

UCH-FC  
Biotecnología  
P 227  
C. I



ESCUELA DE PREGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Rol del eje de señalización SDF-1a/CXCR4b en la  
retención de los neutrófilos durante el desarrollo y la  
respuesta inflamatoria”**

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

**SUSANA CAROLINA PAREDES ZÚÑIGA**

Director del Seminario de Título:

Dr. Miguel Luis Allende Connelly

Codirector:

MSc. Oscar Andrés Peña Cabello

Diciembre de 2014



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

**SUSANA CAROLINA PAREDES ZÚÑIGA**

**“Rol del eje de señalización SDF-1a/CXCR4b en la retención de los neutrófilos durante el desarrollo y la respuesta inflamatoria”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

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

Firma manuscrita en tinta azul de Miguel Luis Allende Connelly.

MSc. Oscar Peña Cabello  
**Codirector Seminario de Título**



### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. Daniela Sauma Mahaluf  
**Presidenta**

Firma manuscrita en tinta azul de Daniela Sauma Mahaluf.  
Firma manuscrita en tinta negra de un evaluador.

Dr. Elías Utreras Puratich  
**Evaluador**

Santiago, diciembre de 2014

## BIOGRAFÍA



Nací en Santiago, ciudad en la que he vivido la mayor parte de mi vida. Crecí en una familia compuesta por mis abuelos, mi madre y Renato, quienes han tenido un gran impacto en mi formación académica y personal.

Desde mi niñez siempre sentí un gran interés por la naturaleza, el cual fue reforzado gracias a los juegos didácticos, libros y juguetes que me regalaban. A los 6 años decidí que quería ser paleontóloga, lo que me llevó a leer cuánto libro de biología se encontrara al alcance de mis manos. Esto me llevó a descubrir que en realidad la Bioquímica era lo mío. No fue hasta Primero Medio cuando conocí la Biotecnología, maravillándome la enorme potencialidad y dificultad de esta disciplina.

El año 2008 entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Tras haber concluido mis ramos en esta carrera, decidí complementar el conocimiento adquirido ingresando a la Licenciatura en Ciencias c/m Biología. De manera paralela realicé mi Seminario de Título en el Laboratorio del Dr. Miguel Allende el cual fue concluido a finales del año 2014.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Laboratorio de Biología del Desarrollo a cargo del Dr. Miguel Allende, por el aprendizaje y ayuda entregada durante este proceso.

A mi familia, por incentivarne desde niña a dedicarme a las Ciencias y por brindarme las herramientas necesarias para desempeñarme en las múltiples áreas del conocimiento que llamaban mi atención.

A mis amigos de la Universidad, por todos los momentos de alegría y el compañerismo entregado durante estos años.

A mis amigos de toda la vida, por apoyarme siempre, entenderme y estar presentes en momentos felices y difíciles.

Finalmente quiero agradecer a mi pololo, por ayudarme, comprenderme y ser un pilar fundamental en mi vida.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1 Desarrollo de los neutrófilos en pez cebra	6
1.2 Retención y liberación de los neutrófilos en sistemas homeostáticos	9
1.3 Retención y liberación de neutrófilos ante el quiebre de la homeostasis	12
1.4 Evidencia que sustenta que el eje de señalización SDF-1/CXCR4 actúa en la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético	14
1.5 Ventajas de utilizar al pez cebra como modelo	15
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
2.1 Condiciones de cría y experimentación de pez cebra	19
2.2 Identificación de larvas mutantes con tinción DiOC <sub>6</sub>	20
2.3 Tinción de neutrófilos con Sudan Black	21
2.3 Cuantificación de Neutrófilos en Circulación	22
2.4 Inducción de inflamación	23
2.5 Adquisición, procesamiento y análisis de microscopía de tiempo extendido	23
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
3.1 Distribución de neutrófilos en tejidos hematopoyéticos de larvas mutantes para SDF1-a ( <i>medusa</i> ), CXCR4b ( <i>odysseus</i> ) y silvestres durante el transcurso del desarrollo larval	25
3.2 Determinación del número de neutrófilos circulantes en larvas mutantes para SDF1-a ( <i>medusa</i> ), CXCR4b ( <i>odysseus</i> ) y silvestres durante el transcurso del desarrollo larval	30
3.3 Determinación del número de neutrófilos reclutados al sitio de daño luego de transectar la cola de larvas silvestres, <i>medusa</i> y <i>odysseus</i>	32
3.4 Determinación de velocidad y direccionalidad de los neutrófilos reclutados al sitio de daño luego de transectar la cola de larvas silvestres, <i>medusa</i> y <i>odysseus</i>	35

4. DISCUSIÓN	39
5. CONCLUSIONES	49
6. BIBLIOGRAFÍA	50

## INDICE DE FIGURAS <sup>n</sup>

1. Representación esquemática de la localización de los tejidos hematopoyéticos y vasos sanguíneos en la larva del pez cebra	7
2. Etapas de desarrollo de los neutrófilos desde mieloblasto a neutrófilo maduro	9
3. Larvas de pez cebra luego de ser sometidas a tinción con DiOC <sub>6</sub>	21
4A. Distribución de neutrófilos en los tejidos hematopoyéticos de larvas silvestres y <i>medusas</i> a distintos estadios del desarrollo larval (3-9dpf)	28
4B. Distribución de neutrófilos en los tejidos hematopoyéticos de larvas silvestres y <i>odysseus</i> a distintos estadios del desarrollo larval (3-9dpf)	29
5. Gráficos de cuantificación de neutrófilos circulantes en larvas mutantes y silvestres a distintos estadios del desarrollo (3-13dpf)	31
6. Curva de reclutamiento de neutrófilos al sitio de daño en larvas silvestres y mutantes en función de las horas post-transecto (hpt)	33
7. Imagen de los neutrófilos reclutados luego de 4 horas post-transección de cola en larvas mutantes y sus respectivos "siblings" silvestres	34
8. Determinación de la velocidad de neutrófilos reclutados al sitio de daño en larvas silvestres y mutantes	36
9. Determinación de la direccionalidad de neutrófilos reclutados al sitio de daño en larvas silvestres y mutantes	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AGM:** Aorta-Gónada-Mesonefros

**ANOVA:** Análisis de la Varianza

**CHT:** Tejido Caudal Hematopoyético

**CXCL1:** Ligando 1 de quimioquina CXC

**CXCL2:** Ligando 2 de quimioquina CXC

**CXCL8:** Ligando 8 de quimioquina CXC

**CXCL12:** Ligando 12 de quimioquina CXC

**CXCR1:** Receptor 1 de quimioquina CXC

**CXCR2:** Receptor 2 de quimioquina CXC

**CXCR4:** Receptor 4 de quimioquina CXC

**dpf:** días post-fertilización

**GFP:** Proteína Fluorescente Verde

**G-CSF:** Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas

**hpf:** horas post-fecundación

**hpt:** horas post-transecto

**HSC:** Células Troncales Hematopoyéticas

**IL-8:** Interleuquina 8

**LAD:** Deficiencia de Adhesión Leucocitaria

**mpx:** mieloperoxidasa

**SDF-1:** Factor 1 derivado de estroma

**SEM:** Error estándar de la media



**(Tg(mpx:GFP)):** Línea transgénica que expresa GFP bajo el promotor de la mieloperoxidasa

**VCAM:** Molécula de Adhesión Celular Vascular

**VLA-4:** Antígeno 4 muy tardío

**WAS:** Síndrome de Wiskott-Aldrich

**WHIM:** Heridas, Hipogamaglobulinemia, Infecciones y Mielocatexis

## RESUMEN

La quimioquina SDF-1a (CXCL12) es expresada constitutivamente en el tejido hematopoyético por las células estromales. En este tejido se encuentra participando como señal quimiotáctica y de retención para las células troncales hematopoyéticas (HSC), mientras que en los neutrófilos se encuentra actuando como señal de retención en condiciones homeostáticas. Uno de los receptores de SDF-1a es CXCR4b, que es expresado tanto en la superficie de las células madre hematopoyéticas como de los neutrófilos. Esta vía de señalización es regulada por la internalización del receptor CXCR4b. En pez cebra se ha demostrado que la inducción de mutaciones que impiden la internalización de CXCR4b induce una señalización constante que provoca la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético. Sin embargo, el papel que cumple esta señalización durante la respuesta inflamatoria y a lo largo del desarrollo no ha sido estudiada *in vivo*.

El objetivo de este proyecto fue evaluar la acción del eje de señalización SDF-1a/CXCR4b en la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético a lo largo del desarrollo, en condiciones homeostáticas y ante la respuesta inflamatoria. Para ello, se utilizaron larvas de pez cebra mutantes que portan versiones funcionalmente nulas de SDF-1a y CXCR4b.

Se comparó la distribución de los neutrófilos en distintos estadios del desarrollo, observando que a los 3dpf los neutrófilos se encuentran en el tejido caudal hematopoyético (CHT) y no hay diferencias entre mutantes y silvestres. Sin embargo, a

partir del 5dpf, cuando la granulopoyesis definitiva se establece en los pronefros, las larvas silvestres exhiben una densidad considerablemente mayor de neutrófilos en esta zona que las mutantes.

Utilizando peces transgénicos que expresan GFP en los neutrófilos se cuantificó el número de células que circulan por la aorta dorsal. Se observó que a los 3dpf no existían diferencias significativas en el número de neutrófilos circulantes entre mutantes y silvestres, sin embargo desde el 7dpf ambos mutantes exhiben números significativamente mayores de neutrófilos circulantes respecto a los silvestres.

Para determinar el rol de SDF-1a y CXCR4b en la respuesta inflamatoria, se realizó transección de cola a larvas transgénicas de 3dpf. El número de neutrófilos reclutados durante 24h fue cuantificado y se observó que las larvas mutantes reclutan un número significativamente superior de neutrófilos al inicio de la inflamación, pero sin diferencias significativas durante la resolución de la inflamación.

Finalmente se determinó la velocidad y direccionalidad de migración de los neutrófilos reclutados durante el estímulo inflamatorio utilizando microscopía de tiempo extendido. Mediante el análisis de las trayectorias, se observó que no existen diferencias significativas en las velocidades de migración de los neutrófilos reclutados a las heridas, pero sí en la direccionalidad de éstos.

De este trabajo se concluye que el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b se encuentra actuando como una señal de retención para los neutrófilos a medida que avanza el desarrollo en sistemas homeostáticos y durante la inflamación.

## ABSTRACT

SDF-1a is a chemokine expressed in the hematopoietic tissue stroma. In this tissue, it is participating as a retention and chemiotactic signal to the hematopoietic stem cells (HSC), while in neutrophils is acting as a retention signal in homeostatic conditions. One of the SDF-1a receptors' is CXCR4b, which is expressed on the HSC and neutrophils' surface. It has been documented that when SDF-1a interacts with CXCR4b, it generates adhesion of neutrophils to the hematopoietic tissue. The regulation of this signaling is controlled by CXCR4b internalization. In zebrafish it has been shown that mutations which prevent CXCR4b internalization, cause a constant signaling that induces neutrophils' retention in the hematopoietic tissue. However, the role of this signaling pathway during the inflammatory response and throughout the development has not been studied *in vivo*.

The aim of this project was to evaluate the effect of SDF-1a/CXCR4b signaling pathway in the retention of neutrophils in the hematopoietic tissue throughout development, in homeostatic conditions and under inflammatory response. For this purpose, we used mutant zebrafish larvae carrying functionally null versions of SDF-1a y CXCR4b.

Neutrophils' distribution was compared at different stages of zebrafish development, observing that at 3dpf, both mutants and wild type neutrophils are distributed on the caudal hematopoietic tissue (CHT). However, since 5dpf, when

definitive granulopoiesis occurs in the pronephros, wild type larvae showed a higher density of neutrophils in the CHT compared to mutants.

To determine the distribution of neutrophils in the circulation, mutant and wild type transgenic larvae, which express GFP in the neutrophils were used. The number of neutrophils was quantified by quick acquisition of a small section of the dorsal aorta. The results did not show any difference in the number of circulating neutrophils between mutants and wild type at 3dpf. However, since 7dpf both mutants exhibited a higher numbers of circulating neutrophils compared to their wild type "siblings".

To determine whether SDF-1a and CXCR4b were involved in neutrophils recruitment under inflammatory response, complete tailfin transection was performed to 3dpf mutants and wild type transgenic larvae. The recruited neutrophils were scored for 24 hours, observing that the mutant larvae recruited a higher number of neutrophils than their siblings in the inflammatory phase, but not during the resolution of inflammation.

Finally, time-lapse microscopy of neutrophil recruitment after tailfin transection showed an increased directionality of these cells to wounds in mutants, but there was no difference in speed.

In summary, the results show that SDF-1a/CXCR4b signaling pathway is involved in the retention of neutrophils in the hematopoietic tissue and its effects become more important as development proceeds or in response to an inflammatory stimulus.

## 1. INTRODUCCION

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación tanto de humanos como del pez cebra y juegan un rol fundamental en la respuesta inmune innata (Lieschke y col., 2001). En respuesta a daño tisular, infección u otro estímulo inflamatorio, los neutrófilos son reclutados rápidamente infiltrándose en el tejido afectado, lo que genera un ambiente tóxico para los patógenos a través de sus funciones efectoras: degranulación, fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), secreción de citoquinas pro-inflamatorias y extrusión de trampas extracelulares neutrofilicas (NETs) (Starnes y Huttenlocher, 2012). Estas respuestas son conocidas por provocar el secuestro y eliminación de microorganismos en su sitio de entrada y promover la activación del sistema inmune adaptativo. Luego sobreviene la resolución de la inflamación, en la cual disminuye la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias y los leucocitos sufren muerte celular programada, necrosis o bien migran fuera del sitio afectado (migración retrógrada) (Mathias y col., 2006; Holmes y cols., 2012).

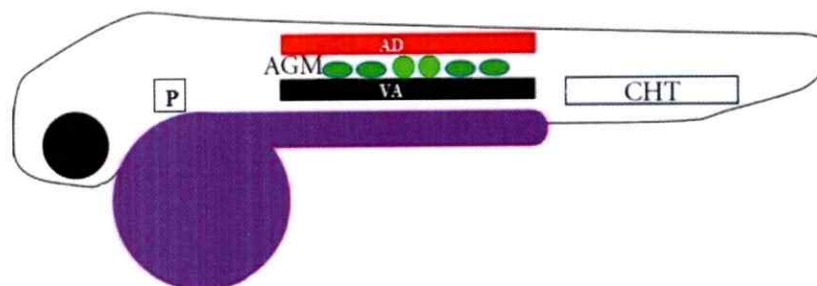
Fallas en la respuesta inflamatoria generan un estado patológico que puede aumentar la susceptibilidad del organismo a sufrir infecciones de tipo bacterianas y micóticas. Por otro lado, si falla la resolución de la inflamación y la infiltración de neutrófilos persiste por mucho tiempo, incrementa la probabilidad de daño a los tejidos sanos, dada la alta capacidad destructiva de estas células (Strydom y Rankin, 2013). De esta manera, el control homeostático de los niveles de neutrófilos circulantes y del número de neutrófilos reclutados durante una respuesta inflamatoria es fundamental, ya que un

desequilibrio puede resultar en infecciones desmesuradas o en estados inflamatorios inapropiados.

### **1.1 Desarrollo de los neutrófilos en pez cebra**

La hematopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos celulares que forman la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética multipotente (HSC). En pez cebra las HSC se originan a las 26 hpf entre la aorta dorsal y la vena axial, zona que ha sido considerada homóloga a la aorta-gónada-mesonefros (AGM) de mamíferos (Figura 1), el cual corresponde al primer lugar donde las células HSC pueden ser detectadas en el desarrollo (Goligorsky y col., 2009). A las 36hpf las primeras poblaciones de HSC entran en la circulación sanguínea y comienzan a colonizar el tejido caudal hematopoyético (CHT) (Figura 1), ubicado en la región ventral de la cola, donde se diferencian y expanden, y a los 4dpf comienzan a migrar anteriormente colonizando los órganos hematopoyéticos definitivos, los pronefros (Figura 1) y el timo (Guyader y col., 2008). De esta manera, se puede decir que el CHT corresponde a una zona de hematopoyesis transitoria, similar al hígado fetal en los mamíferos (Muruyama y col., 2006). Análisis de la expresión de los marcadores hematopoyéticos tempranos indican que el CHT es el principal sitio de hematopoyesis larval hasta 5dpf, durante este periodo los pronefros son colonizados gradualmente desde el 4dpf por células precursoras (HSC) provenientes del CHT, convirtiéndose en el sitio definitivo de hematopoyesis desde el 14dpf (Muruyama y col., 2006). En el pez

cebra adulto la hematopoyesis tiene lugar en la médula renal, el sitio equivalente a la médula ósea de los mamíferos (Bennet y col., 2001).



**Figura 1. Representación esquemática de la localización de los tejidos hematopoyéticos y vasos sanguíneos en la larva del pez cebra.** AGM: Aorta-Gónada-Mesonefros, CHT: Tejido Caudal Hematopoyético, P: Pronefros, AD: Aorta Dorsal, VA: Vena Axial. (Modificado de Khandekar y col., 2012).

Las células HSC pueden dar lugar a células progenitoras linfoides (linfoblastos) o mieloides (mieloblastos) (Kondo, 2010). A partir de las células progenitoras linfoides se generan las células “natural killer” y los linfocitos (B y T), mientras que los eritrocitos, megacariocitos, monocitos y granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) provienen de las células progenitoras mieloides. La generación, desarrollo y maduración de las células del linaje mieloides a partir de una célula progenitora común, el mieloblasto, se conoce como mielopoyesis, cuya diferenciación en los diversos componentes mieloides depende de la expresión de combinaciones sucesivas de factores de transcripción, receptores, factores de crecimiento y citoquinas (Wolff y col., 1995).

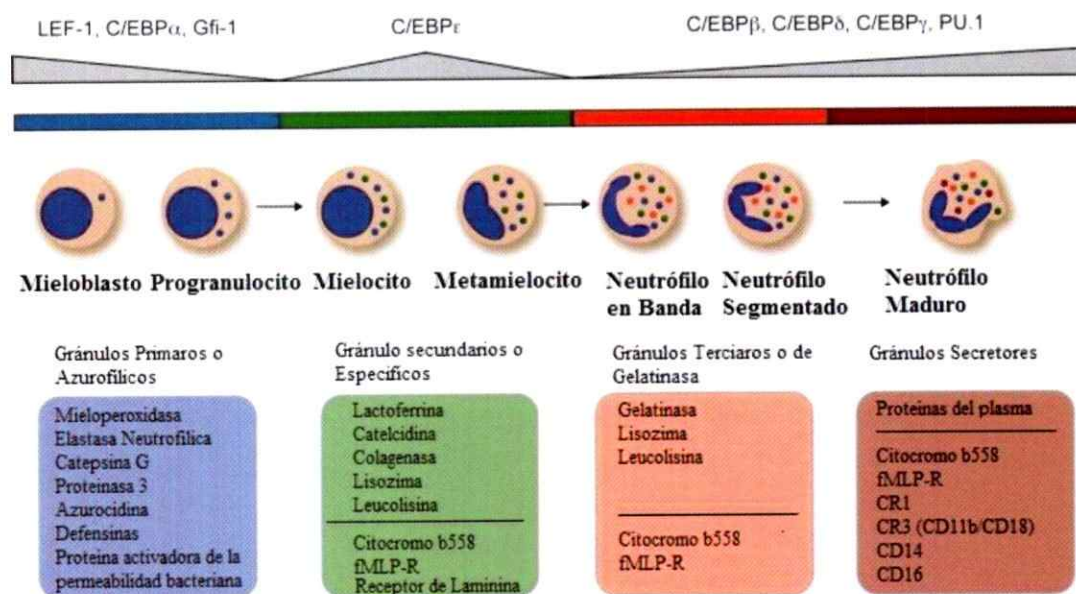


El proceso mediante el cual se generan granulocitos polimorfonucleares maduros a partir de progenitores granulocíticos (promielocitos o progranulocitos) se denomina granulopoyesis. La granulopoyesis de neutrófilos se inicia con un progenitor mielóide o mieloblasto que principalmente por acción de la molécula G-CSF (Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas) se diferencia a progranulocito (Fiedler y Brunner, 2012). Estos se caracterizan por la presencia de los denominados gránulos primarios o azurofílicos, que tienen un alto contenido en mieloperoxidasa, defensinas, catepsina G, elastasa neutrofilica (ELANE) y proteinasa 3 (Nathan, 2006).

Posteriormente estos progranulocitos dan lugar al desarrollo de los mielocitos y metamielocitos (Figura 2), los cuales se caracterizan por presentar segmentación nuclear y por la aparición de los gránulos secundarios, que contienen grandes cantidades de lactoferrina, catelicidina, colagenasa, así como leucolisina y lisozima en la matriz (Fiedler y Brunner, 2012).

La última etapa de la granulopoyesis de neutrófilos corresponde a la generación de los denominados neutrófilos bandas y segmentados (Figura 2), los cuales darán lugar a neutrófilos maduros con núcleo segmentado, gránulos terciarios y secretores. Los gránulos terciarios se encuentran principalmente definidos por un alto contenido de elastinasa, así como leucolisina y lisozima, mientras que los gránulos secretores sólo contienen proteínas plasmáticas en su matriz (Nathan, 2006). En la Figura 2 se puede

apreciar un esquema de las etapas de desarrollo de un neutrófilo desde mieloblasto a neutrófilo maduro (Fiedler y Brunner, 2012).



**Figura 2. Etapas de desarrollo de los neutrófilos desde mieloblasto a neutrófilo maduro.** Se esquematizan las etapas del desarrollo de los neutrófilos con los respectivos factores de transcripción y moléculas producidas en cada etapa. (Modificado de Fiedler y Brunner, 2012)

## 1.2 Retención y liberación de los neutrófilos en sistemas homeostáticos

La homeostasis de los neutrófilos es mantenida por un delicado balance entre granulopoyesis, retención y liberación desde el tejido hematopoyético, así como “clearance” y destrucción de estas células granulocíticas. En el tejido hematopoyético, la granulopoyesis se encuentra restringida al espacio extravascular donde las células hematopoyéticas forman densas cuerdas que se encuentran intercaladas a lo largo de los senos venosos y están íntimamente asociadas con las células del estroma y componentes

de la matriz extracelular (Holmes y col., 2012). La salida de neutrófilos maduros desde el tejido hematopoyético requiere que éstos migren a través del endotelio sinusoidal que separa el compartimento hematopoyético de la circulación. En mamíferos, la médula ósea actúa como un gran reservorio de neutrófilos maduros, y se estima que en estado homeostático más del 90% de los neutrófilos totales son retenidos en su interior, mientras que sólo un 1-2% se encontrarían en la circulación, lo que sugiere que existen mecanismos moleculares específicos que regulan la retención y liberación de estas células en la médula ósea (Strydom y Rankin, 2013).

En mamíferos, el eje de señalización SDF-1/CXCR4 tiene un rol fundamental en la retención de neutrófilos en el tejido hematopoyético en condiciones homeostáticas (Strydom y Rankin, 2013). SDF-1 (Factor 1 derivado de estroma; CXCL12) corresponde a una quimioquina expresada constitutivamente por las células estromales del tejido hematopoyético y en bajos niveles en casi todos los otros tejidos (Summers y col., 2010). Uno de sus receptores es CXCR4 (CXC chemokine receptor 4), un receptor de membrana acoplado a proteína G que se encuentra expresado tanto en la superficie de las HSC como de neutrófilos (Suratt y col., 2004).

Se ha postulado que en estado homeostático la vía de señalización SDF-1/CXCR4 controla la liberación de los neutrófilos desde el tejido hematopoyético, modulando la interacción de las moléculas VLA-4 y VCAM, ambas involucradas en la adhesión celular (Petty y col., 2009). VLA-4 (antígeno 4 muy tardío) es una integrina ( $\alpha_4\beta_1$ ) cuya expresión es fundamental en la retención de las células madres hematopoyéticas (Petty y col., 2009). Mientras que VCAM (molécula de adhesión

celular vascular) corresponde a una molécula de adhesión celular tipo inmunoglobulina expresada en el estroma y endotelio de la médula ósea de mamíferos (Ulyanova y col., 2004). El inicio de la expresión de VCAM coincide con el comienzo de la granulopoyesis, sugiriendo que VCAM estaría actuando como un blanco crítico en la adhesión de neutrófilos (Petty y col., 2009).

La modulación de la interacción VLA-4/VCAM por el eje de señalización SDF-1/CXCR4 se produce cuando SDF-1 interactúa con CXCR4, lo que genera una señal intracelular acoplada a proteína G, que aumenta la afinidad de la integrina VLA-4 de neutrófilos por VCAM del estroma, incrementando la fuerza de la adhesión celular (Auiti y col., 1997).

Tanto la expresión de VLA-4 como la de CXCR4 son altas durante los estadios inmaduros de los neutrófilos, y disminuyen a medida que aumenta la madurez de estas células (Lund-Johansen y Terstappen, 1993). La disminución de CXCR4 en la superficie celular se debe a que a medida que maduran los neutrófilos, ocurre una desensibilización donde el receptor se vuelve refractario ante la estimulación continua por SDF-1, generando la fosforilación del extremo C-terminal de CXCR4, promoviendo la adhesión de  $\beta$ -arrestinas y generando que el complejo CXCR4-SDF1 sea internalizado y degradado en los lisosomas (Busillo y Benovic, 2007).

En resumen, la retención y salida de los neutrófilos desde el tejido hematopoyético en estado homeostático se encuentra relacionado con su madurez y parece estar gobernado por la interacción VLA-4/VCAM, la cual se encuentra modulada

por la activación de la vía SDF-1/CXCR4. Esto explicaría la retención de neutrófilos inmaduros, mientras que la disminución programada de la expresión de CXCR4 como de VLA-4 en neutrófilos maduros, sería responsable de la liberación controlada de éstos en la circulación en estado homeostático (Petty y col., 2009). En las larvas de pez cebra es posible encontrar neutrófilos dispersos en los tejidos y circulantes a partir de las 48hpf, lo que indicaría que desde este estadio ya es posible encontrar una población de neutrófilos maduros (Burns y Zon, 2006).

Además de las señales de retención presentes en el tejido hematopoyético, se encuentran las señales de liberación. Las principales moléculas en actuar como señales de liberación son las quimioquinas CXCL1 y CXCL2, expresadas en bajas concentraciones por las células del endotelio y por megacariocitos. Estas quimioquinas al interactuar con su receptor CXCR2 presente en la superficie de los neutrófilos actuarían atrayendo a los neutrófilos maduros al endotelio y por lo tanto promoverían su salida a la circulación (Strydom y Rankin, 2013).

### **1.3 Retención y liberación de neutrófilos ante el quiebre de la homeostasis**

La interrupción de la señalización de CXCR4 constituye un mecanismo de gran importancia a la hora de movilizar neutrófilos a la circulación ante condiciones de estrés, donde la citoquina G-CSF juega un rol fundamental. En condiciones homeostáticas la expresión de G-CSF por las células estromales del tejido hematopoyético es muy baja, sin embargo, durante el proceso inflamatorio, los niveles de expresión de esta citoquina

aumentan considerablemente, estimulando la liberación de los neutrófilos del tejido hematopoyético (Strydom y Rankin, 2013). G-CSF ejerce sus efectos a través de la unión a receptores de G-CSF, los cuales se encuentran presentes en progenitores granulocíticos y en neutrófilos, siendo estos últimos los que poseen los mayores niveles de este receptor en su superficie desde su desarrollo temprano. La unión de G-CSF al receptor presente en progenitores granulocíticos genera la activación de cascadas de señalización intracelulares involucradas en la granulopoyesis, mientras que en neutrófilos aumenta su velocidad de maduración (Root y Dale, 1999). Además G-CSF induce la movilización de neutrófilos de forma indirecta, al suprimir la actividad productora de SDF-1 (CXCL12) por las células estromales, disminuyendo de esta manera la señalización SDF-1/CXCR4, lo que genera la migración de los neutrófilos desde el tejido hematopoyético (Galdames y col., 2014). G-CSF también estimula de forma indirecta a los megacariocitos que se encuentran cercanos a los vasos sanguíneos a producir CXCL1, un atractor de neutrófilos.

Por otro lado, en el sitio de inflamación se genera CXCL8 (IL-8), una citoquina derivada de macrófagos que actúa como potente atractor y activador de neutrófilos en el sitio de inflamación (Carré y col., 1991). CXCL8 ejerce sus efectos mediante la unión a CXCR2 y a CXCR1, involucrados en la migración de neutrófilos a través del espacio vascular de la médula ósea, oponiéndose a la función del eje de señalización SDF-1/CXCR4 (Nasser y col., 2009).



#### **1.4 Evidencia que sustenta que el eje de señalización SDF-1/CXCR4 actúa en la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético**

Reportes previos de la literatura han permitido asociar el rol de SDF-1 y CXCR4 en la regulación de la retención y liberación de neutrófilos desde el tejido hematopoyético. En algunos de estos trabajos se ha observado que la administración de un antagonista de CXCR4 a ratones o humanos genera un rápido incremento en los neutrófilos circulantes como resultado del bloqueo de la interacción SDF-1/CXCR4, sugiriendo que SDF-1 actuaría como un factor de retención de neutrófilos en el tejido hematopoyético (Furze y Rankin, 2008). En otros artículos se ha observado que el generar una deleción genética de CXCR4 en células murinas hematopoyéticas, resulta en una movilización constitutiva de neutrófilos al torrente sanguíneo (Eash y col., 2009). Por otro lado, se ha observado que pacientes con Síndrome de WHIM (heridas, hipogamaglobulinemia, infecciones y mielocatexis) quienes padecen una profunda neutropenia y altos niveles de neutrófilos en la médula ósea, poseen una mutación en donde el extremo C-terminal de CXCR4 se encuentra truncado en los aminoácidos que experimentan fosforilación, impidiendo de esta manera la internalización del receptor y generando una señalización aumentada que sería la responsable de la alta retención de neutrófilos en la médula ósea (Hernandez y col., 2003).

En el genoma del pez cebra se encuentran codificados dos ligandos SDF1 (CXCL12), SDF-1a y SDF-1b, así como dos receptores ortólogos a CXCR4 de mamíferos, CXCR4a y CXCR4b. SDF-1a se expresa en altas concentraciones en la región del CHT y los pronefros, y en menor concentración en la cabeza, mientras que

SDF-1b se expresa en muy bajas concentraciones en la zona de la cabeza y ventral. Por otro lado, los neutrófilos expresan CXCR4b, pero no CXCR4a (Walters y col., 2011).

Utilizando al pez cebra como modelo, Walters y col. mostraron el 2011 que al inducir una mutación en el dominio C-terminal de CXCR4b se suprime la internalización del receptor, generándose los síntomas del síndrome WHIM (Walters y col., 2011). Además, se mostró que esta ganancia de función de CXCR4b disminuye el reclutamiento de neutrófilos a las heridas e induce la retención de los neutrófilos en el CHT, donde experimentarían apoptosis. La retención sería dependiente de SDF-1a, debido a que la depleción de SDF-1a con oligonucleótidos de morfolino restaura la quimiotaxis a las heridas (Walters y col., 2011).

### **1.5 Ventajas de utilizar al pez cebra como modelo**

A pesar de la gran divergencia evolutiva entre el pez cebra y los mamíferos, los mecanismos moleculares involucrados en la hematopoyesis así como los cambios en los sitios anatómicos en donde se producen las células del sistema sanguíneo a lo largo del desarrollo se encuentran altamente conservados (Davidson y Zon, 2004). Además, el sistema inmune del pez cebra se asemeja bastante al de los mamíferos. Los linajes celulares tales como macrófagos, linfocitos T y B, mastocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos son comunes tanto para humanos como para peces cebra (Starnes y Huttenlocher, 2012). Al igual que en humanos, los neutrófilos son las primeras células inmunes en ser movilizadas desde la médula ósea hacia el sitio de inflamación, donde



experimentan degranulación y son capaces de fagocitar bacterias. Más aún, existe una recapitulación del comportamiento de los neutrófilos en modelos de enfermedades humanas realizados en pez cebra, como los Síndromes de Wiskott-Aldrich (WAS) de WHIM y la Deficiencia de Adhesión Leucocitaria (LAD) (Starnes y Huttenlocher, 2012).

Además, algo muy importante es que los estadios tempranos de desarrollo del pez cebra ofrecen la oportunidad de estudiar la inmunidad innata durante los estadios larvales de manera independiente del componente adaptativo, el cual alcanza la madurez morfológica y funcional sólo después de la cuarta semana de desarrollo (Novoa y Figueras, 2012) . Otra característica atractiva de este organismo modelo es que tiene un genoma secuenciado apto para ser modificado genéticamente con las herramientas existentes, lo que ha permitido la creación de líneas transgénicas estables. Una de ellas es la que marca específicamente neutrófilos, donde la expresión de GFP bajo el promotor de la enzima mieloperoxidasa (Mathias y col., 2006), permite realizar la caracterización de los neutrófilos en estado homeostático y ante estímulos inflamatorios. Tal vez la ventaja más significativa de utilizar la larva del pez cebra como modelo es su transparencia óptica, que permite realizar imagenología *in vivo* de manera no invasiva, utilizando herramientas comúnmente disponibles como lo son la microscopía confocal o estereoscopio de fluorescencia.

Conocer cómo los neutrófilos equilibran su comportamiento y mantienen la homeostasis es un fenómeno de interés; no obstante, en mamíferos este tipo de estudios presenta dificultades como la ausencia de herramientas apropiadas para la visualización

y seguimiento de los leucocitos, en particular para el estudio de su actividad migratoria a largo plazo. Este obstáculo es difícil de sortear en modelos murinos; sin embargo, las larvas de pez cebra ofrecen la oportunidad de monitorear fácilmente los leucocitos en acción, puesto que pueden ser visualizados *in vivo* usando microscopía de fluorescencia y peces transgénicos cuyos leucocitos expresan proteínas fluorescentes. Puesto que la mayoría de los elementos celulares y moleculares de la inmunidad innata se encuentran conservados entre peces y humanos, el pez cebra es un modelo idóneo para la caracterización molecular de la inflamación, migración dirigida, resolución y mecanismos de enfermedades (Starnes y Huttenlocher, 2012).

En este trabajo se pretende demostrar el rol de la vía de señalización SDF-1a/CXCR4b en la retención de los neutrófilos en condiciones homeostáticas, durante el desarrollo y ante la respuesta inflamatoria. Como antecedente fundamental se utilizó el trabajo de Walters y col., 2011, quienes modelaron el Síndrome de WHIM en pez cebra. Para ello expresaron una mutación en el dominio citoplasmático de CXCR4b, dando lugar a una ganancia de función, caracterizada por la retención de neutrófilos en el tejido hematopoyético, una neutropenia exacerbada y un nulo reclutamiento de neutrófilos a las heridas. Por otro lado, ellos observaron que la depleción de SDF-1a con oligonucleótidos de morfolino restablece la quimiotaxis de los neutrófilos al sitio de daño (Walters y col., 2011).

Los resultados obtenidos por Walters y col., 2011, parecen evidenciar un claro papel de SDF-1a y CXCR4b en el comportamiento de los neutrófilos. Sin embargo, la ganancia de función dominante que se genera en el Síndrome de WHIM, impide

observar cómo influyen SDF-1a y CXCR4b en la cinética de reclutamiento de los neutrófilos durante la inflamación, resolución y a lo largo del desarrollo, ya que los neutrófilos permanecen constantemente retenidos en el tejido hematopoyético. Es por ello que para evaluar el rol del eje de señalización en la retención de los neutrófilos durante el desarrollo y la respuesta inflamatoria, es necesario utilizar un modelo de pez cebra que porte versiones funcionalmente nulas de SDF-1a y CXCR4b.

Como hipótesis de trabajo se sostiene que SDF-1a actúa, a través de CXCR4b, como una señal de retención para los neutrófilos durante el desarrollo y la respuesta inflamatoria.

El objetivo general de este seminario de título es estudiar la distribución y reclutamiento de los neutrófilos en larvas que expresan formas mutantes de SDF1a o CXCR4b y compararlas con las silvestres.

Dentro de los objetivos específicos se encuentran los siguientes:

Objetivo Específico 1: Estudiar la distribución de los neutrófilos tanto en los órganos donde ocurre la granulopoyesis como en la circulación sanguínea durante la hematopoyesis primitiva y definitiva en larvas mutantes para SDF1a o CXCR4b.

Objetivo Específico 2: Estudiar el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a daño tisular en larvas mutantes para SDF1a o CXCR4b.

## 2. MATERIALES Y METODOS

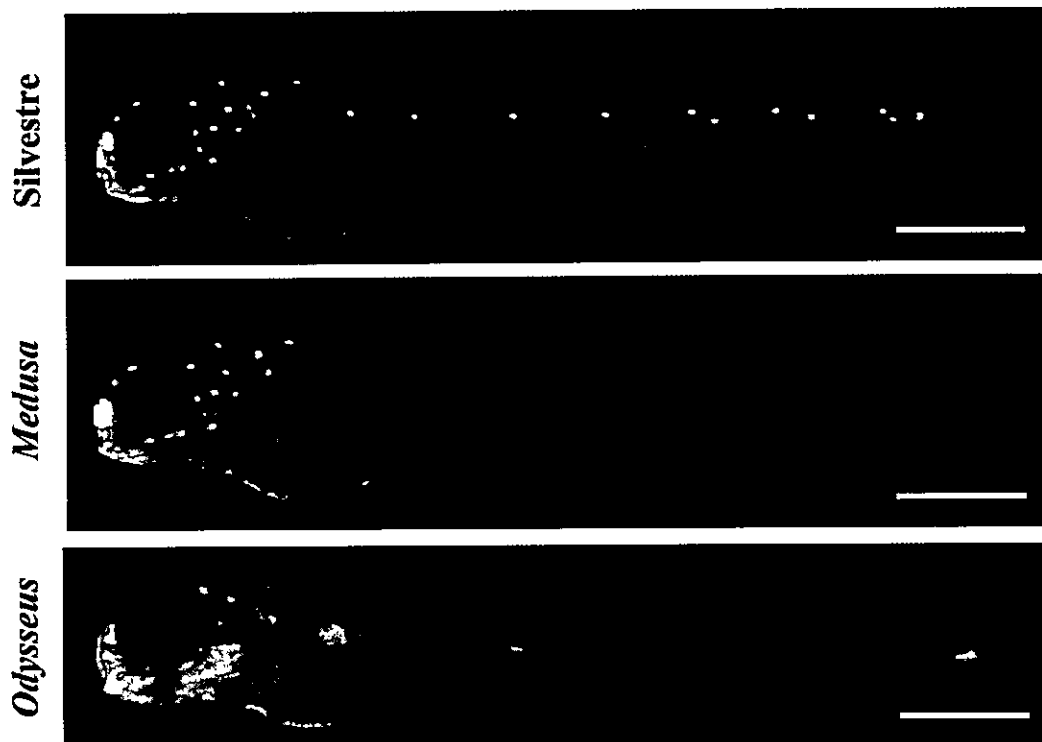
### 2.1 Condiciones de cría y experimentación de pez cebra

En este estudio se utilizaron larvas transgénicas que expresan GFP bajo el promotor de la mieloperoxidasa (TgBAC(mpx:GFP<sup>ii14</sup>)) (Renshaw y col., 2006), lo que permite visualizar el comportamiento de los neutrófilos en larvas silvestres y compararlo con aquellas homocigotas para la mutación de SDF-1a o CXCR4b (Knaut y col., 2003; Valentin y col., 2007). Para la obtención de las larvas, se utilizaron peces parentales transgénicos (TgBAC(mpx:GFP<sup>ii14</sup>)) portadores de la mutación para ligando o receptor y fueron cruzados con animales no transgénicos, pero portadores de la mutación. El sexo de los parentales se determinó observando la zona ventral y anal de los peces, en el caso de las hembras es posible distinguir las por su vientre abultado y por la presencia del órgano ovipositor, mientras que los machos suelen ser mucho más esbeltos y amarillentos en la zona ventral. Los parentales fueron colocados en una misma caja de reproducción, pero separados toda la noche por una división. A la mañana siguiente, luego de 10 horas de oscuridad, las luces se encienden y se retiran las separaciones para permitir el apareamiento, el cual toma entre 20 min y 1 hora. Los embriones fueron colectados por desove natural y mantenidos bajo un fotoperiodo de 14h de luz y 10h de oscuridad a 28.5 °C en medio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,3 mM, y 0.1% (v/v) de azul de metileno, equilibrado a pH 7,0) en placas Petri (Avdesh y col., 2012). Los estadios de desarrollo de las larvas se establecieron de acuerdo a Kimmel y col. 1995, y se expresaron en días post fertilización (dpf). Todos los animales

usados en este trabajo fueron anestesiados con MS-222 (tricaine; A5040, Sigma) antes de cada experimento.

## 2.2 Identificación de larvas mutantes con tinción DiOC<sub>6</sub>

Tanto las larvas mutantes *odysseus* (CXCR4b<sup>-/-</sup>) como *medusa* (SDF-1a<sup>-/-</sup>) tienen un fenotipo de desarrollo anómalo de la línea lateral posterior. La línea lateral corresponde a un sistema mecanosensorial compuesto por un grupo de órganos sensoriales superficiales denominados neuromastos (Knaut y col., 2003; Valentin y col., 2007). Su desarrollo se inicia con un primordio de células cuya migración y direccionalidad son dependientes de SDF-1 y CXCR4 (David y col., 2002). Las larvas mutantes para SDF-1 y CXCR4 tienen un número significativamente menor de neuromastos en la línea lateral posterior o carecen absolutamente de ellos (Figura 3). Para identificar las larvas mutantes se realizó una tinción con DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide; D273, Invitrogen), un compuesto lipofílico fluorescente que se intercala en las membranas de las células de la piel y permite así observar los neuromastos de la línea lateral. Antes de realizar cada experimento las larvas se incubaron durante 5 minutos en DiOC<sub>6</sub> (300 ng/mL) disuelto en E3 y posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos con E3. Se identificó cada larva observando su línea lateral posterior en un estereoscopio de fluorescencia. Se separaron las larvas mutantes de sus hermanas o "siblings" silvestres. Los experimentos se realizaron utilizando como control silvestre a los respectivos "siblings" de cada mutante.



**Figura 3.** Larvas de pez cebra luego de ser sometidas a tinción con DiOC<sub>6</sub>. Se puede apreciar que las larvas silvestres poseen neuromastos (círculos de color blanco en la imagen) a lo largo de la línea lateral, sin embargo los mutantes no. Las larvas corresponden a 3dpf. Barra de Escala: 500  $\mu$ m.

### 2.3 Tinción de neutrófilos con Sudan Black

Para observar la distribución de los neutrófilos de mutantes y silvestres a distintos estadios del desarrollo (3, 5, 7 y 9dpf) en condiciones homeostáticas, se realizó una tinción con Sudan Black ((2,2-dimetil-1,3-dihidropirimidina-6-il)-(4-fenilazo-1-naftil) diazeno; 3801, Sigma), un diazo-compuesto lipídico que tiñe los gránulos secundarios de los neutrófilos. Las larvas previamente identificadas fueron fijadas con paraformaldehído 4% en PBS (“phosphate-buffered saline”) por 2 horas a temperatura

ambiente. Luego se incubaron con Sudan Black (0,03%) en etanol 70% por 20 minutos. Transcurrido ese tiempo se realizaron dos lavados con etanol 70% (v/v) y posteriormente las larvas se rehidrataron progresivamente con PBS Tween (PBS y 0,1% Tween 20). Dado que las larvas de pez cebra presentan cúmulos de pigmentos que darán origen a las rayas en el adulto, se debió realizar un proceso de despigmentación, el cual consiste en incubar las larvas fijadas durante 1,5hrs en una solución de PBS con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) y KOH 0,5% (p/v) seguido de 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Para la adquisición de imágenes las larvas fijadas se montaron en glicerol 80% (v/v) disuelto en PBST 0,1% y se fotografiaron utilizando el programa QImaging Pro y un estereoscopio de fluorescencia Olympus MVX10 equipado con una cámara digital QImaging. Se fotografió la zona de los pronefros utilizando un aumento de 4x y la zona del CHT con un aumento de 2,5x. En la figura 1 se muestra un esquema donde se indica la posición de los pronefros y CHT.

### 2.3 Cuantificación de Neutrófilos en Circulación

La cuantificación de neutrófilos en circulación se realizó en larvas transgénicas (*TgBAC(mpx:GFP)<sup>114</sup>*) mutantes (*medusa* y *odysseus*) y silvestres a distintos estadios del desarrollo (3, 5, 7, 9 y 13 dpf). Las larvas fueron anestesiadas con MS-222 (tricaine; A5040, Sigma) al 2% en E3 por 2 minutos. Posteriormente, bajo un estereoscopio de fluorescencia Olympus MVX10 se cuantificó el número de neutrófilos que circulan por la aorta dorsal (Figura 1) durante 1 minuto. Los resultados experimentales fueron

analizados con Prism versión 6 (GraphPad Software). La significancia estadística fue determinada mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni.

## 2.4 Inducción de inflamación

Se utilizaron larvas transgénicas (TgBAC(mpx:GFP)<sup>ii14</sup>) mutantes (*medusa* y *odysseus*) y silvestres de 3dpf. Estas fueron anestesiadas con MS-222 (tricaine; A5040, Sigma) al 4% en E3 por 2 minutos. Con un bisturí se realizó transección de cola con cuidado de no tocar la circulación. Posteriormente cada larva se colocó en un recipiente de una placa multipocillo con medio E3 libre de anestesia. Las cuantificaciones de neutrófilos reclutados al sitio de incisión se realizaron cada 4 horas desde el tiempo cero hasta las 24 horas post-tansecto (hpt) bajo un estereoscopio de fluorescencia Olympus MVX10. Se cuantificó en los dos somitos anteriores al corte. Los resultados experimentales fueron analizados con Prism versión 6 (GraphPad Software). La significancia estadística fue determinada mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni.

## 2.5 Adquisición, procesamiento y análisis de microscopía de tiempo extendido

La microscopía de tiempo extendido se realizó a larvas *medusa*, *odysseus* y silvestres. Las larvas silvestres a diferencia de las utilizadas en los experimentos



anteriores se obtuvieron de un cruce TAB5 (larvas silvestres no transgénicas) con larvas silvestres que marcaban los neutrófilos (TgBAC(mpx:GFP)<sup>i114</sup>). A todas las larvas se les realizó transección de cola siguiendo el protocolo descrito previamente. Estas fueron colocadas en medio E3 con 1% de MS-222 (tricaine; A5040, Sigma). Las imágenes se capturaron cada 30s durante 2h con un estereoscopio de fluorescencia Olympus MVX10 equipado con una cámara digital QImaging. Todas las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ versión 4,2 (Schneider y col., 2012). Las trayectorias de los neutrófilos migrando hacia el sitio de daño se obtuvieron utilizando el plugin “Manual Tracking”. La velocidad ( $\mu\text{m/s}$ ) y el índice de direccionalidad (distancia lineal/ distancia total recorrida) de los neutrófilos se obtuvo utilizando el plugin “Chemiotaxis and Migration Tool” de ImageJ. Los resultados experimentales fueron analizados con Prism versión 6 (GraphPad Software). La significancia estadística fue determinada mediante test t de Student no pareado de dos colas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Distribución de neutrófilos en tejidos hematopoyéticos de larvas mutantes para SDF1-a (*medusa*), CXCR4b (*odysseus*) y silvestres durante el transcurso del desarrollo larval.

El tejido caudal hematopoyético (CHT) corresponde a un tejido hematopoyético transitorio, el cual es colonizado por las células troncales hematopoyéticas (HSC) a las 36hpf. En este tejido hematopoyético, ubicado en la región ventral de la cola, las HSC se diferencian, expanden y al 4dpf inician la migración hacia los pronefros.

Para observar cómo varía la distribución de los neutrófilos en el CHT y los pronefros en las larvas mutantes y silvestres a lo largo del desarrollo, se realizó una tinción con Sudan Black. Este compuesto tiñe intensa y específicamente los gránulos de los neutrófilos con un precipitado negro. La ubicación anatómica del CHT y los pronefros se encuentra en el esquema de la figura 1.

En la figura 4A se puede observar que a los 3dpf los mutantes *medusa*, que carecen de SDF-1a, exhiben una distribución de neutrófilos indistinguible de sus “siblings” silvestres. Además, en este estadio la mayor densidad de neutrófilos se encuentra en la zona del CHT, sitio principal de hematopoyesis a los 3dpf.

A los 5, 7 y 9dpf no se aprecian diferencias en la distribución de los neutrófilos presentes el CHT de larvas *medusas* y sus “siblings” silvestres; sin embargo, si se puede apreciar una diferencia considerable en la distribución de los neutrófilos presentes en los pronefros. En las silvestres, es posible observar una gran densidad de neutrófilos en la

zona de los pronefros a los 5, 7 y 9dpf (Figura 4). En cambio, en larvas mutantes prácticamente no se observan neutrófilos en ese sitio. Por otro lado, la presencia de neutrófilos en los pronefros de larvas silvestres coincide con el hecho que a los 5dpf la hematopoyesis tiene lugar principalmente en este tejido.

En la figura 4B se encuentran las imágenes de distribución de neutrófilos en larvas *odysseus*, que carecen de CXCR4b, comparadas con sus respectivos “siblings” silvestres. Se puede observar que a los 3dpf no hay diferencias significativas entre *odysseus* y silvestres. Además la mayor cantidad de neutrófilos se encuentra concentrada en la zona del CHT.

A los 5, 7 y 9dpf se observa que las larvas silvestres presentan una gran densidad de neutrófilos en la zona de los pronefros, no así las *odysseus*. En estos estadíos parece no haber diferencias en la distribución de los neutrófilos en el CHT.

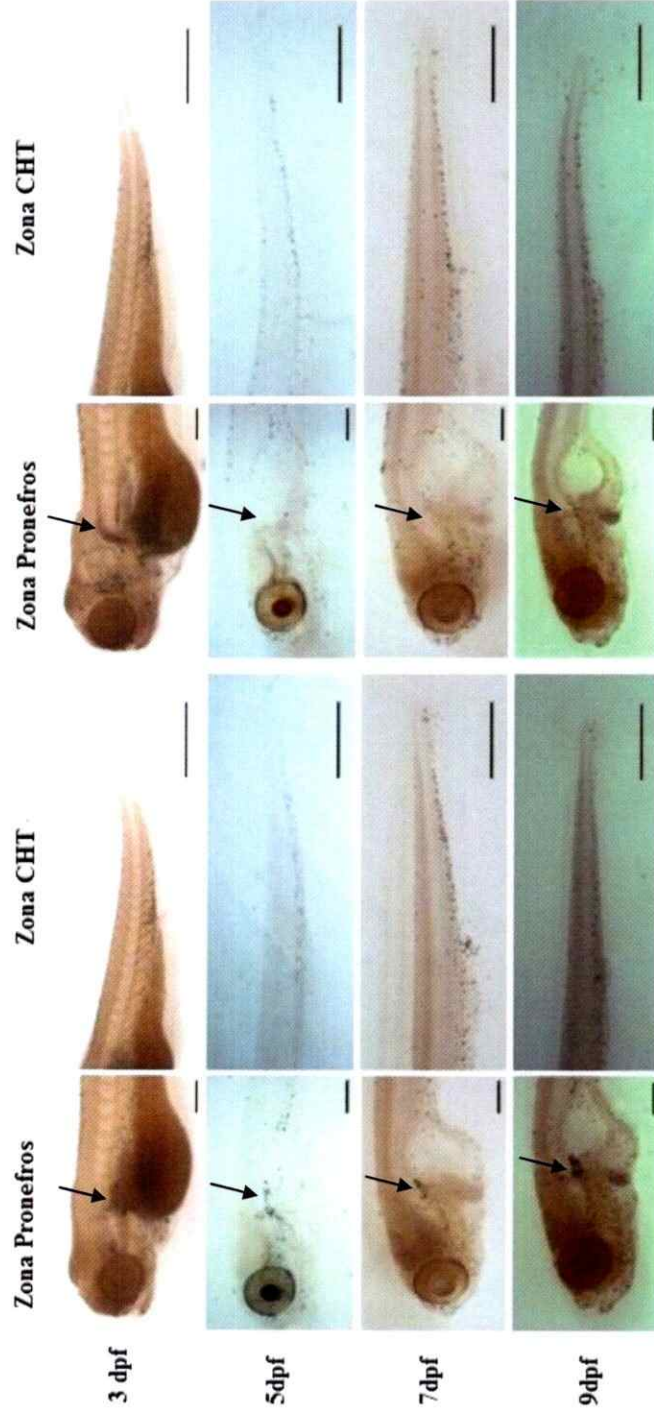
En general se pudo observar que el patrón de distribución de neutrófilos en función del desarrollo era el mismo en ambos mutantes. Es decir, en ambos mutantes no se apreciaron diferencias en la distribución de neutrófilos en la zona del CHT al compararlos con sus respectivos “siblings” silvestres, en ningún estadio del desarrollo. Sin embargo, desde el 5dpf se pudo observar que ambos mutantes exhibían una densidad de neutrófilos casi nula en la zona de los pronefros, a diferencia de los silvestres, los cuales presentaban una gran densificación de neutrófilos en esa zona.

Lo observado en la figura podría estar dando cuenta de la participación del eje de señalización SDF-1a/CXCR4b en la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético a medida que avanza el desarrollo larval.



(A) "SIBLINGS" SILVESTRES

MUTANTES MEDUSA

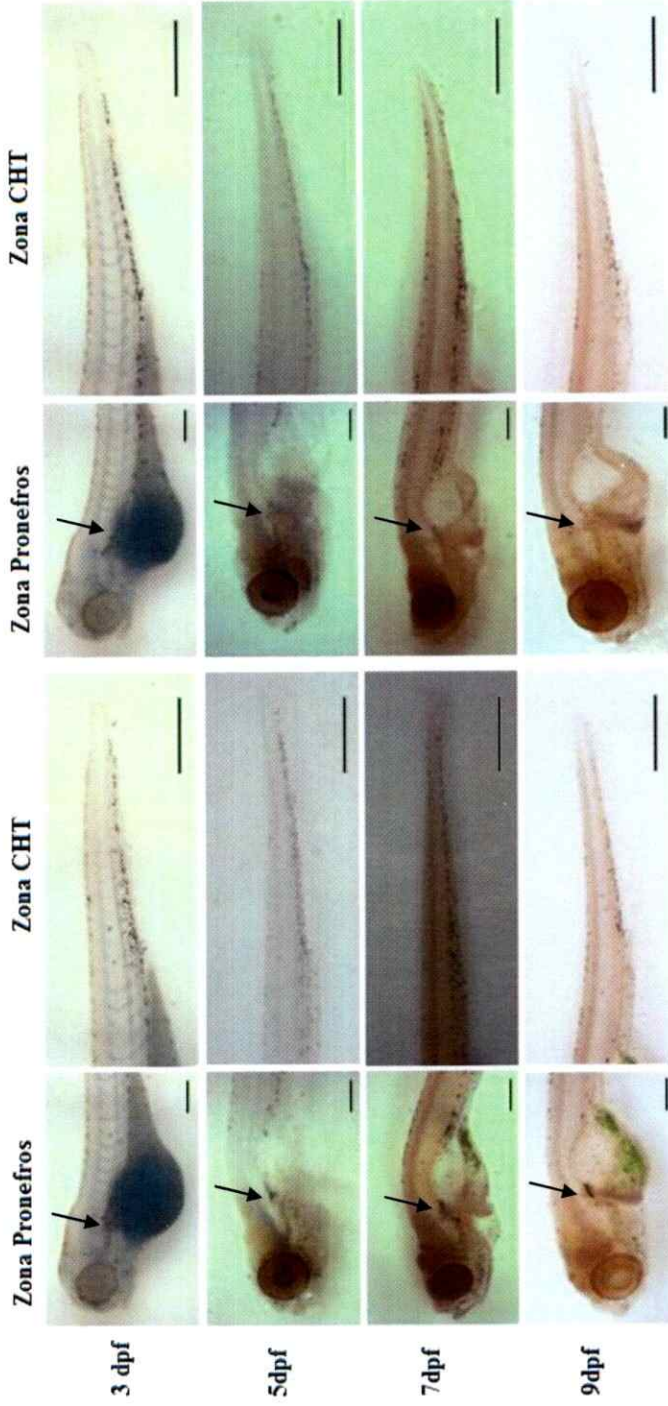


**Figura 4A. Distribución de neutrófilos en los tejidos hematopoyéticos de larvas silvestres y medusas a distintos estadios del desarrollo larval (3-9dpf).** Comparación de distribución de neutrófilos en larvas *medusa* con sus respectivos "siblings" silvestres a diferentes estadios de desarrollo, visualizados con tinción de Sudan Black. En la parte superior de cada imagen se indica la zona fotografiada (pronefros o CHT). A la izquierda se indica el estadio de desarrollo en días post-fertilización (dpf) de las larvas al momento de la tinción. Se observa que a los 3dpf no hay diferencias significativas en la distribución de neutrófilos entre larvas silvestres y mutantes. A los 5, 7 y 9 dpf se observa una densidad considerable de neutrófilos en la zona de los pronefros en las larvas silvestres, pero no en las mutantes. En el estadio de 9dpf se puede apreciar una disminución de neutrófilos en la zona del CHT respecto a los estadios previos tanto en mutantes como silvestres. La barra de escala en la zona de los pronefros es de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que en la zona del CHT es de 500  $\mu\text{m}$ . Las larvas presentes en la imagen corresponden a aquellas que poseían el fenotipo más representativo de la población, cercano a un 70%,  $n = 30 - 35$  larvas.

(B)

"SIBLINGS" SILVESTRES

MUTANTES ODYSSEUS



**Figura 4B. Distribución de neutrófilos en los tejidos hematopoyéticos de larvas silvestres y *odysseus* a distintos estadios del desarrollo larval (3-9dpf).** Comparación de distribución de neutrófilos en larvas *odysseus* con sus respectivos "siblings" silvestres a diferentes estadios de desarrollo, visualizados con tinción de Sudan Black. En la parte superior de cada imagen se indica la zona fotografiada (pronefros o CHT). A la izquierda se indica el estadio de desarrollo en días post-fertilización (dpf) de las larvas al momento de la tinción. Se observa que a los 3dpf no hay diferencias significativas en la distribución de neutrófilos entre larvas silvestres y mutantes. A los 5, 7 y 9 dpf se aprecia una densidad considerable de neutrófilos en la zona de los pronefros en las larvas silvestres, pero no en las mutantes. En el estadio de 9dpf se observa una disminución de neutrófilos en la zona del CHT respecto a los estadios previos tanto en mutantes como silvestres. La barra de escala en la zona de los pronefros es de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que en la zona del CHT es de 500  $\mu\text{m}$ . Las larvas presentes en la imagen corresponden a aquellas que poseían el fenotipo más representativo de la población, cercana a un 70%,  $n = 30 - 35$  larvas.

### **3.2 Determinación del número de neutrófilos circulantes en larvas mutantes para SDF1-a (*medusa*), CXCR4b (*odysseus*) y silvestres durante el transcurso del desarrollo larval**

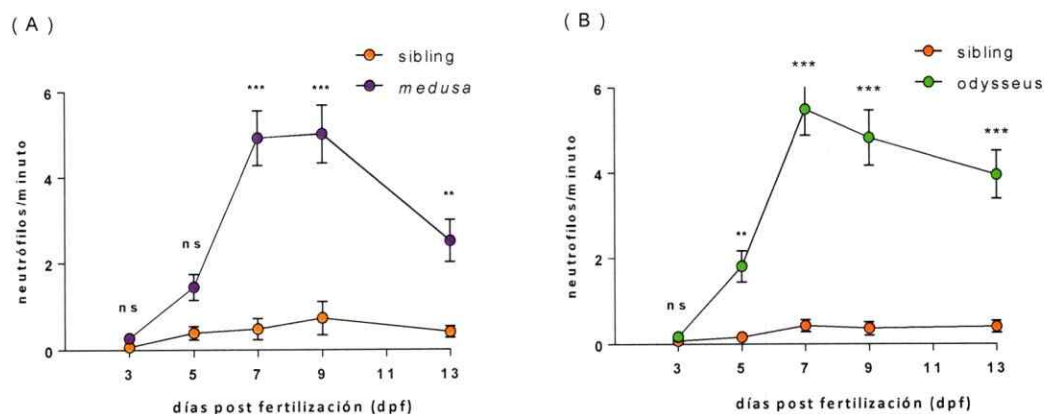
Tanto en pez cebra como en mamíferos, los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea son los neutrófilos. En condiciones homeostáticas, cuando estas células alcanzan la madurez, una pequeña población que generalmente son las que se encuentran en estrecha cercanía a los vasos sanguíneos, sale a la circulación (Strydom y Rankin, 2013). En el pez cebra, los primeros neutrófilos maduros aparecen alrededor de las 48 hpf (Burns y Zon, 2006). Sin embargo, no todas las células maduras entran en la circulación. Esto se debe en alta probabilidad a que su liberación se encuentra controlada por señales de retención presentes en el tejido hematopoyético comandadas por el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b (Strydom y Rankin, 2013).

Para probar el impacto de este par de moléculas en la liberación de neutrófilos desde el tejido hematopoyético a la circulación, se comparó el número de neutrófilos circulantes presentes en larvas mutantes para SDF-1a o CXCR4b con el de sus “siblings” silvestres. Para ello, se utilizaron larvas transgénicas que expresaban GFP en sus neutrófilos, lo que permitió cuantificar el número de células que circulaban por la aorta dorsal durante un minuto.

Como se puede apreciar en la figura 5, ambos mutantes exhiben un aumento significativo en el número de neutrófilos circulantes a medida que avanza el desarrollo, comparado con las larvas silvestres, las cuales presentan un leve incremento.



A partir de este experimento se puede inferir que SDF-1a y su receptor CXCR4b influyen en el número de neutrófilos presentes en la circulación.



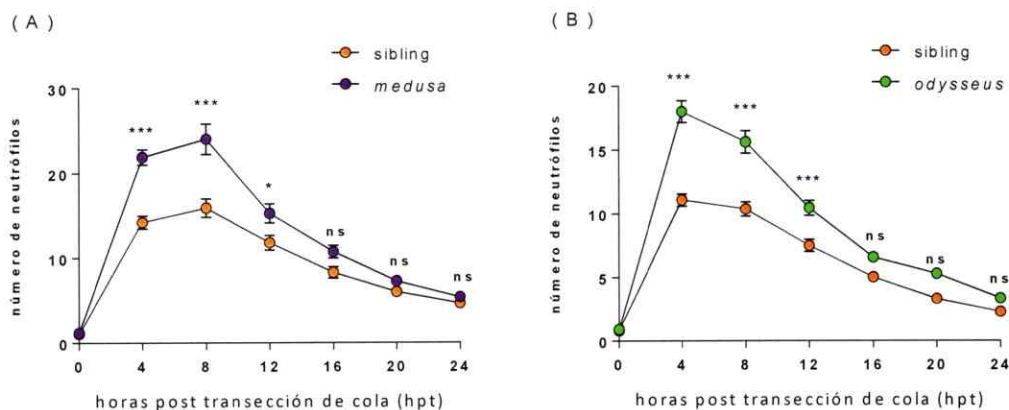
**Figura 5. Gráficos de cuantificación de neutrófilos circulantes en larvas mutantes y silvestres a distintos estadios del desarrollo (3-13dpf).** Las larvas mutantes exhiben un aumento significativo del número de neutrófilos en el torrente sanguíneo respecto a las silvestres a medida que avanza el desarrollo. (A) Larvas mutantes para SDF-1a (*medusa*) exhiben diferencias significativas en los estadios más tardíos de desarrollo (7-13dpf), pero no en los más tempranos (3-5dpf). (B) Larvas mutantes para CXCR4b (*odysseus*) muestran diferencias significativas desde los 5dpf. Las comparaciones se realizaron con ANOVA de dos vías y test *post-hoc* de Bonferroni. Barras de error = SEM, \*\*\*: p-value < 0,001, \*\*: p-value < 0,01, ns: p-value > 0,05, n = 30 – 40 larvas.



### 3.3 Determinación del número de neutrófilos reclutados al sitio de daño luego de transectar la cola de larvas silvestres, *medusa* y *odysseus*

Una de las principales características de la respuesta inmune innata es el proceso inflamatorio, donde los neutrófilos se infiltran en el tejido dañado y generan un ambiente tóxico para los patógenos. El número de neutrófilos reclutados al sitio de inflamación es fundamental, ya que es necesaria una respuesta altamente controlada para evitar estados patológicos tales como susceptibilidad a infecciones (por bajo reclutamiento) o daño tisular (por alto reclutamiento). Para determinar si SDF-1a y CXCR4b se encuentran involucrados en el reclutamiento de neutrófilos ante la generación de un estímulo inflamatorio, se trabajó con líneas mutantes y silvestres, ambas transgénicas (TgBAC(*mpx:GFP*)<sup>i114</sup>), a las cuales se les realizó transección de cola. Luego se cuantificó el número de neutrófilos reclutados cada 4 horas desde el tiempo cero hasta las 24 horas post-transecto (hpt).

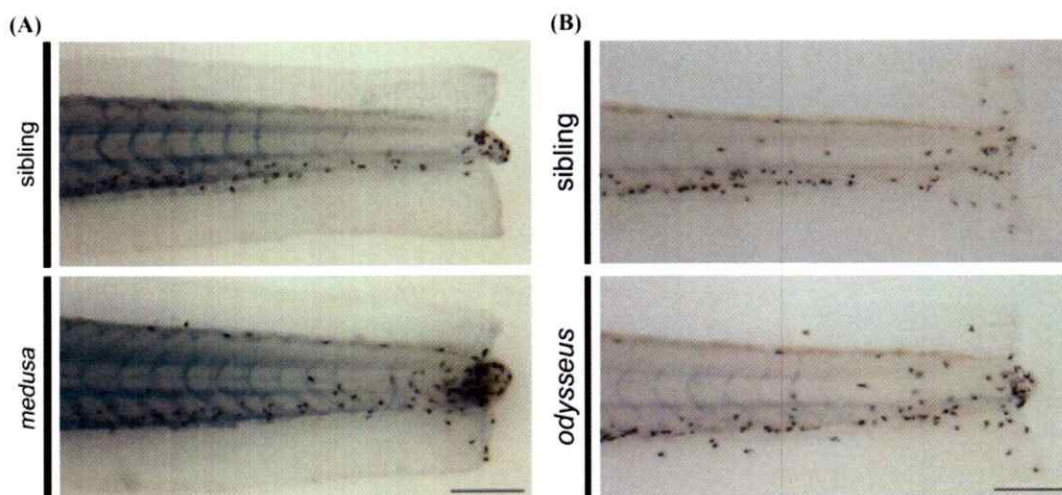
En la Figura 6 se puede observar que los mutantes y sus respectivos “siblings” silvestres poseen una cantidad reducida y similar de neutrófilos al momento de realizar la transección. Sin embargo, durante el proceso inflamatorio, a las 4 y 8hpt las diferencias entre mutantes y silvestres son estadísticamente significativas, observándose una mayor cantidad de neutrófilos reclutados al sitio del daño en los mutantes que en sus “siblings” silvestres.



**Figura 6. Curva de reclutamiento de neutrófilos al sitio de daño en larvas silvestres y mutantes en función de las horas post-transecto (hpt).** Las cuantificaciones se realizaron en larvas de 3dpf cada 4 horas durante 24 horas desde la inducción del daño. Se observa que tanto las larvas *medusa* (A) como *odysseus* (B) exhiben una diferencia significativa de neutrófilos reclutados respecto a las silvestres a las 4, 8 y 12 hpt. Las comparaciones se realizaron con ANOVA de dos vías y test *post-hoc* de Bonferroni. Barras de error = SEM, \*\*\*: p-value < 0,001, \*: p-value < 0,01, no significativo (ns): p-value > 0,05, n = 60 - 75 larvas.

Durante el proceso de resolución de la inflamación neutrofílica, sólo se observa una diferencia significativa entre mutantes y silvestres a las 12hpt, debido probablemente al alto reclutamiento observado horas antes, mientras que en el resto de los puntos correspondientes al proceso de resolución (16-24hpt) no se observan diferencias significativas.

Para mostrar de forma cualitativa las diferencias en el reclutamiento de neutrófilos entre mutantes y silvestres luego de un estímulo inflamatorio, se realizó una tinción con Sudan Black luego de 4hpt. En la Figura 7 se observa una clara diferencia, donde los mutantes presentan un mayor número de neutrófilos reclutados al sitio de inflamación que sus respectivos “siblings” silvestres.



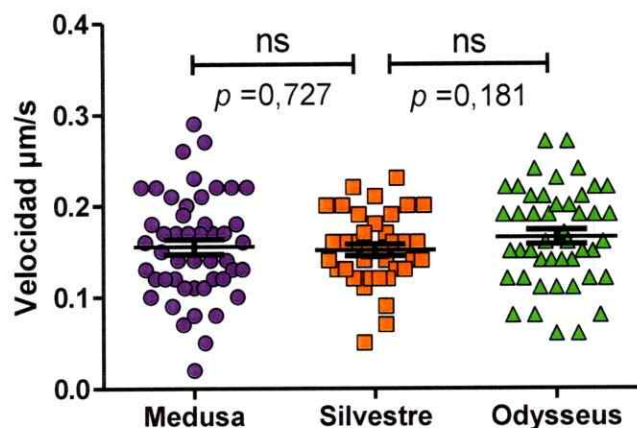
**Figura 7. Imagen de los neutrófilos reclutados luego de 4 horas post-transección (hpt) de cola en larvas mutantes y sus respectivos “siblings” silvestres.** Tinción con Sudan Black que permite visualizar los neutrófilos en corte de cola. Se aprecia una densidad de neutrófilos mayor en los cortes de cola de mutantes que en los silvestres (A) Transección de cola en peces *medusa* comparado con sus respectivos “siblings” silvestres. (B) Transección de cola en peces *odysseus* comparado con sus respectivos “siblings” silvestres. Las larvas presentes en la imagen corresponden a aquellas que presentaban el fenotipo más representativo de la población, cercano a un 70%, n = 30 – 40 larvas.

### 3.4 Determinación de velocidad y direccionalidad de los neutrófilos reclutados al sitio de daño luego de transectar la cola de larvas silvestres, *medusa* y *odysseus*

Dado que anteriormente se encontraron diferencias significativas en el reclutamiento de neutrófilos entre mutantes y silvestres, se quiso observar *in vivo* qué parámetros de la quimiotaxis de neutrófilos se veían afectada por SDF-1a y CXCR4b. Para ello se realizó transección de cola a larvas de 3dpf mutantes y silvestres, todas transgénicas (TgBAC(mpx:GFP)<sup>ii14</sup>), las cuales posteriormente fueron sometidas a microscopía de tiempo extendido durante 2h, tomando imágenes cada 30s. Los resultados fueron analizados con ImageJ, siguiendo el desplazamiento de cada neutrófilo hacia el sitio de inflamación.

El primer parámetro que se analizó fue la velocidad de reclutamiento de los neutrófilos al sitio de daño. La velocidad promedio de los neutrófilos reclutados en larvas *medusa* fue de  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ , mientras que la del silvestre fue de  $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ . En las larvas *odysseus* el promedio de las velocidades de los neutrófilos fue de  $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$  comparado con un promedio de  $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$  observado en los neutrófilos silvestres (Figura 8). A partir de los resultados obtenidos se puede observar que no existen diferencias significativas entre mutantes y silvestres, indicando que el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b no se encuentra involucrado en la velocidad con la que se mueven los neutrófilos al sitio de inflamación.





**Figura 8. Velocidad de migración de neutrófilos reclutados al sitio de daño en larvas silvestres y mutantes.** No se observan diferencias significativas en la velocidad de migración de neutrófilos entre silvestres y mutantes. El promedio de las velocidades de los neutrófilos *medusa* fue de  $(0,16 \pm 0,01) \mu\text{m/s}$ ,  $n = 48$ . El promedio de las velocidades de los neutrófilos *odysseus* fue de  $(0,17 \pm 0,01) \mu\text{m/s}$ ,  $n = 46$ , mientras que el de los silvestres fue de  $(0,15 \pm 0,01) \mu\text{m/s}$ ,  $n = 36$ . Los datos fueron analizados con test t de Student no pareado de dos colas. No significativo (ns):  $p\text{-value} > 0,05$ .

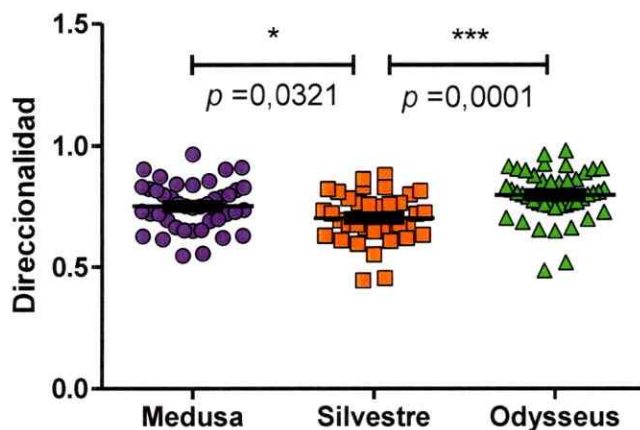
Puesto que no se encontraron diferencias en las velocidades de migración de los neutrófilos reclutados en larvas silvestres y mutantes luego de un estímulo inflamatorio (Figura 8), se puede deducir que el número significativamente mayor de neutrófilos reclutados al sitio de daño en larvas mutantes (Figura 6), es debido a que SDF-1a y CXCR4b se encuentran actuando como una señal de retención durante la inflamación y no debido a diferencias en la velocidad con la que las células son reclutadas.

Posteriormente se quiso saber si SDF-1a era sentido por los neutrófilos una vez que éstos abandonaban el tejido hematopoyético. Para ello se analizó la direccionalidad de la migración de los neutrófilos durante el reclutamiento al sitio de daño. Se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en la direccionalidad de



migración de los neutrófilos presentes en larvas mutantes comparada con la de los neutrófilos de larvas silvestres (Figura 9).

La direccionalidad de los neutrófilos *medusa* fue de  $0,75 \pm 0,02$  y la de los *odysseus*  $0,80 \pm 0,02$ , mientras que en los silvestres se observó una direccionalidad menor  $0,70 \pm 0,02$  indicando que el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b se encontraría involucrado en la direccionalidad con la que se mueven los neutrófilos al sitio de inflamación.



**Figura 9. Direccionalidad de la migración de los neutrófilos reclutados al sitio de daño en larvas silvestres y mutantes.** La direccionalidad de los neutrófilos presentes en larvas *medusa* fue de  $(0,75 \pm 0,02, n = 42)$ , la de los *odysseus* fue de  $(0,80 \pm 0,02, n = 44)$  comparada con la del silvestre  $(0,703 \pm 0,017, n = 36)$ . Se observa que tanto neutrófilos *medusas* como *odysseus* exhiben una diferencia significativa en la direccionalidad de los neutrófilos reclutados respecto a los silvestres. Los datos fueron analizados con test t de Student no pareado de dos colas, significativo: p-value < 0,05

A partir de este resultado se puede concluir que el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b no sólo influye en el número de neutrófilos que abandona la médula ósea,

sino que además que participa como señal de retención durante la migración al sitio de inflamación.

#### 4. DISCUSIÓN

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación y corresponden a un componente esencial de la respuesta inmune innata. La homeostasis de los neutrófilos puede ser regulada a varios niveles, uno de ellos es a través de la liberación de neutrófilos desde la médula ósea al torrente sanguíneo, donde compiten tanto señales de liberación como de retención (Strydom y Rankin, 2013).

En este trabajo se puso especial énfasis en estudiar el rol del eje de señalización SDF-1/CXCR4, el cual se ha sugerido que participa en la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético, tanto en mamíferos como en pez cebra.

El primer objetivo consistió en determinar si el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b influía en la distribución de los neutrófilos en las larvas del pez cebra a lo largo del desarrollo. Para ello se utilizaron larvas mutantes, para SDF-1a (*medusa*) y CXCR4b (*odysseus*), cuya distribución de neutrófilos fue comparada con la de sus “siblings” silvestres.

Mediante tinción de Sudan Black se pudo apreciar que la distribución de los neutrófilos a los 3dpf era similar entre mutantes y sus respectivos “siblings” silvestres, observando una mayor densidad en la zona del CHT. Por otro lado, a los 5, 7 y 9dpf no se ven diferencias significativas en la distribución de neutrófilos en la zona del CHT, sin embargo, se puede apreciar una gran densidad de neutrófilos en la zona de los pronefros de los peces silvestres, pero no en los mutantes.



La marca de neutrófilos en los pronefros de las larvas silvestres, se debe a que al 4dpf este tejido es colonizado por células HSC, convirtiéndose en el sitio principal de hematopoyesis desde los 5dpf (Muruyama y col., 2006). Dado que las larvas mutantes carecen de la marca de neutrófilos en los pronefros, estos resultados sugieren que la migración de las HSC dependerían del eje de señalización SDF-1a/CXCR4b para migrar desde el CHT hacia el tejido hematopoyético definitivo (pronefros), sin embargo, como la distribución de neutrófilos en el CHT es similar entre mutantes y silvestres, sugiere que la migración de las células HSC desde el AGM al CHT podría ocurrir a través de otros mecanismos independientes de SDF-1a/CXCR4b, o tal vez contar con un mecanismo adicional redundante que permita que los mutantes tengan fenotipo normal.

En mamíferos se ha demostrado que aquellos ratones que carecen de SDF-1 o CXCR4 tienen problemas en establecer hematopoyesis en la médula ósea, aunque la hematopoyesis en el hígado fetal es normal. Esto se debe a que la presencia de SDF-1 no es necesaria para la colonización del hígado fetal, pero sí para la de la médula ósea, según han demostrado estudios en "knock-out" de SDF-1 (Christensen y col., 2004). Lo anterior podría explicar el motivo por el cual existe una distribución de neutrófilos similar en mutantes y silvestres en el CHT, pero no en la médula ósea. Vale destacar que en ambos modelos existe un lugar de hematopoyesis transitoria, que en el caso de los mamíferos es el hígado fetal, mientras que su homólogo en pez cebra corresponde al CHT. Por otro lado, el sitio de hematopoyesis definitiva en mamíferos es la médula ósea, homóloga a los pronefros de pez cebra (Muruyama y col., 2006).

En el trabajo de Walters y col., 2011 se modeló la enfermedad de WHIM sobre-expresando una versión mutante de CXCR4b en la que el dominio citoplasmático de este receptor se encontraba truncado, suprimiendo su internalización. Esto resultó en una ganancia de función que inducía la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético, observándose cantidades anormalmente bajas de neutrófilos en la circulación (neutropenia) o prácticamente nulas. Dado que en el trabajo de Walters y col., 2011, los neutrófilos permanecían constantemente retenidos, era imposible observar su comportamiento en condiciones homeostáticas o ante la inducción de la inflamación en función de SDF-1a y CXCR4b.

En este trabajo, utilizamos peces mutantes que expresaban versiones no funcionales de las proteínas SDF1a y CXCR4b para observar si en caso de pérdida de función había un aumento en los neutrófilos presentes en el torrente sanguíneo. Congruente a los resultados de distribución, no se observaron diferencias significativas a los 3dpf entre los neutrófilos circulantes de mutantes y silvestres. Sin embargo, al 5dpf los neutrófilos provenientes de larvas *odysseus* sí mostraron diferencias significativas respecto a sus "siblings" silvestres, no así las larvas *medusa*. La única diferencia entre las larvas *odysseus* y *medusa*, es que las primeras poseen versiones truncas no funcionales de CXCR4b, mientras que las segundas poseen versiones no funcionales de SDF-1a. Se ha documentado que CXCR4b sólo es capaz de interactuar con SDF-1a; sin embargo, esta quimioquina puede interactuar con más de un receptor, siendo el más citado CXCR7 (Valentin y col., 2007). Dado que *odysseus* carece de una versión funcional de CXCR4b, pero no de SDF-1a, las diferencias observadas entre neutrófilos

*odysseus* y *medusa*, podrían ser explicadas por la presencia de CXCR7, donde los neutrófilos podrían verse atraídos por fuentes de SDF-1a que se encuentren fuera del tejido hematopoyético, como por ejemplo en la zona cefálica (Walters y col., 2011). Esta explicación también podría aplicarse a la diferencia observada a los 13dpf entre neutrófilos provenientes de larvas *odysseus* y *medusas* (Figura 5).

A los 7, 9 y 13dpf se observa un aumento significativo de neutrófilos circulantes en ambos mutantes respecto a sus “siblings” silvestres. Esto se podría deber a que en estadios más tardíos del desarrollo hay un incremento en el número de neutrófilos maduros y por lo tanto expresarían menor cantidad de la integrina VLA-4 en su superficie. En el caso de los neutrófilos silvestres la disminución de la expresión de la integrina no afecta la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético, ya que la presencia de SDF-1a activa su receptor CXCR4b enviando una señal intracelular acoplada a proteína G, que aumentaría la afinidad de la integrina VLA-4 de neutrófilos por VCAM del estroma, modulando de esta manera la adhesión celular al tejido hematopoyético (Auiti y col., 1997). Sin embargo, los mutantes al carecer de versiones funcionales de SDF-1a o CXCR4b, pierden la señalización y por lo tanto la unión VLA-4/VCAM no es lo suficientemente fuerte como para mantener adhesión celular, perdiéndose la retención en el tejido hematopoyético. Además, en estado homeostático, las células endoteliales producen la quimioquina CXCL2 y CXCL1 en bajas concentraciones. Éstas interactúan con su receptor CXCR2 presente en neutrófilos, dirigiendo su quimiotaxis hacia la vasculatura para entrar a la circulación. De modo que se podría decir que la interacción de CXCL2 y CXCL1 y su receptor CXCR2

corresponderían a un eje de señalización antagónico a CXCR4b y SDF-1a (Strydom y Rankin, 2013). Por lo tanto, los neutrófilos presentes en los mutantes no sólo carecen de la señalización que promueve su retención, sino que además se encuentran expuestos a señales quimiotácticas que generan su salida del tejido hematopoyético, provocando las grandes diferencias de neutrófilos circulantes respecto a sus “siblings” silvestres.

Durante la inflamación la concentración de los ligandos de CXCR2 aumenta en la circulación, mientras que la expresión de SDF-1a disminuye en el tejido hematopoyético (Galdames y col., 2014), promoviendo la migración de los neutrófilos hacia el sitio de inflamación. Se ha documentado que el “peak” de neutrófilos reclutados ocurre a las 6 horas post transecto, seguido de una resolución espontánea de la inflamación neutrofilica, en donde los neutrófilos necróticos y apoptóticos son fagocitados por macrófagos (Elks y col., 2011).

De modo que el siguiente objetivo fue determinar si SDF-1a y CXCR4b tenían algún efecto en el reclutamiento de neutrófilos ante un estímulo inflamatorio. Para ello se realizó transección de cola a larvas de 3dpf, y se cuantificó bajo estereoscopio de fluorescencia el número de neutrófilos reclutados cada 4 horas durante 24 horas. Vale destacar que a los 3dpf no existen diferencias significativas entre los neutrófilos circulantes de mutantes y silvestres, por lo que cualquier efecto observable no es producido por un valor inicial mayor de neutrófilos en circulación.

A partir de los resultados obtenidos en la Figura 6 se puede observar que al tiempo cero la cantidad de neutrófilos presentes en el sitio de transección eran

prácticamente idénticos entre mutantes y silvestres. Sin embargo, a las 4 y 8 horas post-transección se observó un reclutamiento significativamente mayor de neutrófilos en las larvas mutantes que en las silvestres.

Cuando una larva silvestre es sometida a daño, los niveles de G-CSF aumentan, lo que tiene importantes consecuencias en la liberación y reclutamiento de neutrófilos. Se ha documentado que G-CSF disminuye la producción de la quimioquina SDF-1a en el tejido hematopoyético (Galdames y col., 2014). Esto trae como consecuencia que la señalización a través de CXCR4b se vea reducida y por lo tanto, también la adhesión celular.

Si bien en condiciones homeostáticas a los 3dpf esta señalización no tiene gran relevancia debido al alto número de VLA-4 en la superficie de neutrófilos, los cuales probablemente en su mayoría sean inmaduros en ese estadio del desarrollo, al romperse la homeostasis, la carencia de SDF-1a y CXCR4b si parece cobrar importancia, ya que hay señales pro-inflamatorias y liberadoras de neutrófilos que compiten con las de retención. De hecho, G-CSF no sólo se encuentra disminuyendo los niveles de SDF-1a, sino que además se encuentra estimulando de manera indirecta la producción de la quimioquina CXCL1 en el endotelio, la cual es conocida por encontrarse involucrada en la liberación de neutrófilos hacia el torrente sanguíneo (Strydom y Rankin, 2013). CXCL1 estaría actuando como señal antagónica a la producida por SDF-1a/CXCR4b, donde la unión de CXCL1 a CXCR2 promueve la extravasación de los neutrófilos hacia la circulación, los cuales son guiados al sitio de inflamación por acción de las citoquinas pro-inflamatorias y señales asociadas a daño generadas en esa zona.

Los resultados observados podrían indicar que tanto SDF-1a como CXCR4b tienen un rol crucial en el proceso inflamatorio, ya que al estar ausentes las señales de retención, cualquier señal proinflamatoria sería lo suficientemente fuerte para reclutar neutrófilos incluso inmaduros. En el caso de los neutrófilos silvestres, estos responden ante señales de retención y proinflamatorias. Dicha competencia de señales reduciría el número de neutrófilos reclutados al sitio de inflamación. En el caso de los neutrófilos mutantes su alto reclutamiento podría deberse a que a pesar de expresar VLA-4/VCAM, que los mantendría unidos al tejido hematopoyético, la unión de la integrina VLA-4 a VCAM no sería tan fuerte como en un neutrófilo silvestre. Esto se debe a que el mutante carece de las versiones funcionales de SDF-1a o CXCR4b, que aumentan la afinidad de VLA-4 por VCAM, de modo que al verse expuestos a un incremento considerable en las señales de liberación, es de esperar que se reclute un número mayor de neutrófilos mutantes.

Además se ha documentado que G-CSF participa acelerando la velocidad con la que maduran los neutrófilos en cerca un 50% (Root y Dale, 1999). Como ha sido explicado anteriormente, en neutrófilos maduros los niveles de VLA-4 son considerablemente más bajos que en los inmaduros, de modo que la carencia de SDF-1a y CXCR4b se hace más notoria. Esto se debe a que al no existir la señalización que aumente la afinidad de VLA-4 por VCAM, y dada la poca cantidad de VLA-4 en la superficie celular de los neutrófilos maduros, el número de neutrófilos reclutados será mayor en mutantes que en silvestres.

A las 12 hpt a pesar de haber comenzado la resolución de la inflamación, se puede observar que existe un mayor número de neutrófilos en los mutantes respecto a los silvestres, lo que se puede deber al alto número de neutrófilos reclutados en las horas previas.

Se puede observar que durante el periodo resolutivo, a las 16, 20 y 24 hpt no hay diferencias significativas entre mutantes y silvestres. Durante la resolución de la inflamación los neutrófilos que participaron del proceso experimentan apoptosis o necrosis *in situ*. Durante la necrosis y desintegración de los neutrófilos los macrófagos fagocitan estas células, evitando la liberación del contenido citotóxico de sus gránulos y una nueva respuesta inflamatoria y daño tisular (Strydom y Rankin, 2013). De modo que era de esperar no encontrar diferencias significativas entre mutantes y silvestres, ya que la resolución de la inflamación, depende principalmente de la eliminación de los neutrófilos apoptóticos o necróticos del sitio de daño por los macrófagos y no parece ser un proceso dependiente de SDF-1a y CXCR4b.

Un paso crítico en la función de un neutrófilo es su habilidad para desplazarse al sitio de daño o inflamación. Si el neutrófilo carece de la habilidad de migrar al área de daño, no basta con que sea funcional, pierde su rol defensor e incluso podría ser dañino para los tejidos circundantes (Hoang y col., 2013). De modo que el último objetivo fue determinar si SDF-1a y CXCR4 afectaban la velocidad y direccionalidad de los neutrófilos una vez que éstos inician la migración hacia el sitio de daño. Para ello se realizó microscopía de tiempo extendido a larvas mutantes y silvestres transgénicas y sus trayectorias en el tiempo fueron analizados con ImageJ.

Se determinó que la velocidad promedio de los neutrófilos reclutados en larvas *medusa* fue de  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ , en las larvas *odysseus* de  $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ , mientras que la del silvestre fue de  $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ . Al analizar estos datos, no se observaron diferencias significativas entre mutantes y silvestres. Al comparar con los datos de velocidad presentes en la literatura, se puede observar que son muy similares a los obtenidos aquí, alcanzando los  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$  en silvestres (Mathias y col., 2006). Esta ausencia de diferencia se puede deber a que la maquinaria del citoesqueleto así como las moléculas de adhesión celular que participan en la migración de estas células hacia el sitio de daño, no se ven afectadas por la ausencia de funcionalidad de SDF-1a o CXCR4b. Este resultado podría entregar evidencia de que los fenómenos observados anteriormente, tales como el aumento de neutrófilos en circulación, el alto reclutamiento de estas células a las heridas y su disminución en los pronefrós en individuos mutantes, son debidos a la carencia de la señal de retención generada por SDF-1a/CXCR4b y no a las moléculas que median la migración.

Respecto a la direccionalidad, sí se encontraron diferencias significativas entre los neutrófilos presentes en los mutantes comparados con los silvestres, donde la direccionalidad de los neutrófilos *medusa* fue de  $0,75 \pm 0,02$ , la de los *odysseus*  $0,80 \pm 0,02$ , mientras que en los silvestres se observó una direccionalidad menor  $0,70 \pm 0,02$ . Estos valores son congruentes a los indicados en literatura para la direccionalidad de los neutrófilos en larvas silvestres, donde alcanza un valor de  $0,70$  (Mathias y col., 2006).

Para explicar esta situación hay que recordar que además de la presencia de la quimioquina CXCL1 en el endotelio, para iniciar la diapédesis de los neutrófilos, es



necesaria la existencia de un gradiente quimiotáctico a través de la matriz extracelular hacia la fuente de quimioquina producida en el sitio de inflamación (Massena y col., 2010). Una gran variedad de señales moleculares han sido identificadas que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos al sitio dañado. La más común es la citoquina CXCL8 (IL-8), junto con las señales redox asociadas a daño celular como el  $H_2O_2$  (Carré y col., 1991). Por otro lado, SDF-1a al tratarse de una quimioquina, genera señales atractantes hacia el lugar de producción, es decir, el tejido hematopoyético. De modo que cuando un neutrófilo silvestre inicia la migración celular, se enfrentaría a una competencia de señales atractantes, unas hacia el tejido hematopoyético y otras hacia el sitio de inflamación. En mutantes, como carecen de SDF-1a o CXCR4b, no existiría esta competencia de señales y tienden a tener una direccionalidad mayor hacia las señales pro-inflamatorias generadas en el sitio de daño.

## 5. CONCLUSIONES

- El eje de señalización SDF-1a/CXCR4b participa en la retención de los neutrófilos en el tejido hematopoyético caudal (CHT) y está involucrado en la granulopoyesis definitiva en los pronefros.
- Al romperse la homeostasis, es decir, ante un estímulo inflamatorio, el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b es necesario para controlar el número de neutrófilos reclutados al sitio de daño. Por otro lado, la resolución de la inflamación no parece depender de SDF-1a y CXCR4b.
- La velocidad con que migran los neutrófilos reclutados al sitio de inflamación es independiente de SDF-1a y CXCR4b.
- La direccionalidad con que los neutrófilos son reclutados al sitio de inflamación es dependiente del eje de señalización SDF-1a/CXCR4b.
- En general se puede concluir que el eje de señalización SDF-1a/CXCR4b actúa como una señal de retención para los neutrófilos a medida que transcurre el desarrollo y durante la respuesta inflamatoria.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., & Gutierrez-Ramos, J. C. 1997. The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34<sup>+</sup> Progenitors to Peripheral Blood. *The Journal of Experimental Medicine*. **185** (1): 111–120.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Martins, R. N. 2012. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*. **69**: 4196.
- Bennett, C. M., Kanki, J. P., Rhodes, J., Liu, T. X., Paw, B. H., Kieran, M. W., Langenau, D. M., Delahaye-Brown, A., Zon, L. I., Fleming, M. D., Look, A. T. 2001. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*. **96**: 643–651.
- Burns, C.E y Zon, L.I. 2006. Homing sweet homing: odyssey of hematopoietic stem cells. *Immunity*. **25** (6): 859–862
- Busillo, J.M y Benovic. J.L. 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**: 952–963
- Carré, P.C., Mortenson, R.L., King, T.E., Noble, P.W., Sable, C.L., y Riches, D.W. 1991. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest*. **88** (6): 1802–1810.
- Christensen, J.L., Wright, D.E., Wagers, A.J., Weissman, I.L., 2004. Circulation y Chemotaxis of Fetal Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Biol* **2**(3): e75
- David, N. B., Sapède, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (25): 16297–16302.
- Davidson, A.J. y Zon, L.I. 2004. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene*. **23** (43): 7233-7246.
- Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W., Link, D.C. 2009. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*. **113** (19): 4711-4719
- Elks, P.M., van Eeden, F.J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C.C., Ingham, P.W., Whyte, M.K., Walmsley, S.R., Renshaw, S.A. 2011. Activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) delays inflammation resolution by reducing neutrophil

apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood*. **118** (3): 712-722

Furze, R. G., y Rankin S.M. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. **125** (3): 281-288.

Fiedler, K., y Brunner, C. 2012. The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis. *American Journal of Blood Research*, **2** (1), 57-65.

Galdames, J.A., Zúñiga-Traslaviña, C., Reyes, A.E., Feijóo, C.G. 2014. Gcsf-Chr19 promotes neutrophil migration to damaged tissue through blood vessels in zebrafish. *J. Immunol*. **193** (1): 372-378

Goligorsky, M.S. 2009. This extraordinary extramedullary haematopoiesis. *Nephrol Dial Transplant* **24**: 2016-2017.

Guyader, D. Le, Redd, M.J., Colucci-guyon, E., Murayama, E., Kissa, K., Briolat, V., Mordelet, E., Zapata, A., Shinomiya, H., and Herbomel, P. 2008. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood*. **111**: 132-141.

Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., Diaz, G.A. 2003. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet*. **34** (1): 70-74

Hickstein, D.D y West R. R. 2010. AWHIM-sical zebrafish. *Blood* **116**: 2621-2622

Hoang, A.N., Jones, C. N., Dimisko, L., Hamza, B., Martel, J., Kojic, N., e Irimia, D. 2013. Measuring neutrophil speed and directionality during chemotaxis, directly from a droplet of whole blood. *Technology*, **1** (1): 49

Holmes, G.R., Dixon, G., Anderson, S.R., Reyes-Aldasoro, C.C., Elks, P.M., Billings, S.A., Whyte, M.K.B., Kadiramanathan, V., y Renshaw, S.A. 2012. Drift-Diffusion Analysis of Neutrophil Migration during Inflammation Resolution in a Zebrafish Model. *Adv. Hematol*. **2012**.

Khandekar, G., Kim, S y Jagadeeswaran P. 2012. Zebrafish Thrombocytes: Functions and Origins. *Advances in Hematology*. **2012**. 857058

Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., Screen, T.T., y Nüsslein-Volhard, C. 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* **421**: 279-282.

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., y Schilling, T.F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253–310.
- Kondo M. 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev.* **238** (1): 37-46.
- Lieschke, G.J., Oates, A.C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C., Layton J.E. 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood.* **98** (10): 3087-3096.
- Lund-Johansen, F y Terstappen, L.W. 1993. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *J Leukoc Biol.* **54**: 47–55.
- Mathias, J.R., Perrin, B.J., Liu, T., Kanki, J., Look, A.T., Huttenlocher, A. 2006. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* **80**: 1281–1288.
- Massena, S., Christoffersson, G., Hjertström, E., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Ausmees, N., Phillipson M. 2010. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*, **116** (11): 1924–1931.
- Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H.F., Handin R.I., Herbomel, P. 2006. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* **25**: 963–975
- Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* **6** (3):173-182.
- Nasser, M., Raghuwanshi, D. J., Grant, V. R., Jala, K., Rajarathnam, R., Richardson, M. 2009. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *J. Immunol.* **183**: 3425–3432.
- Novoa B y Figueras A. 2012. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. *Adv Exp Med Biol.* **946**: 253-275.
- Petty, J.M., Lenox, C.L., Weiss, D.J., Poynter, M.E., Suratt, B.T. 2009. Crosstalk between CXCR4/Stromal Derived Factor-1 and VLA-4/VCAM-1 Pathways Regulates Neutrophil Retention in the Bone Marrow. *J Immunol* **182**:604-612
- Renshaw, S.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**: 3976–3978.

- Root, R.K y Dale, D.C. 1999. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J Infect Dis.* **179** (2): 342-352.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671-675.
- Starnes, T.W y Huttenlocher A. 2012. Neutrophil reverse migration becomes transparent with zebrafish. *Adv Hematol.* **2012**: 398640
- Strydom, N., y Rankin, S.M. 2013. Regulation of Circulating Neutrophil Numbers under Homeostasis and in Disease. *J. Innate Immun.* **5**: 304–314.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., Chilvers, E.R. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunol* **31**: 318-324.
- Suratt, B.T., Petty, J.M., Young, S.K., Malcolm, K.C., Lieber, J.G., Nick, J.A., Gonzalo, J.A., Henson, P.M., Worthen GS. 2004. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* **104** (2): 565-571.
- Ulyanova, T., Scott, L. M., Priestley, G. V., Jiang, Y., Nakamoto, B., Koni, P. A., & Papayannopoulou, T. 2005. VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* **106** (1): 86–94.
- Valentin, G., Haas, P., and Gilmour, D. 2007. The chemokine SDF1 $\alpha$  coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr. Biol.* **17**: 1026-1031.
- Walters, K.B., Green, J.M., Surfus, J.C., Yoo, S.K., and Huttenlocher, A. 2010. Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood.* **116**: 2803–2811.
- Wolff, L y Perkins, A.S. 1995. Molecular Regulation of Myelopoiesis. *Trends in Cell Biology.* **5** (9): 369-371.