

UCh-FC
Biotecnología
M-964
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE
PREGRADO

“*olfm4.1*, un nuevo marcador molecular de neutrófilos asociado a la respuesta
inflamatoria inducida por infección bacteriana”

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

Salomé de las Nieves Muñoz Sánchez

Director del Seminario de Título: Miguel Luis Allende

Diciembre 2016

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.

“*olfm4.1*, un nuevo marcador molecular de neutrófilos asociado a la respuesta inflamatoria inducida por infección bacteriana”

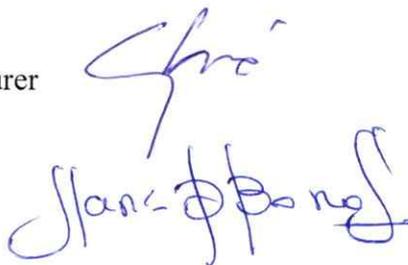
Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: Dr. Miguel Allende Connelly

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: Dr. Álvaro Glavic Maurer

Evaluador: Dra. María Rosa Bono Merino



Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



En 1988, no sin pocas complicaciones, irrumpí en la vida de mi familia con un llanto fuerte, al pasar los años cambié el llanto por las palabras y desde entonces no he parado de hacer preguntas y transmitir al mundo lo que pienso; a veces incluso a quienes no han pedido mi opinión.

Son variados los momentos en que éste, “mi don”, me ha costado caro, mas existe un espacio en que siempre es bien recibido e incluso valorado, este espacio es el mundo de las ideas, más específicamente, el mundo de las ciencias biológicas. Es por esto que puedo decir con toda seguridad que, mientras tenga algo que decir o aprender, es en la ciencia donde encontraré el lugar para hacerlo.

DEDICATORIA

A Leonor y Edgardo.

A ella por darme la vida y a él por devolvérmela.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que de algún modo contribuyeron a que esto fuera posible. Ustedes saben quiénes son, pero por si lo han olvidado.

A Leonor, Edgardo, Tommy, Gaspy, Valeria, Estephanie, Carlos, Felipe M, Claudio O, Camilo R, Stefania M. Al laboratorio AG y VP en especial a Luis S. Al laboratorio MA, en especial a Consuelo A y Nicolas C.

A Florencio E y Miguel A, gracias por creer en mí...

RESUMEN

La respuesta inmune, ya sea ante el daño tisular o infección, involucra la infiltración de leucocitos, principalmente macrófagos y neutrófilos, eliminación de debris o patógenos y restauración de la homeostasis. Una pregunta aún sin responder, dice relación a los mecanismos moleculares usados por leucocitos, para el reconocimiento específico del estímulo inflamatorio ocurrido en tejidos periféricos. Con este objetivo, se desarrolló una búsqueda de un candidato molecular capaz de distinguir entre dos principales eventos inflamatorios: infección y daño estéril de tejido. El modelo seleccionado para estudio fue la larva de pez cebra, debido a su transparencia óptica, disponibilidad de herramientas genéticas y por poseer una inmunidad conservada con respecto a mamíferos. Se seleccionó el gen *olfactomedin 4.1 (olfm4.1)* de pez cebra, un gen ortólogo al gen *Olfm4* de mamíferos, implicado en inmunidad y apoptosis. Su expresión está localizada en el páncreas y células en el tejido hematopoyético. Para determinar su expresión en neutrófilos de larvas de pez cebra, se estandarizó un protocolo para aislar esta población celular mediante *cell sorting*, usando larvas que expresan GFP en sus neutrófilos. Se encontraron altos niveles, tanto de mRNA como de proteína, del gen *olfm4.1* en las células aisladas, confirmando su expresión en neutrófilos. Cabe destacar que se observó un aumento significativo, del mRNA y proteína, de *olfm4.1* en neutrófilos de larvas de pez cebra infectados con *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, pero no cuando los peces fueron dañados con sulfato de

cobre (inflamación estéril). Por tanto, se concluye que este gen es inducido por señales relacionadas a un estímulo inflamatorio específico, y que está tal vez sea parte de la vía molecular activada por neutrófilos para la eliminación de patógenos infecciosos.

ABSTRACT

The innate immune response to tissue damage or infection involves infiltration of leukocytes, mainly neutrophils and macrophages, clearance of debris or pathogens and restoration of homeostasis. An open question concerns the molecular mechanisms that leukocytes use to specifically recognize the type of inflammatory event that has occurred in peripheral tissues. To this aim, we have carried out a search for candidate molecules that distinguish between the two main inflammatory events: infection and sterile tissue damage. The model chosen for this work is the zebrafish larva, because of its optical transparency, availability of genetic tools and conserved immunity with mammals. We chose to study zebrafish *olfactomedin 4.1* (*olfm4.1*), a gene orthologous to the mammalian *Olfm4* gene, implicated in immunity and apoptosis. Expression is localized to the pancreas and to cells in the hematopoietic tissue. In order to detect expression in neutrophils, we developed methods to isolate this cell population from larvae by cell sorting and using transgenic larvae that express GFP in neutrophils. We found high levels of both mRNA and protein of the *olfm4.1* gene in the isolated cells confirming neutrophil expression. Importantly, we detected a significant increase in *olfm4.1* mRNA and protein in neutrophils of zebrafish larvae infected with *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, but not when fish are damaged with copper sulfate (sterile inflammation). Therefore, we conclude that this gene is induced specifically by

signals related to a specific inflammatory event and that it may be part of a molecular pathway activated by neutrophils primed to eliminate an infectious pathogen.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I INTRODUCCIÓN.....	1
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
2.1 Hipótesis.....	5
2.2 Objetivos.....	5
2.2.1 Objetivo General.....	5
2.2.2 Objetivos Específicos.....	5
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1 Material Biológico.....	6
3.2 Bioinformática y análisis filogenético.....	7
3.2.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias homólogas a olfm4....	7
3.2.2 Construcción árbol filogenético de OLFM4.....	7
3.3 Hibridación in situ en larva completa.....	8
3.4 Inmunocitoquímica de neutrófilos de pez cebra in vitro.	8
3.4.1 Disección de riñón de peces adultos.....	8
3.4.2 Disgregación tejido renal de pez cebra adulto.....	9
3.4.3 Inmunocitoquímica fluorescente.....	10
3.5 Inducción de inflamación en pez cebra.....	11
3.5.1 Inflamación inducida por infección.....	11
3.5.2 Inflamación inducida por cobre.....	12
3.6 Citometría de Flujo y Cell Sorting.....	13
3.7 Análisis de la variación de expresión de RNA en respuesta al daño....	14
3.7.1 Extracción de RNA.....	14
3.7.2 Síntesis cDNA.....	15
3.7.3 qRT-PCR.....	15
3.8 Análisis Western Blot.....	17

3.9 Adquisición y procesamiento de imágenes.....	18
3.10 Análisis estadístico.....	18
IV RESULTADOS	19
4.1 Selección de un gen candidato: análisis bioinformático y filogenético.	19
4.1.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias homólogas a OLFM4	19
4.1.2 Construcción de un árbol filogenético de secuencias OLFM4	22
4.2 Expresión del gen olfm4.1 en pez cebra.....	24
4.3 Inducción de inflamación en pez cebra.	30
4.3.2 Caracterización cinética de la inflamación inducida por infección	33
4.3.3 Inflamación Estéril.....	35
4.3.4 Caracterización cinética de inflamación inducida por inmersión en solución de CuSO ₄	38
4.4 Citometría de Flujo y Cell Sorting	40
4.4.1 Identificación de la población de neutrófilos en pez cebra	40
4.4.2 Aislamiento neutrófilos de pez cebra mediante FACS.....	42
4.5 Variación de la expresión de RNA en inflamación	43
4.5.1 Evaluación de la expresión de olfm4.1 en neutrófilos de pez cebra y su variación durante la inflamación	43
4.5.2 Evaluación de los niveles de expresión de mRNA de olfm4.1 en neutrófilos de pez cebra en condiciones de inflamación.....	50
4.6 Evaluación nivel de expresión de proteína OLFM4 en inflamación.....	52
V DISCUSIÓN	54
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII BIBLIOGRAFÍA	62
VIII ANEXOS	65
8.1 Expresión olfm4.1 en pez cebra.....	65

8.2 Análisis de pureza población neutrófilos aislados por FACS.....	66
8.3 Presencia de proteína OLFM4 en pez cebra.....	67
8.4 Evaluación nivel de expresión de proteína OLFM4 en inflamación.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados para el análisis de expresión génica	16
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Alineamiento secuencias proteicas OLFM4.	21
Figura 2: Árbol filogenético proteína OLFM4.	24
Figura 4: Inmunocitoquímica fluorescente neutrófilos de pez cebra.	27
Figura 5: Inmunocitoquímica fluorescente Olfm4 en neutrófilos de pez cebra.	29
Figura 6: Inflamación inducida por infección con Salmonella Thyphimurium.	32
Figura 7: Caracterización cinética de la inflamación inducida por infección.	34
Figura 8: Cuantificación de leucocitos infiltrados en línea lateral, (modificado de (d'Alencon y col., 2010)).	36
Figura 9: Inflamación inducida por inmersión en solución de CuSO4.	37
Figura10: Caracterización cinética inflamación inducida por cobre.	39
Figura 11: Identificación de la población de neutrófilos en larvas de pez cebra.	41
Figura 12: Purificación de neutrófilos GFP+ de pez cebra.	42
Figura 13: Expresión de genes en neutrófilos aislados vs el resto de los tejidos de la larva de pez cebra.	45
Figura 14: Expresión de genes durante la inflamación inducida por infección.	47
Figura 15: Expresión de genes durante la inflamación inducida por daño con cobre.	49
Figura 16: Expresión diferencial del gen olfm4.1 en neutrófilos de pez cebra luego de la inflamación.	51
Figura 17: Análisis semicuantitativo de OLFM4 en pez cebra.	53

LISTADO ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

CHT: tejido caudal hematopoyético

cxcr4b: receptor quimioquina motivos C-X-C

dpf: Días post fertilización

GFP: green fluorescent protein

hpf: horas post fertilización

hpt: horas post tratamiento

hpi: horas post inyección

il1b: interleuquina 1 beta

mpx: mieloperoxidasa

mmp9: metaloproteinasa 9

olfm4: olfctomedin 4

SBF: Suero bovino fetal

V.O.: vesícula ótica

UFC: unidades formadoras de colonias

WB: western blot

I INTRODUCCIÓN

El término inmunidad ha sido relacionado históricamente a “protección”, específicamente, contra enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de esta, constituyen el sistema inmune, y su respuesta coordinada y colectiva ante sustancias ajenas es denominada la respuesta inmune (Abbas y col., 2015). La inmunidad está dividida, según los mecanismos que operan, en innata y adaptativa. La inmunidad innata, bloquea o elimina de manera genérica e inespecífica el crecimiento de microbios capaces de colonizar tejidos. La inmunidad adaptativa, consiste en una serie de reacciones antígeno-específicas a través de linfocitos T y B y su respuesta es precisa y tiene memoria, por tanto, ante una exposición subsecuente el sistema responde de manera más robusta y rápidamente (Parkin y col., 2001).

El rol de la respuesta inmune es combatir infecciones y daño tisular. Desde el punto de vista del sistema inmune innato, en el que se enfoca este trabajo, existen células residentes de tejido, tales como macrófagos, fibroblastos y células dendríticas y células circulantes del tipo leucocitos, tales como monocitos y neutrófilos. Estas células reconocen la invasión de patógenos o el daño tisular mediante receptores de reconocimiento de patrones, en inglés: Pattern Recognition Receptors (PRRs). Estos receptores detectan directa e indirectamente patrones moleculares asociados a patógenos, en inglés: Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Ejemplos de estos patrones conservados incluyen ácidos nucleicos, lipoproteínas, y carbohidratos

microbianos. Los receptores detectan también patrones moleculares asociados a daño, en inglés: Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). Una vez activados, los PRRs oligomerizan formando complejos de múltiples subunidades, e inician cascadas de señalización que desencadenan la liberación de factores que promueven el reclutamiento de leucocitos al lugar del daño (Newton y col., 2012). Este reclutamiento recibe el nombre de inflamación y comprende, además de leucocitos, la acumulación de proteínas plasmáticas de la sangre en tejidos sujetos a daño o infección. El mayor número de leucocitos reclutados durante la inflamación corresponde a neutrófilos, quienes guían la primera oleada defensiva contra la infección y el daño tisular. Estas células efectoras destruyen amenazas circundantes mediante fagocitosis, degranulación, liberación de especies reactivas de oxígeno y de trampas extracelulares (NETs), (de Oliveira y col., 2016).

Es importante señalar que el exceso de infiltración y activación de neutrófilos en el lugar del daño, puede causar inflamación crónica, por lo que este proceso debe ser finamente controlado. Para ello, los granulocitos deben ser eliminados del sitio inflamado y la población de de monocitos residentes de tejido debe regresar a los números y fenotipos preinflamatorios. Este proceso homeostático se denomina resolución de la inflamación (Serhan y col., 2005). Se ha sugerido que este es un proceso activo, que involucra programas moleculares particulares que se activan temprano en la respuesta inflamatoria, determinando el destino por el cual las células inmunes son eliminadas, ya sea por apoptosis o migración retrógrada, del lugar del daño.

Desentrañar los mecanismos moleculares que determinan tanto la respuesta inflamatoria como su correcta resolución es fundamental para aproximarse a terapias que solucionen las patologías relacionadas a la inflamación exacerbada o crónica. En este trabajo, nos interesamos en identificar algún marcador molecular que distinguiera entre los procesos inflamatorios inducidos por un daño estéril (inducido por DAMPs) o inducido por un agente infeccioso (estimulado por PAMPs). Dado que los neutrófilos son los actores principales del proceso, nos propusimos encontrar un gen expresado en este tipo celular que tuviera este comportamiento. Este proyecto requería disponer de un robusto modelo animal, donde se pudiera generar inflamación de manera fácil y reproducible y con una población de neutrófilos accesible para el análisis de expresión. La larva de pez cebra cumple con estos requisitos y realizamos los experimentos con este modelo animal.

Seleccionamos un gen candidato, el gen *olfactomedin4 (Olfm4)*, debido a que es una proteína involucrada en una variedad de funciones celulares, tales como proliferación, diferenciación, apoptosis y adhesión celular (Grover y col., 2010). Experimentos *in vitro* en líneas celulares cancerígenas, han establecido que estas funciones son tejido, célula y estímulo específicas (Zhang y col., 2004). El transcrito del gen humano posee expresión endógena en madura ósea, intestino delgado, estómago, colon, próstata y páncreas (Zhang y col., 2002). OLFM4 es una glicoproteína de secreción, se ha reportado su ubicación en circulación sanguínea y también en citoplasma y mitocondria (Liu y col., 2010). En neutrófilos humanos existe

principalmente en los gránulos secundarios (Clemmensen y col., 2012). Múltiples factores y vías de señalización regulan la expresión de este gen y forma complejos proteicos con moléculas involucradas en vías de señalización con roles esenciales en inflamación y carcinogénesis, tales como NF-kb y Wnt (Liu y col., 2016).

En esta tesis se propone investigar la posible expresión diferencial el gen *olfm4.1* en larvas de pez cebra sometidas a estímulos inflamatorios del tipo infeccioso y daño estéril.

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La respuesta inflamatoria de neutrófilos progresa por distintas vías moleculares cuando el estímulo es de origen estéril versus infeccioso.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Identificación de un marcador molecular diferencialmente expresado en daño estéril vs infección, en larvas de pez cebra

2.2.2 Objetivos Específicos

1. Selección de un gen candidato molecular asociado a respuesta inflamatoria en neutrófilos
2. Análisis de expresión del gen candidato identificado y validación de su expresión en neutrófilos
3. Evaluar la expresión diferencial del gen candidato en la respuesta inflamatoria generada ante un daño estéril vs infección en larvas de pez cebra.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Biológico

El modelo biológico utilizado para este estudio fue el pez cebra (*Danio rerio*, *Telostei*, *Cyprinidae*), específicamente larvas de 72 horas post fertilización (hpf) obtenidos de forma natural a partir de cruces entre peces adultos. En particular, para este estudio, se utilizó la línea transgénica *BACmpx:GFP* (Renshaw et al., 2006). El transgen contiene el promotor de mieloperoxidasa dirigiendo la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) permitiendo de este modo visualizar neutrófilos mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación de agua y aire constante, un ciclo de 14 horas luz/ 10 horas oscuridad, 28°C, pH entre 7-7,3, conductividad del agua entre 400-600 μ S y una dieta en base a *Artemia salina* suplementada con hojuelas Tetra. Los cruces entre peces adultos se realizan aislando una pareja macho hembra la noche anterior, disponiendo una separación física entre ellos. A la mañana siguiente, al momento de encenderse la iluminación del vivero, la separación física se retira permitiendo la fertilización externa de los huevos, de esta manera es posible sincronizar el momento de la fertilización para todos los cruces. Los embriones colectados se agruparon de a 50 y fueron incubados hasta alcanzar el estadio de larva de 72 hpf en las siguientes condiciones: 28°C en placas Petri con medio E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13 mM; MgSO₄ 0,33 mM) con azul de metileno 0,1%, renovando el medio diariamente. Para todos los experimentos realizados se

utilizaron sólo aquellas larvas que eclosionaron espontáneamente, ya que el uso de pinzas y enzimas para decorionar causa inflamación espontánea y se descartaron todas las larvas atrasadas en su desarrollo o con anomalías morfológicas. Todas las larvas sometidas a experimentación fueron anestesiadas con MS-222 (Tricaina; A5040; Sigma, Saint Louis, MO, USA).

3.2 Bioinformática y análisis filogenético

3.2.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias homólogas a *olfm4*

Las secuencias ortólogas al gen *olfactomedin 4* de humano (ENSG00000102837) fueron extraídas desde la base de datos *Ensembl*. Se realizó la búsqueda de las respectivas secuencias aminoacídicas, incorporando secuencias ortólogas presentes en la base de datos de secuencias no redundantes *Uniprot*. Para estandarizar la nomenclatura de cada secuencia, se usó el código *UniProt* de éstas. Finalmente las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalX 2.0.12, usando la matriz de sustitución *BLOSUM62* e iterando en cada paso del alineamiento.

3.2.2 Construcción árbol filogenético de OLFM4

Se construyó un árbol filogenético mediante la metodología de inferencia bayesiana, utilizando el programa MrBayes 3.2.0. Como archivo de entrada se utilizó el alineamiento generado previamente de 60 taxas, 57 secuencias de OLFM4 y 3 secuencias de OLFM1, éstas últimas utilizadas como grupo externo para enraizar el árbol. Se asumió una distribución gamma y un modelo de sustitución WAG. El número

de generaciones de árboles fue ajustado a 10 millones, usando una frecuencia de muestreo cada 100 generaciones. Se descartó del análisis el 10% de los árboles obtenidos. Finalmente el árbol filogenético generado fue visualizado en el programa *Fig Tree*, este permitió agrupar taxas en un clado para de este modo depurar visualmente el resultado.

3.3 Hibridación *in situ* en larva completa

Se amplificó un fragmento del cDNA del gen *olfm4.1* usando partidores basados en la secuencia presente en el genoma (Ensembl v. 8.0). A partir del fragmento de cDNA, se sintetizó una sonda de RNA antisentido usando RNA Polimerasa T7 e incorporando UTP-digoxigenina; la sonda control sentido se sintetizó con RNA Polimerasa SP6 (ver Tabla 1). Se detectó la expresión de mRNA de *olfm4.1* mediante hibridación *in situ* en embriones de 1 y 2 dpi y en larvas de 3 y 4 dpf usando las sondas de RNA y anticuerpo anti-digoxigenina-AP (1:3000, Roche, USA). La técnica se llevó a cabo utilizando como base protocolos publicados, agregando modificaciones de acuerdo al estadio de desarrollo a analizar (Thisse y col., 2008).

3.4 Inmunocitoquímica de neutrófilos de pez cebra *in vitro*.

3.4.1 Disección de riñón de peces adultos

Se utilizaron peces transgénicos adultos *BACmpx:GFP*. Antes de proceder con la disección, los peces fueron anestesiados por 3 minutos con tricaina 5% v/v en agua de sistema de acuario. Una vez anestesiados, los peces fueron sacrificados con una

sobredosis de tricafna 200-300 mg/L (Westerfield, 2007). Se procedió con la disección realizando un corte longitudinal a lo largo del tronco, usando fórceps se extrajo el intestino, gónadas y vejiga natatoria para dejar expuesto el riñón ubicado a lo largo de la región dorsal del pez. Finalmente el riñón fue almacenado en un tubo de microcentrífuga de 2 mL con PBS 1X y mantenido en hielo hasta la disgregación del tejido.

3.4.2 Disgregación tejido renal de pez cebrado adulto

Se descartó el PBS1X en el cual fue almacenado el órgano y se agregaron 500 μ L de tripsina 0,25% (Trypsin -EDTA. Sigma, St Louis, MO, USA). La mezcla se homogeneizó con una micropipeta de 1mL mediante "*up and down*" durante 5 minutos, y la reacción se detuvo agregando 1 mL de medio L15 (L-15 Leibovitz Medium. Sigma, St Louis, MO, USA) 10% suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum. Sigma, St Louis, MO, USA). La muestra se centrifugó a 6.000 g por 2 minutos a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1 mL de PBS 1X. Se centrifugó nuevamente a 6.000g por 2 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio L15 10% SBF. Finalmente la solución fue filtrada a través de la malla de un separador celular de nylon de 40 μ m (Cell Strainer 40 μ m nylon. FALCON, NY, USA). La muestra se almacenó al hielo hasta el momento de comenzar la inmunocitoquímica en frotis.

3.4.3 Inmunocitoquímica fluorescente

Las muestras de células generadas en 3.5.2 fueron cuantificadas en cámara de Neubauer y se evaluó la viabilidad celular agregando azul de tripán. La muestra fue diluida hasta obtener una concentración de 1 millón de células en 300 μ L de medio L15 10% SBF (aprox. 3.000 células/ μ L). En paralelo se preparó una placa de 24 pocillos disponiendo un cubreobjetos redondo por pocillo sobre los cuales se agregaron 500 μ L de poli-ornitina (Sigma Aldrich, USA) y se incubaron por media hora a T° ambiente en condiciones de esterilidad. Luego se removió la poli-ornitina, se lavó con agua bidestilada y se agregaron 300 μ L de la suspensión celular antes mencionada, finalmente se agregan 700 μ L de medio L15 10% SBF para completar 1 mL y se incubó O/N a T° ambiente. Al día siguiente se lava una vez con PBS1X y se agrega PFA 4% en PBS 1X por 20 minutos a T° ambiente para fijar las muestras. Pasado el tiempo se lavó 2 veces con PBS1X y se procedió a permeabilizar las muestras con 500 μ L PBS 0,1 % Tritón por 20 minutos a T° ambiente. Se lavó 2 veces con PBS1X y se bloquearon las muestras por 1 hora a T° ambiente con suero equino al 5% en PBS1X. Luego se descartó el suero y se agregaron los anticuerpos primarios anti-OLFM4 hecho en conejo y diseñado para detectar OLFM4 humana (1/50; abcam, ab85046, USA) y anti-GFP hecho en ratón (1/400; Millipore, MAB3580, USA) cada uno por triplicado y se incubaron O/N a 4°C en cámara húmeda. Se mantuvieron 2 cubreobjetos sin anticuerpo primario como controles de anticuerpo secundario. Al día siguiente se retiran los anticuerpos primarios y las muestras se incuban por 2 horas a T° ambiente con los anticuerpos secundarios

Alexa 594 anti-conejo (1/200; A31632 Invitrogen; USA), Alexa 488 anti-ratón (1/200; A11029; Molecular Probes; USA), los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma-Aldrich, USA). Finalmente se lavaron los anticuerpos secundarios con PBS1X y las muestras se montaron con Fluor Save (CalbioChem, USA) para su posterior análisis con microscopía confocal (Zeiss LSM 710).

3.5 Inducción de inflamación en pez cebra

3.5.1 Inflamación inducida por infección

Para los ensayos de inducción de inflamación por infección se utilizaron larvas transgénicas *BACmpx:GFP* de 3dpf. Las larvas fueron anestesiadas y montadas en agarosa de bajo punto de fusión 1% (V/V) (peqGOLD 35-2099; PEQ-LAB Biotechnologie, Erlangen, Alemania) disuelta en E3. Luego, fueron microinyectadas en la vesícula ótica (Deng y col., 2012) con 100 UFC de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium. Para todos los experimentos se utilizó la cepa mutante *aro A* (Sebkova y col., 2008) cultivadas en medio Luria-Bertani (LB). Para comprobar que la cantidad de bacterias fuera 100 UFC, en cada experimento se plaqueó en LB/ Ampicilina una gota generada por un pulso de microinyector, de la misma manera en que se inyectaron las larvas, se incubó la placa ON a 37°C y al día siguiente se contaron las colonias. Para la microinyección se utilizaron capilares de vidrio de Borosilicato con filamento interior (OD: 1,2mm; ID: 0,69 mm. Sutter Instrument, USA) como agujas. Para generarlas los capilares fueron sometidos a dos pulsos de altas temperaturas en un pulser de agujas

(Narashige, PC-10). A modo de control las larvas fueron microinyectadas sólo con LB. Luego ser de inyectadas las larvas fueron desmontadas cuidando no provocar daños que pudiesen causar inflamación. Tanto larvas control como experimentales fueron incubadas a 28°C y fotografiadas a intervalos de 3 horas. Las fotografías permitieron cuantificar la intensidad de fluorescencia presente en la vesícula ótica, utilizando el programa ImageJ, para establecer la cinética de inflamación, esto hasta alcanzar un total de 9 horas post tratamiento. Además, se cuantificó el número de neutrófilos en la circulación sanguínea cada 3 horas hasta alcanzar 9 horas post infección. Para ello, las larvas fueron anestesiadas por 2 minutos con Tricaína 1% en E3 y luego se contaron los neutrófilos circulantes en la arteria dorsal durante 1 minuto (Walters y col., 2010). Tanto para los experimentos de evaluación de los niveles de expresión génica como Western Blot, posterior a las 6 hrs de tratamiento, las larvas fueron disgregadas acorde a lo señalado en 3.4

3.5.2 Inflamación inducida por cobre

Para los ensayos de inducción de inflamación por daño con cobre (estéril) se utilizaron larvas transgénicas *BACmpx:GFP* de 3dpf. En placas de 6 pocillos se dispusieron 15 larvas por pocillo en un volumen de 6 mL de E3. Paralelamente se preparó una solución stock de sulfato de cobre (CuSO_4) 10 mM. A los pocillos de tratamiento experimental se les agregaron 60 μL de la solución stock, obteniéndose una solución tratamiento de 100 μM CuSO_4 en E3. Las larvas condición control y experimental fueron incubadas por 2 horas a 28°C, posterior a lo cual se realizaron 3



lavados con E3. Las larvas fueron incubadas a 28°C por intervalos de 2 horas entre los cuales se cuantificó el número de neutrófilos reclutados a lo largo del miosepto horizontal (d'Alencon y col., 2010). Para establecer la cinética de inflamación hasta alcanzar un total de 8 horas post tratamiento, se utilizó un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus). Tanto para los experimentos de evaluación de los niveles de expresión génica como Western Blot, luego de las 2 hrs de tratamiento y los lavados con E3, las larvas fueron disgregadas acorde a lo señalado en 3.4

3.6 Citometría de Flujo y *Cell Sorting*

Luego de generar la inflamación en larvas transgénicas *BACmpx:GFP* de 3 dpf, ya sea por daño estéril o por infección, se esperó el tiempo al cual se alcanza el máximo de neutrófilos reclutados (*peak* de inflamación). Pasado este tiempo se inició el protocolo de disgregación de la larva. A lo largo de todo el protocolo se trabajó manteniendo tanto los reactivos como las muestras en hielo. Se dispusieron entre 100-150 larvas anestesiadas en tubos de microcentrífuga de 2 mL, se descartó el medio E3 y se agregó 1mL de PBS1X para lavar las larvas. Se descartó el PBS1X y se agregaron 500 µL de tripsina 0,25% (Trypsin –EDTA. Sigma, St Louis, MO, USA), la mezcla se disgregó con una micropipeta de 1mL mediante “*up and down*” durante 5 minutos, la reacción se detuvo agregando 1 mL de medio L15 (L-15 Leibovitz Medium, Sigma, St Louis, MO, USA) 10% suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum. Sigma, St Louis, MO, USA). La muestra se centrifugó a 6.000g por 2 minutos a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1 mL de PBS1X. Se

centrifugó nuevamente a 6.000g por 2 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio L15 10% SBF. Finalmente la solución fue filtrada a través de la malla de un separador celular de nylon de 40 µm (Cell Strainer 40 µm nylon. FALCON, NY, USA). La muestra se almacenó al hielo hasta el momento de analizarla por citometría de flujo (FACSCanto II, Becton Dickinson) o aislarlas mediante *Cell Sorting* (FACSaria II, Becton Dickinson), los análisis fueron realizados usando el programa computacional FACSDiva (Becton Dickinson). Las células fueron separadas utilizando como parámetro la presencia GFP+. Para cada experimento se trabajó con entre 500-600 larvas por condición: control y tratamiento. Ioduro de propidio (Life technologies, USA) fue utilizado como tinción vital para descartar células muertas. Las muestras fueron almacenadas en Trizol (Trizol Reagent; Life Technologies; USA) a -80 °C hasta el momento de proceder con la extracción de RNA.

3.7 Análisis de la variación de expresión de RNA en respuesta al daño

3.7.1 Extracción de RNA

Las muestras disueltas en Trizol (Trizol Reagent; Life Technologies; USA) obtenidas en 3.5 fueron descongeladas en hielo. Luego se añadieron 200 µL de cloroformo (Merck; Darmstad, Germany) y se dejaron reposar en hielo por 10 min, posterior a lo cual fueron centrifugadas a una velocidad de 13.000g por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo de microcentrífuga de 1,7 mL y se añadieron 500 µL de isopropanol (Merck; Darmstad, Germany). Las muestras fueron luego

incubadas a -20°C por 2 hrs y centrifugadas a 13.000g durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con EtOH 75% (Merck; Darmstad, Germany). Las muestras se centrifugaron a 8000g por 8 min a 4°C, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 20 µL de agua ultrapura (Agua libre de nucleasas; Ambion; USA).

3.7.2 Síntesis cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg de RNA de las muestras obtenidas en 3.7.1. Las muestras fueron tratadas con DNAasa (RQ1, RNasa free DNasa; Promega; USA) y luego se procedió con la retrotranscripción utilizando el Kit Improm II Reverse (Promega, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

3.7.3 qRT-PCR

El análisis de expresión de RNA se realizó mediante PCR en tiempo real a partir del cDNA obtenido en 3.7.2. Para esto se utilizó el equipo de qPCR Strata Gene Mx3000P (Gene Express) utilizando Brilliant II SYBR Green (Agilent Technologies, USA). Los mix de reacción fueron incubados por 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 59 °C y 1 min a 72 °C y finalmente 1 min a 95°C, 30 seg a 59°C y 1 min a 95°C. Para cada muestra de RNA la expresión fue normalizada al gen EF-1α. Los partidores utilizados se muestran en la **Tabla 1**. En todos los casos cada PCR fue hecho con tres réplicas técnicas y tres experimentos independientes como mínimo.

Para los análisis se utilizó el programa computacional MxPro-Mx300P (Agilent Technologies, USA).

Tabla 1: Partidores utilizados para el análisis de expresión génica

Gen	Partidor	Seq Partidor 5'3'	Referencia
<i>ef-1α</i>	F	CTGGTTCAAGGGATGGAAGA	-
	R	CAGGCTTGAGGACACCAGTC	
<i>mpx</i>	F	AGGGCGTGACCATGCTATAC	(Candel y col., 2014)
	R	AGGCTCAGCAACACCTCCTA	
<i>egfp</i>	F	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	(Candel y col., 2014)
	R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	
<i>mmp9</i>	F	CATTAAAGATGCCCTGATGTATCCC	(van der Vaart y col., 2013)
	R	AGTGGTGGTCCGTGGTTGAG	
<i>cxcr4b</i>	F	CGAGCATGGGTACCATCTGCGA	(Riesco y col., 2013)
	R	GACATTGGCCTCCTGCGGGT	
<i>IL1β</i>	F	TGGACTTCGCAGCACAAAATG	(Clatworthy y col., 2009)
	R	CGTTCACTT CACGCTCTTGGATG	
<i>olfm4</i>	F	TTGGGCCAGTGTGTCTGTAA	-
	R	GCTGATGTGGATCTGGACCT	
<i>olfm4.1 (ISH)</i>	F	TGATGAAGATCCTCCTGCTG	-
	R	AAGGGCTTGGAGTCTTTTCC	

3.8 Análisis Western Blot

Larvas transgénicas *BACmpx:GFP* de 2 hrs posterior a la inflamación inducida por infección o por cobre, fueron disgregadas acorde a lo señalado en 3.5 considerando diferencias al final del protocolo. Luego de filtrar las muestras la solución a través de la malla de un separador celular de nylon de 40 μm (Cell Strainer 40 μm nylon. FALCON, NY, USA) las muestras fueron nuevamente centrifugadas a una velocidad de 7000g por 2 min a 4°C, se descartó el sobrenadante luego de lo cual se resuspendieron en 300 μL de inhibidor de proteasas en buffer de extracción de proteínas (SDS 2%; Glicerol 10%; Tris HCl pH 6,8 50 mM). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta realizar el WB para la identificación de la presencia de la proteína OLFM4. Se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril (60 μg), se separaron mediante SDS-PAGE10% y luego fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon Transfer Membranes 0,2 μm ; Milipore USA). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 8%. Luego, las proteínas unidas a la membrana fueron ensayadas para los anticuerpos primarios anti-OLFM4 hecho en conejo (1/3000; abcam, ab85046; USA) y anti- β actina hecho en ratón (1/2000; SC-47778, Santa Cruz; USA) seguidos de los anticuerpos secundarios anti-conejo HRP (1/2000; SC-2004, Santa Cruz Biotechnology; USA) y anti-ratón HRP (1/2000; SC-2005, Santa Cruz Biotechnology; USA). Las bandas fueron visualizadas por la emisión de una señal quimioluminiscente utilizando el kit de detección *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific; USA)

3.9 Adquisición y procesamiento de imágenes

La adquisición de imágenes *in vivo* se realizaron utilizando un estereoscopio de fluorescencia (MVX10, Olympus) acoplado a una cámara fotográfica digital (Micropublisher 3.3, QImaging) o un microscopio de epifluorescencia (IX81, Olympus). La adquisición de imágenes *in vitro* se realizaron utilizando microscopía confocal (LSM 710, Zeiss). Para la generación de *Time Lapse in vivo* se utilizó microscopio de epifluorescencia (IX81, Olympus) y las larvas fueron anestesiadas y montadas en Agarosa de bajo punto de fusión 1% en E3.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas en el programa Image J (Versión 4.2).

3.10 Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedios \pm error estándar. El número de experimentos independientes y números de individuos en cada experimento se indica en la leyenda de la figura. El análisis estadístico fue realizado usando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. El nivel de probabilidad para la significancia estadística fue: $p < 0,005$.

IV RESULTADOS

4.1 Selección de un gen candidato: análisis bioinformático y filogenético

4.1.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias homólogas a OLFM4

olfm4 es un miembro de la familia de genes olfactomedin, que se caracterizan por compartir un dominio C-terminal del tipo olfactomedin. Este gen es expresado principalmente en células de linaje mieloide y en el tracto intestinal y regula múltiples funciones tales como diferenciación y crecimiento celular (Grover y col., 2010). Estudios *in vitro* localizaron la proteína en gránulos-específicos de neutrófilos (Clemmensen y col., 2012). Dada la relevancia biológica de esta molécula y en particular teniendo en cuenta su potencial vínculo con la función inmune, se inició la caracterización de este gen en pez cebra, donde es posible analizar su rol *in vivo*.

En primera instancia se identificaron todas las secuencias ortólogas al gen *olfm4* humano (ENSG00000102837) en pez cebra utilizando la base de datos Ensembl. En el genoma de pez cebra existen dos parálogos para el gen: *olfm4_1_2* (*Danio rerio*, ENSDARG00000041960) y *olfm4_2_2* (*Danio rerio*, ENSDARG000000087625), ambos en el cromosoma 17. Luego se obtuvieron las respectivas secuencias aminoacídicas y se alinearon de acuerdo a lo indicado en la sección 3.2.1. La Figura 1 muestra el alineamiento entre las secuencias aminoacídicas humana y de pez cebra. Ambos parálogos de pez cebra presentan un 31% de identidad respecto la secuencia humana. En particular, la región C-terminal, muestra la mayor identidad de secuencia, ya que

corresponde al dominio olfactomedin que define la familia. De aquí en adelante, llamamos al par de parálogos *olfm4.1* y *olfm4.2*.

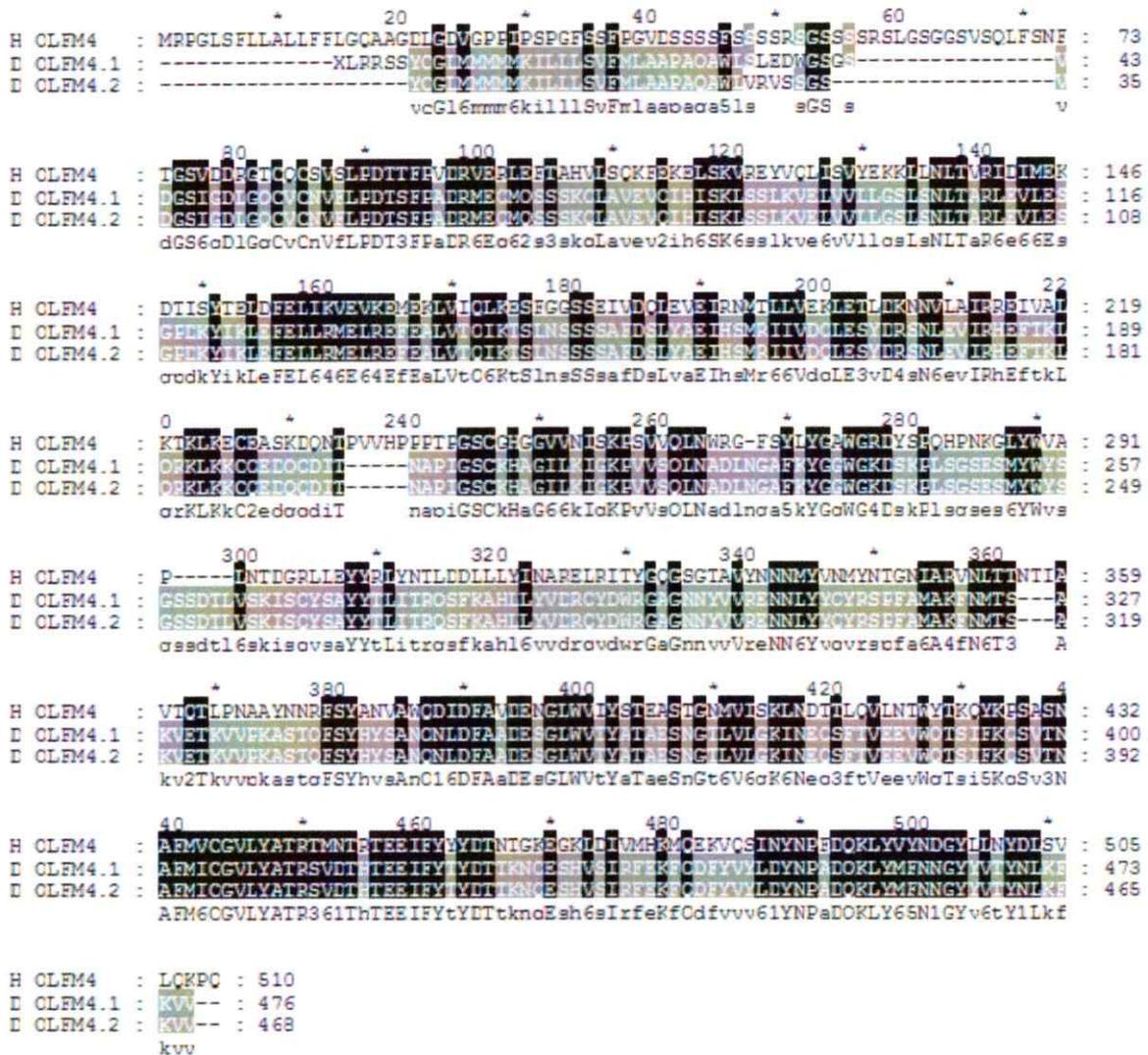


Figura 1: Alineamiento secuencias proteicas OLFM4.

Alineamiento entre secuencias de proteínas OLFM4 Homo sapiens (H OLFM4, 510 aa) y Olfm4.1 Danio rerio (D OLFM4.1, 476 aa), Olfm4.2 Danio rerio (D OLFM4.2, 468 aa). Las secuencias poseen un 31% de identidad entre ellas. En la figura, negro indica identidad de la columna, gris indica identidad de grupo.

4.1.2 Construcción de un árbol filogenético de secuencias OLFM4

Al momento de realizar la búsqueda de ortólogos del gen *olfm4*, como se señaló en la sección 4.1.1, se identificaron dos parálogos para el gen en pez cebra. Dada que la duplicación de genes normalmente se acompaña de una subfuncionalización o una neofuncionalización, decidimos asumir que una mayor conservación de secuencias llevaría a una mayor conservación funcional. Para analizar este punto, se decidió utilizar un enfoque filogenético en base a las secuencias aminoacídicas de estos genes. Se construyó un árbol filogenético utilizando un alineamiento de 60 taxas, 57 secuencias de OLFM4 y 3 secuencias de OLFM1, estas últimas utilizadas como grupo enraizante y el árbol fue visualizado utilizando el programa Fig Tree (Figura 2). El árbol filogenético obtenido entregó como resultado que de las dos variantes de *Olfm4* de pez cebra, la variante *olfm4.1* (cód. uniprot: F1QXE0) se encuentra más emparentada con las secuencias de vertebrados superiores, incluyendo OLFM4 de Humano y por tanto es el mejor candidato a conservar la función original de la proteína. Para efectos de esta tesis, se continuó el estudio en base a esta secuencia.

Figura 2: Árbol filogenético proteína OLFM4.

Las secuencias aminoacídicas OLFM1 de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Danio rerio* fueron utilizadas como grupo externo enraizante. La familia OLFM4 presenta duplicaciones iniciales (Nodo A) que dan origen a proteínas en reptiles y aves. Los nodos B y C dieron origen a OLFM4 en mamíferos, peces y otros organismos superiores. Las flechas azules señalan, de arriba hacia abajo, las secuencias proteicas de *Mus musculus* (cód. uniprot: D3YYD0) y *Homo sapiens* (cód. uniprot: Q6UX06). Las flechas rojas señalan de arriba hacia abajo a los parálogos de *Danio rerio*: Olfm4.2 (cód. uniprot: E7EY81) y Olfm4.1 (cód. uniprot: F1QXE0). El análisis dio como resultado que éste último está más evolutivamente emparentado a las secuencias humanas y de ratón.

4.2 Expresión del gen *olfm4.1* en pez cebra

Considerando los antecedentes descritos en mamíferos, en los cuales el gen *olfm4* se expresa en células inmunes y también en otros tejidos, indagamos en el perfil de expresión del ortólogo de pez cebra. En primer lugar, corroboramos la expresión del mRNA de *olfm4.1* por RT-PCR convencional. Se detectó el transcrito de *olfm4.1* a las 96hpf, estadio en el cuál todos los tejidos y órganos del pez cebra se encuentran presentes (Anexo 1). Luego, examinamos el patrón de expresión del gen mediante hibridación *in situ*, usando una sonda específica marcada con digoxigenina y revelada con una tinción de color violeta (Figura 3). Mediante la hibridación en *whole mount*, observamos la distribución de los transcritos en los embriones y larvas de 1, 2, 3 y 4 días post fecundación. Observamos una marca localizada en el páncreas, órgano que se diferencia a partir de los 2 dpf pero cuyo primordio se detecta en 1 dpf. Además, a los 3

y 4 dpf, detectamos marca en células discretas ubicadas en la cola ventral, donde se ubica el tejido hematopoyético primitivo, la *caudal hematopoietic tissue*. Este es el lugar anatómico donde esperaríamos encontrar la mayoría de los neutrófilos en estos estadios de desarrollo. Dado que no disponemos de un método que nos permita identificar estas células, resolvimos examinar la expresión de la proteína Olfm4 con el objeto de confirmar su expresión en neutrófilos.

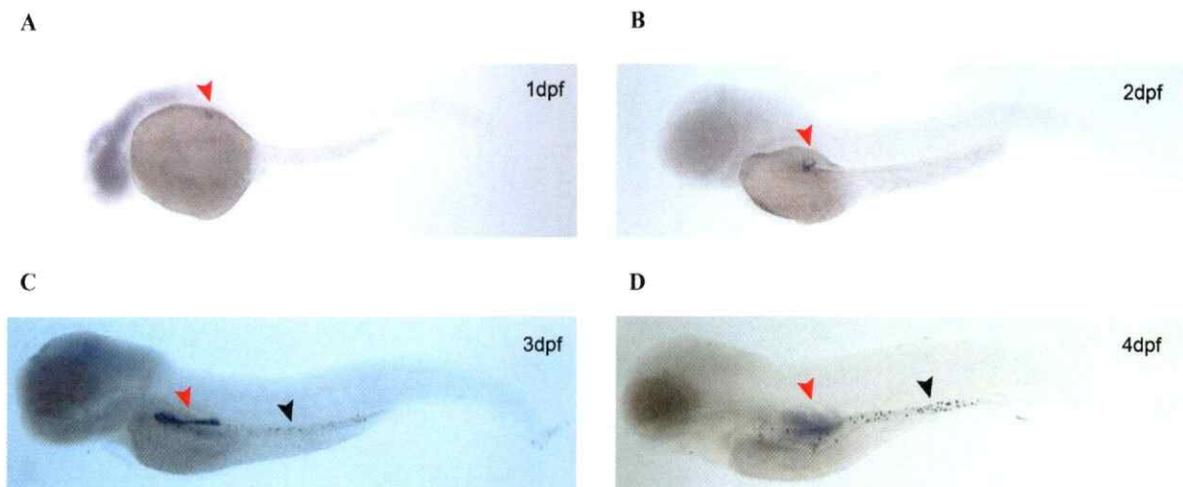


Figura 3: Hibridación in situ *olfm 4.1*. Distribución del transcrito *olfm4.1* durante el desarrollo del pez cebra.

Se muestra el patrón de expresión entre los días 1 y 4 post fecundación (dpf). Se observa una fuerte expresión en el páncreas (cabeza de flecha roja), particularmente notoria a los 3dpf. Se observa a los 3 y 4dpf, la aparición de marca puntiforme, concentrada en el tejido hematopoyético (cabeza de flecha negra).

Para detectar la proteína Olfm4 se diseñó un protocolo de Inmunodetección utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína OLFM4 humana, ya que esta posee un alto grado de identidad de secuencias aminoacídicas con las proteínas Olfm4 de pez cebra. Para el ensayo se usaron células provenientes de riñones de peces transgénicos adultos *BACmpx:GFP*. Esta línea transgénica fue generada utilizando el promotor del gen mieloperoxidasa dirigiendo la expresión de la proteína fluorescente verde. Si bien, hasta la fecha, el tipo celular no se ha definido inequívocamente para esta línea transgénica, existe un consenso en la comunidad científica, en llamar “Neutrófilos” a las células marcadas en estos peces. En relación al uso de riñones de pez cebra adulto, este órgano es equivalente a la médula ósea de mamíferos, la cual corresponde al órgano hematopoyético definitivo (Cumano y col., 2007). La Figura 4 muestra el resultado del aislamiento y preparación de las células de riñón. Los núcleos celulares se marcaron con la tinción TOPRO (color azul), mientras que los neutrófilos se distinguen del resto de las células presentes por la expresión de GFP (color verde). Observamos numerosas células marcadas tanto con TOPRO como GFP indicando que pudimos aislar neutrófilos eficientemente desde el riñón adulto. Al realizar inmunofluorescencia en ausencia del anticuerpo primario anti-OLFM4 (marca roja), no se observó tinción, por tanto se descarta que la marca OLFM4+ lograda en experimentos posteriores se deba a la unión inespecífica del anticuerpo secundario visible en el espectro de emisión de fluorescencia rojo (Figura 4C).

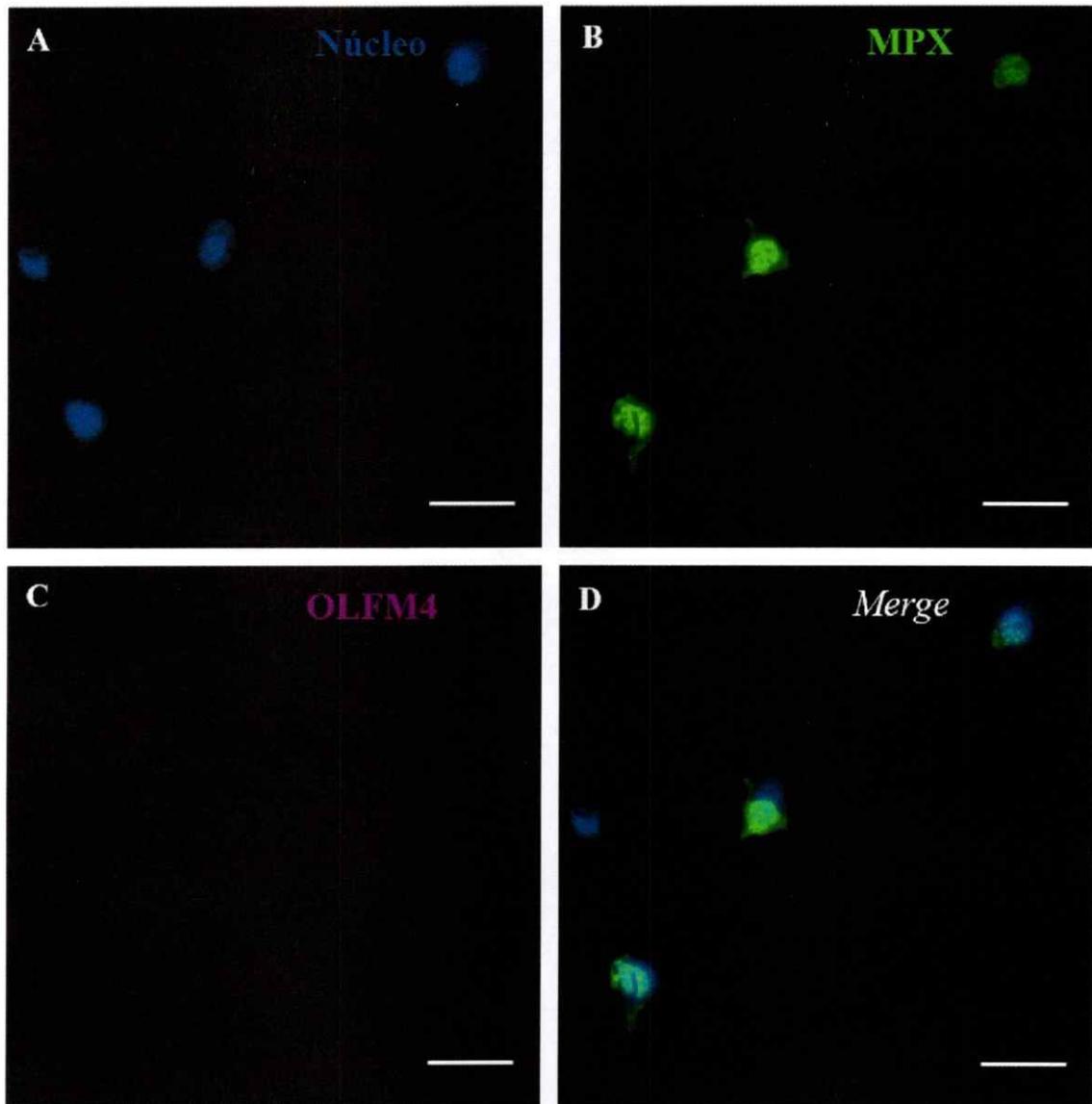
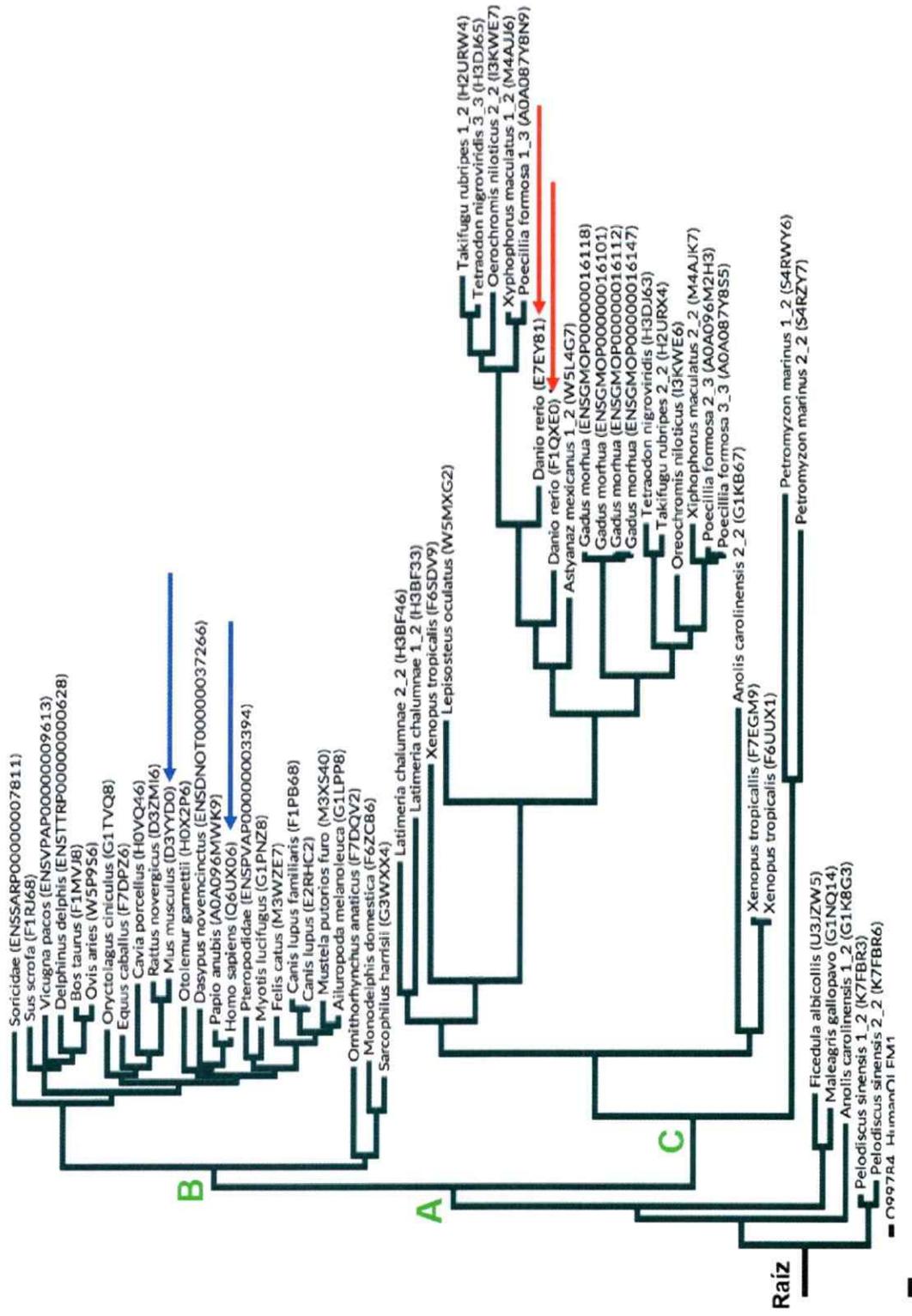


Figura 4: Inmunocitoquímica fluorescente neutrófilos de pez cebra.

Imagen de microscopía confocal de un frotis generado a partir de tejido de riñón de pez cebra adulto (*tg(BACmpx:GFP)*). Inmunocitoquímica fluorescente con anticuerpo secundario visible en rojo, en ausencia de anticuerpo primario anti-OLFM4. En (A) se muestra la emisión de fluorescencia en el azul y la marca generada por los núcleos de las células marcadas con TOPRO. En (B) se muestra la emisión de fluorescencia en verde y la presencia de marca correspondiente a neutrófilos GFP positivos. En (C) se muestra el canal de detección en el



espectro de emisión de fluorescencia rojo y la ausencia de marca. Por último en (D) la combinación de los tres canales, *merge*. Barra de tamaño equivale a 10 um.

Una vez estandarizado, el protocolo de inmunocitoquímica de neutrófilos de pez cebra aislados fue utilizado para analizar la presencia de la proteína Olfm4. En la Figura 5 se observa una célula GFP+/DAPI+, lo que la identifica como un neutrófilo, de acuerdo a lo señalado previamente. De manera importante, la misma célula posee la marca OLFM4+ visible en el canal rojo. La marca tiene una distribución citoplasmática lo cual coincide a lo previamente reportado (Liu y col., 2010). Concluimos que los neutrófilos de pez cebra expresan la proteína Olfm4.

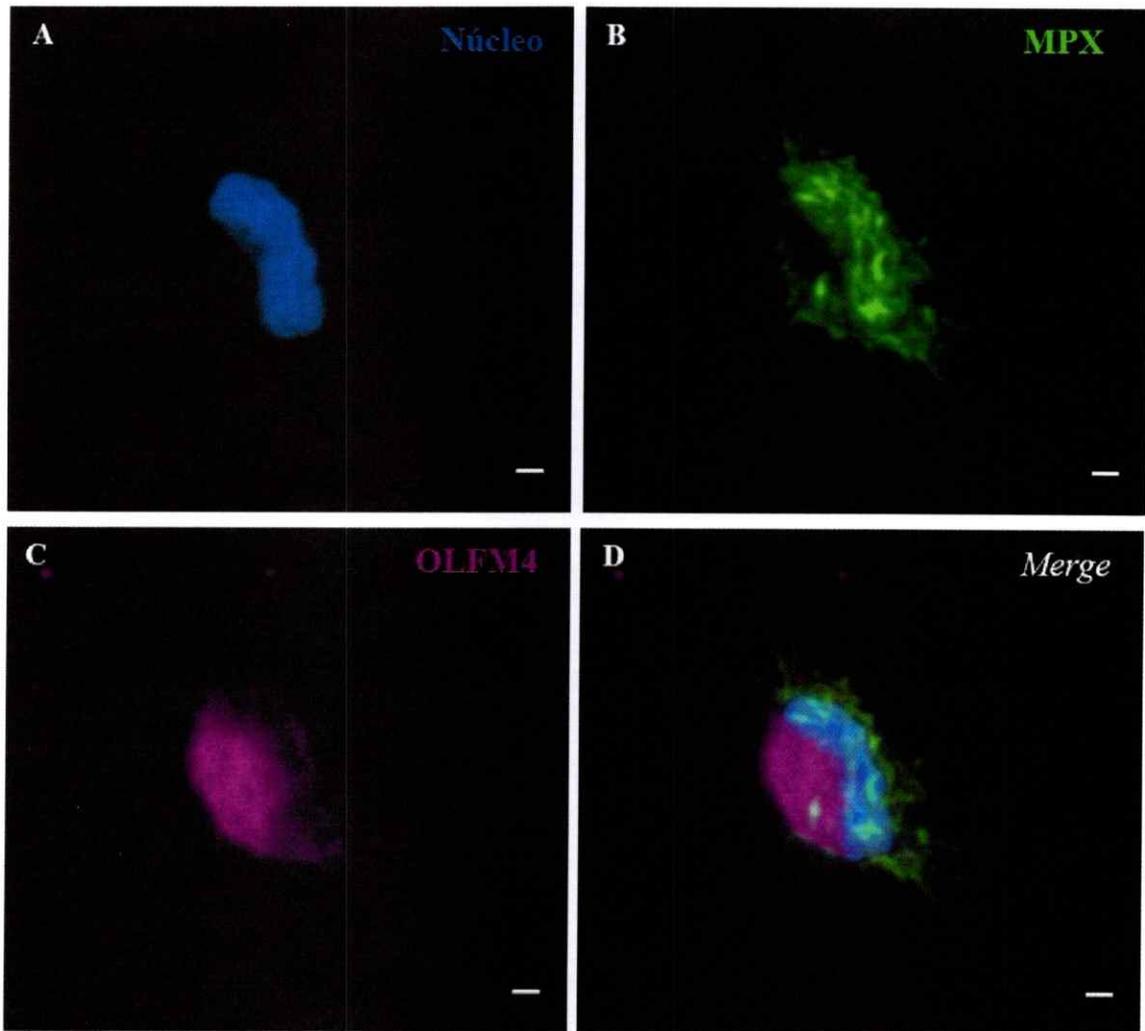


Figura 5: Inmunocitoquímica fluorescente Olfm4 en neutrófilos de pez cebra.

Imagen de microscopía confocal de un frotis generado a partir de tejido de riñón de pez cebra adulto (*tg(BACmpx:GFP)*). Inmunocitoquímica fluorescente realizada en presencia de anticuerpo primario anti-OLFM4 visible en rojo. En (A) se muestra la emisión de fluorescencia en azul y la marca generada por los núcleos marcados con DAPI. En (B) se muestra el canal de detección en el espectro de emisión de fluorescencia verde la presencia de marca correspondiente a neutrófilos. En (C) se muestra en magenta la emisión de fluorescencia en el rojo y la marca generada por la presencia de la proteína Olfm4. Por último en (D) la combinación de los tres canales, *merge*. La barra de tamaño equivale a 1 μ m.

4.3 Inducción de inflamación en pez cebra.

Una vez determinada la presencia de la proteína Olfm4 en neutrófilos de pez cebra, fue posible diseñar experimentos que permitieran determinar su posible expresión diferencial en la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos en pez cebra. Para ello se estandarizaron dos protocolos de inducción de la inflamación: inflamación inducida por infección e inflamación inducida por daño estéril con cobre.

El sistema inmune innato es el primer mecanismo involucrado en la defensa de un organismo. Una característica de este sistema es la respuesta inflamatoria, donde leucocitos, principalmente neutrófilos, infiltran el tejido dañado y generan un ambiente tóxico para los patógenos y favorable para los procesos regenerativos. Las señales proinflamatorias pueden provenir de distintas fuentes como por ejemplo daño estéril o infección. En la inflamación, los neutrófilos son los actores predominantes y son los primeros leucocitos en ser reclutados al lugar del daño. Utilizando nuevamente larvas transgénicas de 3dpf *BACmpx:GFP*, cuyos neutrófilos GFP+ pueden ser visualizados *in vivo* gracias a la transparencia de la larva de pez, caracterizamos el proceso inflamatorio, analizando la expresión de *olfm4.1* en ambos contextos.

4.3.1 Inflamación inducida por infección.

Para las infecciones se utilizó la bacteria *Salmonella enterica serotipo Typhimurium (S.T.)*. Esta bacteria es un patógeno intracelular ampliamente distribuido en la naturaleza que causa gastroenteritis a humanos y otras especies (Kouadio y col., 2012). Para los ensayos de inflamación en pez cebra, se utilizó una cepa mutante, S. T. aroA, cepa que presenta mutaciones en genes que participan en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y, por lo tanto, incapaces de producir metabolitos aromáticos, principalmente aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina y triptófano (Sebkova y col., 2008).

Las infecciones fueron realizadas de acuerdo a lo descrito en 3.5.1. La Figura 6 muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos. La inyección control usando sólo el medio de cultivo bacteriano (LB) estéril, no indujo reclutamiento de células inmunes, lo que descarta un proceso inflamatorio asociado a la microinyección. Por otro lado, se observó un reclutamiento notorio de neutrófilos en larvas inyectadas con *Salmonella (S.T.)* el cual está focalizado exclusivamente a la región delimitada por la vesícula ótica.

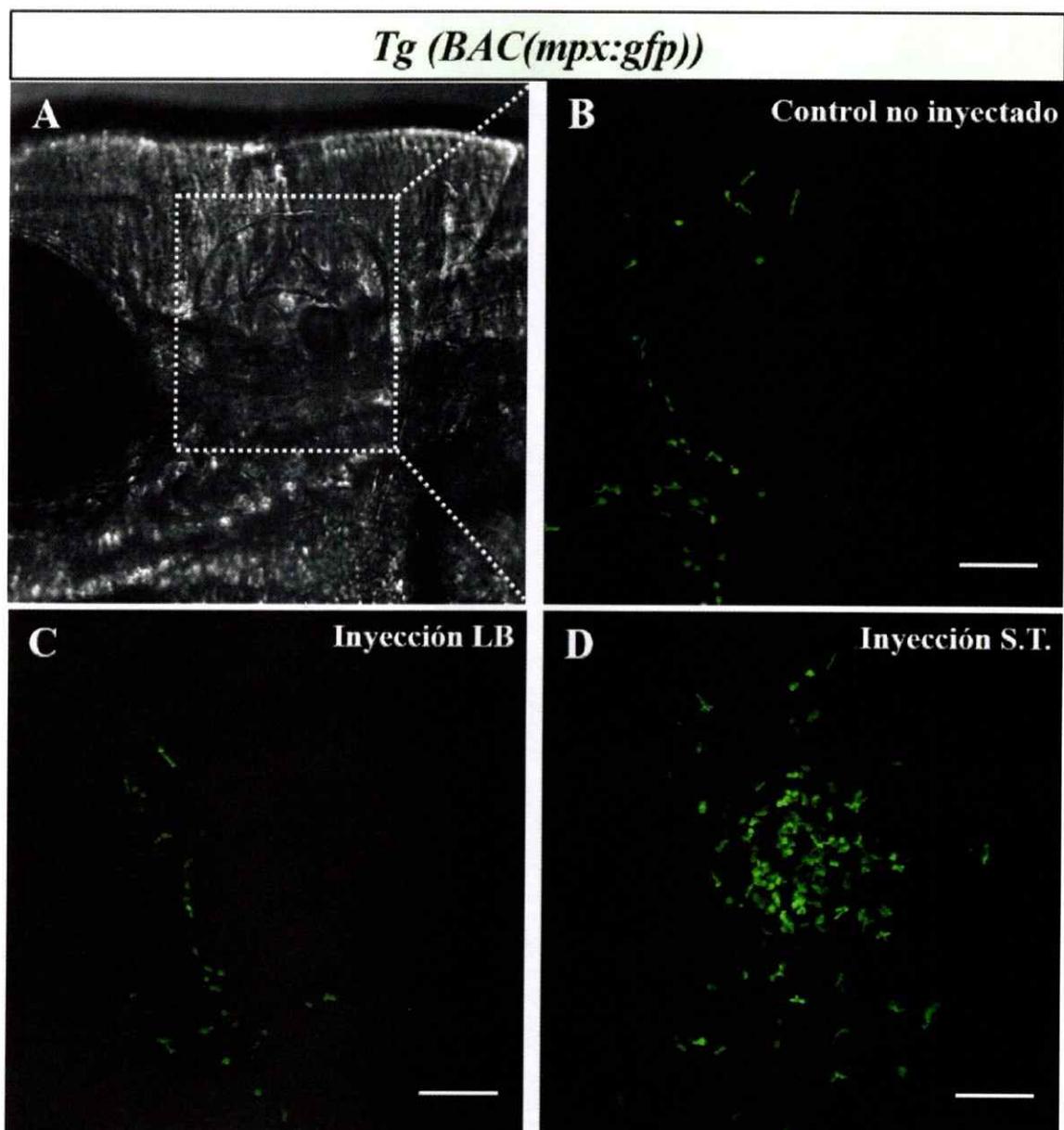


Figura 6: Inflamación inducida por infección con *Salmonella Typhimurium*.

Imágenes de microscopía confocal en larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf. En (A) imagen campo claro, el cuadrado blanco destaca región que incluye la vesícula ótica V.O. (B), (C) y (D) zoom de la misma región mostrada en A, en el canal de detección en el espectro de emisión de fluorescencia verde. (B) V.O. de una larva control no inyectada. (C) V.O. larva control inyectada

solamente con medio de cultivo LB 8 hpi. (D) V.O. larva inyectada con 100 UFC de *S.T.* en 8 hpi. 100 um.

4.3.2 Caracterización cinética de la inflamación inducida por infección

Para precisar los tiempos adecuados para medir los niveles de transcrito de *olfm4.1* en neutrófilos que corresponde a la infección, se realizó una caracterización de la cinética de la inflamación generada en respuesta a infección. Se tomaron imágenes a las larvas *BAC:mpx* infectadas desde 1 hora post infección (hpi) hasta 9 hpi. Se delimitó la zona inflamada en las imágenes en campo claro (localizando el área alrededor de la vesícula ótica) y luego se capturaron imágenes de las células marcadas con GFP bajo iluminación UV. La gran cantidad de células reclutadas no permitió una cuantificación individual, ya que era difícil distinguir entre un neutrófilo, u otro por lo que se decidió medir la intensidad de fluorescencia en el área utilizando el software ImageJ. La Figura 7A muestra como el reclutamiento de neutrófilos en la condición de infección es significativo respecto al control (inyección de LB) desde las 3 hpi, alcanzando su máximo a las 6 hpi. En 7B es visible la tendencia a la disminución a partir de las 9 hpi. La Figura 7C revela el aumento de neutrófilos en circulación debido a la infección con *S.T.* Esto se debe a que neutrófilos deben desplazarse desde el CHT hasta la V.O., y una parte de ellos lo hace por la circulación sanguínea y extravasación.

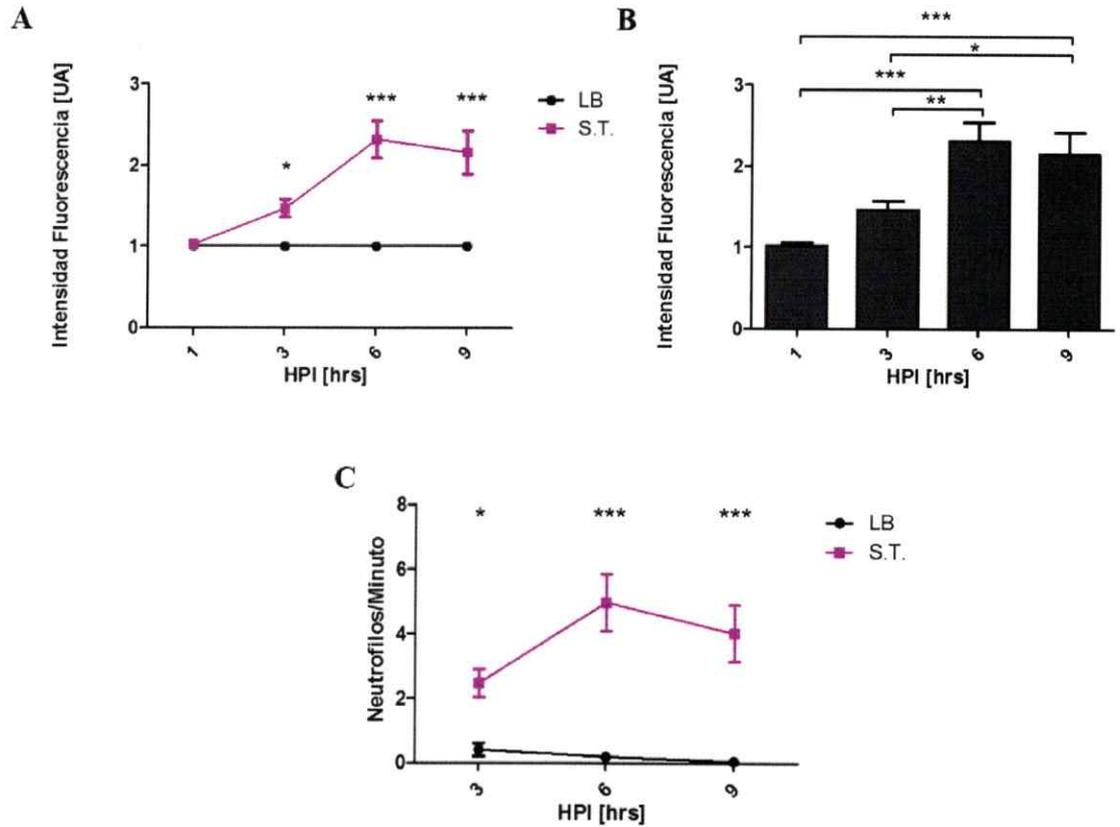


Figura 7: Caracterización cinética de la inflamación inducida por infección.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf fueron inyectadas con 100 UFC de *S.T.* (A) Cuantificación intensidad de fluorescencia emitida en V.O. La máxima intensidad de inflamación se alcanza a las 6 hpi. (B) Detalle de la cinética indica la tendencia a la disminución en la intensidad de fluorescencia en la V.O. N=5, n=10. (C) Cuantificación del número de neutrófilos en circulación muestra un aumento significativo en respuesta a la infección, con un máximo a las 6 hpi. N=4, n=6. Las comparaciones fueron realizadas mediante ANOVA de dos vías (A y C) y por ANOVA de una vía en (B). Post test Bonferroni en todos los casos. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

4.3.3 Inflamación Estéril

Para inducir la inflamación por daño estéril se utilizó la inmersión en solución de sulfato de cobre. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio caracterizaron los efectos del cobre en estadios tempranos de desarrollo del pez cebra, estos determinaron que el pez cebra es capaz de captar y acumular el cobre disuelto en el medio de un modo exposición-tiempo dependiente (Hernandez y col., 2011). Un segundo estudio obtuvo como resultado que ante un daño a los neuromastos inducido por cobre en larvas de pez cebra, se desarrolla rápidamente una respuesta inmune innata específica y altamente reproducible (d'Alencon y col., 2010). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizó el protocolo de inflamación por inmersión en cobre ya estandarizado en el laboratorio. La Figura 8 muestra de manera esquemática la región donde se realizaron las cuantificaciones de neutrófilos reclutados.

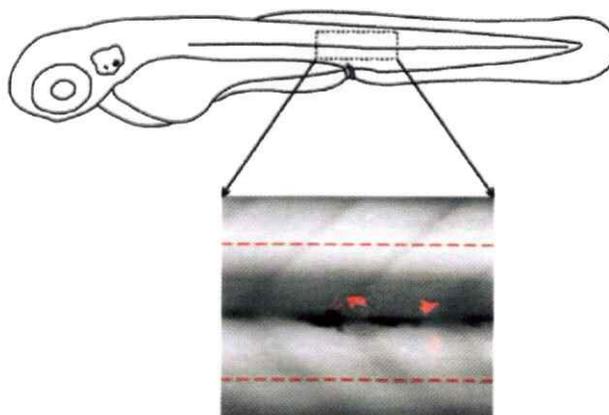


Figura 8: Cuantificación de leucocitos infiltrados en línea lateral, (modificado de (d'Alencon y col., 2010)).

Esquema de una larva de pez cebra de 3 dpf. El área encuadrada corresponde a una sección del miosepto horizontal (línea). Se delimitó un área aproximada de 10 diámetros celulares alrededor del miosepto (líneas punteadas rojas) que corresponde al área dónde los leucocitos fueron cuantificados manualmente para los experimentos de inducción de la inflamación por inmersión en solución de cobre.

La Figura 9 corresponde a una imagen representativa de la respuesta inflamatoria generada ante el daño por cobre previamente señalado. En la Figura 9A se observa en campo claro una larva control y el miosepto horizontal donde se realizaron las cuantificaciones. En la Figura 9B, capturada bajo iluminación UV, se observa que no hay presencia de neutrófilos en el miosepto horizontal en larvas control. En cambio, en las larvas expuestas a cobre (Figura 9C), se observa una gran cantidad de neutrófilos reclutados a lo largo del miosepto horizontal y en particular un aumento en la densidad en las regiones donde se ubican los neuromastos de la línea lateral posterior.

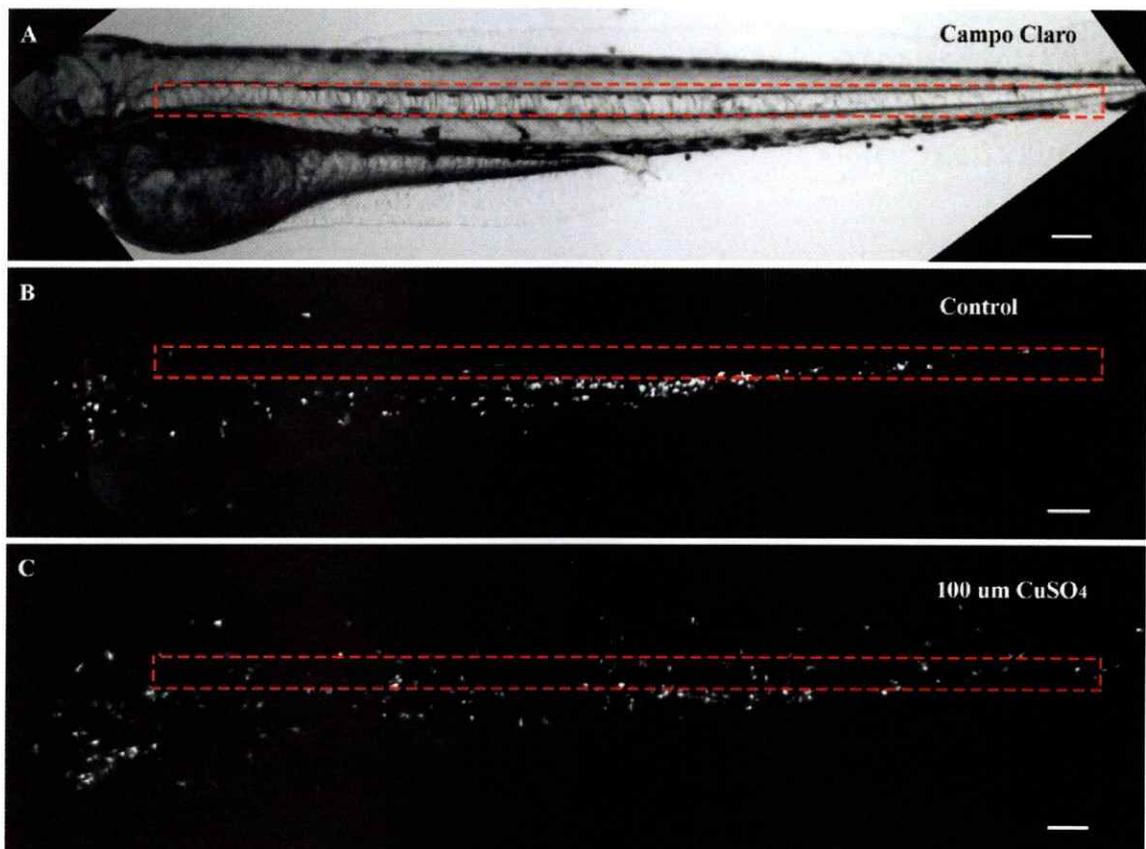


Figura 9: Inflamación inducida por inmersión en solución de CuSO_4 .

Imágenes microscopía epifluorescencia larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf. En (A) imagen campo claro muestra el miosepto horizontal. (B) y (C) canal de detección en el espectro de emisión de fluorescencia verde. (B) larva control, inmersión en E3. (C) larva tratada, inmersión 2 hrs en solución $100 \mu\text{M}$ CuSO_4 , la imagen corresponde a media hora post tratamiento y muestra gran cantidad de neutrófilos reclutados a lo largo del miosepto horizontal (rectángulo rojo).

4.3.4 Caracterización cinética de inflamación inducida por inmersión en solución de CuSO₄

Se realizó, al igual que para la infección, una caracterización de la cinética de la inflamación para determinar en qué momento del proceso se llevarían a cabo los análisis transcripcionales. Se cuantificaron los neutrófilos reclutados a lo largo del miosepto horizontal por un lado del pez. Esto se realizó manualmente a partir de 0 horas post tratamiento (hpt), hasta 8 hpt en estereoscopio de fluorescencia en el espectro de emisión GFP. La Figura 10 muestra como el reclutamiento ya es significativo respecto al control desde las 0 hpt, alcanzando su peak en este mismo punto para luego ir disminuyendo paulatinamente. A las 8hpt ya no se observan diferencias significativas respecto al control.

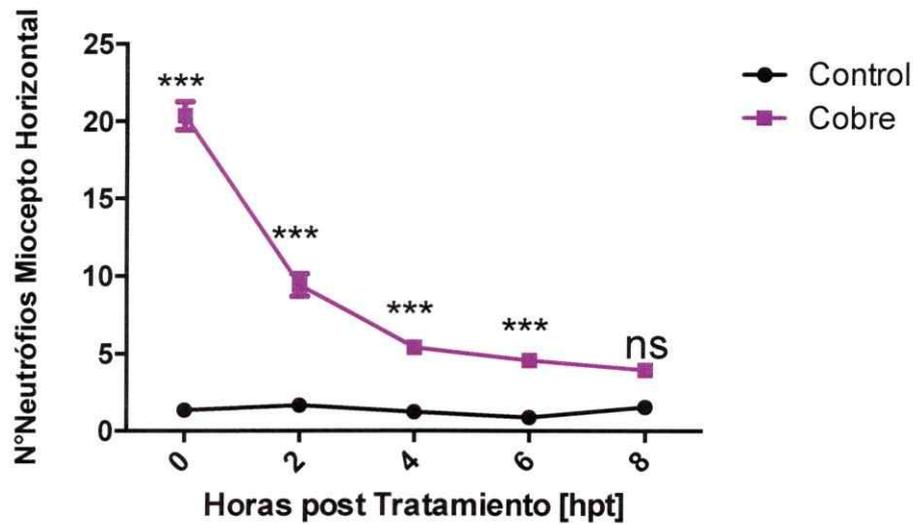


Figura10: Caracterización cinética inflamación inducida por cobre.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf inmersas 2 hrs en solución 100 μ M CuSO₄. Cuantificación número de neutrófilos reclutados a lo largo del miosepto horizontal. El máximo de inflamación se alcanza a las 0 hpt. N=3, n=8. Las comparaciones fueron realizadas mediante ANOVA de dos vías y Post test Bonferroni. ***, $p < 0,001$

Una vez caracterizadas las respuestas inflamatorias, tanto para infección como para el daño estéril, desde el punto de vista del reclutamiento de neutrófilos, se procedió a analizar la posible expresión diferencial de *olfm4.1* en estos procesos, tanto a nivel de mRNA como de proteína.

4.4 Citometría de Flujo y *Cell Sorting*

Para analizar la respuesta transcripcional de *olfm4.1* en neutrófilos durante el proceso inflamatorio se usó citometría de flujo y *Cell Sorting* para obtener neutrófilos aislados. Se utilizó esta tecnología ya que deseábamos obtener información cuantitativa de la expresión génica sólo en la población celular de interés y no en todo el organismo.

4.4.1 Identificación de la población de neutrófilos en pez cebra

En primera instancia, se identificó la población de neutrófilos en larvas de 3dpf de la línea transgénica *BACmpx:GFP* mediante su expresión de GFP. Para ello las larvas transgénicas y sus hermanas no transgénicas (*siblings*) fueron disgregadas de acuerdo a lo indicado en la sección 3.4 y se realizó citometría de flujo. La Figura 10 muestra los resultados de este análisis, en que las larvas silvestres (Figura 11A) se comparan con las transgénicas (Figura 11B). La población celular señalada como P2, presente en la muestra de las larvas transgénicas y ausente en las no transgénicas, incluye los eventos GFP+ que corresponden a los neutrófilos. La población P2 representa un 0,2% del total de eventos analizados luego de descartar los eventos positivos para yoduro de propidio, los cuales corresponden a eventos no viables.

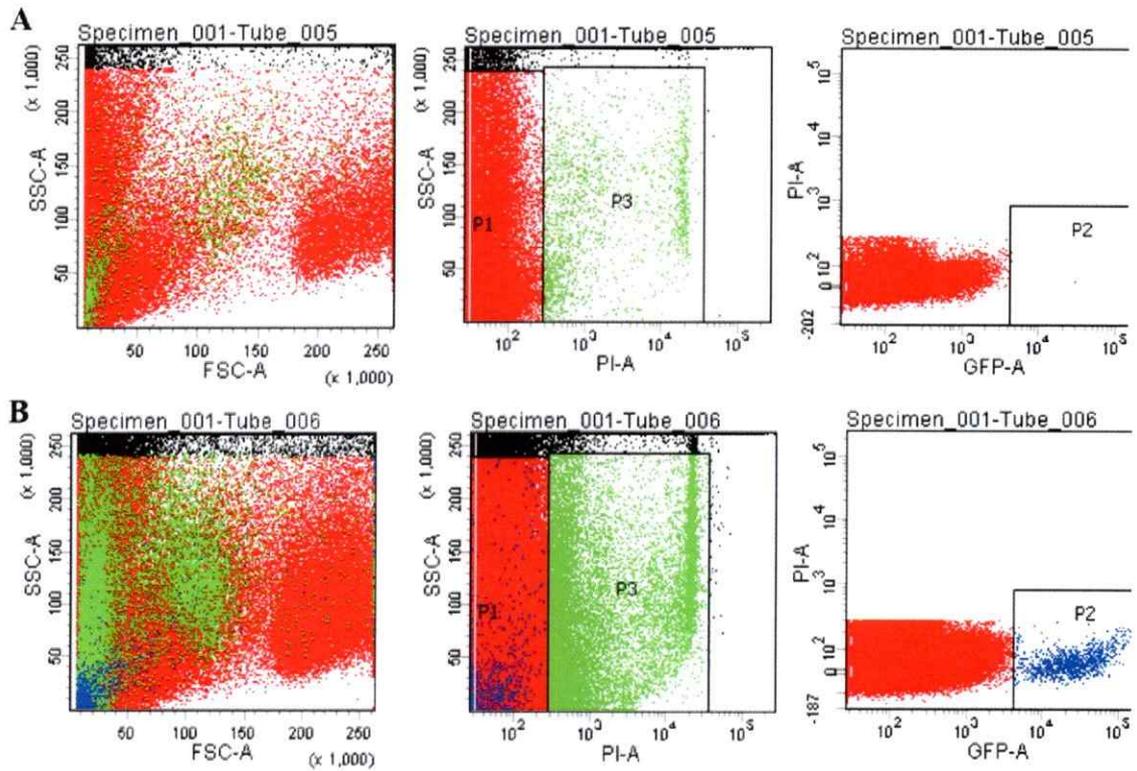


Figura 11: Identificación de la población de neutrófilos en larvas de pez cebra.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* y silvestres de 3dpf fueron disgregadas y analizadas mediante citometría de flujo. En (A) citometría de flujo a larvas silvestres que carecen de marca GFP+ en sus neutrófilos. La ventana indicada como P2 donde se esperan los eventos GFP+ no contiene eventos en esta muestra celular. En (B), se realizó la misma citometría con larvas transgénicas que poseen la marca GFP+ en sus neutrófilos. La ventana indicada como P2 contiene las células GFP+, la cual corresponde a un 0,2% del total de los eventos registrados. n=200 larvas.

4.4.2 Aislamiento neutrófilos de pez cebra mediante FACS

Una vez identificada la población de neutrófilos en larvas de pez cebra, fue posible la planificación de experimentos adicionales de *cell sorting*, donde la población pudiese ser aislada en un contexto inflamatorio. La técnica *cell sorting* permite obtener una población aislada de acuerdo a un parámetro seleccionado, en este caso particular el parámetro fue la marca GFP+ que identifica a neutrófilos en la línea transgénica de pez cebra *tg(BAC:mpx:GFP)*. La Figura 12 es una imagen representativa de los múltiples experimentos de *cell sorting* realizados. Las condiciones experimentales analizadas fueron las previamente explicadas en la sección 4.3, infección con S.T. y daño por Cobre, cada una con su respectivo control.

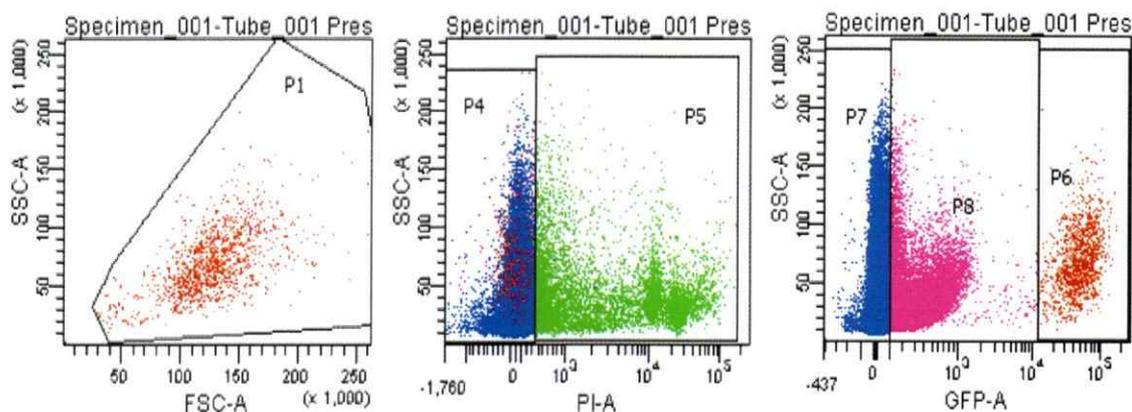


Figura 12: Purificación de neutrófilos GFP+ de pez cebra.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf fueron disgregadas 6 hpi (100 UFC S.T. en V.O.) y analizadas mediante FACS. Los eventos registrados GFP+, población P6, corresponde a un 0,2% del total de los eventos registrados. n=500 larvas.

Cabe destacar que se realizó análisis de pureza, el cual determinó que la muestra era pura en un 95%, (Anexo 2).

4.5 Variación de la expresión de RNA en inflamación

Luego de identificar y aislar la población de neutrófilos se procedió a realizar un análisis cuantitativo de expresión para distintos genes involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo *olfm4.1*. Se realizó un análisis transcripcional a partir de RNA perteneciente a las células aisladas a las 6 hpi. Cabe destacar que para cada réplica experimental independiente se trabajó con 500 larvas por condición y cada experimento independiente se realizó como mínimo por triplicado.

4.5.1 Evaluación de la expresión de *olfm4.1* en neutrófilos de pez cebra y su variación durante la inflamación

Una vez identificada y aislada la población de neutrófilos se procedió a realizar un análisis de expresión del gen *olfm4.1* de acuerdo a lo señalado en la sección 3.7. En primera instancia, se confirmó la identidad y pureza en términos moleculares de las células aisladas usando dos controles positivos. Evaluamos la expresión del mRNA de los genes *egfp* y *mpx*, los cuales deberían presentar altos niveles en neutrófilos (en la línea transgénica usada, GFP esta bajo el control del promotor de mieloperoxidasa) y bajos o nulos niveles de mRNA en el resto de los tipos celulares del animal. Se hizo q-RT-PCR para cuantificar los mRNAs respectivos (ver sección 3.7.3 de Métodos) y se normalizaron los valores de acuerdo al gen *ef-1 α* , que presenta expresión ubicua y es

usado rutinariamente como control interno. Cuando se compararon los valores de los mRNAs de los genes *egfp* y *mpx* entre las muestras de neutrófilos comparado con el resto de las células en larvas control (inyectadas en la V.O. con LB), ambos presentaban un enriquecimiento significativo (Figura 13A-B). En el caso del gen *olfm4.1* (Figura 13C), se observó también una mayor expresión significativa en neutrófilos. Concluimos de este experimento control que i) nuestro protocolo de *cell sorting* esta efectivamente separando neutrófilos con un alto grado de especificidad; ii) los neutrófilos expresan *olfm4.1*, aunque existe expresión en otros tejidos, corroborando lo observado en la hibridación in situ e inmunocitoquímica.

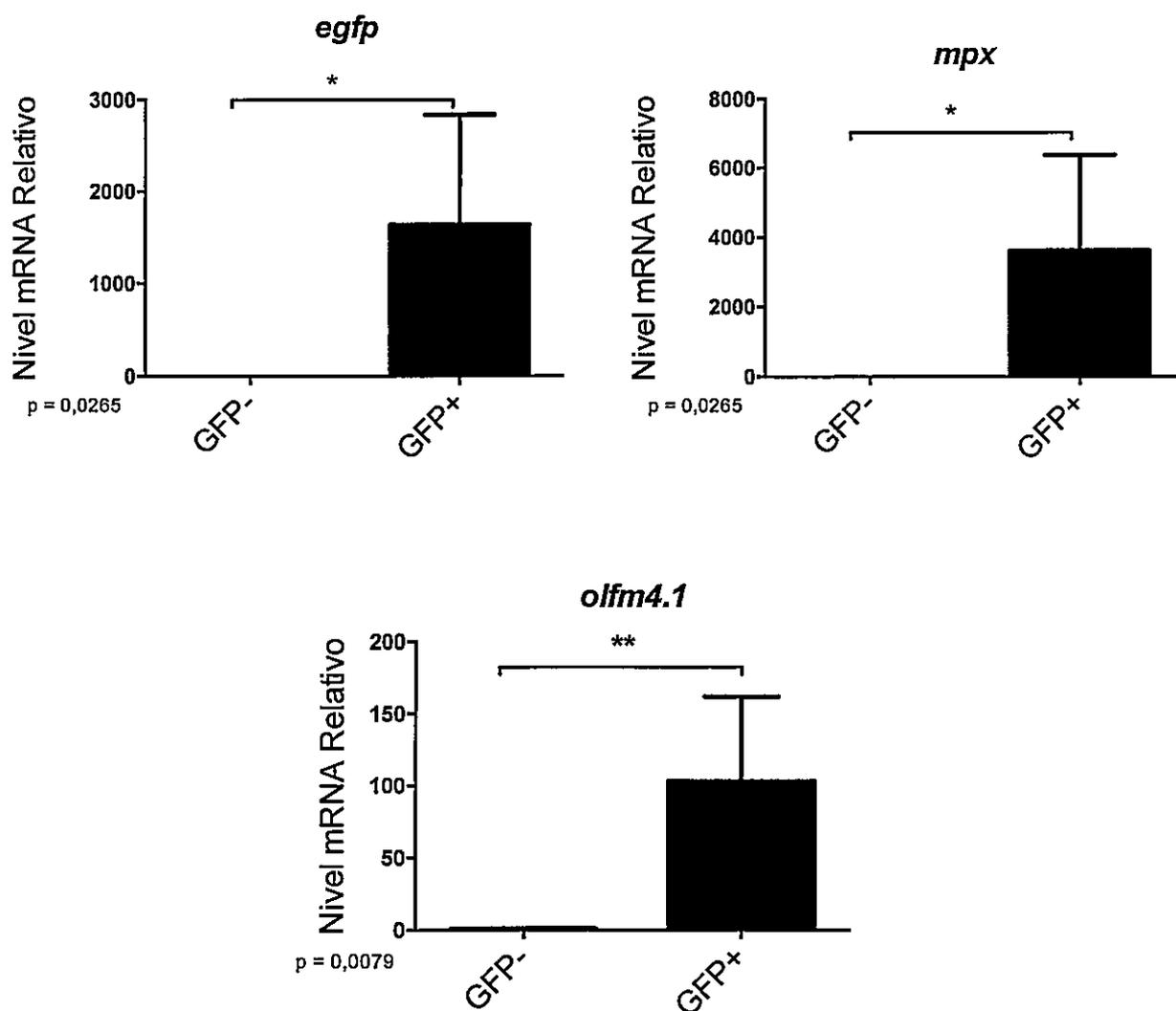


Figura 13: Expresión de genes en neutrófilos aislados vs el resto de los tejidos de la larva de pez cebra.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf inyectadas en la V.O. con LB fueron disgregadas 6 hpi y las células separadas mediante *FACS* según su fluorescencia. Se realizó qRT-PCR a partir del RNA extraído de los neutrófilos (GFP+) y del resto de las células (GFP-). La figura muestra el análisis cuantitativo de los niveles de expresión mRNA para los genes *egfp* (A), *mpx* (B) y *olfm4.1* (C). N=5; n=500 por condición. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Con los resultados obtenidos de la cuantificación de mRNA de genes en neutrófilos, analizamos el perfil de expresión de genes relacionados con la inflamación comparando muestras obtenidas de larvas control (inyección de LB en la V.O.) con muestras obtenidas de larvas desafiadas con un estímulo inflamatorio de tipo infeccioso (inyección de bacterias en la V.O.). El análisis se realizó de acuerdo a lo indicado en la sección 3.6. Todas las muestras del ensayo de infección fueron obtenidas a las 6 hpi, tiempo al cual se alcanza el máximo de inflamación (Figura 7A) y que está temporalmente cercano a la resolución de la inflamación. A pesar de que se observaron niveles de expresión que tendían a variar en la dirección esperada en los cuatro genes examinados (*mpx*, *mmp9*, *illb* y *cxcr4*), no vimos diferencias significativas en los niveles de mRNA respecto de la condición control (Figura 14).

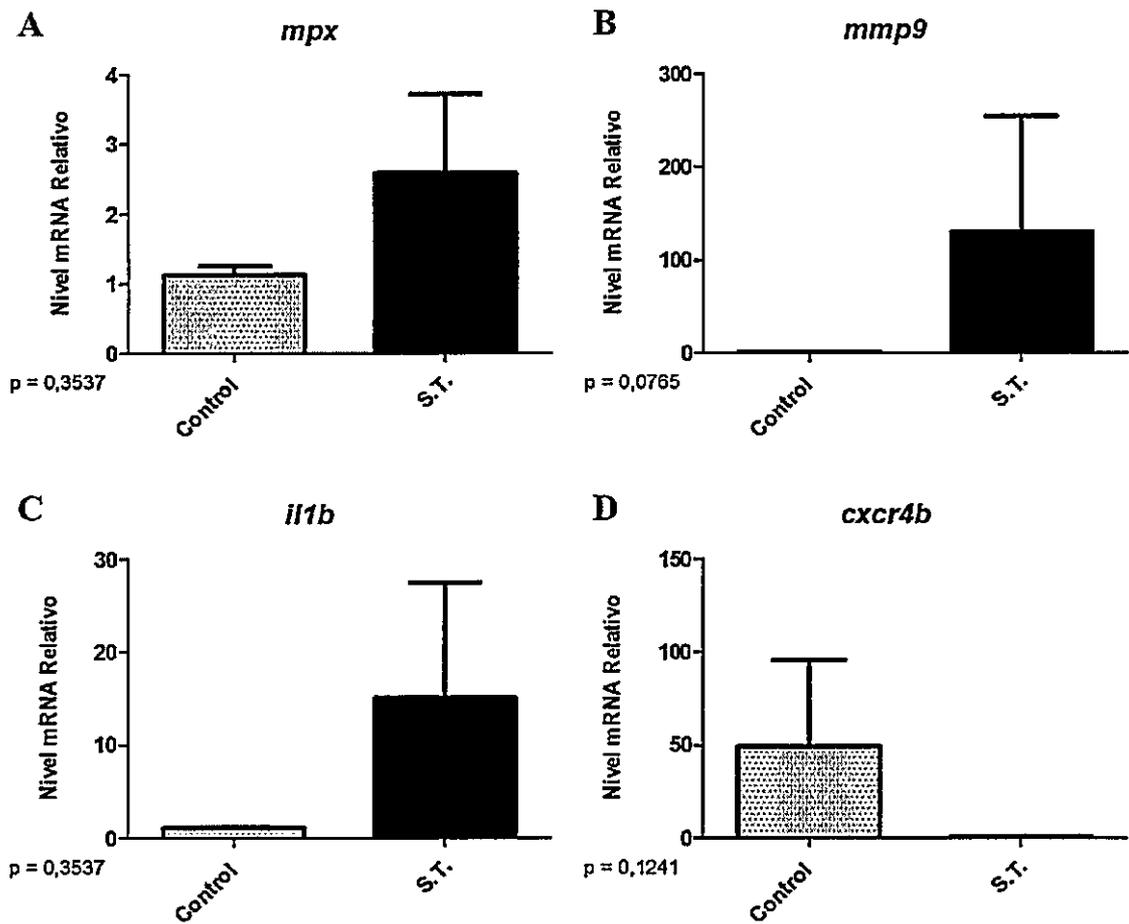


Figura 14: Expresión de genes durante la inflamación inducida por infección.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf fueron disgregadas 6 hpi (100 UFC *S.T.* en V.O.) y las células separadas mediante *FACS*. Se realizó qRT-PCR a partir del RNA extraído de los neutrófilos GFP+. La figura muestra el análisis cuantitativo de los niveles de expresión mRNA para los genes *mpx* (A), *mmp9* (B), *il1β* (C) y *cxcr4b* (D). N=5; n=500 por condición. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001

Se analizó también el perfil de expresión de genes relacionados con la inflamación para muestras obtenidas de larvas desafiadas con un estímulo inflamatorio

de tipo estéril, usando sulfato de cobre como agente de daño celular. Todas las muestras fueron obtenidas a los 20 minutos post tratamiento, tiempo al cual se alcanza el máximo de inflamación (Fig. 10). La figura 15 muestra una tendencia a la disminución en la expresión para *mpx* y una tendencia al aumento para *mmp9*. La expresión de *il1 β* no mostró diferencia alguna respecto a la situación control.

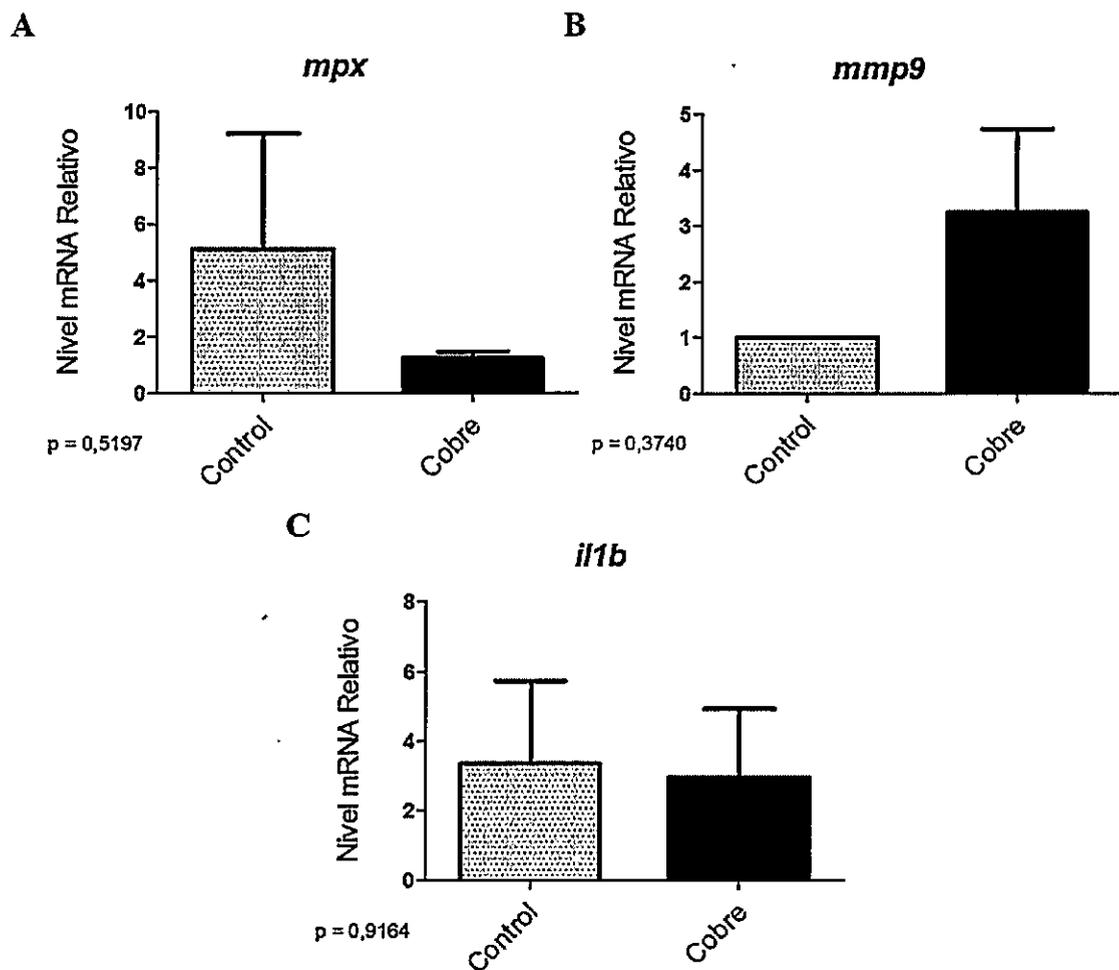


Figura 15: Expresión de genes durante la inflamación inducida por daño con cobre.

Larvas *tg(BAC(mpx:GFP))* de 3dpf inmersas 2 hrs en solución 100 μM CuSO_4 fueron disgregadas 20 minutos post tratamiento (mpt). Las muestras celulares obtenidas fueron separadas mediante FACS y posteriormente se realizó qRT-PCR a partir de RNA extraído de los neutrófilos GFP+. La figura muestra el análisis cuantitativo de los niveles de expresión RNA para los genes *mpx* (A), *mmp9* (B) e *il1 β* (C). N=3; n=500 por condición. Las comparaciones fueron realizadas por Mann-Whitney U test. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Nuevamente, corroboramos que podemos efectivamente aislar neutrófilos de manera consistente y reproducible y podemos obtener datos cuantitativos respecto a los genes que expresan estas células bajo diversas condiciones experimentales.

4.5.2 Evaluación de los niveles de expresión de mRNA de *olfm4.1* en neutrófilos de pez cebra en condiciones de inflamación

Usando la estrategia descrita en la sección anterior, procedimos a medir los niveles de mRNA de *olfm4.1* comparando una condición control (larva inyectada en la V.O. con LB) y una donde se estimuló la inflamación con infección bacteriana (inyección de bacterias en la V.O.). En la Figura 16, se observa que hay una significativa inducción transcripcional de *olfm4.1* en neutrófilos de larvas que han sufrido una infección, comparado con la muestra de animales control.

Para evaluar si esta respuesta esta relacionada genéricamente a la inflamación o si se relaciona sólo con aquella inducida por infección bacteriana, examinamos la expresión de *olfm4.1* en neutrófilos luego de inflamación estéril (inmersión en solución de CuSO_4). En este caso (Figura 16), se observa una tendencia al aumento pero que no es significativa comparando la condición de inflamación con el control. Concluimos que la inflamación generada por un evento de infección, pero no de daño celular, induce un aumento significativo de la expresión de mRNA de *olfm4.1*.

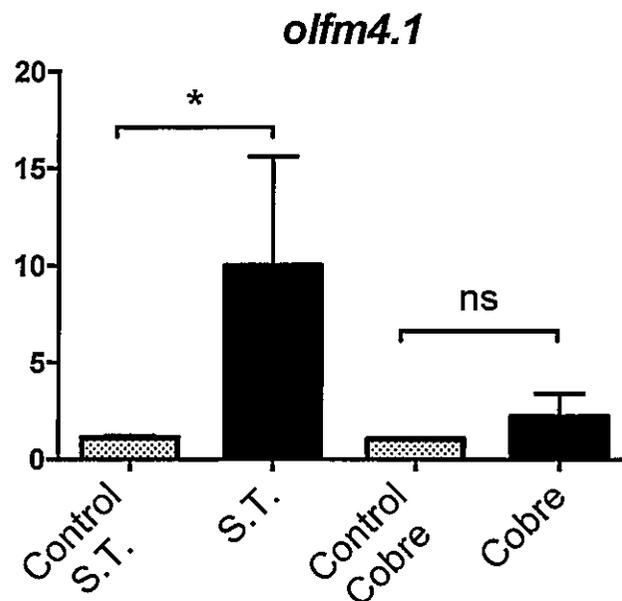


Figura 16: Expresión diferencial del gen *olfm4.1* en neutrófilos de pez cebra luego de la inflamación.

Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf fueron inyectadas con 100 UFC *S.T.* en la V.O, o tratadas por 2 hrs en solución 100 μ M CuSO_4 . En ambos casos las larvas fueron disgregadas en el tiempo de máxima inflamación y analizadas mediante *FACS*. Se realizó qRT-PCR a partir del RNA extraído de los neutrófilos GFP+ y análisis cuantitativo de los niveles de expresión mRNA para *olfm4.1*. N=5; n=500 por condición, tanto para experimentos de daño por infección como inmersión en cobre. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

4.6 Evaluación nivel de expresión de proteína OLFM4 en inflamación

Dado que la transcripción del gen *olfm4.1* se induce durante la inflamación que resulta de una infección, decidimos examinar los niveles de proteína Olfm4 bajo estas condiciones. Para evaluar los niveles de proteína se utilizó un anticuerpo que reconoce la proteína OLFM4 humana, ya que esta posee un alto grado de identidad de secuencias aminoacídicas con las proteínas Olfm4 de pez cebra. Usamos la técnica de *Western Blot* de acuerdo a lo señalado en la sección 3.8. Comparamos proteínas obtenidas de larvas control vs infectadas con bacterias y observamos una banda de Olfm4 más intensa en la condición de infección. Esto no fue así cuando se comparó la condición de inflamación estéril con su respectivo control (Anexo 4). Se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas en todos los casos para evidenciar la aparente diferencia de expresión. En efecto, el resultado de la cuantificación muestra que los niveles de proteína Olfm4 aumentan significativamente cuando los peces se enfrentan a una inflamación inducida por infección bacteriana pero se mantienen sin cambio cuando la inflamación es inducida por daño tisular. Concluimos que tanto mRNA de *olfm4.1* como la proteína Olfm4 son marcadores moleculares que permiten discriminar entre neutrófilos estimulados por inflamación que resulta de una infección vs aquellos inducidos a inflamarse por un daño estéril.

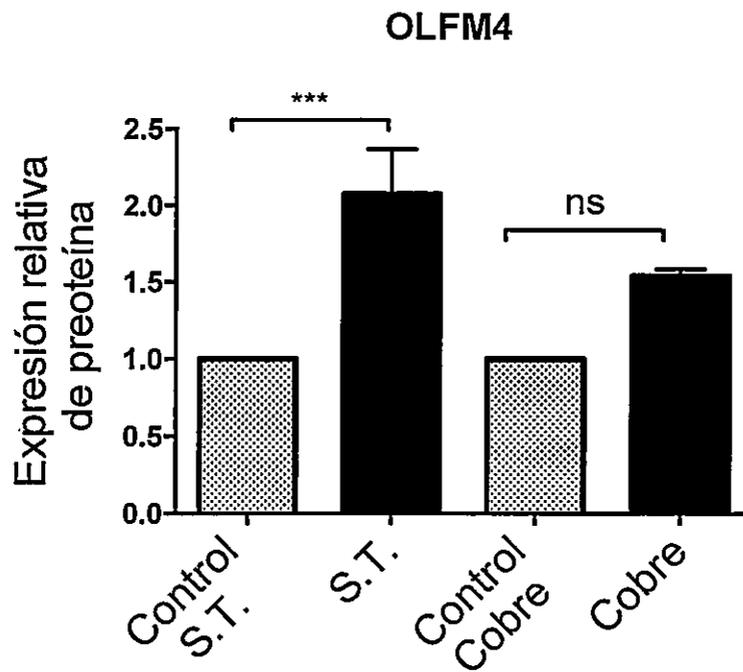


Figura 17: Análisis semicuantitativo de OLFM4 en pez cebra.

Cuantificación análisis a nivel de proteína mostrado en la figura 14. N=3; n= 300 por condición, tanto para experimentos de daño por infección como inmersión en cobre. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

V DISCUSIÓN

La respuesta inmune comprende una serie de eventos de señalización y respuestas celulares que permiten al organismo detectar la presencia de agentes que amenazan su supervivencia. El sistema inmune es capaz de discriminar entre lo inocuo y lo dañino a distintos niveles. Por un lado, la inmunidad adaptativa es capaz de desarrollar una respuesta especializada y mejorada ante amenazas previamente experimentadas. Por otro lado la inmunidad innata es capaz de reconocer genéricamente patógenos a los cuales la especie se ha visto expuesta durante su evolución. Las células predominantes en la respuesta inmune adaptativa e innata son distintas: linfocitos en el primero y macrófagos y granulocitos en el segundo. Dentro del último grupo se encuentran los neutrófilos. Los neutrófilos son reclutados a los sitios de infección o daño tisular a través de la respuesta a gradientes moleculares quimioattractantes, que incluyen el contenido de células dañadas, derivados bacterianos y quimioquinas producidas por el hospedero en respuesta a los estímulos dañinos (Renshaw y col., 2012). Una pregunta no resuelta concierne al tipo de respuesta de los neutrófilos frente a distintos tipos de señales pro-inflamatorias. El papel de estas células es evidentemente distinto en un caso de daño tisular estéril comparado con un evento infeccioso, habiendo, obviamente, elementos compartidos. Así como hay una amplia diversidad de receptores de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y a patógenos (PAMPs), las cascadas de señalización también deben mostrar particularidades. Es en este marco en el que se desarrolla esta tesis, que persigue identificar moléculas que permitan distinguir estas

respuestas mediante su expresión diferencial. Hasta el momento la gran mayoría del conocimiento que se tiene en relación al sistema inmune, ha sido adquirido a través de estudios llevados a cabo en cultivo celular y en el modelo murino. En la presente tesis se utilizó el modelo de pez cebra por dos principales ventajas con respecto a otros modelos: la posibilidad de llevar a cabo visualización *in vivo* de procesos biológicos y la disponibilidad de un amplio repertorio de herramientas genéticas.

Olfm4 es una proteína que pertenece a la familia de glicoproteínas olfactomedin, cuyos miembros presentan un dominio N-terminal en hélice y un dominio C-terminal del tipo olfactomedin. Debido a la evidencia que se ha acumulado en cuanto a la relación de este tipo de proteínas y la regulación una variedad de procesos biológicos y, en particular, los que asignan a OLFM4 una función en inmunidad innata, se seleccionó a esta molécula como candidato para el estudio de la respuesta inflamatoria frente a daño tisular e infección bacteriana en neutrófilos de pez cebra.

En primera instancia, debido a la existencia de 2 parálogos para el gen *olfm4* en el genoma de pez cebra, se realizó un análisis bioinformático para determinar cuál de ellas utilizar para el estudio. Utilizando un enfoque filogenético, en base a secuencias aminoacídicas, se determinó que la secuencia *olfm4.1* se encuentra más cercana a las secuencias de vertebrados superiores y, por tanto, es el mejor candidato a conservar la función en el modelo de pez cebra (ver Figura 2). Sin embargo, no es posible descartar que *olfm4.2* sea el ortólogo funcional del gen de mamíferos debido a la alta identidad de secuencias que mantienen ambos parálogos del pez.

Un requisito para considerar una función en inmunidad de *olfm4.1* es que su expresión ocurra en células inmunes. En primer lugar, examinamos el patrón de expresión de *olfm4.1* mediante hibridación *in situ* (Figura 3). El tejido en que se observó una marca predominante de mRNA de *olfm4.1* es el páncreas, distinguible por su posición anatómica, asimetría en el eje izquierda-derecha y comparación con otros marcadores (Wilfinger y col., 2013). Cabe destacar que a los 4dpf, la marca en el páncreas se vuelve difusa y disminuye en intensidad. A partir de los 3dpf (Figura 3 C), se observó expresión en células discretas de la región caudal hematopoyética donde, para ese estadio de desarrollo, se ubican los neutrófilos. A los 4dpf aumenta el número de células marcadas en dicha región, etapa que coincide con el aumento de células de linaje mielóide acorde avanza el desarrollo (Xu y col., 2012). Para determinar si la marca observada mediante hibridación *in situ* estaba efectivamente localizada en neutrófilos, se diseñó un protocolo de inmuno detección en neutrófilos de pez cebra. Mediante este método, utilizando un anticuerpo anti-OLFM4 para la proteína humana, se determinó que los neutrófilos de pez cebra expresan la proteína (Figura 5) y que la ubicación de esta es citoplasmática. Hasta la fecha, los datos reportados para la ubicación subcelular de esta proteína, indican distribución en mitocondrias, citoplasma y asociada a la membrana celular (Liu y col., 2010). Estos datos provienen de cultivos celulares de humano y ratón y, por tanto, nuestros resultados coinciden con los de mamíferos y son los primeros reportados para este gen en pez cebra.

Considerando lo anterior, se procedió a analizar la posible expresión diferencial de *olfm4.1*, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en distintos procesos inflamatorios: daño estéril e infección, lo que corresponde a la hipótesis de este trabajo. Como vimos una fuerte expresión pancreática de *olfm4.1*, concluimos que no sería posible detectar fácilmente cambios a nivel de mRNA en las larvas. Para resolver esta dificultad, se estandarizó un protocolo de aislamiento de neutrófilos, utilizando para ello muestras celulares provenientes de la línea transgénica *BACmpx:GFP*, cuyos neutrófilos expresan GFP. Se determinó, mediante citometría de flujo, que la población de neutrófilos corresponde a un 0,2% de la totalidad de células del pez a los 3dpf (Figura 11). La población identificada fue aislada por *Cell Sorting* y se confirmó su identidad y pureza en términos moleculares. Las células aisladas presentan un enriquecimiento significativo para los dos controles positivos utilizados, *egfp* y *mpx*, así como también para *olfm4.1* (Figura 13). Por tanto, la población aislada corresponde a neutrófilos y estos expresan la molécula de interés. Para analizar el perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, se aislaron neutrófilos provenientes del punto máximo de inflamación, tanto para daño estéril como para infección, ya que en este punto ambas respuestas son equivalentes en términos de número de neutrófilos reclutados; de este modo la única diferencia entre ambos diseños experimentales a comparar, es el contexto inflamatorio que generó dicho reclutamiento.

Antes de examinar un potencial cambio de expresión de *olfm4.1*, fue necesario demostrar con genes control que efectivamente estábamos activando vías

específicas en cada contexto inflamatorio. Se analizaron los genes *mpx*, *mmp9*, *il1 β* y *cxcr4b* como genes control de la activación de la respuesta inmune debido a sus funciones previamente conocidas. *Mpx* es un componente mayoritario de los gránulos azurofílicos de neutrófilos, participando de la producción de ácidos hipohalogenosos, estos últimos centrales en la actividad microbicida de neutrófilos (Klebanoff, 2005). El gen *mmp9* codifica para una una proteinasa liberada por neutrófilos activados y provee de una auto-protección contra la actividad elastasa de los neutrófilos, entre otras funciones (Parks y col., 2004). IL-1B es una citoquina proinflamatoria involucrada en la infección y la activación de la vía NF-kB (Yan y col., 2014). Por último, *Cxcr4b* es un receptor de la quimioquina *Sdf1* regula negativamente el tráfico de leucocitos (Walters y col., 2010). La Figura 14 muestra los niveles de expresión del pool de genes control en respuesta a infección. Se observó una tendencia al aumento en la expresión de *mpx*, *mmp9* e *il-1 β* y lo contrario para el gen *cxcr4b*, lo que se condice con lo reportado en la literatura de acuerdo a la función de cada gen en lo relacionado a inmunidad. En la respuesta a daño estéril, el comportamiento de los genes fue distinto y también acorde a lo esperado. Se observó una una tendencia a la disminución en la expresión para *mpx* y una tendencia al aumento para *mmp9*. La expresión de *il-1 β* no mostró diferencia alguna respecto a la situación control (Figura 15).

Para el caso particular de *olfm4.1* (Figura 16), se observó un aumento significativo en los niveles de transcrito en los neutrófilos de larvas que han sufrido una infección, mientras que en el caso de daño estéril, no se observó diferencia. Lo mismo se

observó a nivel de proteína (Figura 17). Se concluye entonces que, a nivel génico y proteico, *olfm4.1* se expresa diferencialmente dependiendo del contexto inflamatorio presente.

Este resultado abre una puerta para estudiar el mecanismo molecular que permite al neutrófilo responder apropiadamente a uno vs otro tipo de señal pro-inflamatoria. Sin embargo, con nuestros experimentos, no podemos asignar fehacientemente una función a *olfm4.1* en uno, ambos o ninguno de estos eventos. Basandonos en la literatura, podemos aventurar algunas hipótesis, que deberán ser respondidas con experimentos de ganancia o pérdida de función. En una respuesta inflamatoria exitosa, además del reclutamiento de leucocitos, debe ocurrir una salida oportuna o *clearance* de los leucocitos, que permita la reparación de los tejidos dañados y restablecimiento general de la homeostasis inmune. Mucho se ha discutido acerca de la existencia de eventos moleculares activos (más que la ausencia de eventos pro-inflamatorios), que lleven a la correcta resolución y término de la inflamación. Si aceptamos la existencia de eventos activos, la proteína Olfm4 podría estar involucrada debido a lo que se sabe de otros organismos en cuanto a su rol en la célula. En este sentido, la proteína GRIM-19, involucrada en la muerte celular mediada por interferon/ácido retinoico (INF/AR), interactúa con OLFM4, atenuando su función de inducción de la apoptosis celular (Huang y col., 2010). Se ha descrito, tanto en ratón como en pez cebra (Hall y col., 2012) que, uno de los principales mecanismos por los cuales se lleva a cabo la resolución de la inflamación en respuesta a infección, es la muerte celular de

neutrófilos, evitando de este modo la propagación del agente infeccioso en el organismo. De tal modo, podemos presentar como hipótesis para un trabajo futuro, que *olfm4.1* esta involucrado en la apoptosis de neutrófilos finalizado un proceso infeccioso-inflamatorio. Destacamos que nuestro laboratorio ha demostrado un proceso de resolución por migración retrógrada de neutrófilos en el contexto de la inflamación estéril (como aquel inducido por daño con cobre), contexto en el que, precisamente, no vemos cambios en la expresión de *olfm4.1*. Para evaluar esta hipótesis, será necesario evaluar tanto inflamación como resolución de la inflamación inducida por ambos agentes en condiciones de pérdida de función del gen *olfm4.1*. La reciente introducción de la eficiente tecnología CRISPR/Cas9 en pez cebra ofrece una excelente herramienta para contestar esta pregunta.

VI. CONCLUSIONES

- Hemos identificado dos genes homólogos de OLFM4 humano en el pez cebra, *olfm4.1* y *olfm4.2*, siendo *olfm4.1* el de más alta identidad de secuencias (y por lo tanto, el más probable ortólogo del gen de mamíferos).
- El gen *olfm4.1* se expresa específicamente en páncreas y en neutrófilos en larvas de pez cebra.
- La proteína Olfm4.1 se detecta en neutrófilos y se distribuye en el citoplasma de estas células.
- La expresión del mRNA y de la proteína de *olfm4.1* se incrementa en un contexto de inflamación inducida por infección bacteriana, no así cuando la inflamación se induce por daño tisular.
- Olfm4.1 representa un excelente marcador para distinguir las vías moleculares inducidas por estímulos inflamatorios de diverso origen y se constituye como un gen de interés para ser analizado funcionalmente en este marco.

VII BIBLIOGRAFÍA

Abbas A. K. , Lichtman A. H. y Pillai S. (2015). "Cellular and molecular immunology". Journal viii, 535 pages

Borregaard N. (2010). "Neutrophils, from marrow to microbes". *Immunity* 33: 657-670

Candel S. , de Oliveira S. , Lopez-Munoz A. , Garcia-Moreno D. , Espin-Palazon R. , Tyrkalska S. D. , Cayuela M. L. , Renshaw S. A. , Corbalan-Velez R. , Vidal-Abarca I. , Tsai H. J. , Meseguer J. , Sepulcre M. P. y Mulero V. (2014). "Tnfa signaling through tnfr2 protects skin against oxidative stress-induced inflammation". *PLoS Biol* 12: e1001855

Clatworthy A. E. , Lee J. S. , Leibman M. , Kostun Z. , Davidson A. J. y Hung D. T. (2009). "Pseudomonas aeruginosa infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants". *Infect Immun* 77: 1293-1303

Clemmensen S. N. , Bohr C. T. , Rorvig S. , Glenthoj A. , Mora-Jensen H. , Cramer E. P. , Jacobsen L. C. , Larsen M. T. , Cowland J. B. , Tanassi J. T. , Heegaard N. H. , Wren J. D. , Silaharoglu A. N. y Borregaard N. (2012). "Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils". *J Leukoc Biol* 91: 495-500

Cumano A. y Godin I. (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system". *Annu Rev Immunol* 25: 745-785

d'Alencon C. A. , Pena O. A. , Wittmann C. , Gallardo V. E. , Jones R. A. , Loosli F. , Liebel U. , Grabher C. y Allende M. L. (2010). "A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish". *BMC Biol* 8: 151

de Oliveira S. , Rosowski E. E. y Huttenlocher A. (2016). "Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse". *Nat Rev Immunol* 16: 378-391

Deng Q. , Harvie E. A. y Huttenlocher A. (2012). "Distinct signalling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury". *Cell Microbiol* 14: 517-528

Grover P. K. , Hardingham J. E. y Cummins A. G. (2010). "Stem cell marker olfactomedin 4: critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis". *Cancer Metastasis Rev* 29: 761-775

Hall C. J. , Flores M. V. , Oehlers S. H. , Sanderson L. E. , Lam E. Y. , Crosier K. E. y Crosier P. S. (2012). "Infection-responsive expansion of the hematopoietic stem and

progenitor cell compartment in zebrafish is dependent upon inducible nitric oxide". *Cell Stem Cell* 10: 198-209

Hernandez P. P. , Undurraga C. , Gallardo V. E. , Mackenzie N. , Allende M. L. y Reyes A. E. (2011). "Sublethal concentrations of waterborne copper induce cellular stress and cell death in zebrafish embryos and larvae". *Biol Res* 44: 7-15

Huang Y. , Yang M. , Yang H. y Zeng Z. (2010). "Upregulation of the GRIM-19 gene suppresses invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cell line". *Exp Cell Res* 316: 2061-2070

Klebanoff S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe". *J Leukoc Biol* 77: 598-625

Kouadio I. K. , Aljunid S. , Kamigaki T. , Hammad K. y Oshitani H. (2012). "Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures". *Expert Rev Anti Infect Ther* 10: 95-104

Liu W. , Lee H. W. , Liu Y. , Wang R. y Rodgers G. P. (2010). "Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acids and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid leukemia cell growth, differentiation, and apoptosis". *Blood* 116: 4938-4947

Liu W. y Rodgers G. P. (2016). "Olfactomedin 4 expression and functions in innate immunity, inflammation, and cancer". *Cancer Metastasis Rev* 35: 201-212

Newton K. y Dixit V. M. (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation". *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:

Parkin J. y Cohen B. (2001). "An overview of the immune system". *Lancet* 357: 1777-1789

Parks W. C. , Wilson C. L. y Lopez-Boado Y. S. (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity". *Nat Rev Immunol* 4: 617-629

Renshaw S. A. y Trede N. S. (2012). "A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity". *Dis Model Mech* 5: 38-47

Riesco M. F. y Robles V. (2013). "Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges". *PLoS One* 8: e67614

Sebkova A. , Karasova D. , Crhanova M. , Budinska E. y Rychlik I. (2008). "aro mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane integrity". *J Bacteriol* 190: 3155-3160

Serhan C. N. y Savill J. (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end". *Nat Immunol* 6: 1191-1197

Thisse C. y Thisse B. (2008). "High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos". *Nat Protoc* 3: 59-69

van der Vaart M. , van Soest J. J. , Spaink H. P. y Meijer A. H. (2013). "Functional analysis of a zebrafish *myd88* mutant identifies key transcriptional components of the innate immune system". *Dis Model Mech* 6: 841-854

Walters K. B. , Green J. M. , Surfus J. C. , Yoo S. K. y Huttenlocher A. (2010). "Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome". *Blood* 116: 2803-2811

Westerfield M. (2007). "The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory use of Zebrafish (*Danio rerio*)". Journal

Wilfinger A. , Arkhipova V. y Meyer D. (2013). "Cell type and tissue specific function of islet genes in zebrafish pancreas development". *Dev Biol* 378: 25-37

Xu J. , Du L. y Wen Z. (2012). "Myelopoiesis during zebrafish early development". *J Genet Genomics* 39: 435-442

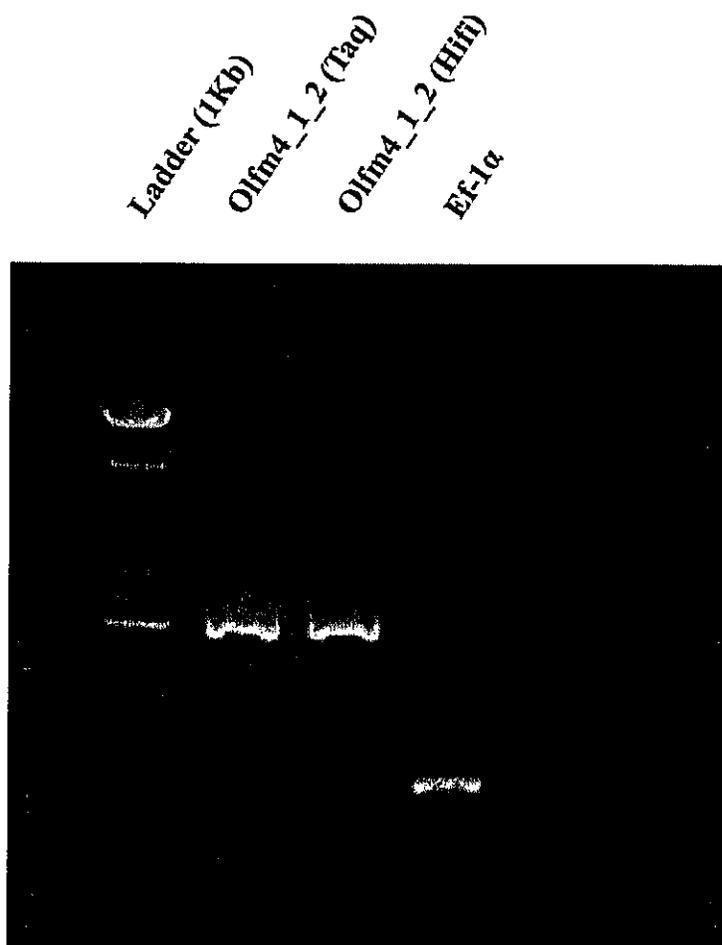
Yan B. , Han P. , Pan L. , Lu W. , Xiong J. , Zhang M. , Zhang W. , Li L. y Wen Z. (2014). "IL-1beta and reactive oxygen species differentially regulate neutrophil directional migration and Basal random motility in a zebrafish injury-induced inflammation model". *J Immunol* 192: 5998-6008

Zhang J. , Liu W. L. , Tang D. C. , Chen L. , Wang M. , Pack S. D. , Zhuang Z. y Rodgers G. P. (2002). "Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development". *Gene* 283: 83-93

Zhang X. , Huang Q. , Yang Z. , Li Y. y Li C. Y. (2004). "GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth". *Cancer Res* 64: 2474-2481

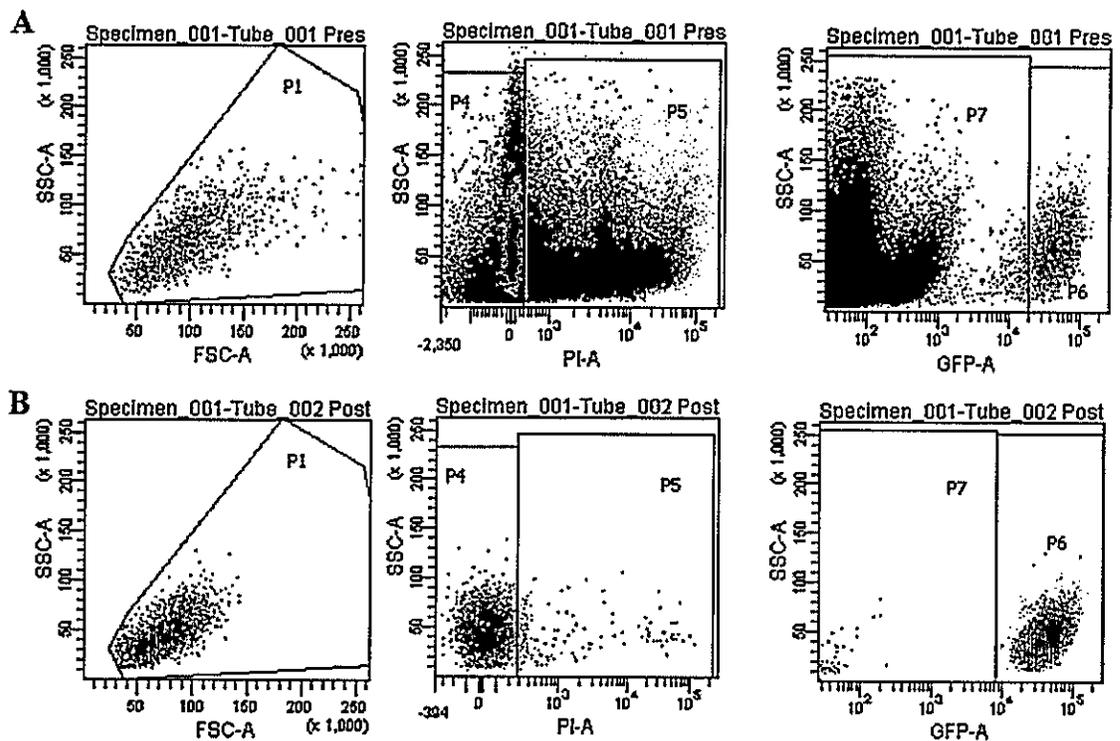
VIII ANEXOS

8.1 Expresión *olfm4.1* en pez cebra



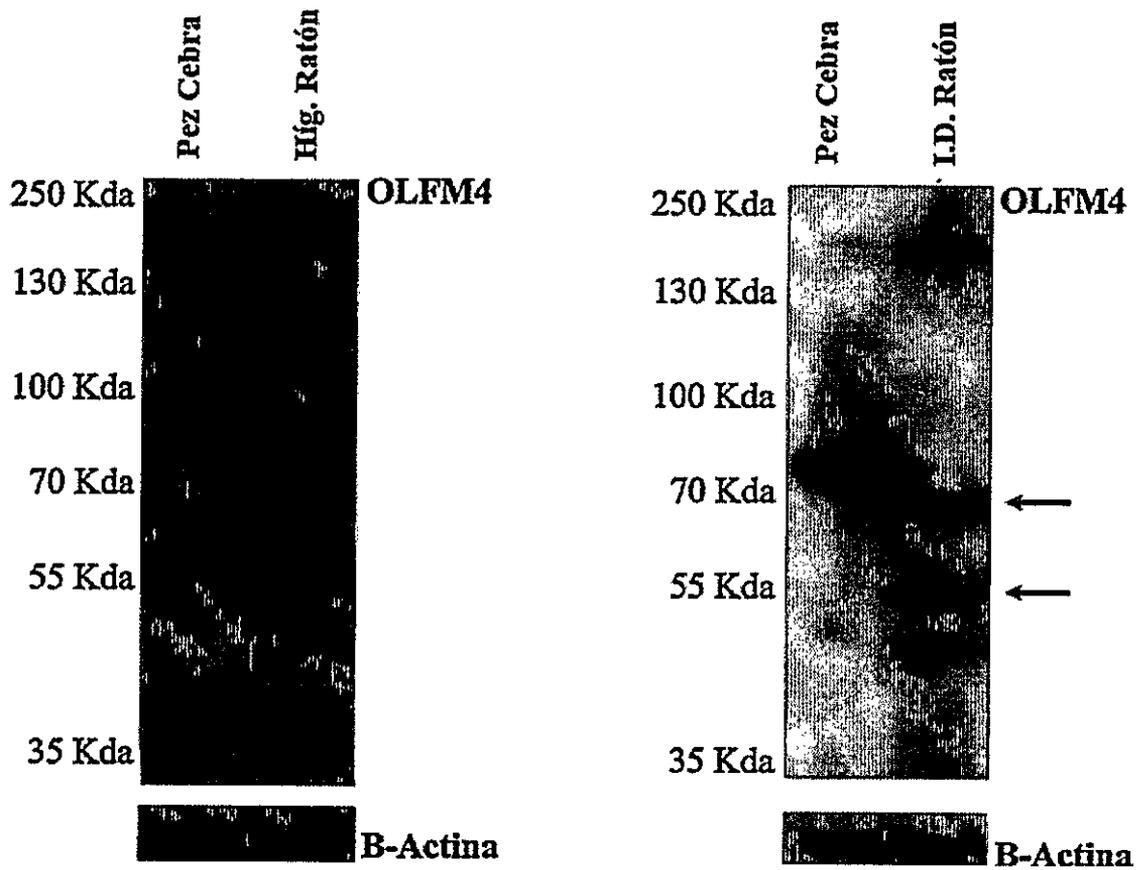
Anexo 1: Expresión génica *olfm4.1* en pez cebra. Perfil electroforético correspondiente a amplificación por RT-PCR a partir de RNA extraído de larvas *Tg* (*BAC (mpx:gfp)*) de 96hpf. De izquierda a derecha: ladder (1kb), amplificado del gen *olfm4.1* utilizando enzima Taq (700pb) polimerasa convencional, amplificado del gen *olfm4.1* utilizando enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (700pb) y finalmente amplificado ef-1 α (200pb)

8.2 Análisis de pureza población neutrófilos aislados por *FACS*



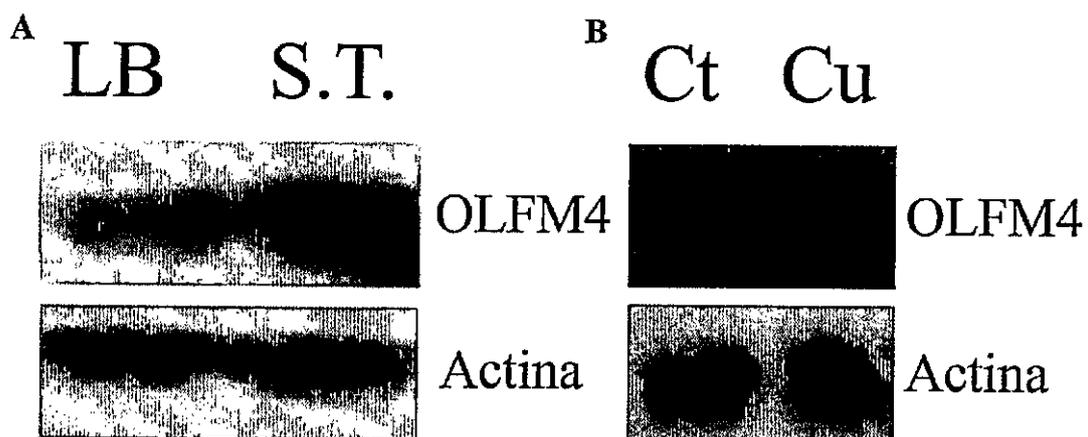
Anexo 2: Análisis de pureza eventos GFP+ aislados mediante FACS. Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf fueron disgregadas 6 hpi (LB en V.O.) y analizadas mediante FACS. En (A) los eventos registrados GFP+, población P6, corresponde a un 0,2% del total de los eventos registrados. $n=500$ larvas. . En (B) los eventos registrados GFP+, población P6, corresponde a un $(94 \pm 1)\%$ del total de los eventos aislados en (A).

8.3 Presencia de proteína OLFM4 en pez cebra



Anexo 3: Olfm4 se encuentra presente en pez cebra. Prueba de la presencia de la proteína Olfm4 en pez cebra mediante W.B. Se utilizaron muestras de hígado e intestino delgado de ratón (cepa silvestre c57bl/6) y 300 larvas de pez cebra de 3dpf.

8.4 Evaluación nivel de expresión de proteína OLFM4 en inflamación



Anexo 4: Expresión diferencial de proteína OLFM4 en pez cebra. Larvas *tg(BAC:mpx:GFP)* de 3dpf fueron inyectadas con 100 UFC *S.T.* en V.O (A), e inmersas 2 hrs en solución 100 μ M CuSO_4 (B). En ambos casos las larvas fueron disgregadas en el máximo de inflamación y analizadas mediante *W.B.*