

UCH-FC

Biotecnología

R459

C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

“Caracterización de la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Nicole Reynaert Godefroy

Director de Seminario de Título:
Dr. Miguel Luis Allende Connelly

Marzo de 2012
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Nicole Reynaert Godefroy.

“Caracterización de la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Miguel Luis Allende Connelly
Director Seminario de Título

Miguel Allende

Comisión de Evaluación

Dra. Liliana Angélica Cardemil Oliva
Presidente Comisión

Liliana Cardemil

Dr. Juan Carlos Letelier Parga
Evaluador

Letelier

Santiago de Chile, Marzo 2012



Autobiografía



Originaria de Bolivia, chilena de corazón y alemana en el mesón. Mis primeros pasos en la ciencia fueron a los 6 años, cuando construí un volcán de cerámica y lo hice erupcionar con bicarbonato sódico y vinagre en la cocina de mi casa en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Cuando cumplí los 10 me mudé a Santiago de Chile, donde conocí una nueva cultura y nuevos amigos en el Colegio Alemán. Viví 6 años en Chile, en los cuales definí que quería continuar mis estudios universitarios en este país de playas frías y corazones cálidos. Así, cuando mi hermano mayor entró a Biotecnología, plantó la idea en mi cabeza, la cual finalmente dio frutos al terminar 4to Medio en Bolivia y me incentivó a postular al programa de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. Desde el momento en que quedé aceptada, el verano del 2007, me he arrepentido muchas veces de haber entrado a la carrera, sin embargo, me he maravillado incontables veces con cada detalle hermoso que hay detrás de cada fenómeno de la naturaleza. Y es ese asombro el que me ha llevado hasta acá el día de hoy, y me ha motivado a seguir adelante y lograr mis metas.

DEDICATORIA

Con cariño para Claudia, Eugene y mis mayores fans, los nonos.



AGRADECIMIENTOS

A mi Má por creer en mí incondicionalmente y brindarme todo su apoyo para lograr mis sueños.

A mi Pá por sus valiosas y sabias lecciones de vida.

A mi querido y admirable hermano por esperar a que yo termine mi tesis para terminar la suya. Y por iluminar mi camino hacia el Magíster.

A Raimundo por su infinita paciencia.

A Miguel Allende por otorgarme tantas oportunidades de crecer en el ámbito científico y por haber depositado su confianza en mí.

A Oscar por dirigir el barco y a Mario por quemar y darle color.

A los fly-zebra-chicken-lolos por acompañarme día a día, en los experimentos frustrados y exitosos, en los kioscazos y en la cancha.

A Floro por ser la solución a todos mis problemas, a la Cata y a Don Víctor por cuidar de nuestra fuente de trabajo y a Juanito por los penta-saludos al día.

A Xin Zhao y Caitlyn por su compañía, apoyo incondicional y sentencias motivacionales.

A Harriet y Comidin por el sacrificio aviar que realizaron a los dioses para que yo termine la tesis.

Y por supuesto, al Zebrafish por ser tan lindo y transparente.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE PELÍCULAS (DVD)	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Respuesta inmune	3
1.2. Respuesta inmune innata: inflamación	3
1.3. Resolución de la inflamación	4
1.4. El pez cebra como modelo de estudio en inmunología	5
1.5. Metodologías para el estudio de la resolución de la inflamación	6
1.6. Método de inflamación química por daño específico de la línea lateral posterior de larvas de pez cebra	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
	iv

2.1. MATERIALES	11
2.1.1. Material biológico	11
2.1.2. Reactivos	12
2.1.3. Medios de cultivo	12
2.1.4. Material plástico y otros	12
2.1.5. Equipos	13
2.1.6. Programas	13
2.2. MÉTODOS	13
2.2.1. Determinación preliminar del curso temporal de la resolución en larvas <i>BACmpx:GFP</i> y <i>LysC:GFP</i> .	13
2.2.2. Análisis <i>in vivo</i> de la resolución mediante microscopía en tiempo extendido (<i>time-lapse</i>) en lupa de fluorescencia	14
2.2.3. Evaluación del efecto de compuestos potencialmente inmunomoduladores de la resolución	15
3. RESULTADOS	16
3.1.1. Caracterización del curso temporal de la resolución	16
3.1.2. Seguimiento individual de neutrófilos durante la resolución	23
3.1.3. Evaluación de la resolución como modelo para el desarrollo de un método de <i>screening</i> de compuestos potencialmente inmunomoduladores.	25
4. DISCUSIÓN	32
5. CONCLUSIÓN	42

6. ANEXOS	43
7. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Compuestos potencialmente inmunomoduladores de la resolución	16
---------	--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de la línea lateral posterior de una larva de 3 dpf	9
Figura 2	Resolución de la inflamación en una misma larva <i>BACmpx:GFP⁺ICxcr4b:RFP⁺</i>	18
Figura 3	Caracterización del curso temporal de la resolución en larvas <i>BACmpx:GFP</i>	20
Figura 4	Caracterización del curso temporal de la resolución en larvas <i>LysC:GFP</i>	21
Figura 5	Análisis comparativo entre las líneas <i>BACmpx:GFP</i> y <i>LysC:GFP</i> en la resolución	22
Figura 6	Efecto de <i>Wortmannin</i> en la resolución	26
Figura 7	Efecto de Diclofenaco en la resolución	27
Figura 8	Efecto de las prostaglandinas J ₂ y E ₂ en la resolución	28
Figura 9	Efecto de 2,4 DPD en la resolución	29
Figura 10	Efecto de Sulindac, MMP9i, Indometacina, Diclofenaco, Hidroclotisona y Dexametasona en la resolución	30
Figura 11	Efecto de Sulindac e Indometacina en la resolución	31
Figura S.1	Caracterización del curso temporal de la resolución en larvas <i>BACmpx:GFP</i>	43
Figura S.2	Seguimiento individual de neutrófilos durante la resolución	44
Figura S.3	Trayectoria de neutrófilos durante la resolución	44

INDICE DE PELÍCULAS (DVD)

- Película 1 Resolución de la inflamación
- Película 2 Resolución de la inflamación
- Película 3 Migración de leucocitos hacia la MCI
- Película 4 Migración de leucocitos entre neuromastos
- Película 5 Migración de leucocitos hacia la región dorsal
- Película 6 Migración de leucocitos hacia la MCI y a los neuromastos

LISTA DE ABREVIATURAS

MCI	:	Masa celular intermedia
ROS	:	Sigla en inglés de "Reactive oxygen species"
hpf	:	Horas post-fertilización
dpf	:	Días post-fertilización
hpt	:	Horas post-tratamiento
LLP	:	Línea lateral posterior
GFP	:	Sigla en inglés de "Green fluorescent protein"
ADN	:	Ácido desoxiribonucleico
PGJ ₂	:	Prostaglandina J ₂
PGE ₂	:	Prostaglandina E ₂
2,4 DPD	:	2,4-Dietilpiridina dicarboxilato
PHD	:	Prolil Hidroxilasas
Hif1 α	:	Sigla en inglés de "Hipoxia inducible factor 1 α "
MMP9	:	Metaloproteinasa 9

RESUMEN

La inmunidad es un aspecto esencial de la supervivencia de los organismos y juega un rol clave en la defensa contra patógenos y la mantención de la homeostasis tisular. La inflamación es parte de la respuesta inmune y se gatilla ante una señal de peligro como daño o infección. Las células inmunes que participan en la inflamación acuden al tejido afectado y se encargan de eliminar el agente que causó el daño o infección. Sin embargo, el ambiente inflamatorio puede provocar efectos nocivos, dañando tejidos adyacentes, por lo que se requiere que la inflamación cese. Este proceso se denomina resolución de la inflamación y es un proceso activo y fundamental para la recuperación funcional de los tejidos.

En este seminario de título se caracterizó la resolución de la inflamación mediada por daño químico en larvas de pez cebra. Para cuantificar la inflamación y su resolución, se contó el número promedio de células inmunes a intervalos regulares de tiempo en la zona del daño luego de haberlo inducido. Para visualizar los leucocitos, se usó microscopía de fluorescencia de larvas transgénicas que expresan proteínas fluorescentes en las células inmunes. Se describió el curso temporal de la resolución y se determinó que ocurre durante las primeras 24 horas luego del daño. Mediante microscopía en tiempo extendido, *time-lapse*, se observó que durante las primeras 6 horas de resolución, las células inmunes migran de forma retrógrada, dejando la zona del daño. Por último, se evaluó el potencial de la resolución como blanco para la búsqueda de fármacos con propiedades inmunomoduladoras.

ABSTRACT

Immunity is essential for the survival of all organisms, playing a critical role in defense against pathogens and tissue homeostasis. Inflammation is part of the immune response and is triggered after a signal of danger, such as injury or infection. The immune cells involved in inflammation migrate towards the affected tissue and are responsible for removing the agent that caused the injury or infection. However, the inflammatory environment can be detrimental to adjacent tissues, such that inflammation must cease in a timely manner. This process is termed resolution of inflammation and is an active and crucial process for the recovery of tissue function.

In this work, inflammation resolution induced by chemical damage was characterized in zebrafish larvae. To quantify inflammation and its resolution, we counted the average number of immune cells at the wounded area at regular intervals of time after damage induction. To visualize the leukocytes, fluorescence microscopy of transgenic larvae that express fluorescent proteins in immune cells were used. The time course of resolution was described and it was determined that it occurs during the first 24 hours after injury. Using *time-lapse* we observed that immune cells migrate in a retrograde manner during the first 6 hours of resolution, leaving the area of damage. Finally, we evaluated the potential use of resolution as a target for the search for drugs with immunomodulatory properties.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Respuesta inmune

En términos generales, el sistema inmune corresponde al conjunto de células y moléculas responsables de la inmunidad de un organismo, el cual le permite reconocer entre lo propio y lo ajeno y entre lo nocivo y lo inocuo, y así sobrevivir a las adversidades de su ambiente. Por esto, la respuesta global y coordinada de estos componentes frente a la introducción de agentes extraños y/o peligrosos en un organismo se denomina como respuesta inmune. En el sistema inmune de organismos vertebrados se distinguen la inmunidad innata y la adaptativa, las cuales difieren en las poblaciones celulares involucradas, la ventana temporal de acción, la especificidad y mecanismo molecular por el cual actúan, siendo la primera el foco central de este seminario.

1.2. Respuesta inmune innata: inflamación

La inmunidad innata es la primera barrera de defensa contra agentes extraños y/o infecciosos y se compone principalmente de células epiteliales, células fagocíticas, leucocitos y factores solubles como defensinas, lizosimas, quimioquinas, citoquinas y proteínas del complemento. Este tipo de inmunidad se caracteriza por ser poco específico y capaz de reconocer patrones moleculares compartidos por distintas clases de microorganismos.

La inflamación corresponde a la fase inicial de la respuesta inmune innata provocada por daño, estrés celular o la presencia de microorganismos y se caracteriza por ser rápida y localizada. Inicialmente, se gatilla la degranulación y

subsecuente activación de mastocitos y macrófagos residentes en el área del daño o infección. Esto a su vez induce la síntesis de señales pro-inflamatorias, como por ejemplo citoquinas, quimioquinas, mediadores lipídicos y aminas bioactivas, quienes reclutan y activan neutrófilos y macrófagos (Gilroy *et al.*, 2004). Estas células eliminan restos celulares y a los agentes infecciosos mediante la liberación de enzimas y/o su posterior fagocitosis. Sin embargo, con el fin de recuperar la funcionalidad de los tejidos dañados y así mantener la salud del organismo, la inflamación debe eventualmente disminuir en intensidad y finalmente desaparecer mediante un proceso denominado resolución. Durante este proceso las células del sistema inmune abandonan la zona afectada, dando paso al restablecimiento de la homeostasis tisular. Cuando se manifiesta una falla en la resolución, se provoca una inflamación sostenida o crónica, característica de enfermedades como la artritis o la aterosclerosis (Tabas, 2010). Actualmente, los tratamientos para enfermedades inflamatorias están basados en moléculas que interrumpen la síntesis o acción de mediadores de la inflamación. Sin embargo, el uso de estos fármacos conlleva efectos secundarios, como osteoporosis e incremento de la susceptibilidad a infecciones (Gilroy *et al.*, 2004). Por esto, la resolución de la inflamación resulta ser un proceso de interés en la búsqueda de blancos moleculares para el desarrollo de terapias alternativas para enfermedades inflamatorias.

1.3. Resolución de la inflamación

La resolución es el proceso mediante el cual la inflamación se revierte y es primordial para la recuperación de los tejidos. Para que ocurra la resolución, es crucial que se neutralicen y eliminen los agentes que dieron inicio a la inflamación. Los neutrófilos cumplen con esta tarea, mediante la liberación del contenido tóxico

de sus gránulos (Serhan & Savill, 2005). Luego, se requiere que las células inmunes reemplacen la conducta *pro* inflamatoria por una *anti* inflamatoria, y que además éstas dejen la zona del daño. Esto puede ocurrir por la recircularización sistémica de las células inmunes o por apoptosis de ellas, seguida de su fagocitosis por parte de macrófagos derivados de monocitos. Por último, los macrófagos dejan el área del daño (Gilroy *et al.*, 2004).

1.4. El pez cebra como modelo de estudio en inmunología

Se conocen con profundidad los mecanismos inmunes que operan en los mamíferos, no así en otros vertebrados donde el conocimiento en esta área es incipiente. En este seminario, exploraremos la inmunidad innata en los peces, contextualizando nuestros resultados con respecto al conocimiento previo adquirido en mamíferos. Si bien el modelo murino ha permitido describir, entre otros, la resolución de la inflamación, presenta algunas limitaciones, como por ejemplo, la carencia de herramientas para la visualización directa de las conductas celulares específicas durante el transcurso de la inflamación y resolución. En cambio, las subpoblaciones celulares son analizadas mediante citometría de flujo, lo que las saca de su contexto, o son examinadas mediante técnicas histológicas, siendo escasos los estudios *in vivo*. A esto hay que agregar las dificultades para generar modelos reproducibles, las consideraciones bioéticas y el número limitado de animales posibles de incluir por experimento.

El pez cebra ha surgido como modelo alternativo para el estudio del sistema inmune en la última década, principalmente por sus notables ventajas: ilimitado número de individuos, herramientas de transgénesis sencillas, disponibilidad de

bancos de mutantes, tiempo generacional corto, desarrollo externo, bajo costo de manutención, etc. Además, la transparencia óptica de las larvas de pez cebra las hacen un modelo particularmente conveniente para el estudio del comportamiento celular *in vivo* y de procesos como la inflamación y su posterior resolución, durante una respuesta inmune (Carradice & Lieschke, 2008; de Jong & Zon, 2005). Esta transparencia, en conjunto con la transgénesis, han permitido dirigir la expresión de proteínas fluorescentes en poblaciones celulares definidas, lo que hace posible visualizar específicamente neutrófilos, macrófagos, eritrocitos, linfocitos, etc. (Renshaw *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2009; Ellett *et al.*, 2011; Long *et al.*, 1997; Carradice & Lieschke, 2008). Además, el pez cebra desarrolla el sistema inmune innato desde las etapas larvales, mientras que el sistema inmune adaptativo entra en funcionamiento alrededor del primer mes de vida. Esta segregación temporal, permite estudiar de manera aislada y específica los procesos celulares involucrados en la inmunidad innata.

1.5. Metodologías para el estudio de la resolución de la inflamación

En el ratón, la resolución de la inflamación ocurre por apoptosis de la mayoría de los neutrófilos reclutados y la posterior fagocitosis de ellos por macrófagos que llegan más tardíamente al lugar de la inflamación (Gilroy *et al.*, 2004). En estudios recientes en larvas de pez cebra, se indujo la inflamación mediante una transección completa de la cola y se propuso que el reclutamiento de los neutrófilos también es seguido de su apoptosis durante la resolución de la inflamación (Loynes *et al.*, 2010). Sin embargo, en un modelo en el cuál la inflamación es inducida por una perforación de la aleta caudal de larvas, se ha observado migración retrógrada de los neutrófilos durante la resolución (Mathias *et al.*, 2006). Por último, existe un

modelo de daño, en el cual la inflamación se produce mediante un láser. Sin embargo, en este modelo no se ha analizado la resolución, sólo la inflamación (Mathias *et al.*, 2009). Si bien estos modelos permiten visualizar el fenómeno de resolución, presentan desventajas experimentales derivadas del daño físico directo. Por ejemplo, no existe control sobre la magnitud del daño y hay una baja reproducibilidad en el tratamiento entre individuos. Además, el daño físico involucra un procedimiento engorroso, lo que disminuye el número de larvas que pueden utilizarse por experimento y por lo tanto disminuye su eficiencia como modelo. Además, el uso de un láser para realizar el daño puede resultar costoso y complejo.

En nuestro laboratorio se desarrolló recientemente un modelo de inflamación donde se induce el daño de forma química, mediante la inmersión de las larvas en una solución de CuSO_4 (d'Alençon *et al.*, 2010). Este modelo, denominado *Chln assay* o *Chemically induced Inflammation assay*, permite la cuantificación del nivel de inflamación de forma más fidedigna, eficiente y altamente reproducible. Además, este ensayo es de bajo costo y muy sencillo de realizar. Debido a estas ventajas, se escogió esta metodología para el estudio de la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra.

1.6. Método de inflamación química por daño específico de la línea lateral posterior de larvas de pez cebra

El pez cebra pertenece a la clase de peces teleósteos, que se caracterizan por poseer un sistema de órganos mecanosensoriales sobre la superficie del cuerpo, denominados neuromastos. En estadíos larvales, los neuromastos están dispuestos en patrones reproducibles a lo largo del tronco y la cola e interconectados por las

células interneuromásticas (Figura 1A). En conjunto, los neuromastos y las células interneuromásticas, conforman el sistema de la línea lateral posterior (LLP) (Ghysen & Dambly-Chaudière, 2004). La LLP detecta movimientos en el agua y así participa en varias conductas: la detección de presas y depredadores, el reconocimiento de la pareja sexual, y el nado en cardumen.

En particular, cada neuromasto se conforma por al menos 3 tipos celulares distintos: las células de soporte, las células del manto y las células ciliadas mecanosensoriales (Williams & Holder, 2000). Éstas últimas se asemejan mucho a las células ciliadas del oído de vertebrados y están más expuestas que el resto de las células del neuromasto, por lo que son altamente sensibles a las condiciones del medio (Figura 1B).

El *Chln Assay* es un ensayo basado en el daño químico de los neuromastos de la LLP, usando CuSO_4 disuelto en el agua como agente citotóxico. Se ha reportado que la exposición transiente a CuSO_4 induce la necrosis de las células ciliadas y daña parcialmente las células accesorias (células del manto y de soporte) (Hernández *et al.*, 2006; Olivari *et al.*, 2008). Este daño induce la migración de neutrófilos a los neuromastos de forma estereotipada y cuantificable durante la inflamación (d'Alençon *et al.*, 2010). Sin embargo, el destino de las células inmunes durante la resolución en este modelo de inflamación aún se desconoce.

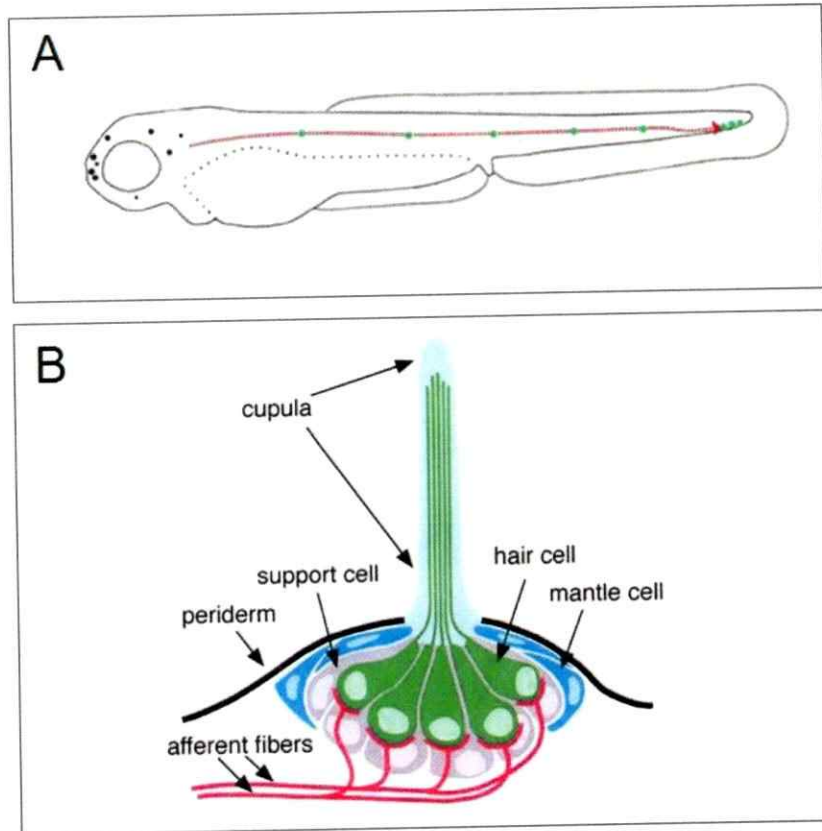


Figura 1. Esquema de la línea lateral posterior de una larva de 3 dpf. (A) Los neuromastos (puntos verdes) se encuentran a lo largo del miosepto horizontal e interconectados por las células interneuromásticas (puntos rojos). (B) Un neuromasto se conforma por células de soporte (*support cell*, lila), células del manto (*mantle cell*, azul) y células ciliadas (*hair cell*, verde) (Adaptado de Dambly-Chaudière *et al.*, 2003).

HIPÓTESIS

La caracterización de la resolución de la inflamación en larvas de pez cebra permite la formulación de un método eficiente de detección de moléculas inmunomoduladoras de la resolución.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la resolución de la inflamación inducida por daño químico en larvas de pez cebra, y evaluar su potencial como herramienta para la búsqueda de compuestos potencialmente inmunomoduladores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar el número de leucocitos mieloides presentes en la LLP a intervalos regulares luego del daño químico de los neuromastos para caracterizar la dinámica del proceso de resolución de la inflamación en larvas de 3 días post fecundación.
2. Realizar un seguimiento del proceso de resolución mediante *time-lapse* bajo fluorescencia en larvas de 3 días post fecundación para determinar el destino de las células que participan en la inflamación.
3. Repetir el método de cuantificación en presencia de compuestos potencialmente inmunomoduladores de la resolución para evaluar su potencial como herramienta de búsqueda de fármacos nuevos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Material biológico

Como modelo animal de estudio se utilizaron larvas de pez cebra de 72 horas post fertilización (hpf). En particular, se utilizaron las líneas transgénicas *BACmpx:GFP* (Renshaw *et al.*, 2006), *LysC:GFP* (Hall *et al.*, 2007) y *Cxcr4b:RFP* (Gamba *et al.*, 2010). Estas líneas se construyeron usando los promotores de los genes de mieloperoxidasa, lisozima C y del receptor de quimioquinas CXCR4b, y permiten visualizar neutrófilos, neutrófilos y macrófagos y células de la LLP, respectivamente, mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Hacemos notar que, para ninguna de las líneas transgénicas que identifican células inmunes usadas en este seminario, ha sido definido inequívocamente el tipo celular marcado. Existe consenso en las publicaciones que usan la línea *BACmpx:GFP* en llamar a estas células neutrófilos, por lo que seguimos esa nomenclatura. Por otro lado, en la literatura más reciente se usa el término "leucocitos" para nombrar las células marcadas en la línea *LysC:GFP*, terminología que usamos en este estudio. Para la obtención de las larvas se cruzaron peces adultos, cuyas condiciones de mantención fueron las estándar (Nüsslein-Volhard & Dahm, 2002): un ciclo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad, 28°C, con circulación de agua y aire constantes, pH de 7-7,3, conductividad de 400-600 μ S y una dieta alimenticia basada en *Artemia salina* suplementada con hojuelas Tetra. Una vez colectados los embriones, se distribuyeron en grupos de 50 y se criaron en placas Petri de plástico

con E3, el medio estándar para cultivo de larvas, en una incubadora a 28°C. El medio de las placas se renovó diariamente.

2.1.2. Reactivos

- Sulfato de cobre II (CuSO_4) anhidro para análisis, 1.02791.0250 Merck, Alemania.
- Tricaína (Ethyl-m-aminobenzoatemethanesulphonate), SIGMA.
- Diclofenaco
- 2,4 DPD
- Wortmannin
- Inhibidor de MMP9
- Indometacina
- Sulindac
- Dexametasona
- Hidrocortisona

2.1.3. Medios de cultivo

- E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl_2 , 0,33 mM MgSO_4) (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

2.1.4. Material plástico y otros

- Placas Petri de poliestireno de 100x15 mm, VWR.
- Placas multipocillo de 6 Merck.
- Pipetas de transferencia de plástico Biologix.

2.1.5. Equipos

- Lupa de fluorescencia MVX10, Olympus.
- Cámara digital Micropublisher 3.3, QImaging.

2.1.6. Programas

- QCapture Pro 6.0.0.412 para Windows 32-bit, S/N 47N60203-24701.
- ImageJ 1.45e (Java 1.6.0_20 (64-bit)).

Plugins: Stackreg (Rasband, 1997)

Turboreg (Thévenaz et al., 1998)

MtrackJ (Meijering et al., in press)

- GraphPad Prism 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.
- Adobe Photoshop CS5 Extended, versión 12.0 para Windows 32-bit.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinación preliminar del curso temporal de la resolución en larvas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP*.

Se obtuvieron larvas *BACmpx:GFP* a partir de un cruce de peces adultos heterocigotos y se criaron a 28°C en grupos de 50 en placas Petri con E3. Se les renovó el E3 cada día y a los 3 dpf se distribuyeron las larvas en grupos de 20-30 en placas Petri con 20 mL de E3 y se trataron con 20 µL de una solución 10 mM de CuSO₄ preparada el mismo día. De esta forma, las larvas quedaron expuestas a una concentración final de 10 µM de CuSO₄. Paralelamente, se mantuvieron grupos de alrededor de 25 larvas en 20 mL de E3 como grupo control. Se incubaron ambos

grupos de larvas, el control y el experimental, a 28°C durante 2 horas. Luego del tratamiento se lavaron las larvas tres veces consecutivas con E3 y se contó el número de células GFP⁺ (neutrófilos) en el miosepto horizontal de aproximadamente 25 larvas tratadas y 25 larvas control en lupa de fluorescencia como ha sido previamente descrito (d'Alençon *et al.*, 2010). Para esto se anestesiaron previamente las larvas con triclaína. El conteo se repitió a intervalos de tiempo regulares, utilizando un grupo diferente de larvas tratadas y controles cada vez (ver Figura 3). Este experimento se replicó en 3 instancias independientes, con larvas provenientes de cruces *BACmpx:GFP* distintos.

El protocolo de inflamación se repitió en larvas *LysC:GFP* de 3 dpf obtenidas a partir de un cruce de adultos hererocigotos, y se realizó un conteo de células GFP⁺ en el miosepto a intervalos de tiempo regulares, bajo las mismas condiciones que para las larvas *BACmpx:GFP* (ver Figura 4).

En otra instancia, se repitió el protocolo de inflamación en larvas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP* de 3 dpf y se realizó una comparación del número promedio de células GFP⁺ en el miosepto durante las primeras 10 horas de resolución (ver Figura 5).

2.2.2. Análisis *in vivo* de la resolución mediante microscopía en tiempo extendido (*time-lapse*) en lupa de fluorescencia

Para el análisis *in vivo* de la resolución se utilizó la técnica de *time-lapse*. Ésta se basa en la captación de imágenes a determinados intervalos de tiempo, obteniéndose una secuencia continua de imágenes. Luego, se crea una película a partir de la secuencia de imágenes que se reproduce con efecto de imagen acelerada.

Previo a la realización del *time-lapse*, se repitió el protocolo descrito en Métodos 2.2.1., utilizando larvas *BACmpx:GFP* de 3 dpf. Luego del tratamiento con CuSO_4 por 2 horas, se lavaron las larvas y se escogió una que tuviera un patrón de inflamación representativo a lo largo de la LLP (se ilustran ejemplos de este patrón y la secuencia de resolución en las películas 1 y 2 del DVD adjunto. Se anestesió y montó la larva en una placa Petri de vidrio pequeña con E3 y tricaina. Se establecieron los parámetros de fotografiado en QCapture Pro, el programa asociado a la cámara digital, la cual está acoplada a la lupa de fluorescencia. Los parámetros establecidos fueron 5 segundos de exposición de la cámara, *Signal (Red: 1, Green: 1, Blue: 1), White balance (Gain: 1, Gamma: 1, Offset: 0)*, resolución de adquisición: 2048 x 1536 y las fotos se sacaron automáticamente cada 30 segundos por el *Software*, QCapture Pro. El *time-lapse* se inició lo antes posible luego de los lavados con E3, con el fin de capturar el proceso de resolución desde su inicio (el proceso de lavado, montaje y enfoque demora alrededor de 10 minutos). La duración y el aumento utilizado varían de acuerdo al *time-lapse*. La habitación se mantuvo en condiciones de oscuridad y a 28°C mediante un calefactor durante todo el *time-lapse*. Luego de cada *time-lapse* se verificó que la larva tuviera buena circulación y apariencia normal; de otro modo se descartaron los datos.

Las imágenes obtenidas se procesaron con ImageJ y en particular, para seguir la trayectoria de cada neutrófilo, se utilizó el *plugin*, MtrackJ (Meijering *et al.*, In Press).

2.2.3. Evaluación del efecto de compuestos potencialmente inmunomoduladores de la resolución

Se repitió el protocolo descrito en Métodos 2.2.1. con la modificación del tiempo de exposición de las larvas al CuSO_4 de 2 horas a 40 min. Para los ensayos se utilizaron larvas *BACmpx:GFP* de 3 dpf. Luego de lavar las larvas con E3 se agregó el compuesto de interés y se realizaron los conteos (Tabla 1). Como control negativo, se agregó el solvente del compuesto a otro grupo de larvas, pero con las mismas condiciones de inflamación. En la tabla se muestra el tiempo en el que se evaluó el grado de resolución mediante los conteos.

Tabla 1. Compuestos potencialmente inmunomoduladores de la resolución. Se evaluó el efecto de los siguientes compuestos en el proceso de resolución de la inflamación mediada por CuSO_4 en larvas de 3 dpf. Los compuestos seleccionados se agregaron al medio de incubación inmediatamente luego de remover el CuSO_4 , a la concentración y hora post tratamiento (Hpt) indicadas.

Compuesto	Solvente	Concentración final (μM)	Hpt
<i>Wortmannin</i>	DMSO	5	2, 4
2,4 DPD	Etanol 100%	0,01	3
Diclofenaco	DMSO 1%	3	2,4,6
Sulindac	DMSO 1%	100	2
Indometacina	DMSO 1%	50	2
Hidroclortisona	DMSO 1%	100, 50	2
Dexametasona	DMSO 1%	1000	2
PGJ2	Metilacetato	10	4
PGE2	Metilacetato	10	4
Inhibidor de MMP9	DMSO 1%	10	2

3. RESULTADOS

3.1.1. Caracterización del curso temporal de la resolución

La inflamación es un proceso que ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en distintos modelos de daño en pez cebra. Por el contrario, la resolución no ha sido caracterizada exhaustivamente y aún quedan muchas preguntas por responder.

Previamente, en el laboratorio se desarrolló un modelo de daño químico a la LLP de larvas de pez cebra y se caracterizó la respuesta inmune inducida. Se observó el reclutamiento rápido y masivo de leucocitos mieloides a la LLP durante la inflamación. Por otro lado, la disminución subsecuente de estas células en el área del daño sugirió un proceso de resolución (D'Alençon et al., 2010). Dado que este aspecto no ha sido explorado en profundidad, el objetivo de este estudio fue describir la resolución de la inflamación luego de un daño químico en la LLP de larvas de 3 dpf de pez cebra y evaluarla como modelo para el desarrollo de un nuevo método de *screening* de fármacos.

Como experimento preliminar para el estudio de la resolución, se realizó el protocolo de inflamación en larvas doble transgénicas, *BACmpx:GFP*¹ y *Cxcr4b:RFP* de 3 dpf, en las cuales es posible visualizar tanto los neutrófilos como los neuromastos de la LLP, respectivamente. Se analizó la respuesta inmune en una misma larva, inmediatamente antes y después del daño y también a las 6 hpt (Figura 2).

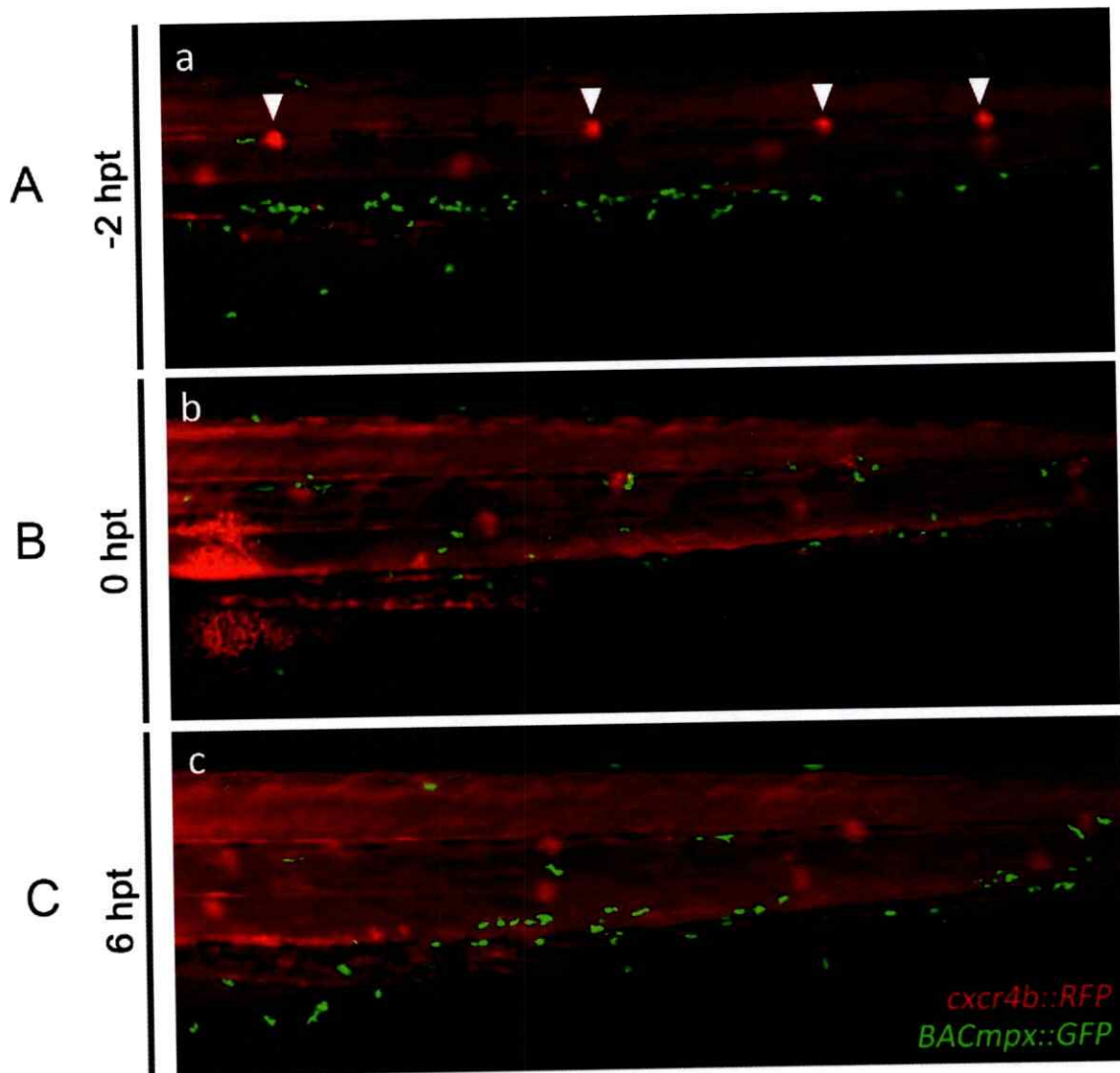


Figura 2. Resolución de la inflamación en una misma larva *BACmpx:GFP⁺/Cxcr4b:RFP⁺*. Las imágenes muestran el tronco y una porción de la cola de una larva doble transgénica de 3 dpf donde los neuromastos se visualizan de color rojo (flechas) y los neutrófilos de verde. **(A)** Previo al tratamiento (-2hpt), los neutrófilos se mantienen en la masa celular intermedia y se encuentran sólo ocasionalmente en las cercanías de los neuromastos. **(B)** La larva se incubó en una solución 10 μ M de CuSO_4 por 2 horas a 28°C y, al cabo del tratamiento se volvió a fotografiar (0 hpt). Nótese la concentración de neutrófilos rodeando los neuromastos en esta zona de la larva. **(C)** La larva se lavó repetidamente para remover el CuSO_4 , se incubó a 28°C y a las 6 hpt se fotografió nuevamente. Se observa que los neutrófilos han abandonado la zona cercana a los neuromastos.

Al comenzar el experimento (Figura 2A, -2 hpt) se observa que el lugar de residencia de los neutrófilos en este estadio de desarrollo es la masa celular intermedia (MCI) y que hay pocos de ellos dispersos en el resto del tronco y cola. De hecho, en la larva seleccionada se observa un sólo neutrófilo en el miosepto, espacio en el que se encuentra la LLP (Figura 2A). Normalmente también se observan neutrófilos en el área de la cabeza, pero para efectos del tema en estudio nos concentramos en efectuar las observaciones en el tronco y cola de las larvas. Luego del tratamiento con CuSO_4 se observa un evidente reclutamiento de neutrófilos en la LLP, en particular alrededor de los neuromastos (Figura 2B). Éstos últimos se observan desorganizados y pierden considerablemente la intensidad de fluorescencia roja. A las 6 hpt se observa nuevamente la estructura de tipo roseta que tienen normalmente los neuromastos, indicando su regeneración. También se observa que disminuye el número de células inmunes en la LLP, restableciéndose la condición pre-inflamatoria, aún cuando permanecen algunos leucocitos en el área (Figura 2C).

Luego, se caracterizó el curso temporal y el comportamiento de leucocitos mieloides durante la resolución en larvas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP* de forma independiente. Para esto, primero se realizó el protocolo de inflamación, y luego de remover el CuSO_4 se realizó el conteo del número de leucocitos reclutados en el miosepto de larvas tratadas y larvas control a intervalos de tiempo regulares (Figuras 3 y 4).

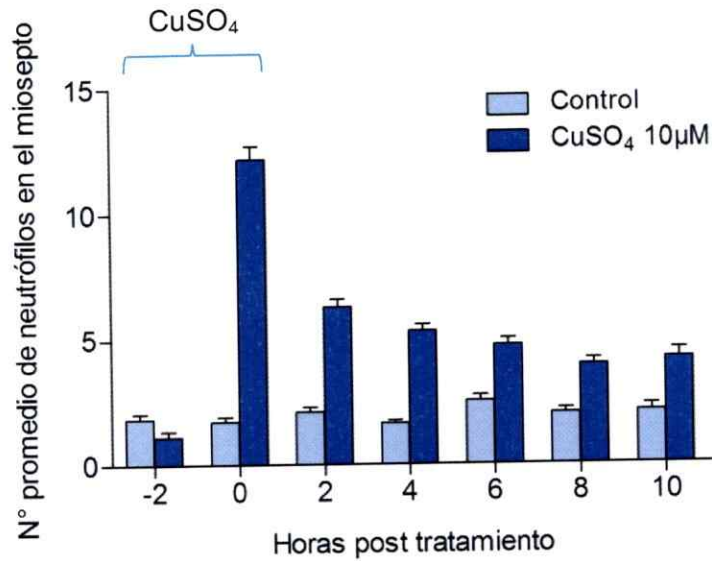


Figura 3. Caracterización del curso temporal de la resolución en larvas *BACmpx:GFP*. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 µM de CuSO₄ por 2 horas a 28°C (de -2 a 0 hpt) y a las 0 hpt se lavaron. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto a intervalos de 2 horas luego del daño con CuSO₄ en lupa de fluorescencia. El experimento se realizó 4 veces en instancias distintas, obteniéndose un *n* aproximado de 60-90 larvas por condición y tiempo. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados en una condición y tiempo. En cada tiempo existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratados y controles respectivos según la prueba de ANOVA de dos vías realizada; el tiempo -2 hpt no se consideró en el análisis, ya que ninguno de los dos grupos de larvas fue expuesto a CuSO₄ en este tiempo. En el gráfico se muestra el error estándar.

Se observa que dos horas después de remover el CuSO₄, ya ha disminuido el número de células en el área del daño, es decir, que la resolución se inicia en el intervalo comprendido entre las 0 y 2 horas post tratamiento (hpt). Se observó que la resolución inflamatoria en larvas *BACmpx:GFP*, mediada por neutrófilos, ocurre de forma continua y regular durante las primeras 10 hpt (Figura 3), aunque con una disminución más pronunciada del número promedio de neutrófilos en las primeras 2 hpt. Además, observamos que la resolución se inicia antes de remover el CuSO₄,

alrededor de la primera hora de tratamiento y que finaliza dentro de las primeras 24 hpt (Figura Suplementaria 1).

Una vez caracterizada la resolución en la línea *BACmpx:GFP*, se repitió el protocolo de inflamación en la línea *LysC:GFP*, y se contó el número promedio de células GFP⁺ o leucocitos mieloides en el miosepto de larvas de 3 dpf. Se observa que el comportamiento es similar a aquel observado en la línea *BACmpx:GFP* (Figura 4).

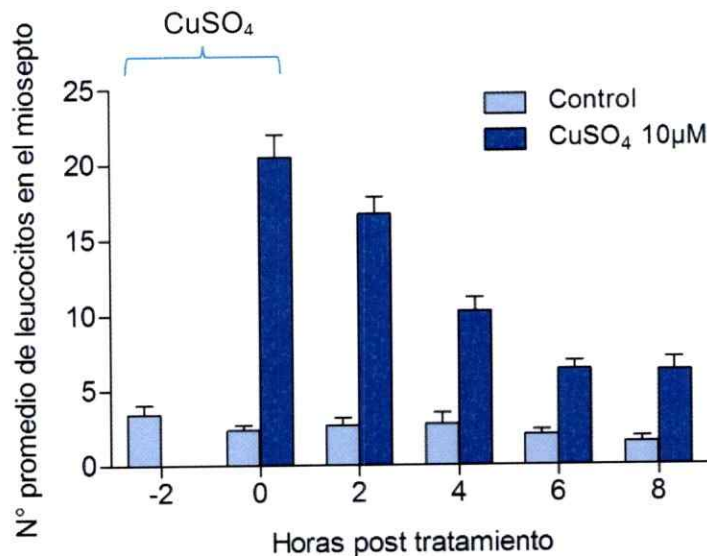


Figura 4. Caracterización del curso temporal de la resolución en larvas *LysC:GFP*. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 µM de CuSO₄ por 2 horas a 28°C (de -2 a 0 hpt) y a las 0 hpt se lavaron. Se contó el número de células GFP⁺ reclutados en el miosepto a intervalos de 2 horas luego del daño con CuSO₄ en lupa de fluorescencia. El experimento se realizó 1 vez, obteniéndose un *n* aproximado de 15 larvas por condición y tiempo. Cada barra representa el número promedio de células GFP⁺ reclutados en una condición y tiempo. De 0 a 8 hpt, existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba de ANOVA de dos vías realizada. En el gráfico se muestra el error estándar.

Con el fin de comparar en detalle la temporalidad y características de la resolución entre las líneas transgénicas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP*, se repitió el protocolo de inflamación en grupos de larvas de 3 dpf de ambas líneas en paralelo y se cuantificó el comportamiento de los leucocitos durante la resolución (Figura 5). Se observa que no existe una diferencia significativa entre el número promedio de células GFP⁺ de ambas líneas a las 0 hpt, es decir, inmediatamente después del daño. Durante la resolución, se observa que en las larvas *BACmpx:GFP*, las células GFP⁺ dejan con mayor rapidez el área del daño en relación a las células GFP⁺ de larvas *LysC:GFP*. Esto sugiere que los tipos celulares marcados en estas líneas transgénicas acuden a la zona del daño en una misma ventana temporal pero que durante la resolución, se comportan de manera distinta.

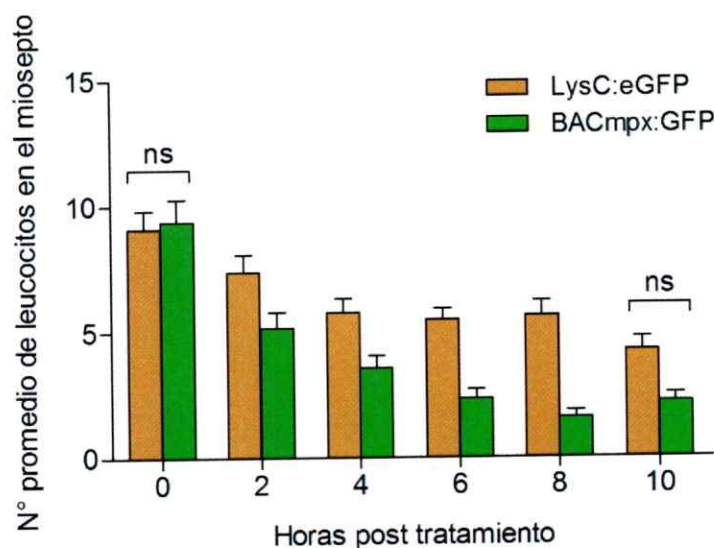


Figura 5. Análisis comparativo entre las líneas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP* en la resolución. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 μ M de CuSO_4 por 2 horas a 28°C (de -2 a 0 hpt) y a las 0 hpt se lavaron. Se contó el número de células GFP⁺ reclutadas en el miosepto a intervalos de 2 horas luego del daño con CuSO_4 en lupa de fluorescencia. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de dos vías y el *post test* Bonferroni. En el gráfico se

muestra el error estándar. Las diferencias entre ambas líneas transgénicas son significativas ($p < 0.05$) excepto en los tiempos 0hpt y 10hpt (ns).

Una vez descrito el curso temporal de la resolución, se determinó el mecanismo por el cual ésta ocurre, es decir, se describió la manera en que el número promedio de neutrófilos en la zona del daño disminuye después de la inflamación.

3.1.2. Seguimiento individual de neutrófilos durante la resolución

En distintos modelos de daño se ha descrito tanto la migración retrógrada como la apoptosis de neutrófilos durante la resolución. Aunque la inflamación en el modelo de daño químico con CuSO_4 ya está caracterizada, se desconoce el mecanismo por el cual ocurre su resolución. Para resolver esta incógnita, se realizó microscopía de tiempo extendido o *time-lapse*, en larvas *BACmpx:GFP* de 3 dpf durante la resolución con el fin de determinar el destino de los neutrófilos en este proceso. Las películas generadas a partir de los *time-lapse* se encuentran disponibles en los DVDs adjuntos al manuscrito. Se marcaron las trayectorias seguidas por los neutrófilos que pudieron ser identificados durante el transcurso del *time-lapse* y se numeraron mediante *Tracks* generados con el programa Image J.

Se realizó un total de 8 *time-lapse*, donde se visualizó la resolución en 14 larvas y se pudo seguir aproximadamente a 250 neutrófilos, luego del daño químico. Cabe destacar que los 250 neutrófilos analizados corresponden a todos aquellos que se encontraban en el miosepto horizontal al momento de iniciarse el *time-lapse* en las 14 larvas. En la mayoría de los videos se observan cambios de foco espontáneos,

los cuales se realizaron manualmente para evitar el desenfoque del miosepto horizontal de las larvas durante el *time-lapse*.

Se observó que la resolución de la inflamación mediada por neutrófilos ocurre mediante migración retrógrada durante las primeras 6 hpt. Inicialmente, se observa que los neutrófilos se encuentran agrupados a intervalos regulares a lo largo del tronco de las larvas (Película 1 y 2). Como se ilustró en la figura 2, y como se ha descrito previamente (d'Alençon *et al.*, 2010), los neutrófilos se encuentran inicialmente reclutados en los neuromastos dañados por el CuSO₄. Posteriormente, los neutrófilos dejan la zona del daño mediante migración, extendiendo protrusiones activamente. Específicamente, se observó migración celular hacia la MCI (Película 3, *Tracks* 1-7, Película 4, *Tracks* 10, 14, 15, 17), migración entre neuromastos adyacentes (Película 4, *Tracks*, 1-13) migración de algunos neutrófilos hacia la región dorsal (Película 4, *Track* 4 y Película 5, *Tracks* 1, 2, 3 y desde la región dorsal como se muestra en la Película 3, *Track* 2). Incluso se puede observar la migración de neutrófilos desde la MCI hacia el miosepto (Película 4, *Track* 12). La migración entre neuromastos queda evidenciada por las líneas horizontales que se observan al final de cada *time-lapse*, ya que el *Track* indica la trayectoria de los neutrófilos durante la resolución (Figura Suplementaria 3). Es interesante observar neutrófilos que siguen la misma trayectoria que otros (Película 4). También se observaron algunos neutrófilos que migran hacia la MCI y luego regresan al área del daño, como se muestra en el único *Track* de la película 6. Por último, existen neutrófilos que se mantienen relativamente constantes en un mismo sitio desde las primeras 2 horas de *time-lapse* (Película 4, sin *Tracks*).

Además de los neutrófilos que acuden al área del daño, se observan otros que se mueven a gran velocidad por la circulación sanguínea de la larva durante el proceso de resolución y no pueden ser seguidos con esta metodología. Una segunda dificultad técnica ocurre cuando los neutrófilos se agrupan perdiéndose la identificación individual de ellos. Esto último, representa una de las mayores limitantes a efectuar seguimientos de largo plazo de estas células, quedando abierta la pregunta sobre el destino final de los leucocitos mieloides después de un proceso inflamatorio.

3.1.3. Evaluación de la resolución como modelo para el desarrollo de un método de *screening* de compuestos potencialmente inmunomoduladores.

Previamente, se había evaluado el efecto de moléculas antiinflamatorias en el ensayo de daño químico con CuSO₄ en larvas y el efecto sobre la infiltración de neutrófilos en los neuromastos de la LLP (d'Alençon *et al.*, 2010). Usando el mismo protocolo de inflamación, se evaluó a continuación el efecto de diversos compuestos con propiedades potencialmente inmunomoduladoras en el proceso de resolución, agregándolos inmediatamente después de remover el CuSO₄ de las larvas. Para estos ensayos se varió el tiempo de exposición a CuSO₄ de 2 horas a 40 minutos, debido a que la fase de resolución comienza alrededor de 1 hora después de iniciada la inflamación con CuSO₄ (Figura Suplementaria 1). Además, con 40 minutos de exposición se logra el mismo nivel de inflamación que con 2 horas (d'Alençon *et al.*, 2010). En particular se evaluó el efecto de Diclofenaco, Sulindac, Indometacina, Hidrocortisona y Dexametasona en la resolución, dado que ya se ha descrito su efecto antiinflamatorio (Figuras 7, 10, 11, 12) (d'Alençon *et al.*, 2010). También se evaluó el efecto del inhibidor de MMP9, inhibidor de

Fosfoinositol Quinasa 3 (PI3K), *Wortmannin*, del inhibidor del inhibidor de Hif1 α , 2,4 DPD, y de las prostaglandinas J₂ y E₂ (Figuras 6, 8 y 9).

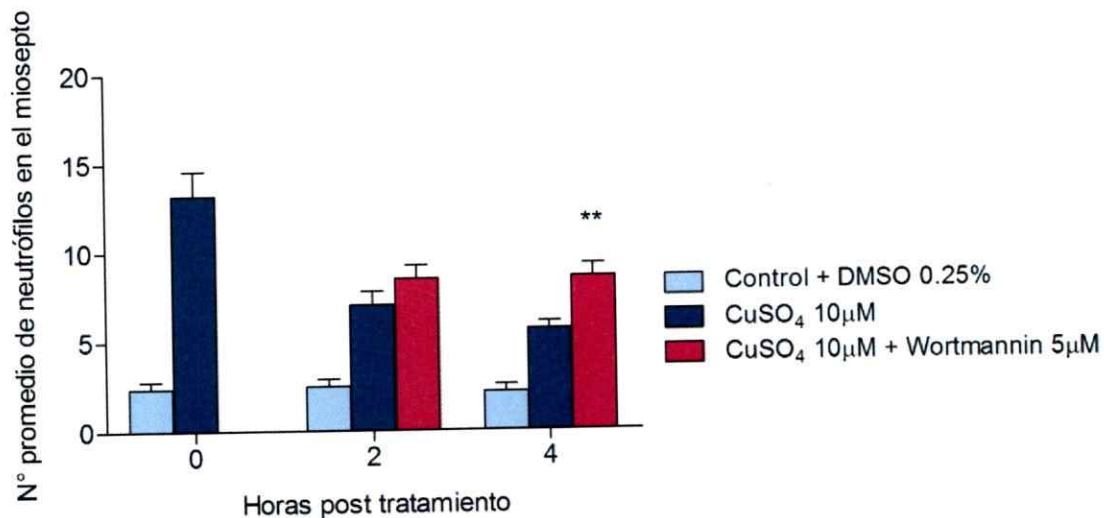


Figura 6. Efecto de *Wortmannin* en la resolución. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 µM de CuSO₄ por 40 minutos a 28°C, se lavaron y se agregó *Wortmannin* 5µM a un grupo de larvas tratadas con CuSO₄. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto a intervalos de 2 horas luego del daño con CuSO₄ en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados en una condición y tiempo, con n aproximando de 20 larvas. Según el ANOVA de dos vías y el *post test* de Bonferroni, las larvas tratadas con *Wortmannin* presentan diferencias significativas (p<0.05) respecto a larvas tratadas únicamente con CuSO₄ a las 4 hpt. En el gráfico se muestra el error estándar.

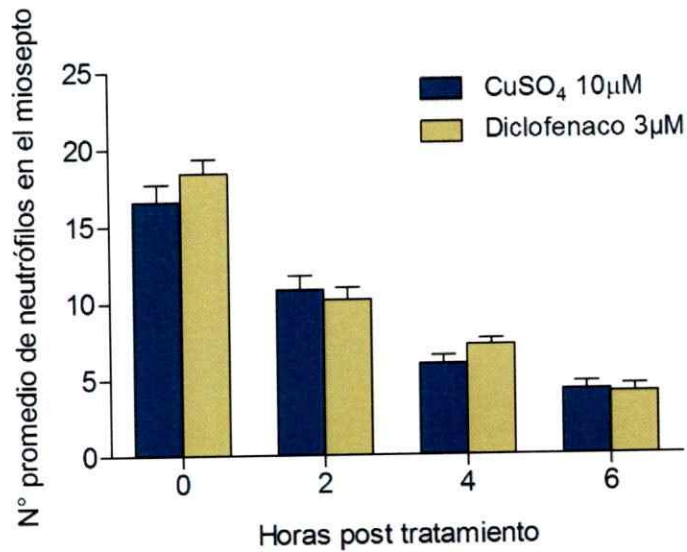


Figura 7. Efecto de Diclofenaco en la resolución. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 µM de CuSO₄ por 40 minutos a 28°C y a las 0 hpt se lavaron y se agregó Diclofenaco 3µM. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto a intervalos de 2 horas luego del daño con CuSO₄ en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados en una condición y tiempo, con un *n* aproximado de 40 larvas. Según el ANOVA de dos vías y el *post test* de Bonferroni, las larvas tratadas con Diclofenaco no presentan diferencias significativas respecto a larvas tratadas únicamente con CuSO₄. En el gráfico se muestra el error estándar.

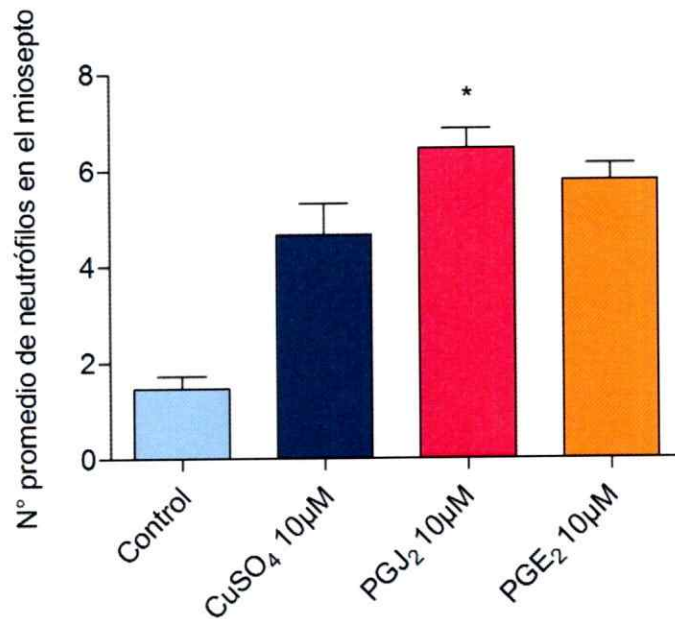


Figura 8. Efecto de las prostaglandinas J₂ y E₂ en la resolución. Se sumergieron larvas de 3 dpf en una solución 10 µM de CuSO₄ por 40 minutos a 28°C y a las 0 hpt se lavaron y se agregaron las prostaglandinas a una concentración final de 10 µM en grupos separados de larvas tratadas con CuSO₄. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados por condición a las 4 hpt, con n aproximando de 50 larvas. Según el ANOVA de una vía y el *test* de Dunn, las larvas tratadas con la prostaglandina J₂ presentan diferencias significativas (p<0.05) respecto a larvas tratadas únicamente con CuSO₄. En el gráfico se muestra el error estándar.

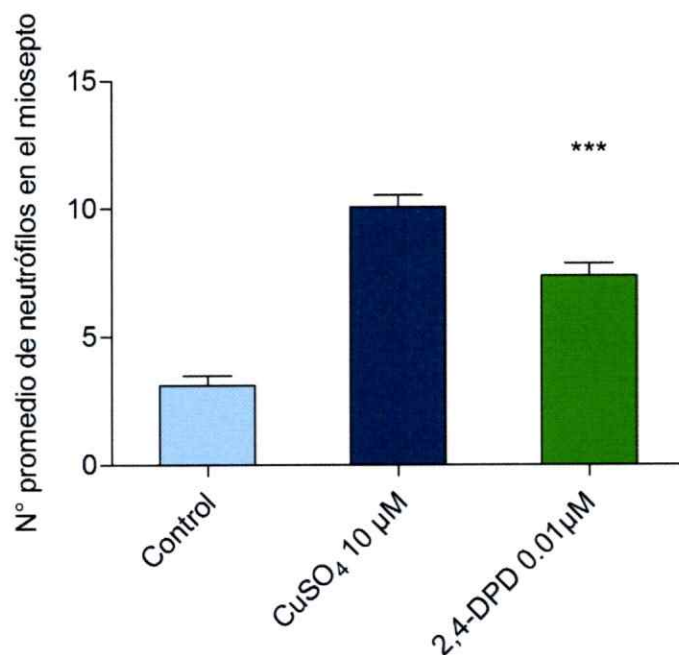


Figura 9. Efecto de 2,4 DPD en la resolución. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 μM de CuSO₄ por 40 minutos a 28°C y a las 0 hpt se lavaron y se agregó 2,4-DPD 0.01 μM a un grupo de larvas tratadas con CuSO₄. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados por condición a las 3 hpt, con un *n* aproximando de 60 larvas. Según el ANOVA de una vía y el *post test* de Bonferroni, las larvas tratadas con 2,4-DPD presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a larvas tratadas únicamente con CuSO₄. En el gráfico se muestra el error estándar.

Se encontró que 2,4 DPD actúa como un compuesto *pro-resolutivo*, disminuyendo el número de neutrófilos reclutados en la zona de daño con mayor rapidez que el control positivo de resolución. Por el contrario, *Wortmannin*, y la prostaglandina J₂ ralentizan el proceso de resolución respecto del control.

Se evaluó el efecto de Indometacina 100 μM durante 2 horas de exposición, dado que a esta concentración y tiempo posee un efecto antiinflamatorio y no es letal para las larvas (d'Alençon *et al.* 2010). En este experimento se inflamaron las

larvas según el protocolo descrito en Métodos 2.2.1. y luego de remover el CuSO_4 , se expusieron a Indometacina. Al cabo de este tiempo, aproximadamente un 25% de las larvas estaba muerto, y el resto con problemas de circulación, posiblemente por el tiempo de exposición más extendido en el experimento de resolución comparado con el de inflamación. Se repitió el experimento con una concentración final de $50 \mu\text{M}$ (Figura 10).

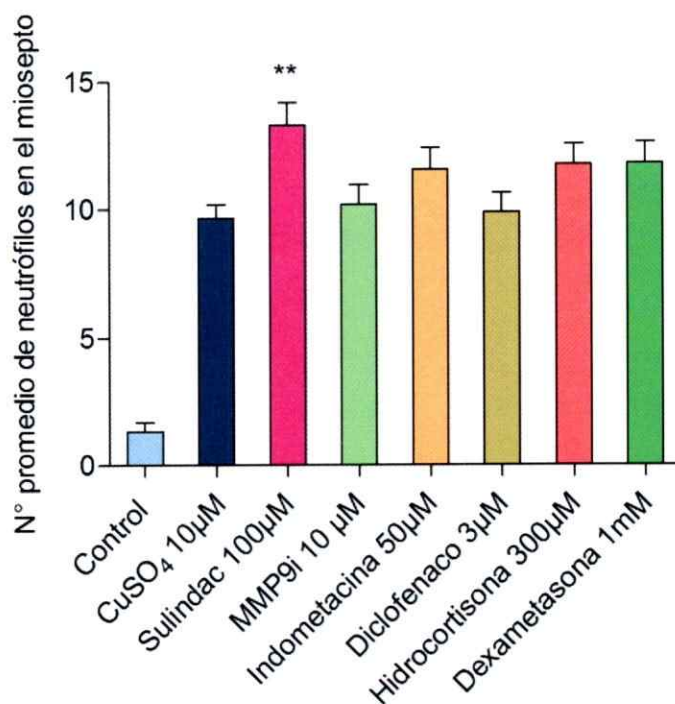


Figura 10. Efecto de Sulindac, MMP9i, Indometacina, Diclofenaco, Hidrocortisona y Dexametasona en la resolución. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución $10 \mu\text{M}$ de CuSO_4 por 40 minutos a 28°C y a las 0 hpt se lavaron y se agregó el compuesto de interés a grupos independientes de larvas tratadas con CuSO_4 . Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados por condición a las 2 hpt, con un n aproximando de 20 larvas. Según el ANOVA de una vía y el post test de Bonferroni, las larvas tratadas con Sulindac presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a larvas tratadas únicamente con CuSO_4 mientras

que los demás tratamientos no muestran diferencias con el control. En el gráfico se muestra el error estándar.

En este experimento la sobrevivencia de larvas incubadas con Indometacina fue normal. Sin embargo, aunque el Sulindac tuvo un efecto en la resolución, también lo tuvo sobre el estado general de las larvas por lo que se repitió el experimento usando esta droga a una concentración de 50 μ M (Figura 11).

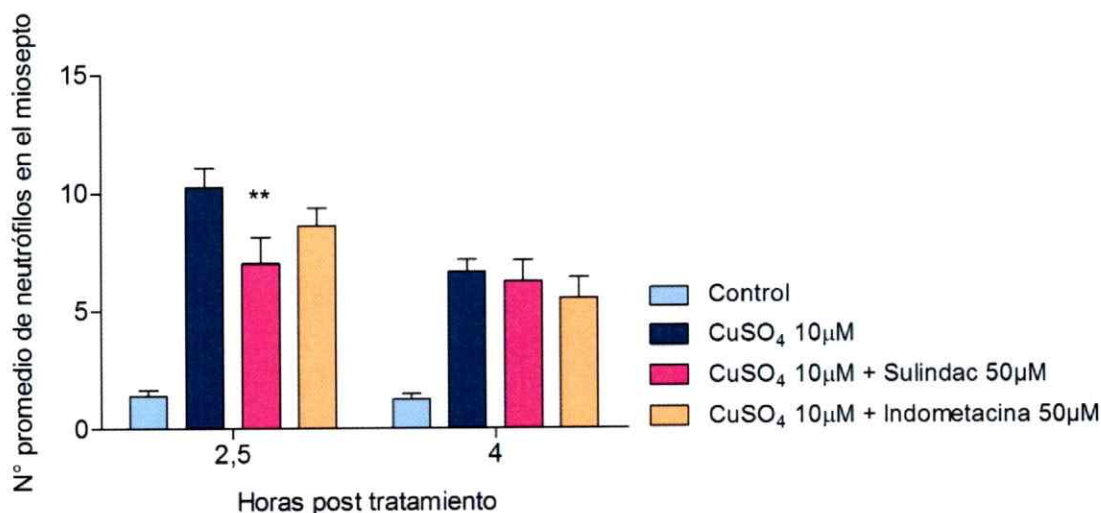


Figura 11. Efecto de Sulindac e Indometacina en la resolución. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 μ M de CuSO₄ por 40 minutos a 28°C, se lavaron y se agregó el compuesto de interés a grupos independientes de larvas tratadas con CuSO₄. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto a las 2,5 y 4 hpt en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados por condición y tiempo, con un *n* aproximando de 20 larvas. Según el ANOVA de dos vías y el post test de Bonferroni, las larvas tratadas con Sulindac presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a larvas tratadas únicamente con CuSO₄. En el gráfico se muestra el error estándar.

Por último, Sulindac entregó resultados inconsistentes entre sí, ya que en tres instancias independientes resultó promover la resolución, ralentizarla y no tener efecto alguno (no se muestra el gráfico del triplicado que no tuvo efecto). Además,

la prostaglandina E₂, Diclofenaco, Hidrocortisona, Dexametasona y el inhibidor de la MMP9 no tuvieron un efecto en la resolución a las concentraciones y tiempos de exposición evaluados.

En resumen, se identificaron compuestos que promueven la resolución, y otros que la ralentizan. También se identificaron compuestos que a las concentraciones utilizadas y tiempos de exposición analizados, no tienen efecto en la resolución.

4. DISCUSIÓN

Este seminario de título se enfocó en el estudio de la respuesta inmune innata en larvas de pez cebra y, en particular, en la resolución de esta respuesta. En los últimos años, el pez cebra ha surgido como un potencial modelo de estudio de enfermedades humanas, a pesar de la divergencia evolutiva que existe entre ellos. Por ser un organismo vertebrado, el pez cebra posee muchos órganos y tipos celulares similares a aquellos de mamíferos y actualmente existen numerosos modelos de enfermedades humanas cardiovasculares, del sistema nervioso e involucradas con la hematopoyesis, como por ejemplo el Huntington, Alzheimer, anemia, talasemia, etc. Inclusive existe un modelo de inflamación crónica, en el cual la línea mutante *Hai1* posee leucocitos que persisten en los tejidos dañados, produciéndose una inflamación no resuelta (Mathias *et al.*, 2007). Estos modelos se han logrado gracias a *screenings* de mutantes y a las herramientas genéticas disponibles para el manejo del pez cebra (Barut & Zon, 2000; Dooley & Zon, 2000; Fishman, 2001; Rubinstein, 2003). Además, una de las ventajas del pez cebra es que permite el estudio *in vivo* de los procesos celulares, a diferencia de otros modelos de estudio evolutivamente más cercanos al humano, como es el caso del

modelo murino. Cabe destacar que al efectuar los análisis en estadíos larvales del pez cebra, estamos considerando la acción exclusiva del sistema inmune innato, dado que el sistema adaptativo sólo madura al cabo de dos a tres semanas de vida; esto representa una situación única, no disponible en otros modelos usados hasta ahora. No menos relevante es el estudio en profundidad de la inmunidad en peces, aspecto que no ha sido tratado con el mismo rigor hasta ahora comparado al estudio del sistema inmune murino o humano.

En nuestro laboratorio se desarrolló recientemente un modelo de inflamación donde se induce el daño específico de los neuromastos de la LLP de forma química (d'Alençon *et al.*, 2010). En dicho trabajo se describió el reclutamiento de las células del sistema inmune a los neuromastos dañados en un proceso claramente inflamatorio. Posteriormente, se comprobó la existencia de una fase de resolución, aunque no se analizaron sus características. Existe evidencia en otros modelos de daño, como la perforación de la aleta caudal o el corte de cola en larvas, donde la resolución de la inflamación ocurre por migración retrógrada y apoptosis, respectivamente (Mathias *et al.*, 2006; Renshaw *et al.*, 2006). La discrepancia puede deberse a las características propias de los modelos de inflamación usados o a la existencia simultánea de más de un mecanismo de resolución. El objetivo de este seminario fue analizar cuidadosamente la resolución de la inflamación en el modelo de daño inducido por toxicidad de cobre y describir la ventana temporal y destino de las células inmunes durante la resolución. Y así como la inflamación es un blanco para el desarrollo de compuestos antiinflamatorios, también se evaluó el potencial que tiene la resolución como modelo para la búsqueda de fármacos

inmunomoduladores, aspecto de mayor trascendencia clínica que la inflamación misma.

El uso de las líneas transgénicas que marcan los leucocitos con proteína fluorescente verde o roja, resultó crucial para llevar a cabo este trabajo de una manera eficiente y rápida. Las células pueden ser fácilmente contadas y seguidas en el tiempo entre los 3 a 4 dpf, cuando se realizan los experimentos. Además, el uso del protocolo de daño con CuSO_4 disuelto en el agua, permite el daño simultáneo y equivalente de conjuntos grandes de individuos, facilitando el análisis estadístico. La inflamación localizada en los neuromastos representa además una ventaja para la evaluación de la inflamación y resolución, dado que son estructuras ubicadas en posiciones estereotipadas en la larva de pez cebra de 3 dpf.

Para cuantificar la inflamación provocada por daño químico en larvas, se contó el número total de leucocitos presentes en la LLP de un costado de cada larva luego del daño en lupa de fluorescencia. En una condición control, la LLP se mantiene prácticamente despejada de células del sistema inmune, por lo que un mayor número de estas luego de daño implica una respuesta inflamatoria. Utilizando el mismo método de cuantificación descrito para la inflamación, se logró examinar la fase de resolución y así describir su curso temporal durante las primeras 10 hpt (Figura 3). Se contó el número de células inmunes a intervalos regulares de tiempo luego de provocar la inflamación con CuSO_4 en larvas transgénicas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP*. Se observó que el número promedio de células inmunes disminuye paulatinamente en el tiempo. Por los análisis estadísticos realizados, la resolución neutrofílica finaliza durante las primeras 24 hpt, ya que la diferencia entre el control negativo y el experimental no es

significativa en esta etapa de la resolución (Figura Suplementaria 1). Por otro lado, en el modelo de daño por transección completa de la cola de larvas, la resolución neutrofílica finaliza alrededor de las 24 hpt (Renshaw *et al.*, 2006) y en el modelo de daño por perforación de la aleta caudal de larvas, también se observa que la resolución neutrofílica finaliza alrededor de las 24 hpt (Mathias *et al.*, 2006). A partir de esta evidencia, y de los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que la resolución neutrofílica de la inflamación mediada por neutrófilos en el modelo de daño químico de la LLP de larvas también ocurre dentro de las primeras 24 hpt. Estos resultados sugieren que el curso temporal de la resolución luego de un daño físico en larvas de pez cebra es independiente del tipo de daño inducido.

En particular, nos interesó estudiar la etapa inicial de la resolución, de 0 a 6 hpt, dado que en este intervalo el número promedio de neutrófilos disminuye abruptamente y ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que guían el comportamiento y destino de las células inmunes. Así, es posible dilucidar el momento exacto en que la resolución comienza y finaliza, tanto cualitativa como cuantitativamente.

Es interesante notar la diferencia que existe en la resolución entre las líneas *BACmpx:GFP* y *LysC:GFP* (Figura 5). Está descrito que la línea *BACmpx:GFP* marca exclusivamente neutrófilos y que la línea *LysC:GFP* marca macrófagos y posiblemente neutrófilos. En la figura 5 se observa que ambas líneas se comportan de forma similar durante la inflamación. Sin embargo, durante la resolución algunas células inmunes de la línea *LysC:GFP* tardan ligeramente más en abandonar los neuromastos dañados. Esto puede explicarse por el comportamiento que tienen los macrófagos y neutrófilos durante una respuesta inmune; está descrito que los

macrófagos migran más lentamente que los neutrófilos durante la inflamación y que además permanecen un tiempo más prolongado que los neutrófilos en la zona del daño (Ellett, *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2011).

En este estudio se evaluó el potencial de la resolución como blanco en la búsqueda de fármacos inmunomoduladores. Se ensayaron diversos compuestos que tienen un efecto antiinflamatorio en el mismo modelo de daño, y otros compuestos cuyo efecto ya ha sido descrito en otros modelos.

Los compuestos antiinflamatorios no esteroideos, como el Diclofenaco, actúan como inhibidores inespecíficos de la enzima ciclooxigenasa (COX), al inhibir ambas isoenzimas, la ciclooxigenasa-1 (COX1) y la ciclooxigenasa-2 (COX2). Estas enzimas son *pro* inflamatorias durante la fase temprana de la inflamación pero en una fase más tardía, ayudan en la resolución mediante la generación de distintas prostaglandinas (Gilroy *et al.*, 2004). Por esto, se planteó la hipótesis de que el Diclofenaco tuviese un efecto *anti* resolutorio en la resolución. Inesperadamente, el Diclofenaco no tuvo efecto alguno durante la resolución, a la misma concentración utilizada durante la inflamación en ensayos *Chln* (d'Alençon *et al.*, 2010). Es posible que se requiera de una dosis más concentrada de Diclofenaco para observar un efecto en la resolución o que simplemente existen alternativas a la vía COX por lo que el Diclofenaco no afecta la resolución.

Las prostaglandinas son un subproducto del metabolismo del ácido araquidónico por parte de las COXs, por lo que se esperaría un efecto opuesto al Diclofenaco al agregarlas durante la resolución (Gilroy *et al.*, 2004). Nuevamente el resultado fue inesperado, pues sólo una de las prostaglandinas evaluadas tuvo un

efecto sobre la resolución, y además fue opuesto al esperado ya que la Prostaglandina J₂ ralentizó la resolución. Para el caso de la Prostaglandina E₂ se puede justificar de la misma forma que para Diclofenaco, pero el caso de la Prostaglandina J₂ queda como un efecto a explorar en futuros trabajos.

Las proteínas PHD (Prolyl Hidroxylases) inhiben a Hif1 α (Hipoxia inducible factor 1 α) en condiciones de normoxia, pero en condiciones de hipoxia se inactivan y permiten la estabilización de Hif1 α . El 2,4 DPD es un compuesto que actúa como inhibidor de las PHD, al igual que dimetiloxaloylglicina o DMOG, y se demostró que en presencia de DMOG, Hif1 α extiende la supervivencia de neutrófilos durante la resolución y además preserva su actividad (Elks *et al.*, 2011). Entonces, se postula la hipótesis de que la resolución debiera verse ralentizada en presencia de 2,4 DPD, es decir, el número de neutrófilos presentes en la LLP debiera mantenerse elevado durante la resolución. Sin embargo, el resultado fue opuesto, ya que en presencia de 2,4 DPD la resolución resultó acelerada. Esto podría explicarse por las diferencias que existen entre los modelos de daño usados en ambos estudios; para el caso de DMOG el daño se provocó por transección de la cola de larvas con un escalpelo inmerso en un quimioattractante y para 2,4 DPD se siguió el protocolo de daño químico previamente descrito en este seminario. Como se mencionó previamente, el daño por transección completa de la cola provoca la apoptosis de neutrófilos durante la resolución y se describió que Hif1 α evita la apoptosis. Como se discutirá más adelante, no se observó apoptosis durante las primeras 6 horas de resolución luego del daño químico, sino migración retrógrada. Por esto, si el blanco de Hif1 α es la apoptosis, es esperable que 2,4 DPD no tenga un efecto en la resolución de la inflamación inducida por daño químico. Como la resolución se vió

acelerada en este contexto, es probable que 2,4 DPD actúe por otra vía como por ejemplo, la migración celular.

En conclusión, se comprobó la prueba de principio con los compuestos mencionados, dado que el método permitió analizar el efecto de drogas o moléculas conocidas o nuevas en la resolución. Es importante considerar que estos resultados constituyen una estrategia preclínica de búsqueda y para confirmar la eficacia de las moléculas, grado de toxicidad, etc., se requiere de estudios posteriores, incluyendo estudios en mamíferos.

La información que se tiene hasta la fecha sobre inflamación y su posterior resolución en larvas de pez cebra se ha logrado mediante estudios de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, tinciones histológicas (Sudan Black) u otras tinciones específicas de neutrófilos, como la tinción de mieloperoxidasa. Para la evaluación de apoptosis durante la resolución se han utilizado inhibidores de apoptosis, la técnica TUNEL y por último, mediante la observación por *time-lapse* de la morfología celular y pérdida de fluorescencia (Renshaw *et al.*, 2006; Loynes *et al.*, 2010).

En este trabajo, se observó mediante *time-lapse* que la resolución ocurre por migración retrógrada de neutrófilos durante las primeras 6 hpt. Se siguió la trayectoria de aquellos neutrófilos reclutados en la zona de daño durante la resolución y se observaron distintas direcciones de migración; hacia la MCI, entre neuromastos adyacentes y hacia y desde la región dorsal. Si bien, se observa una distribución homogénea en las direcciones seguidas por las células en resolución, existen claras preferencias por migraciones a lo largo de los dos ejes principales

(dorso-ventral y antero-posterior) y claramente no hay una fuga azarosa de ellas desde el sitio de daño. Es posible que la migración durante la resolución siga los caminos menos complejos para alejarse del sitio de inflamación como podrían ser los mioseptos (espacios entre los somitos) o también en las cercanías de la vasculatura. También podrían seguir de preferencia los caminos que ya han sido recorridos por las células cuando acuden al sitio de daño en la inflamación; es importante notar que durante la inflamación los neutrófilos expresan altas cantidades de metaloproteasas, como la *metaloproteinasa 9* (d'Alençon *et al.*, 2010), lo que dejaría "caminos" en la matriz extracelular que podrían seguir las células en las horas que siguen al evento inflamatorio. Es sabido que la MCI produce ligandos como el SDF1 o CXCL12 que son atrayentes para los neutrófilos que expresan el receptor CXCR4b, lo que tiende a retener estas células en la zona ventral del tronco y cola (Walters *et al.*, 2010; Yoo & Huttenlocher, 2011). Esta misma señal y otras podrían inducir la migración retrógrada hacia la MCI una vez que decae la señal pro-inflamatoria. Las señales que podrían inducir la migración hacia otras regiones del cuerpo se desconocen y abren interesantes interrogantes para futuras exploraciones.

Uno de los mayores obstáculos durante el procesamiento de las imágenes y el seguimiento de cada neutrófilo individual fue la incapacidad de individualizarlos al superponerse unos con otros en un mismo lugar (Figura Suplementaria 2). Por esto, no se pudo seguir el destino de los neutrófilos una vez que éstos dejan la zona del daño y migran por la MCI, donde se concentra la mayoría de los neutrófilos. No se descarta la posibilidad de que la apoptosis contribuya al proceso de resolución, pero en 250 casos, no observamos ninguna evidencia de apoptosis

en las células que pudieron ser seguidas; en ninguna de ellas se observó morfología y comportamiento apoptótico o la pérdida repentina de fluorescencia según lo descrito previamente (Loynes *et al.*, 2010). Sin embargo, es posible que los neutrófilos sufran apoptosis una vez que ingresan a la MCI, lo que podría confirmarse por TUNEL o experimentos con naranjo de acridina. También se propone el uso de inhibidores de la apoptosis como por ejemplo zVD.fmk o el morfolino antisentido de p53, y la evaluación de su efecto en la resolución, luego del tratamiento con CuSO₄ (Renshaw *et al.*, 2006). Para resolver esta incógnita y caracterizar más finamente la resolución, se propone para un trabajo futuro una estrategia innovadora que está basada en el sistema *Brainbow* (Weissman *et al.*, 2011). Este sistema fue diseñado inicialmente para ser utilizado en ratones, con el fin de marcar células de una misma población con distintas combinaciones de proteínas fluorescentes. Para esto se diseñó un único vector que codifica para varias proteínas fluorescentes, cada una flanqueada por distintas secuencias *loxP* (Livet *et al.*, 2007; Weissman *et al.*, 2011). La expresión estocástica de una u otra proteína fluorescente es gatillada por la escisión o inversión del ADN codificante contenido en el constructo, mediante la acción de la recombinasa Cre (Branda & Dymecki, 2004). Así, cada célula de la población que expresa el *cassette Brainbow* adopta un color al azar, dado por la combinación de proteínas fluorescentes y el número de copias que se expresen. Actualmente, ya se ha utilizado el sistema *Brainbow* en pez cebra (Pan *et al.*, 2011) y para caracterizar con mayor detalle la resolución de la inflamación, se propone el diseño de una línea transgénica que permita visualizar cada neutrófilo con un identificador distinto. Para ello, se propone usar el promotor de la peroxidasa mielóide, *mpo*, para dirigir la expresión de la proteína Cre. Al cruzar este transgénico con una línea que expresa el *cassette* de

expresión *Brainbow*, la proteína Cre podría inducir la recombinación de los sitios *lox* que flanquean las proteínas fluorescentes codificadas en el *cassette* de expresión *Brainbow*, únicamente en neutrófilos. En esta condición, se espera obtener neutrófilos que expresen combinaciones distintas de proteínas fluorescentes y por lo tanto, que sean distinguibles unos de otros. Finalmente, la metodología propuesta permitiría profundizar más en el estudio de la resolución de la inflamación así como de otros eventos inmunológicos que ocurren *in vivo*.

5. CONCLUSIÓN

- La resolución de la inflamación mediada por neutrófilos en el modelo de daño químico en la LLP de larvas de 3 dpf de pez cebra ocurre de forma estereotipada durante las primeras 10 hpt, y finaliza antes de las 24 hpt.
- La resolución de la inflamación ocurre por migración retrógrada de neutrófilos, al menos durante las primeras 6 hpt.
- Se comprobó que la resolución es un blanco ideal para el desarrollo de un método de *screening* de compuestos inmunomoduladores.

6. ANEXOS

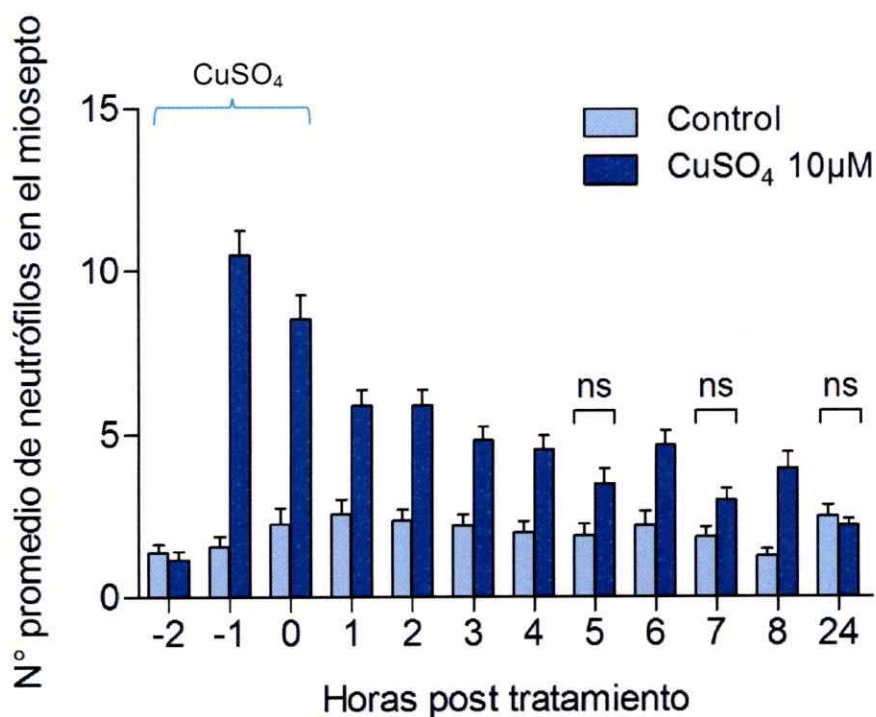


Figura Suplementaria 1. Caracterización del curso temporal de la resolución en larvas *BACmpx:GFP*. Se incubaron larvas de 3 dpf en una solución 10 µM de CuSO₄ por 2 horas a 28°C (de -2 a 0 hpt) y a las 0 hpt se lavaron. Se contó el número de neutrófilos reclutados en el miosepto a intervalos de 1 hora luego del daño con CuSO₄ en lupa de fluorescencia. Cada barra representa el número promedio de neutrófilos reclutados en una condición y tiempo. En cada tiempo existe una diferencia significativa entre tratados y controles respectivos según la prueba de ANOVA de una vía realizada, a excepción por la hora 5, 7 y 24 post tratamiento; el tiempo -2 hpt no se consideró en el análisis, ya que ninguno de los dos grupos de larvas fue expuesto a CuSO₄ en este tiempo. En el gráfico se muestra el error estándar.

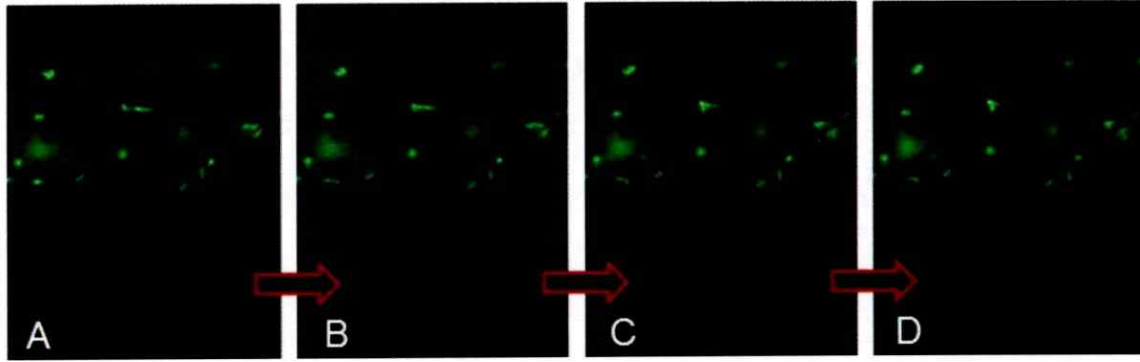


Figura Suplementaria 2. Seguimiento individual de neutrófilos durante la resolución. Se muestra el miosepto de una larva *BACmpx:GFP* de 3 dpf durante la resolución de la inflamación provocada por daño químico. La larva se fotografió cada 30 segundos y en la figura se ilustra una secuencia de 4 imágenes continuas. En (A) se observan dos neutrófilos en el miosepto claramente distinguibles, sin embargo, se pierde su identidad en (B), (C) y (D). Esta sobreposición de células representa uno de los mayores obstáculos durante el seguimiento individual de neutrófilos durante la resolución.

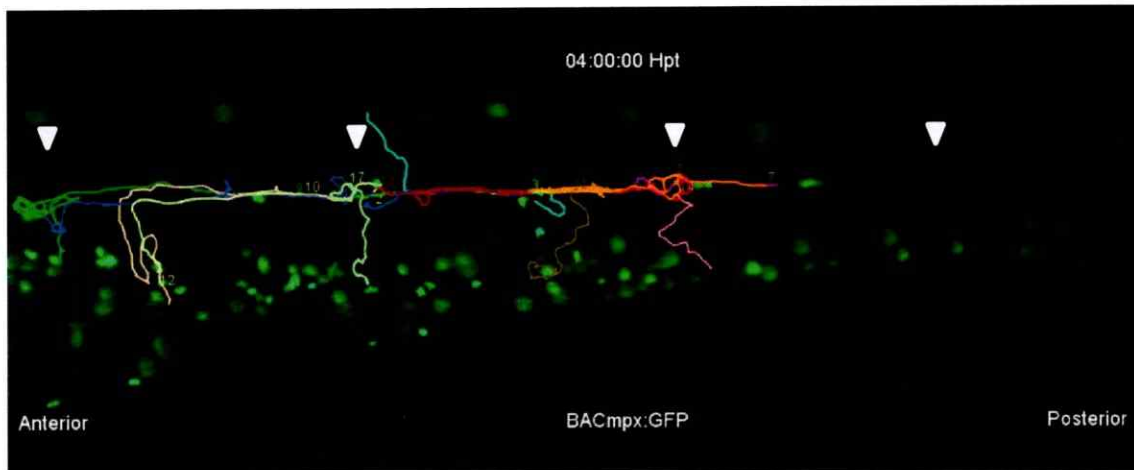


Figura Suplementaria 3. Trayectoria de neutrófilos durante la resolución. Se muestra una larva *BACmpx:GFP* de 3 dpf a las 4 hpt luego de haber inducido el daño químico. Cada color representa la trayectoria de un neutrófilo hasta las 4 hpt. Las flechas blancas indican la posición de los neuromastos. Los Tracks se generaron con el *plug-in* de ImageJ, MtrackJ. Se observa que existe una preferencia dorso-ventral y antero-posterior de los neutrófilos que migran durante la resolución.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Barut, B. a, & Zon, L. I. (2000). Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease. *Physiological genomics*, 2(2), 49-51.
- Branda, C. S., & Dymecki, S. M. (2004). Talking about a Revolution: The Impact of Site-Specific Recombinases on Genetic Analyses in Mice, 6, 7-28.
- Carradice, D., & Lieschke, G. J. (2008). Zebrafish in hematology: sushi or science? *Blood*, 111(7), 3331-42. doi:10.1182/blood-2007-10-052761
- Dambly-Chaudière, C., Sapède, D., Soubiran, F., Decorde, K., Gompel, N., & Ghysen, A. (2003). The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biology of the Cell*, 95(9), 579-587. doi:10.1016/j.biolcel.2003.10.005
- Dooley, K., & Zon, L. I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current opinion in genetics & development*, 10(3), 252-6.
- D'Alençon, C. a, Peña, O. a, Wittmann, C., Gallardo, V. E., Jones, R. a, Loosli, F., Liebel, U., et al. (2010). A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC biology*, 8(1), 151. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1741-7007-8-151
- Elks, P. M., van Eeden, F. J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C. C., Ingham, P. W., Whyte, M. K. B., et al. (2011). Activation of Hif-1alpha delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood*, 712-722. doi:10.1182/blood-2010-12-324186
- Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A., & Lieschke, G. J. (2011). Mpeg1 Promoter Transgenes Direct Macrophage-Lineage Expression in Zebrafish. *Blood*, 117(4), e49-56. doi:10.1182/blood-2010-10-314120
- Fishman, M. C. (2001). Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1290-1. doi:10.1126/science.1066652
- Gamba, L., Cubedo, N., Ghysen, A., Lutfalla, G., & Dambly-Chaudière, C. (2010). Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6358-63. doi:10.1073/pnas.0909998107
- Ghysen, A., & Dambly-Chaudière, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current opinion in neurobiology*, 14(1), 67-73. doi:10.1016/j.conb.2004.01.012
- Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., & Rossi, A. G. (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(5), 401-16. doi:10.1038/nrd1383
- Gray, C., Loynes, C., Whyte, M. K. B., Crossman, D. C., Renshaw, S., & Chico, T. J. (2011). Simultaneous intravital imaging of macrophage and neutrophil behaviour during

inflammation using a novel transgenic zebrafish. *Thrombosis and haemostasis*, 105(5), 811-9. doi:10.1160/TH10-08-0525

Hall, C., Flores, M. V., Storm, T., Crosier, K., & Crosier, P. (2007). The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC developmental biology*, 7, 42. doi:10.1186/1471-213X-7-42

Hernández, P. P., Moreno, V., Olivari, F. a, & Allende, M. L. (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing research*, 213(1-2), 1-10. doi:10.1016/j.heares.2005.10.015

Livet, Jean, Weissman, T. a, Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R. a, Sanes, J. R., et al. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166), 56-62. doi:10.1038/nature06293

Long, Q., Meng, A., Wang, H., Jessen, J. R., Farrell, M. J., & Lin, S. (1997). GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development*, 124(20), 4105-11.

Loynes, Catherine a, Martin, J. S., Robertson, A., Trushell, D. M. I., Ingham, P. W., Whyte, M. K. B., & Renshaw, S. a. (2010). Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *Journal of leukocyte biology*, 87(2), 203-12. doi:10.1189/jlb.0409255

Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Rhodes, J., Kanki, J. P., Look, A. T., & Huttenlocher, A. (2007). Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish *Hai1*. *Journal of cell science*, 120(Pt 19), 3372-83. doi:10.1242/jcs.009159

Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Ranheim, E. a, & Huttenlocher, A. (2009). Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Developmental and comparative immunology*, 33(11), 1212-7. doi:10.1016/j.dci.2009.07.003

Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T.-xi, Kanki, J., Look, A. T., & Huttenlocher, A. (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(December). doi:10.1189/jlb.0506346.1

Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I. (in press). Methods for cell and particle tracking. *Methods in Enzymology: Live Cell Imaging*.

Olivari, F. a, Hernández, P. P., & 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. doi:10.1016/j.brainres.2008.09.050

Pan, Y. a., Livet, J., Sanes, J. R., Lichtman, J. W., & Schier, a. F. (2011). Multicolor Brainbow Imaging in Zebrafish. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5546-pdb.prot5546. doi:10.1101/pdb.prot5546

- Renshaw, Stephen a, Loynes, C. a, Trushell, D. M. I., Elworthy, S., Ingham, P. W., & Whyte, M. K. B. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 108(13), 3976-8. doi:10.1182/blood-2006-05-024075
- Rubinstein L, A. (2003). Zebrafish: From disease modeling to drug discovery. *Current*, 218-223.
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 6(12), 1191-7. doi:10.1038/ni1276
- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis, 10(1), 36-46. doi:10.1038/nri2675.
- Thévenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 7, no. 1, pp. 27-41.
- Walters, K. B., Green, J. M., Surfus, J. C., Yoo, S. K., & Huttenlocher, A. (2010). Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood*, 116(15), 2803-11. doi:10.1182/blood-2010-03-276972
- Weissman, T. a, Sanes, J. R., Lichtman, J. W., & Livet, J. (2011). Generating and imaging multicolor brainbow mice. *Cold Spring Harbor protocols*, 2011(7), 763-769. doi:10.1101/pdb.top114
- Williams, J. A., & Holder, N. (2000). Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hearing Research*, 143, 171-181.
- Yoo, S. K., & Huttenlocher, A. (2011). Spatiotemporal photolabeling of neutrophil trafficking during inflammation in live zebrafish. *Journal of leukocyte biology*, 89(5), 661-7. doi:10.1189/jlb.1010567
- de Jong, J. L. O., & Zon, L. I. (2005). Use of the Zebrafish System to Study Primitive and Definitive Hematopoiesis. *Annual Review of Genetics*, 39, 481-501.