteinase 9 (*mmp9*) expression by copper treatment in zebrafish larvae. *In situ* hybridization to detect expression of *mmp9* was carried out in control (a and c) and sibling fish treated with copper sulfate (b and d). (a and b) Induction of *mmp9* expression after treating 2-day-old fish with 10 μM CuSO_4 for 40 minutes. While control fish have few detectable cells labeled with probe, clusters of highly labeled cells are seen in a characteristic pattern along the flanks of the treated animals. The inset shows a closeup image of one of these clusters. (c and d) *mmp9* induction by treatment of 3-day-old fish with 100 μM CuSO_4 for 6 hours and fixed immediately thereafter. Note that clustering of labeled cells at discrete positions along the midline is also apparent after the more severe treatment.

Additional file 2: Supplementary Movie 1. Migration of leukocytes toward damaged neuromasts. Transgenic *BACmpx::GFP* larvae were stained with 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DIOC₆) to reveal neuromasts (red arrows; individual labeled cells on the skin are chemosensory cells). In the movie, the trunk and part of the tail are shown anterior to the left. The images are displayed without pseudocoloring, given that DIOC₆ is visible in the green fluorescent protein (GFP) fluorescence channel. After adding 50 μM CuSO_4 to the medium, fish were mounted and immediately imaged for 2 hours to observe the behavior of leukocytes. Two GFP-labeled cells have been colored red to follow their trajectories toward the nearest neuromast. A wavelike contraction of the neuromast can be seen near the beginning of the sequence. Note the large number of leukocytes that arrive at the posterior-most neuromast after copper damage. Original magnification, $\times 20$.

Additional file 3: Supplementary Movie 2. Leukocytes patrol among neuromast cells after copper induced damage. Description: Compound *cidnB::GFP*, *lysC::DsRED2* transgenic fish that have green-labeled neuromasts and red-labeled leukocytes were treated with 50 μM CuSO_4 and immediately mounted for imaging for 1 hour under a confocal microscope. Images were taken in both channels and in bright-field illumination every 60 seconds in three z-planes for 1 hour and were then combined for every time point to produce the movie. Note the progressive disorganization of the neuromast cells, which loses its rosette structure while cells become detached from one another and leukocytes actively migrate throughout the organ. Original magnification, $\times 40$.

Additional file 4: Supplementary Figure 2. Neutrophils and macrophages behave similarly in response to copper exposure. Compound *BACmpx::GFP/lysC::DsRED2* transgenic fish were treated with 10 μM copper sulphate, and the area surrounding a neuromast was imaged 20 minutes after initiation of exposure. Detection of cells was carried out in the GFP channel (a) and the red (DsRED2) channel (b),

and both images were merged (c). Both neutrophils (yellow cells in (c)) and macrophages (red cells in (c)) can be observed to migrate to damaged neuromasts.

Additional file 5: Supplementary Figure 3. Behavior of leukocytes after long-term copper exposure in zebrafish larvae. At 3 days postfertilization (dpf), transgenic *lysC::DsRED2* fish were left untreated (a, c, e, and g) or exposed permanently thereafter to 10 μM CuSO_4 (b, d, f, h, and i-k) and were imaged daily until 7 dpf (times in the right-hand column are expressed in hours posttreatment, hpt). (a-h) Lateral views of entire larvae. Note the general dispersal of leukocytes in treated vs. control fish simultaneous with accumulation in different anterior regions, especially the branchial arches of the animal beginning 1 day after beginning treatment. (i-k) Closeups of specific areas at 72 hpt. (i) Ventral view of branchial arches. (j) Lateral view of head; arrow indicates olfactory pit area. Closeup view of the area surrounding a neuromast. Note that fish exposed for long periods to copper sulfate suffer developmental delays.

Additional file 6: Supplementary Figure 4. Chemically induced inflammation assay (ChIn) using Sudan Black. (a and b) Bright-field images of untreated (a) and 10 μM CuSO_4 -treated (b) 56-hpf *casper* larvae stained with Sudan Black to reveal leukocytes. Note the congregation of labeled cells at the posterior lateral line neuromasts (arrows). (c) Quantification of leukocyte migration (detected by Sudan Black staining) to the lateral line in untreated and metal-exposed larvae. The result is equivalent to that obtained with *BACmpx::GFP* or *lysC::DsRED2* transgenic larvae.

Additional file 7: Supplementary Figure 5. Neomycin ablates hair cells but fails to induce localization of leukocytes to the horizontal myoseptum. (a and c) Transgenic *Brn3c::mGFP* larvae express GFP in hair cells of the lateral line neuromasts as well as in cells of the ear, eye and brain. Transgenic larvae were left untreated (a) or were treated with 100 μM neomycin for 2 hours (b) and imaged under fluorescence. Note the ablation of lateral line hair cells, though other expressing tissues are unaffected. (b and d) *BACmpx::GFP* larvae were treated in parallel with *Brn3c::GFP* larvae to examine leukocyte behavior. Note that while leukocytes disperse with the neomycin treatment, they do not congregate near neuromasts as they do with copper treatment.

Additional file 8: Supplementary Figure 6. The ChIn assay can be adapted to carry out an inflammation resolution screen. *BACmpx::GFP* transgenic fish were raised and treated at 56 hpf with 10 μM CuSO_4 as described for the ChIn assay. The number of infiltrating leukocytes in the lateral line were counted and compared to those of untreated fish at 0 hours posttreatment (hpt). These fish were then left for a further 3 hours after removal of copper (3 hpt) and examined once again to count infiltrating leukocytes. Copper-treated fish show significant diminishment of leukocyte numbers by this time, indicating resolution of inflammation. If copper-treated fish are exposed to diclofenac or ibuprofen at 0 hpt and examined at 3 hpt, the number of infiltrating leukocytes remains high, indicating that these drugs inhibit resolution.

Acknowledgements

We thank Catalina Lafourcade, Víctor Guzmán, Nadine Eschen and Sebastian Hoetzl for expert fish care, Florencio Espinoza for technical help and Luisa Pereiro for help with time-lapse imaging. Zebrafish strains were kindly provided by Stephen Renshaw, Phillip Crosier, John Rawls, Darren Gilmour, Paul Martin, Herwig Baier and Leonard Zon. This work was supported by grants to MA from Fondecyt (1070867), FONDAP (15090007), ICM (P06-039F), CORFO-Innova (09MCS5-6705), DFG-Conicyt 075-2009; to CD from UNAB (DI-01-09/1) and Fondecyt (24090004); to UL from Dopaminet (EU FP7 223744); and to CG by a Marie Curie International Reintegration Grant (EU FP7; PIRG07-GA-2010-267552).

Author details

¹Center for Genome Regulation, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile. ³Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, Hermann von Helmholtz

Platz 1, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany. ⁴Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, Bristol BS2 8HD, UK.

Authors' contributions

CD and OP performed all of the manual ChIn assays and statistical analysis and prepared the figures. CW and CG did experiments related to automated ChIn and Sudan Black stains on *was* mutant fish. VG discovered copper-induced expression of *mmp9* and carried out *in situ* hybridization. RJ generated the adult homozygous *was* mutant fish. FL, UL and CG worked on the automated screening system and generated the corresponding data and figures. MA conceived the idea and wrote the initial draft of the paper, which was edited by CG. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 24 September 2010 Accepted: 22 December 2010

Published: 22 December 2010

References

- Martin P, Leibovich SJ: Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005, **15**:599-607.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ: A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009, **459**:996-999.
- Loynes CA, Martin JS, Robertson A, Trushell DM, Ingham PW, Whyte MK, Renshaw SA: Pivotal advance: pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *J Leukoc Biol* 2009, **87**:203-12.
- Martin JS, Renshaw SA: Using *in vivo* zebrafish models to understand the biochemical basis of neutrophilic respiratory disease. *Biochem Soc Trans* 2009, **37**:830-837.
- Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK: A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 2006, **108**:3976-3978.
- Hall C, Flores MV, Storm T, Crosier K, Crosier P: The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol* 2007, **7**:42.
- Cvejic A, Hall C, Bak-Maier M, Flores MV, Crosier P, Redd MJ, Martin P: Analysis of WASp function during the wound inflammatory response: live-imaging studies in zebrafish larvae. *J Cell Sci* 2008, **121**:3196-3206.
- Sullivan C, Kim CH: Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol* 2008, **25**:341-350.
- Renshaw SA, Loynes CA, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK: Modeling inflammation in the zebrafish: how a fish can help us understand lung disease. *Exp Lung Res* 2007, **33**:549-554.
- Redd MJ, Kelly G, Dunn G, Way M, Martin P: Imaging macrophage chemotaxis *in vivo*: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006, **63**:415-422.
- Ghysen A, Dambly-Chaudière C: Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol* 2004, **14**:67-73.
- Olivari FA, Hernández PP, Allende ML: Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 2008, **1244**:1-12.
- Hernández PP, Moreno V, Olivari FA, Allende ML: Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res* 2006, **213**:1-10.
- Hernández PP, Olivari FA, Sarrazin AF, Sandoval PC, Allende ML: Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and -independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol* 2007, **67**:637-654.
- Dahlen B, Shute J, Howarth P: Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax* 1999, **54**:590-596.
- Haas P, Gilmour D: Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell* 2006, **10**:673-680.
- Williams JA, Holder N: Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res* 2000, **143**:171-181.
- Zhang Y, Bai XT, Zhu KY, Jin Y, Deng M, Le HY, Fu YF, Chen Y, Zhu J, Look AT, Kanki J, Chen Z, Chen SJ, Liu TX: *In vivo* interstitial migration of primitive macrophages mediated by JNK-matrix metalloproteinase 13 signaling in response to acute injury. *J Immunol* 2008, **181**:2155-2164.
- Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, Rhodes J, Kanki JP, Look AT, Huttenlocher A: Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish *Hai1*. *J Cell Sci* 2007, **120**:3372-3383.
- Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG: Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:401-416.
- Lutskiy MI, Rosen FS, Remold-O'Donnell E: Genotype-phenotype linkage in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol* 2005, **175**:1329-1336.
- Jin Y, Mazza C, Christie JR, Gilliani S, Fiorini M, Mella P, Gandellini F, Stewart DM, Zhu Q, Nelson DL, Notarangelo LD, Ochs HD: Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 2004, **104**:4010-4019.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de Frías C, Cortés A: Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol* 2006, **20**:126-136.
- De Jong JL, Zon LI: Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu Rev Genet* 2005, **39**:481-501.
- Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, Langenau DM, Delahaye-Brown A, Zon LI, Fleming MD, Look AT: Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* 2001, **98**:643.
- Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, Yoo SK, Ranheim EA, Huttenlocher A: Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:1212-1217.
- Hall C, Flores MV, Chien A, Davidson A, Crosier K, Crosier P: Transgenic zebrafish reporter lines reveal conserved Toll-like receptor signaling potential in embryonic myeloid leukocytes and adult immune cell lineages. *J Leukoc Biol* 2009, **85**:751-765.
- Levrud JP, Disson O, Kissa K, Bonne I, Cossart P, Herbomel P, Lecuit M: Real-time observation of *Listeria monocytogenes*-phagocyte interactions in living zebrafish larvae. *Infect Immun* 2009, **77**:3651-3660.
- Van der Sar AM, Musters RJP, van Eeden FJM, Appelmelk BJ, Vandembroucke-Grauls CMJE, Bitter W: Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cell Microbiol* 2003, **5**:601-611.
- Ou HC, Santos F, Raible DW, Simon JA, Rubel EW: Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today* 2010, **15**:265-271.
- Behra M, Bradsher J, Sougrat R, Gallardo V, Allende ML, Burgess SM: *Phox1b* is required for mechanosensory hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *PLoS Genet* 2009, **5**:e1000455.
- Owens KN, Santos F, Roberts B, Linbo T, Coffin AB, Knisely AJ, Simon JA, Rubel EW, Raible DW: Identification of genetic and chemical modulators of zebrafish mechanosensory hair cell death. *PLoS Genet* 2008, **4**: e1000020.
- Westerfield M: *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* Eugene, OR: University of Oregon Press; 2000.
- White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessling W, Burns CE, Zon LI: Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2008, **2**:183-189.
- Xiao T, Roeser T, Staub W, Baier H: A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development* 2005, **132**:2955-2967.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF: Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995, **203**:253-310.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsch RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C: The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 1996, **123**:1-36.
- Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J: Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1994, **1209**:130-139.
- Johnson JL, Wimsatt J, Buckel SD, Dyer RD, Maddipati KR: Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch Biochem Biophys* 1995, **324**:26-34.
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS: c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001, **108**:73-81.

41. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM: **Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.** *Science* 1997, **275**:218-220.
42. Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE: **RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses.** *Annu Rev Med* 1997, **48**:129-156.
43. Lavista Llanos S, Roldán A: **Effect of dexamethasone on nitric oxide (NO.) production by cultured astrocytes.** *Biocell* 1999, **23**:29-35.
44. Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM: **The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones.** *J Med Chem* 1996, **39**:665-668.
45. de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E: **Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA.** *Brain Res* 2009, **1293**:129-141.
46. Duffy CP, Elliott CJ, O'Connor RA, Heenan MM, Coyle S, Cleary IM, Kavanagh K, Verhaegen S, O'Loughlin CM, NicAmhlaibh R, Clynes M: **Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells *in vitro* by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).** *Eur J Cancer* 1998, **34**:1250-1259.

doi:10.1186/1741-7007-8-151

Cite this article as: d'Alençon *et al.*: A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biology* 2010 **8**:151.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

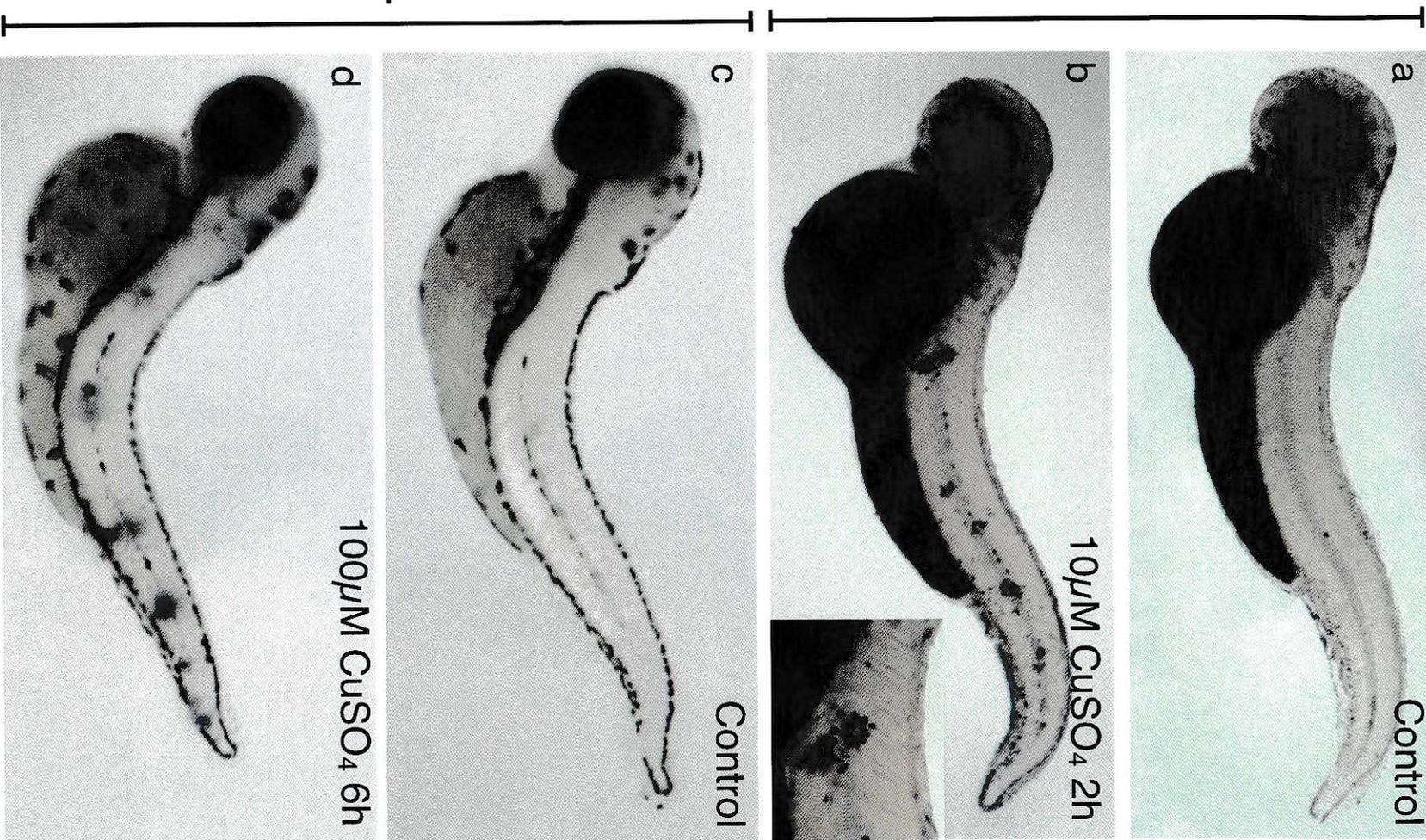
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

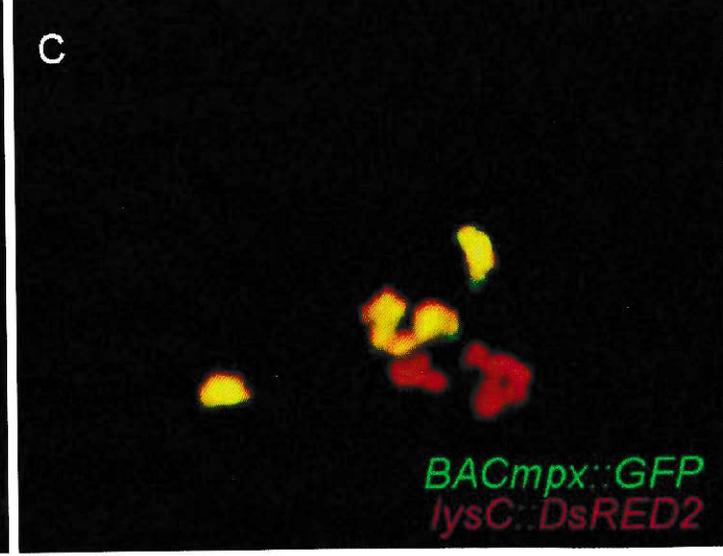
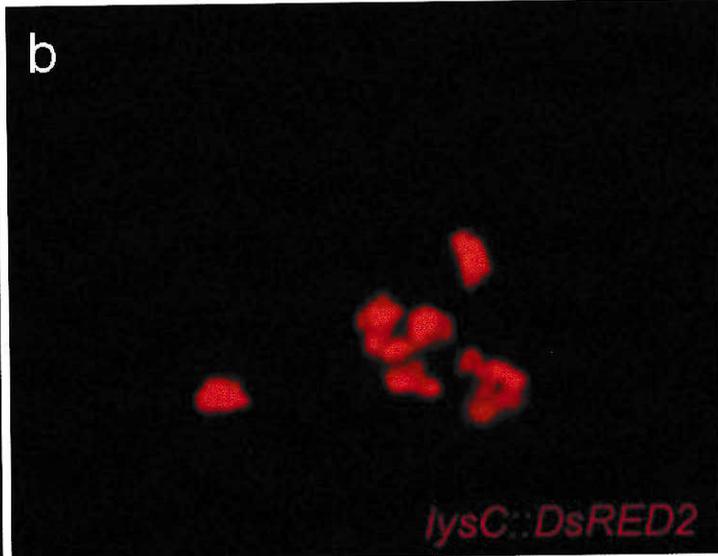
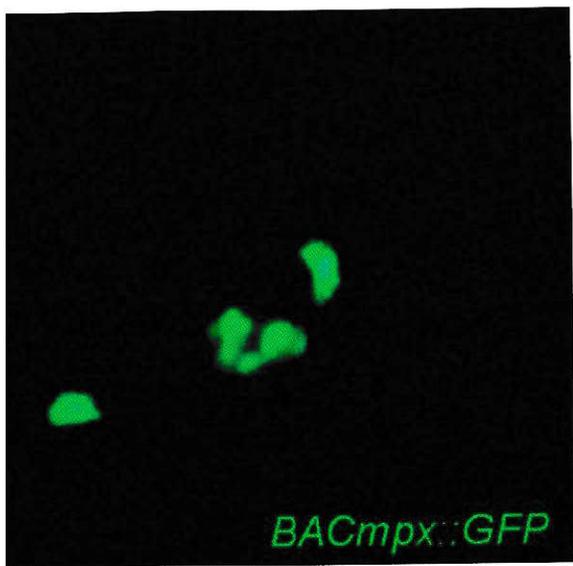
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



58hpf

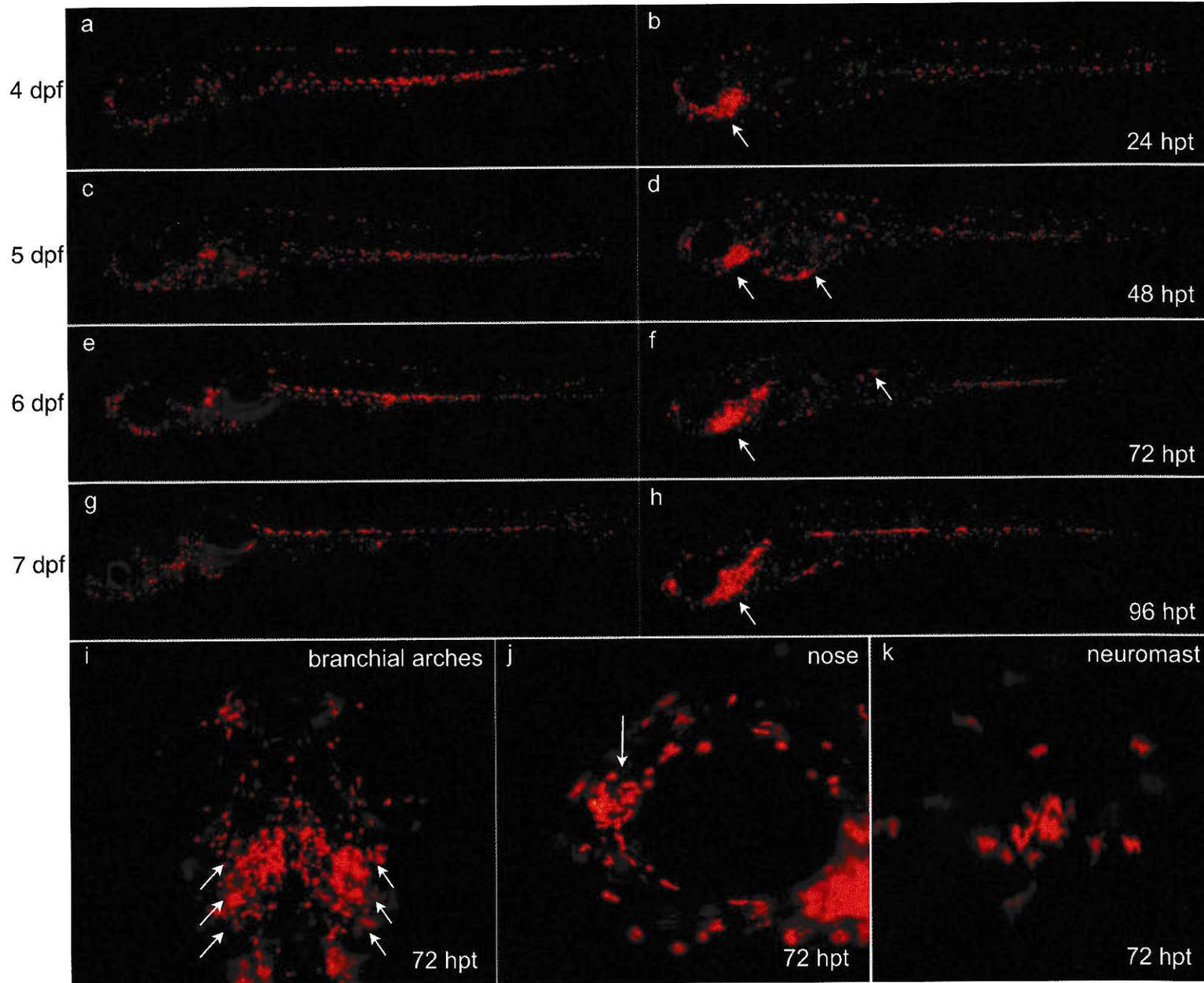
78hpf

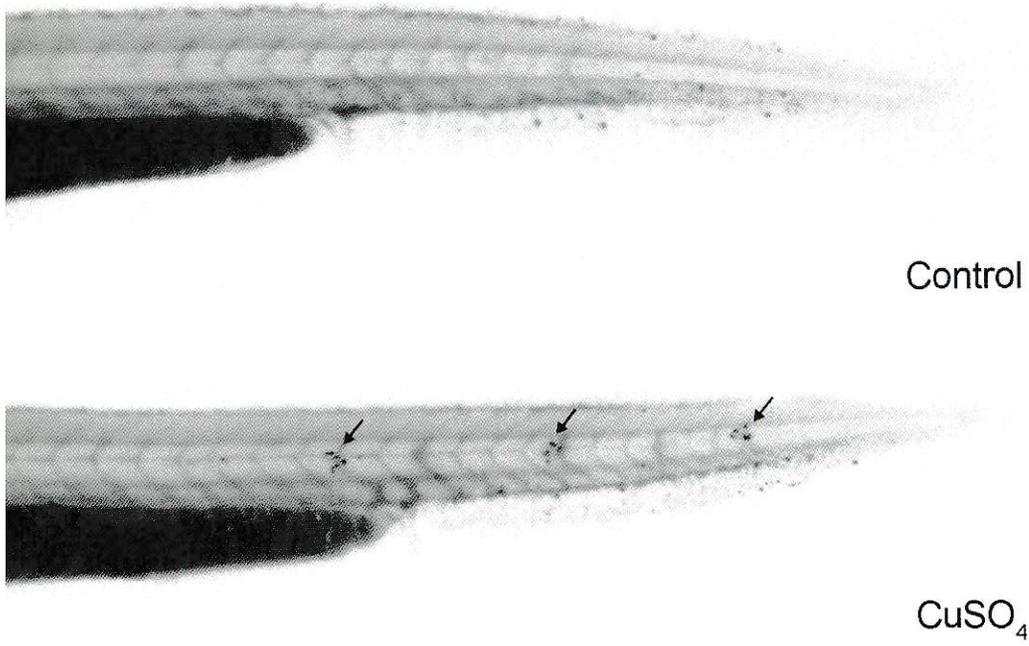




Control

CuSO4





C

