

UCH-FC
Doc-BMCN
P222
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DE NEUTRÓFILOS ACTIVADOS EN INFLAMACIÓN AGUDA INDUCIDA POR LESIÓN VERSUS INFECCIÓN EN PEZ CEBRA

**Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular
Celular y Neurociencias**

**Por
Margarita María Parada Kusz**

**Junio, 2016.
Santiago - Chile**

**Director de tesis: Dr. Miguel Allende C.
Co-director: Dr. Eduardo J. Villablanca.**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

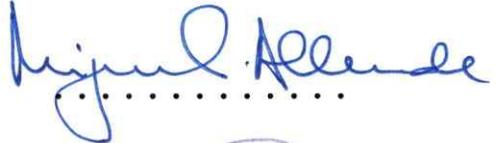
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

MARGARITA MARÍA PARADA KUSZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 1° de junio de 2016.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Allende Connelly

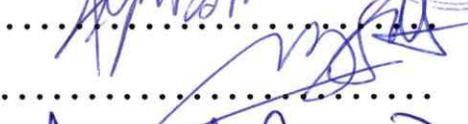


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Roth



Dr. Mario Rosemblatt



Dr. Ariel Reyes



Me-gustaría dedicar este trabajo al Dr. David Carrillo y al Dr. Juan Reyes quienes me enseñaron el amor por la ciencia y me apoyaron al embarcarme en el hermoso camino de la búsqueda del conocimiento. También, pero no menos importante, a mi gran familia por todo su esfuerzo, apoyo y amor incondicional sin los cuales este trabajo no habría sido posible.

AGRADECIMIENTOS

Para poder agradecer a todas las personas que positivamente influyeron en este trabajo probablemente tendría que escribir un libro aparte. Sin embargo, me gustaría agradecer especialmente al Dr. Miguel Allende por haberme otorgado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y haberme concedido maravillosas oportunidades en todo ámbito de cosas de desarrollo personal y profesional.

A su vez, quisiera agradecer a todas las personas que confiaron en este proyecto y contribuyeron invaluablemente al desarrollo de este trabajo. Muchas gracias por haberme enseñado el valor del trabajo en colaboración. Finalmente, quisiera agradecer a Travis por su leal compañía, amor y críticas constructivas al trabajo realizado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	v
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
I. Introducción	1
1.1 Inflamación y patologías inflamatorias	1
1.2 El neutrófilo en inflamación.	4
1.2.1 El neutrófilo en inflamación inducida por infección	6
1.2.2 El neutrófilo en inflamación por infección versus lesión	7
1.3 Relevancia de la remoción de neutrófilos durante la inflamación	9
1.4 Problemáticas experimentales para el estudio de la biología del neutrófilo	11
1.5 El pez cebra como modelo de estudio de la biología del neutrófilo	13
1.6 Neutrófilos de pez cebra evidencian diferencias moleculares en inflamación por lesión versus infección	16
1.7 Planteamiento de hipótesis	18
II. Hipótesis	20
III. Objetivos	21
IV. Materiales y Métodos	22
4.1 Modelos de estudio	22

4.2	Protocolo de inflamación inducida por transección de la aleta caudal	23
4.3	Protocolo de inflamación inducida por infección con <i>Salmonella</i> Typhimurium	23
4.4	Protocolo de inflamación inducida por infección con <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
4.5	Protocolo de inflamación inducida por tratamientos con CuSO ₄	24
4.6	Protocolo de inmunohistoquímica TUNEL	24
4.7	Protocolo de inmunohistoquímica	25
4.8	Protocolo de extracción de células GFP+ a partir de larvas tg(<i>mpx:GFP</i>)	26
4.9	Protocolo de extracción de RNA a partir de células GFP-/GFP+	27
4.10	Protocolo de amplificación de RNA	28
4.11	Protocolo de qRT-PCR	28
4.12	Protocolo de secuenciación del transcriptoma de neutrófilos mediante RNA-HiSeq	29
4.13	Protocolo de aislamiento de células hematopoyéticas murinas	30
4.14	Protocolo de aislamiento de neutrófilos murinos de médula ósea	32
4.15	Protocolo de transplante de células de mamífero en embriones de pez cebra	32
V.	Resultados	33
5.1	Evaluar muerte celular de neutrófilos en inflamación inducida por infección y lesión	33
5.2	Evaluar el transcriptoma de neutrófilos en inflamación por lesión	39
5.3	Identificar genes diferencialmente expresados en infección versus lesión	51
5.4	Establecer xenotransplantes para evaluar la función de neutrófilo de mamífero en larvas de pez cebra	61
VI.	Discusión	86

VII. Conclusiones	131
VIII. Reconocimientos y colaboraciones	132
IX. Bibliografía	133
X. Material suplementario	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad y valores de RIN para el ARN de cada replica biológica en homeostasis y tratamiento seleccionadas para ser secuenciadas.

43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama temporal de la respuesta inflamatoria aguda.	2
Figura 2. Causas y consecuencias fisiológicas y patológicas de la inflamación.	3
Figura 3. Establecimiento de condiciones experimentales de inflamación aguda inducida por infección versus lesión tisular de magnitud de infiltración neutrófila comparables.	34
Figura 4. Detección e identificación de neutrófilos en distintos procesos biológicos durante inflamación aguda inducida por infección.	35
Figura 5. Neutrófilos mueren localmente dentro de las primeras horas de infiltración inducida por infección.	37
Figura 6. La inflamación por lesión inducida por transección de la aleta caudal no evidencia neutrófilos en procesos de muerte.	38
Figura 7. Detección de neutrófilos en procesos de muerte únicamente en inflamación por infección.	40
Figura 8. Un aumento en el número de bacterias inyectadas aumenta el número de neutrófilos en procesos de muerte.	41
Figura 9. La citometría de flujo con separador celular (FACS) permite aislar neutrófilos a partir de larvas <i>tg(mpx:GFP)</i> .	44
Figura 10. El tratamiento con CuSO ₄ en larvas de pez cebra induce modulación transcripcional de neutrófilos activados.	45
Figura 11. Determinación de los ARN mensajeros de neutrófilos en condiciones de homeostasis y en tratamiento con CuSO ₄ mediante RNA- <i>Hiseq</i> .	47
Figura 12. Análisis de expresión diferencial de neutrófilos en homeostasis versus activados por citotoxicidad inducida por tratamiento con CuSO ₄ .	49
Figura 13. El análisis de expresión diferencial de neutrófilos en condiciones de homeostasis versus tratamiento con CuSO ₄ evidencia modulación transcripcional de neutrófilos activados.	50
Figura 14. Identificación del ortólogo de OLFM4 en pez cebra.	53

Figura 15. El análisis de homología de secuencias del dominio funcional de OLFM4 de humano y pez cebra determinó un 39% de identidad entre ellas.	52
Figura 16. OLFM4 es transcrito y expresado en neutrófilos en pez cebra.	54
Figura 17. Olfm4 es diferencialmente expresado en neutrófilos en inflamación inducida por infección versus lesión.	56
Figura 18. El eje de señalización SDF1/CXCR4b limita el reclutamiento de neutrófilos en inflamación inducida por lesión, y no por infección.	59
Figura 19. Uso de tecnología CRISPR/Cas9 para generar mutantes de Olfm4.	60
Figura 20. Metodología establecida para transplantar células murinas de médula ósea en embriones de pez cebra.	62
Figura 21. Cuantificación de parámetros de la metodología establecida para transplantar células murinas de médula ósea en embriones de pez cebra.	63
Figura 22. El trasplante en el blastodermo de embriones de pez cebra genera animales quiméricos con distintas cantidades de células murinas transplantadas.	64
Figura 23. Distribución de las células murinas en embriones de pez cebra transplantados de 1 día post fertilización.	65
Figura 24. Células murinas de médula ósea responden activamente a señales emanadas del tejido hematopoyético caudal de larvas de pez cebra.	66
Figura 25. Células murinas de médula ósea no evidencian eventos de fusión, ni transferencia de tinción a células endógenas.	68
Figura 26. Células murinas de médula ósea se localizan en los conductos pronéfricos, rudimento de riñón y lóbulos tímicos en larvas de 3 días post fertilización.	69
Figura 27. Las células murinas de médula ósea son ligeramente más grandes que las células de pez cebra.	71
Figura 28. Células murinas en el tejido hematopoyético caudal evidencian marcadores de proliferación activa y de células madre y progenitoras.	73
Figura 29. Células murinas en el tejido hematopoyético caudal evidencian marcadores de granulocitos, con pocas células evidenciando muerte celular.	74
Figura 30. Macrófagos endógenos de pez cebra evidencian co-localización con células murinas.	75

Figura 31. Células murinas pueden ser visualizadas en embriones transplantados hasta 6 días post fertilización.	76
Figura 32. Células murinas migran sobre el vitelo en conjunto con la oleada de macrófagos primitivos.	77
Figura 33. Células murinas de médula ósea circulan por todo el cuerpo de embriones de pez cebra.	78
Figura 34. Células murinas de médula ósea en circulación evidencian interacción y adhesión con el endotelio vascular.	79
Figura 35. Células murinas de médula ósea residentes en el tejido hematopoyético caudal de larvas de pez cebra son móviles.	80
Figura 36. Las células murinas residentes del tejido hematopoyético caudal disminuyen su concentración significativamente en solo 5 horas tras una infección intramuscular con <i>K. pneumoniae</i> .	82
Figura 37. Células murinas co-localizan en el sitio de inyección de <i>K. pneumoniae</i> 24 horas post infección	83
Figura 38. Visualización <i>in vivo</i> de células murinas participando del proceso inflamatorio asociado a una infección de vesícula ótica inducida con <i>K. pneumoniae</i> .	84
Figura 39. Células de leucemia humana co-localizan en el tejido hematopoyético caudal en embriones de 3 dpf.	85
Figura suplementaria 1. Inflamación estéril inducida por citotoxicidad por tratamiento con CuSO ₄ no evidencia un aumento significativo en la detección de neutrófilos en apoptosis.	148
Figura suplementaria 2. Exceso de células murinas residentes en el tejido hematopoyético caudal genera deformación local del tejido y cuerpo posterior de embriones de pez cebra	149
Figura suplementaria 3. Neutrófilos murinos de médula ósea co-localizan con el tejido hematopoyético caudal en embriones de 2 dpf.	150

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA, *analysis of variance*

ASC1, *G-protein beta subunit and guanine nucleotide dissociation inhibitor for Gpa2p*

CXCL8, *chemokine (C-X-C motif) ligand 8*, también conocida como IL-8

CXCR4, *C-X-C chemokine receptor type 4*

d.p.f., *días post fertilización*

FACS, *fluorescence-activated cell sorting*

fMLP, *N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine*

GFP, *green fluorescent protein*

egfp, *enhanced green fluorescent protein*

G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*

hpf, *horas post fertilización*

ICAM-1, *intercellular Adhesion Molecule 1*

ICM, *intermediate cellular mass*

IL-8, *interleukin-8*, también conocida como CXCL8

LPS, *lipopolisacáridos*

MAC-1, *macrophage-1 antigen*

MMP9, *matrix metalloproteinase 9*

mpx, *peroxidasa mielóide*

NETs, *neutrophil extracellular traps*

NF- κ B, *nuclear factor κ B*

NODs, *nucleotide-binding oligomerization domain*

RIN, *RNA integrity number*

Sox2, *sex determining Region Y-box 2*

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

TLRs, *toll-like receptors*

TNF- α , *tumor necrosis factor α*

TUNEL, *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

VEGF, *vascular endothelial growth factor*

WHIM, *warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis*

RESUMEN

La inflamación es una respuesta de defensa del organismo frente a una perturbación en la homeostasis. Numerosas patologías involucran una respuesta inflamatoria exacerbada o no resuelta, donde los neutrófilos han sido identificados como un factor responsable de los daños colaterales sobre tejidos inflamados. Dependiendo de si responden a una infección o una lesión, distintos mecanismos podrían promover su infiltración, activación, y posterior eliminación. Sin embargo, pocos mecanismos diferenciales de su programación han sido descritos dada la inherente complejidad de su evaluación *in vivo*. Basados en el alto grado de conservación de la hematopoyesis en vertebrados, utilizamos las ventajas que ofrece el modelo de pez cebra para identificar diferencias en neutrófilos activados en procesos inflamatorios en respuesta a lesiones en comparados con infecciones.

Determinamos que la respuesta de neutrófilos a una infección es rápida, mientras que la respuesta a una lesión es prolongada. La muerte de neutrófilos *in situ* durante el proceso inflamatorio, asociada a la resolución de inflamación fue detectada exclusivamente en infección y dentro de las primeras horas de infiltración. Identificamos a Olfactomedín 4 como un gen diferencialmente expresado por neutrófilos en eventos de infección, mientras que CXCR4b es un gen esencial para la regulación de la magnitud de infiltración de neutrófilos en eventos de lesión y no de infección. Estos resultados evidencian la existencia de diferencias fundamentales en los procesos que regulan la

infiltración, función y eliminación de neutrófilos dependiendo del inductor de inflamación.

Analizamos el transcriptoma de neutrófilos activados en un contexto de lesión. Nuestros resultados evidencian la modulación de procesos fundamentales de neutrófilos activados incluyendo migración, adhesión, tráfico vesicular, señalización NF-kB, metabolismo de carbohidratos y apoptosis entre otros. Estos resultados dan cuenta de la existencia de una lista representativa de genes modulados de neutrófilos en homeostasis y activados en contexto de lesión.

Finalmente, implementamos una metodología simple, eficiente y robusta para generar peces cebra quiméricos con células de mamífero hematopoyéticas. Nuestros resultados evidencian que esta metodología puede ser utilizada para la evaluación y visualización *in vivo* y en tiempo real, de procesos relacionados a la hematopoyesis, inmunidad y enfermedades infecciosas de células de mamífero.

ABSTRACT

Inflammation is a protective response upon a threat to an organism's homeostasis. Several pathologies involve an exacerbated or un-resolved inflammatory response with neutrophils identified as major contributors to collateral tissue damage. Depending on the nature of the inductor of inflammation (i.e. infection or tissue injury), different molecular mechanisms might mediate neutrophil infiltration, activation and removal from tissues. Nevertheless, the molecules orchestrating differential responses upon infection or injury have been poorly characterized due to the experimental complexity that involves studying neutrophils *in vivo*. Considering that the hematopoietic and immune systems are highly conserved among vertebrates, we used zebrafish as a model system to *in vivo* characterize differences in neutrophil function in infection versus tissue injury induced inflammation.

Our results showed that neutrophil response to infections are fast, whereas reactions to tissue injury are sustained. Neutrophil cell death was detected exclusively during infection and within the beginning of the infiltration. We identified Olfactomedin 4 as a differential molecular marker that is over-expressed in neutrophils during infection and not in tissue injury, and determined that CXCR4b is essential for regulating neutrophil infiltration to damaged tissue and not to an infected tissue. These results illustrate the existence of fundamental differences within the processes that mediate

neutrophil infiltration, function and removal depending on the nature of the inductor of inflammation.

We analyzed and compared the transcriptome of neutrophils in homeostasis and activated under tissue injury. Our results evidence the modulation of fundamental processes related to neutrophil function including migration, adhesion, vesicular traffic, NF- κ B signaling pathways, carbohydrate metabolism and apoptosis, among others. These results indicate a representative description of genes modulated in neutrophils in homeostasis and activated under tissue injury.

Finally, we have developed a technique to transiently generate mouse-zebrafish hematopoietic tissue chimeric embryos by transplanting murine bone marrow cells into zebrafish blastulae. This procedure allows for non-invasive *in vivo* visualization of mammalian hematopoietic cells in niche interactions, blood cell-vascular endothelial interactions, and response to bacterial infection at single-cell resolution.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Inflamación y patologías inflamatorias.

La inflamación es la primera respuesta del organismo frente a una perturbación en la homeostasis. Es una respuesta de defensa inespecífica, y tiene como objetivo resguardar la integridad del cuerpo ya sea mediante la eliminación de patógenos invasores, o mediante la remoción de tejido disfuncional para promover la reparación y regeneración de tejidos (*Medzhitov, 2008*).

La respuesta inflamatoria es un proceso sistémico complejo finamente coordinado en el tiempo, que incluye la participación de diversas moléculas, tipos celulares y tejidos. El proceso se caracteriza por la infiltración transitoria de moléculas y células del sistema inmune innato al tejido afectado. Dependiendo del inductor de la inflamación (e.g. infección o lesión tisular), una amplia gama de funciones son ejecutadas localmente. Una vez eliminado el inductor de la inflamación, los componentes del sistema inflamatorio son removidos promoviendo la restauración de la homeostasis (*Cotran y col., 1999; Kumar y col., 2003; Majno y col., 2004*) (**Fig. 1**).

El desarrollo de la respuesta inflamatoria, probablemente, ha sido resultado de presiones selectivas durante el proceso evolutivo de organismos multicelulares. Todos los organismos dependen de la habilidad para protegerse de patógenos exógenos, y en la reparación de tejidos que resultan tras una infección o una lesión tisular. No obstante,

una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada puede tener efectos nocivos. Así, una respuesta inflamatoria excesiva frente a patógenos (i.e. sepsis y shock séptico,), a células dañadas del organismo (e.g. síndrome coronario agudo) o a sustancias exógenas (alergia y shock anafiláctico), puede conducir a falla multiorgánica o incluso la muerte (Medzhitov, 2008; Zheng y col., 2011; Jawad y col., 2012).

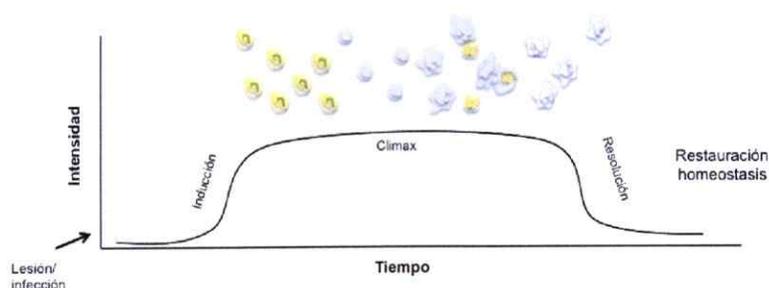


Figura 1. Diagrama temporal de la respuesta inflamatoria aguda. A un nivel básico, la inducción de la respuesta inflamatoria consiste en la infiltración de componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) al sitio vulnerado. Una vez eliminado el inductor de inflamación, comienza la etapa de resolución y reparación de los tejidos para dar retorno a la homeostasis. *Adaptado de Cotran y col., 1999.*

Por otro lado, un defecto en la regulación del proceso inflamatorio puede derivar en la generación de inflamación crónica o no resuelta, promoviendo un deterioro progresivo del tejido afectado. Este fenómeno está asociado a numerosas patologías asociadas a la vida moderna, tales como la artritis reumatoide, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), obesidad y resistencia a la insulina, y enfermedad de Alzheimer entre otras. Si bien cada una de estas enfermedades tiene una patogénesis distinta, todas se caracterizan por inducir una perturbación en la homeostasis del organismo conducente a procesos de inflamación (Medzhitov, 2008; Abrahamm y Cho, 2009; Tabas y Glass, 2013; Swirski y Nahrendorf, 2013) (**Fig. 2**).

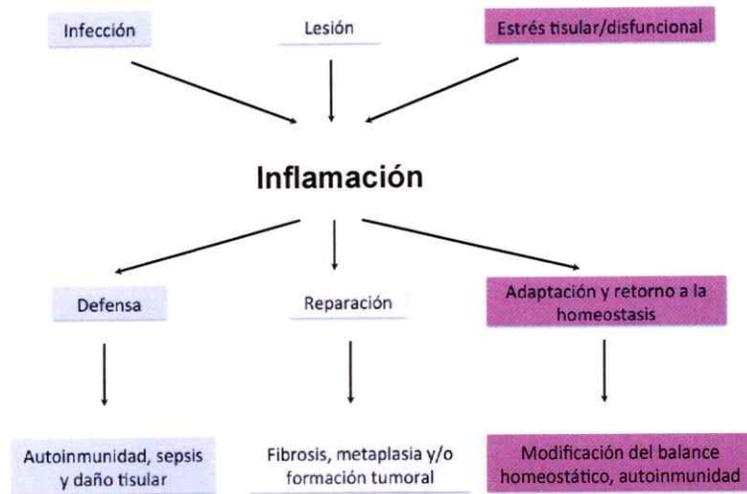


Figura 2. Causas y consecuencias fisiológicas y patológicas de la inflamación. Dependiendo del estímulo, la respuesta inflamatoria tiene un propósito distinto, y puede derivar en consecuencias patológicas distintas. De los tres estímulos posibles, solo la infección está acoplada a la inducción de una respuesta inmune. *Adaptado de Medzhitov, 2008.*

La estrategia actual para combatir todas estas enfermedades ha sido principalmente anti-inflamatoria. Los tratamientos existentes son paliativos, y manifiestan respuestas benéficas de magnitud variable con diversos efectos adversos severos. Por esta razón, la investigación actual está enfocada en descubrir cómo promover la resolución de la inflamación en busca de nuevos tratamientos que emulen procesos fisiológicos normales y de esa forma generen menos efectos colaterales. *(Bannenberg y Serhan, 2010; Serhan 2010; Alessandri y col., 2013).* **Por lo tanto, estudiar los mecanismos que promueven endógenamente la resolución de la inflamación es relevante para el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos.**

1.2 El neutrófilo en inflamación.

Los neutrófilos, células mieloides polimorfonucleadas del sistema inmune innato, son células evolutivamente conservadas que constituyen un 70% de los leucocitos circulantes humanos. Estas son las primeras células en ser infiltradas al sitio de inflamación, y son las que lo hacen en mayor número. Sus funciones incluyen la eliminación de patógenos y restos celulares mediante múltiples mecanismos, incluyendo fagocitosis, desgranulación de componentes tóxicos y liberación de trampas extracelulares (NETs). Además, secretan citoquinas y quimioquinas fundamentales para la ambientación local y posterior inducción de la concomitante respuesta inmune adaptativa (*Nathan, 2006; Medzhitov, 2010; Mantovani y col., 2011; Amulic y col., 2012; Kobayashi, 2015*).

La importancia del papel de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria se evidencia, entre varias otras patologías, en el denominado síndrome de WHIM (*Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis*). Esta enfermedad congénita inmunodeficiente se caracteriza por la retención de neutrófilos en la médula ósea limitando su disponibilidad al flujo sanguíneo. Pacientes con el síndrome de WHIM presentan la generación de infecciones recurrentes y un impedimento en la regeneración de tejidos, evidenciando la importancia de los neutrófilos en la defensa y mantención de la integridad del organismo (*Link, 2005; Dotta y col., 2011*).

En el último tiempo, una evaluación más precisa de la biología del neutrófilo en humanos ha determinado la existencia de una gran heterogeneidad y diversidad de neutrófilos circulantes. Éstos pueden hoy ser sub-agrupados de acuerdo a: (1) su morfología nuclear (*e.g.* células de banda, células maduras y células hiper-segmentadas), (2) según su abundancia (*e.g.* neutrófilos supresores de células T encontrados en baja representatividad, y neutrófilos convencionales de alta representatividad), (3) según sean neutrófilos liberadores o no liberadores de trampas extracelulares (NETs), y (4) según su perfil de expresión de proteínas y su relación a contextos fisiológicos y patológicos (*Kruger y col., 2015*).

Dentro de esta última categoría, por ejemplo, neutrófilos que expresan CD117 se han asociado a enfermedades autoinmunes, mientras que la expresión de CD16/CD62L a neutrófilos inmunosupresores en inflamación sistémica, CD66b/CD33 a neutrófilos de baja densidad supresores de la proliferación de células T, y CXCR4 a poblaciones senescentes. La expresión de MMP-9 y MAC-1 a neutrófilos pro-angiogénicos, expresando CD63 a neutrófilos asociados a fibrosis quística, y expresando ICAM-1/CD45 en inflamación sistémica que han conllevado procesos de migración reversa, entre otros (*Christoffersson y col., 2012; Krueger y col., 2015*).

Aún más, tal como para macrófagos, se distinguen actualmente poblaciones de neutrófilos N1 con características proinflamatorias y antitumorales, y neutrófilos N2 con

características inmunosupresoras y pro-tumorales (Tsuda y col., 2004; Friedlender y col. 2009; Kobayashi, 2015).

Toda esta información da cuenta de la diversidad de funciones y mecanismos que los neutrófilos ejecutan dependiendo del contexto fisiológico. Cómo se programa esta diversidad de funciones constituye una interrogante actual. Por ejemplo, distintas funciones podrían ser ejecutadas por neutrófilos en distintas etapas de su ciclo de vida, estimulados de formas distintas o podría dar cuenta de la existencia basal de sub poblaciones de neutrófilos circulantes, tal como se describe para monocitos (Kolakowska y Kubes, 2012). No obstante, independiente de su origen, **estos antecedentes sugieren que dependiendo del inductor de inflamación, las diferentes respuestas inflamatorias son llevadas a cabo por neutrófilos de características diferentes con consecuencias fisiológicas distintas.**

1.2.1 El neutrófilo en inflamación inducida por infección.

La mayor parte del conocimiento respecto de la función del neutrófilo proviene de la caracterización de su función durante procesos de inflamación inducida por infección. Estimulantes pro-inflamatorios derivados tanto de patógenos como del hospedero (e.g. LPS, fMLP, TNF- α , IL-1 β e IL-17) estimulan al tejido endotelial local e inducen la expresión luminal de moléculas de adhesión tales como selectinas e integrinas. Estas cuales reclutan neutrófilos y promueven las etapas subsiguientes de su extravasación y activación. Una vez en el espacio intersticial, gradientes de citoquinas y quimioquinas

(destacando IL-8 y fMLP) coordinan su programación y repertorio antimicrobial final (Nathan, 2002; Pober y Sessa, 2007; Medzhitov, 2010; Borregaard., 2010; Sadik y col., 2011; Amulic y col., 2012).

Una vez ejecutado su programa bactericida, los neutrófilos cesan sus funciones incurriendo en un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Esto no solo reduce y limita el número de neutrófilos presentes, sino que también disminuye sus funciones efectoras incluyendo migración, fagocitosis, desgranulación y producción de especies reactivas de oxígeno. Los cuerpos apoptóticos son subsecuentemente fagocitados por macrófagos (eferocitosis), induciendo en éstos una transformación a un fenotipo pro-resolutivo (M1 a M2) con la producción y liberación de citoquinas anti-inflamatorias (e.g. TGF- β e IL-10) que promueven la resolución de la inflamación (Savill y col., 1989; Serhan y Savill, 2005; Serhan, 2008; Silva, 2010).

1.2.2 El neutrófilo en inflamación por infección versus lesión.

A diferencia de una condición infecciosa, un proceso inflamatorio asociado a una lesión tisular o trauma estéril comprende principalmente la función de remover células y tejidos dañados y promover la regeneración (McDonald y col., 2010). Estos procesos son clínicamente relevantes ya que se ha descubierto son un componente importante en la fisiopatología de varias enfermedades, incluyendo aterosclerosis, Alzheimer e isquemia y reperusión (Medzhitov, 2008; Barton, 2008; Chen y Nuñez, 2010; Rock y col., 2010; McDonald y Kubes, 2011; Kolaczowska y Kubes, 2012).

Respecto de los neutrófilos, se ha demostrado en tejido hepático que dependiendo de una lesión o una infección, distintos mecanismos de adhesión vascular median su reclutamiento y coordinan el repertorio de sus funciones efectoras. En infección, los neutrófilos son reclutados principalmente mediante las moléculas de adhesión CD44 expresada en neutrófilos y hialuronato en tejido endotelial. Esta interacción programa a los neutrófilos a promover la liberación de trampas extracelulares (NET) en el sitio de infección favoreciendo la contención de una posible diseminación bacteriana (*McDonald y col, 2008; McDonald y Kubes, 2011; McDonald y Kubes, 2012*). En el caso de lesión o trauma estéril la atracción de neutrófilos a sitios de necrosis hepatocelular procede mediante la integrina MAC-1 expresada en neutrófilos y la inmunoglobulina ICAM-1 expresada en tejido endotelial. Estas moléculas promueven el reclutamiento de neutrófilos principalmente mediante quimiotaxis intravascular, impidiendo la destrucción de tejido viable durante el proceso de infiltración al sitio vulnerado (*Seely y col., 2003; Menezes y col., 2009; McDonald y col., 2010; Peri, 2010; McDonald y Kubes, 2011; Phillipson y Kubes, 2011; McDonald y Kubes, 2012*). **Estos antecedentes demuestran la existencia de mecanismos moleculares distintos para la inducción del reclutamiento de neutrófilos durante el proceso inflamatorio inducido por infección y lesión.**

1.3. Relevancia de la remoción de neutrófilos para la resolución de la inflamación.

Los componentes intracelulares granulares de neutrófilos son tóxicos tanto a patógenos invasores como a células del huésped, por lo que una vez realizadas sus funciones éstos deben ser removidos antes que promuevan la destrucción de los tejidos. Este proceso es esencial para la restauración de la homeostasis, y si es alterado, promueve una perpetuación de la inflamación. Las inflamación no resuelta es característica de diversas enfermedades incluyendo la enfermedad pulmonar crónica obstructiva, artritis reumatoidea, granulonefritis y enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) entre otras. Los neutrófilos han sido identificados como los mayores responsables de los efectos colaterales sobre los tejidos inflamados (*Lekstrom-Himes y Gallin, 2000; Yamamoto-Furusho y Kurszenik, 2003; Brown y col., 2006; Yamamoto-Furusho y Podolsky, 2007; Hallet y col, 2008; Khor y col., 2011, Kennedy y DeLeo, 2009; Fox y col, 2010; Nathan y Ding, 2010; Wright y col., 2010; Fournier y col., 2012; Lucas y col., 2013*). **Estos antecedentes demuestran que es relevante estudiar los mecanismos que promueven la remoción de neutrófilos durante la resolución de la inflamación.**

En inflamación por infección, por ejemplo, experimentos muestran que la persistencia de neutrófilos apoptóticos en tejidos inflamados resulta en el desarrollo de necrosis secundaria en éstos, lo que promovería la perpetuación de la inflamación al producir la liberación local de su carga citotóxica y adicional inductores intracelulares pro-inflamatorios. Por estas razones, la eliminación de neutrófilos apoptóticos es

considerado un proceso fundamental durante la fase resolutive en inflamación inducida por infección (Garlichs y col., 2004; Fox y col., 2010; Silva, 2010; El Kebir y Felip, 2010; Bratton y Henson, 2011; McGrath y col., 2011).

De manera interesante, el estudio de la biología del neutrófilo en el modelo de pez cebra otorgó por primera vez evidencia experimental *in vivo* de que los neutrófilos pueden ser removidos de tejidos inflamados retornando al flujo sanguíneo mediante migración retrógrada transendotelial (Mathias y col., 2006). La migración retrograda de neutrófilos ha sido corroborada en mamíferos, con lo que actualmente se contempla la existencia de tres mecanismos de remoción de neutrófilos durante inflamación (Nourshargh y col., 2016). Estos pueden ser removidos por apoptosis con la subsiguiente eferocitosis, mediante migración retrógrada y retorno al flujo vascular, o mediante remoción por exudados inflamatorios. **La apoptosis es considerado el mecanismo principal, y los mecanismos adicionales de remoción de neutrófilos son considerados como menores o excepcionales, no siendo aún propiamente descritos** (Uller y col., 2006; Starnes y Hunttenlocher, 2012).

Considerando que el mecanismo de eliminación basal de neutrófilos apoptóticos circulantes incluye su fagocitosis por parte de macrófagos residentes en el hígado, el bazo, y la médula ósea (Suratt y col., 2001; Suratt, y col., 2004; Luo y Loison, 2008), neutrófilos infiltrados podrían estar retornando al flujo vascular mediante migración retrógrada transendotelial como mecanismo alternativo de resolución, y así estar

contribuyendo a la existencia de poblaciones fenotípicas heterogéneas de neutrófilos circulantes. Apoyan esta hipótesis la identificación de neutrófilos en humanos con marcadores de migración retrógrada transendotelial que se caracterizan por su longevidad (Buckley y col., 2006; Woodfin y col., 2011; Beyrau y col., 2012). Sin embargo, el contexto fisiológico general en el que la migración retrógrada procede en oposición a la muerte por apoptosis *in situ* aún se desconoce.

1.4 Problemáticas experimentales del estudio de la biología del neutrófilo.

El descubrimiento y análisis de estos procesos se ha visto retrasado en gran parte porque el estudio de la biología del neutrófilo es un proceso experimentalmente complejo. La rápida muerte por apoptosis que sufren los neutrófilos en cultivo primario (vida media 8 horas), que exhiban un periodo de vida corto (12,5 horas en ratones y 5,4 días en humanos) y que sean células terminalmente diferenciadas, ha dificultado su estudio en contextos biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

La evaluación de neutrófilos humanos obtenidos de pacientes voluntarios ha entregado valiosa información respecto de su biología, y más específicamente, respecto de las cascadas de señalización que son activadas por las moléculas estimuladoras. Sin embargo, la dificultad para realizar en ellos manipulaciones genéticas ha limitado su utilización.

Existen actualmente varias líneas celulares inmortalizadas que pueden ser genéticamente manipuladas para el estudio del neutrófilo. Ejemplos de estas líneas incluyen la ampliamente utilizada HL-60 (*Human promyelocytic leukemia cells*), y las células murinas progenitoras mieloides dependientes de factores de crecimiento, EPRO y MPRO, todas las cuales han sido caracterizadas y comparadas de acuerdo a sus operaciones y similitudes respecto de neutrófilos funcionales humanos. Sin embargo, estos modelos *in vitro* están lejos de recrear la compleja interacción entre diversos tipos celulares y tejidos que tienen lugar durante el proceso inflamatorio en un organismo (*Collins y col, 1977; Hauert y col., 2002; Millius y Weiner, 2010; Gaines y col., 2005*).

El modelo murino ha sido tradicionalmente el preferido para evaluar la función de neutrófilos *in vivo*. Varios modelos de infección y de inflamación han sido establecidos, y han permitido la evaluación de propiedades de neutrófilos migratorios infiltrados a focos de inflamación en comparación con sus contrapartes circulantes. Actualmente se cuenta con una línea transgénica reportera de neutrófilos lo que facilitaría su estudio *in vivo* (*Hasenberg et al., 2015*). Sin embargo, hay que considerar diferencias significativas entre neutrófilos murinos y humanos. Los neutrófilos murinos representan un 30% de los leucocitos circulantes en comparación al 70% en humanos, y presentan diferencias en su repertorio bactericida, por ejemplo, careciendo de agentes anti-microbianos característicos de neutrófilos humanos (*Amulik y col., 2012*).



De manera interesante, mediante técnicas de ingeniería genética se han desarrollado ratones transgénicos xenotransplantados con células madre hematopoiéticas humanas que desarrollan neutrófilos funcionales (Coughlan y col., 2012, Rongvaux y col., 2014). Estos experimentos han permitido el estudio neutrófilos humanos en un contexto *in vivo*. Estos experimentos en conjunto con avances desarrollados en microscopía intravital permiten la evaluación de neutrófilos durante procesos inflamatorios con aplicaciones clínicas. No obstante, la generación de estos animales quiméricos es técnicamente compleja y los experimentos en general utilizan una cohorte de animales pequeña por su elevado costo, limitando una cuantificación y evaluación estadística precisa de los fenómenos estudiados. Adicionalmente, la técnica de microscopía intravital es invasiva, y no permite una evaluación sistémica del proceso inflamatorio (Shultz y col., 2012). Razón por la cual, han surgido modelos alternativos para el estudio de neutrófilos.

1.5 El pez cebra como modelo de estudio de la biología del neutrófilo.

El teleosteo conocido como pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo amplia y exitosamente utilizado para el estudio genético de la embriogénesis. Su fertilización externa, rápido desarrollo, alta fecundidad, transparencia en estadios larvales y la facilidad para su manipulación, ha simplificado la evaluación de procesos migratorios y de morfogénesis *in vivo*.

El pez cebra se ha vuelto un modelo particularmente exitoso para el estudio de la hematopoyesis. Gracias al alto grado de conservación de genes y procesos relacionados a

la hematopoyesis en vertebrados, el modelo ha sido único al permitir ensayos de evaluación a gran escala de moléculas que favorecen la eficiencia de trasplantes de médula ósea con aplicaciones clínicas (Li y col., 2015). El nivel de conservación de la hematopoyesis entre el pez cebra y humano ha quedado experimentalmente demostrado en experimentos en donde el trasplante de células madre hematopoiéticas humanas (CD34+) en larvas de pez cebra, sobreviven, migran a nichos hematopoiéticos y se diferencian a linajes mieloides (Staal y col., 2015). Estos fenómenos no son de extrañar, sin embargo, si se considera que estudios filogenéticos han determinado que más de un 80% de los genes con función conocida en células madre hematopoyéticas y de linaje mieloides son conservados entre ambas especies (Voskoboynik y col., 2013).

Aún más, el sistema inmune en pez cebra y mamíferos es altamente conservado tanto a nivel molecular como celular (Lieschke y Trade 2009). El pez cebra desarrolla células del sistema inmune incluyendo linfocitos, mastocitos, células dendríticas, eosinófilos, macrófagos, células tipo natural killer y neutrófilos. Producen quimioquinas y citoquinas, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gama (IFN-IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleuquina 8 (IL-8) y receptor de la quimioquina CXCL4/SDF-1 (CXCR4), entre otros (Bennet y col., 2001; Lieschke y col., 2001; Bobe y Goetz, 2001; Traver y col., 2003; Lam y col., 2002; Lam y col., 2004; Trede y col., 2004; van der Sar y col., 2006; Grayfer y Belosevic, 2009; Liongue y col., 2009; Oehlers y col., 2010; Walters y col., 2010; Lopez-Muñoz y col., 2011; Renshaw y Trede, 2012).

También expresan moléculas conservadas en el reconocimiento de patrones moleculares tales como los receptores de tipo Toll (TLRs), moléculas de dominio de reconocimiento y oligomerización de nucleótidos (NODs), transportador de aminoácidos tipo Asc (ASC1) y la proteína de respuesta primaria de diferenciación mielóide (Myd88) (Masumoto y col., 2003; van der Sar y col., 2006; Laing y col., 2008; Oehlers y col., 2011).

El pez cebra depende exclusivamente del sistema inmune innato para la defensa frente a patógenos dentro de las primeras 4 semanas de vida. Esto permite que neutrófilos y macrófagos puedan ser utilizados para el estudio, por ejemplo, de su interacción con patógenos humanos y en su influencia en la regeneración de tejidos sin la existencia del sistema inmune adaptativo, lo que permite independizar sus funciones. Estos experimentos realizados en etapas tempranas del desarrollo permiten, a su vez, visualizar la dinámica celular entre varios tipos celulares y tejidos *in vivo* y en tiempo real sin mayores intervenciones (Meeker y Trede, 2008; Sullivan y Kim, 2008; Gray y col., 2011; Deng y Huttenlocher, 2012).

Los neutrófilos en particular, son células en pez cebra que presentan características funcionales, bioquímicas y morfológicas similares a los de mamífero. Su desarrollo comienza aproximadamente 48 horas post fertilización en el tejido hematopoyético caudal. Gracias a la existencia de líneas transgénicas reporteras de neutrófilos *tg(mpx:GFP)*, varios experimentos se han realizado estudiando sus funciones. Gracias a

esto, el modelo ha contribuido significativamente al conocimiento de la biología del neutrófilo (Traver y col., 2003; Mathias y col., 2006; Renshaw y col., 2006; D'Alençon y col., 2010; Lyones y col., 2010; Goldsmith y Jobin, 2012; Novoa y Figueras, 2012; Wittmann y col., 2012; Henry y col., 2013; Medina y Royo, 2013;). Dentro de estos experimentos se destacan la evaluación de librerías de moléculas que han permitido el descubrimiento de drogas que favorecen la resolución de la inflamación al promover la migración retrógrada transendotelial de neutrófilos desde los tejidos inflamados (Robertson y col., 2014).

1.6 Neutrófilos de pez cebra evidencian diferencias moleculares en inflamación por lesión versus infección.

El modelo, además, ha sido utilizado para evaluar diferencias en neutrófilos activados en procesos inflamatorios inducidos por infección versus lesión. El grupo de Niethammer y cols. (2009), demostró la existencia del gradiente de peróxido de hidrógeno como quimioattractante esencial de neutrófilos durante la inflamación por lesión. El grupo de Deng y cols. (2012), determinó que la liberación de este gradiente es un mecanismo molecular específico de reclutamiento de neutrófilos durante inflamación por lesión, y no por infección. Estos antecedentes se condicen con el descubrimiento de que distintas moléculas de adhesión median el reclutamiento de neutrófilos en infección y lesión, y favorecen la hipótesis de que distintos mecanismos celulares y moleculares programan las funciones de neutrófilos en infección y lesión.

De manera interesante, experimentos de inflamación en un contexto de lesión por transección de la aleta caudal en peces cebra determinaron que la migración retrógrada transendotelial comprendía el mecanismo celular principal de remoción de neutrófilos del tejido inflamado, con únicamente un 4% de éstos exhibiendo apoptosis *in situ* (Loynes y col., 2010). **Estos resultados sugieren que la apoptosis de neutrófilos podría ser un proceso celular innecesario o parcial para la inducción de la resolución en inflamación por lesión.**

Aún más, es posible argüir que la apoptosis de neutrófilos en el lugar de la infección podría haber surgido como respuesta a una presión selectiva, en donde la muerte *in situ* de células del organismo que hayan fagocitado patógenos bacterianos, podría haber favorecido la contención de la infección. Hipótesis apoyada además por la existencia de múltiples mecanismos de evasión de patógenos intracelulares para su supervivencia en células fagocíticas (Casadevall, 2008; Ashida y col., 2011). Por ejemplo, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, una bacteria patógena intracelular que causa gastroenteritis en humanos y enfermedad tipo-tifoidea en ratones ha desarrollado estrategias para suprimir e impedir respuestas inmune celulares (Bueno y col., 2005). Dentro de estas incluye su capacidad para evitar su degradación intracelular al permanecer dentro de compartimentos específicos conocidos como “vacuolas contenedoras de *Salmonella*”, las cuales las protegen de los mecanismos de degradación y favorecen así su diseminación al resto del cuerpo (Hashim y col., 2000; Beuzon y col., 2000; Smith y col., 2007). Ya que la mayor parte de las estrategias incluyen la inhibición

de la muerte celular por parte de fagocitos (*Casadevall, 2008*), éste podría haber sido un mecanismo adquirido primitivamente que favorece la contención de la infección.

1.7 Planteamiento de hipótesis.

Comprender cómo neutrófilos son removidos de tejidos inflamados dependiendo del inductor de inflamación podría llevar al descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos que permitan, por ejemplo, favorecer la resolución de inflamación en patologías de inflamación crónica sin comprometer la capacidad del organismo de defenderse frente a una infección.

Considerando que existen diferencias en los mecanismos de reclutamiento de neutrófilos a focos de inflamación, es razonable pensar que existen diferencias también en los mecanismos que median su remoción. Ya que se ha descrito que el retorno al flujo vascular como mecanismo principal de su extracción en contextos de lesión, es razonable considerar que la muerte celular podría ser un proceso celular específico en inflamación por infección que favorece la contención de una posible diseminación bacteriana. La existencia de poblaciones fenotípicas heterogéneas de neutrófilos circulantes, en donde el subconjunto de neutrófilos que han ejecutado procesos de migración retrógrada transendotelial se caracterizan por su longevidad o incremento en su vida media, favorecen esta hipótesis.

Por lo tanto, considerando los siguientes antecedentes:

1. La remoción de neutrófilos es esencial para la resolución de la inflamación.
2. Distintos mecanismos promueven el reclutamiento de neutrófilos en inflamación por infección y lesión.
3. Distintos mecanismos podrían promover la remoción de neutrófilos en inflamación por infección y lesión.
4. Los neutrófilos pueden ser removidos mediante apoptosis, exudados inflamatorios o migración retrógrada transendotelial.
5. Se desconoce el contexto fisiológico de la remoción de neutrófilos mediante migración retrógrada transendotelial.
6. El pez cebra presenta ventajas metodológicas para evaluar el tráfico de neutrófilos en inflamación *in vivo*.

Nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

II. HIPÓTESIS

La muerte celular de neutrófilos es un proceso que ocurre durante el inicio de la inflamación por infección y no en inflamación por lesión.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Demostrar que la muerte de neutrófilos ocurre al inicio de la inflamación por infección y no en lesión.

Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar muerte celular de neutrófilos en inflamación inducida por infección y lesión.
- 2.- Evaluar el transcriptoma de neutrófilos en inflamación por lesión.
- 3.- Identificar genes diferencialmente expresados en infección versus lesión.
- 4.- Establecer xenotransplantes para evaluar la función de neutrófilos de mamífero en larvas de pez cebra.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelos de estudio

- 1) Peces cebra (*Danio rerio*, *Telostei*, *Cyprinidae*): En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas silvestres, transgénicas y mutantes: AB (silvestre), *tg(mpx:GFP)*^{il14} (Renshaw et al. 2006), *tg(flk:dsred)* (Huang y col., 2005), *tg(mpeg1:mcherry)* (Ellet y col., 2011), *tg(ubi:mcherry)* (Mossiman y col., 2011) y la línea mutante *nacre-/-* (Lister y col., 1999), los cuales fueron cruzados, mantenidos y manipulados según descrito previamente (Westerfield, 2000).
- 2) Ratones (*mus musculus*): animales silvestres C57BL/6 y transgénicos CByJ.B6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J (The Jackson laboratory) fueron utilizados para la obtención de células madre hematopoyéticas y neutrófilos.
- 3) Líneas celulares: células promielocíticas humanas HL-60 fueron adquiridas (ATCC® CCL240TM) y mantenidas según las recomendaciones del proveedor.
- 4) Bacterias: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATTC® 14028) fue utilizada para los experimentos de evaluación de muerte celular en neutrófilos. Una cepa aislada clínicamente del Brigham and Women's Hospital (Boston, USA) de *Klebsiella pneumoniae*, y una versión transgénica conteniendo el vector (pRSET-tdTomato), fueron utilizadas para los experimentos de infección en animales quiméricos.

4.2 Protocolo de inflamación inducida por transección de la aleta caudal

Larvas de 3 dpf fueron anestesiadas con metanosulfonato (MS222, tricafna, A5040; Sigma) de acuerdo a (*Westerfield, 2000*), y la sección posterior caudal carente de melanóforos, presente en todas las larvas, fue removida por transección con bisturí según descrito previamente (*Mathias et al., 2006*). Posteriormente, las larvas fueron incubadas a 28°C y/o fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% horas más tarde.

4.3 Protocolo de inflamación inducida por infección con *Salmonella Typhimurium*

Un inóculo de *Salmonella Typhimurium* fue incubado en medio Luria-Bertani (LB) la noche anterior, y se preparó una solución la mañana siguiente a partir de las bacterias en fase logarítmica de crecimiento de 100, 200, 400 o 800 U.F.C. por dilución con PBS. Para la microinyección, larvas de 3 dpf fueron anestesiadas, immobilizadas con agarosa de bajo punto de fusión al 1% (v/v) (peqGOLD 35-2099; PEQ-LAB Biotechnologie) preparada en medio E3 más anestésico, y microinyectadas con *Salmonella Typhimurium* entre los somitos dorsales, ó en la vesícula ótica según descrito previamente (*Benard y col., 2012; Deng y col., 2012*). Posteriormente, las larvas fueron desmontadas e incubadas a 28°C y/o fijadas con PFA al 4% horas más tarde.

4.4 Protocolo de inflamación inducida por infección con *Klebsiella pneumoniae*.

Un inóculo de *Klebsiella pneumoniae* fue incubado en medio LB la noche anterior, y se preparó una solución la mañana siguiente a partir de las bacterias en fase logarítmica de

crecimiento de 100, 400 o 500 U.F.C. por dilución con PBS. Para la microinyección, larvas de 2 ó 3 dpf fueron inmovilizadas con agarosa al 1% (v/v) preparada en medio E3 más anestésico, y microinyectadas con *Klebsiella* en los somitos dorsales caudales, o en la vesícula ótica según descrito previamente (Benard y col., 2012; Deng y col., 2012).

4.5 Protocolo de inflamación inducida por tratamientos con CuSO₄

Para cada experimento independiente, se preparó una solución fresca de stock 50 mM a partir de sulfato de cobre II pentahidratado (102780; Merck). Para los tratamientos se prepararon 50 mL de sulfato de cobre 50 o 100 μ M por dilución a partir de la solución stock, y 50 larvas de 3 dpf fueron incubadas con los 50 mL de solución de sulfato de cobre en placas petri de 100 mm por 2 horas a 28°C.

4.6 Protocolo de inmunohistoquímica TUNEL

Para los experimentos de evaluación de muerte celular se utilizó un kit comercial (TUNEL EMD Millipore). En breve, las larvas fueron fijadas en PFA por 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas con PBS-Tritón al 0,3% 5 veces por 5 minutos, e incubadas con proteinasa K (10 μ g/mL) por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, las larvas fueron incubadas con PFA al 4% por 20 minutos, y posteriormente lavadas 5 veces con PBS-T al 0,3% por 5 minutos. Luego las larvas fueron incubadas con una solución de etanol/acetona (2:1) por 10 minutos a -20°C, y posteriormente lavadas con PBS-T al 0,3% 5 veces por 5 minutos. Acto seguido, las larvas fueron incubadas con la solución de equilibración por 1 hora a

temperatura ambiente. Posteriormente, las larvas fueron incubadas con una solución de reacción (para 2 reacciones, 24 μL solución de reacción + 12 μL de enzima TdT + 1 μL Triton X-100 10%) durante 12 horas a 37°C. Luego, las larvas fueron incubadas con PBS-T 0,3% por 1 hora a 37°C y por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación las larvas fueron incubadas con una solución de bloqueo (DMSO 1 %(v/v); BSA 1%(p/v); y tritón X-100 0,1 %(v/v) en PBS) por 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las larvas fueron incubadas con el anticuerpo anti digoxigenina (1:2000) (Roche) preparada en solución de bloqueo durante 12 horas a 4°C. Al día siguiente, las larvas fueron lavadas con PBS-T 0,3% 6 veces por 10 minutos, e incubadas con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-T 0,3% por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las larvas fueron lavadas con PBS-T 0,3% 5 veces por 5 minutos, montadas con agarosa 1% de bajo punto de fusión en placas con fondo de vidrio de 35 mm, y visualizadas mediante microscopía confocal (Nikon A1R). Las imágenes adquiridas fueron procesadas por Image J.

4.7 Protocolo de inmunohistoquímica

Para los experimentos de evaluación de marcadores celulares específicos, las larvas fueron fijadas en PFA por 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron lavadas con PBS-Tritón al 0,3% 5 veces por 5 minutos, e incubadas con proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, las larvas fueron incubadas con PFA al 4% por 20 minutos, y posteriormente lavadas 5 veces con PBS-T al 0,3% por 5 minutos. Luego las larvas fueron incubadas con una solución de

etanol/acetona (2:1) por 10 minutos a -20°C , y posteriormente lavadas con PBS-T al 0,3% 5 veces por 5 minutos. Luego, las larvas fueron incubadas con una solución de bloqueo (DMSO 1 % (v/v); BSA 1% (p/v); y tritón X-100 0,1 % (v/v) en PBS) por 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, las larvas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-GFP FITC (1:50) (Abcam, ab6662), anti c-kit biotina (1:50) (Abcam, ab25022), anti Ly-6G/Ly-6C biotina (1:25) (Biolegend, 108404), o anti Ki 67-FITC (1:50) (Ebioscience, 11-5698-80) preparados en solución de bloqueo por 12 horas a 4°C . A continuación, las larvas fueron lavadas 5 veces con PBS-T 0,3% por 5 minutos, y, de ser necesario, fueron incubadas con el anticuerpo secundario estreptavidina FITC (1:50) (Ebioscience, 11-4317-87) en solución de bloqueo por al menos 2 horas a temperatura ambiente, o por 12 horas a 4°C . Finalmente, las larvas fueron lavadas con PBS-T 0,3% 5 veces por 5 minutos, montadas con agarosa 1% de bajo punto de fusión en placas con fondo de vidrio de 35 mm, y visualizadas mediante microscopía confocal (Nikon A1R). Las imágenes adquiridas fueron procesadas por Image J.

4.8 Protocolo de extracción de células GFP+ a partir de larvas *tg(mpx:GFP)*.

Para el aislamiento de las células 100-150 larvas fueron transferidas a un tubo de 1,5 mL y colocadas sobre hielo por 20 minutos. El medio E3 fue extraído y las larvas fueron lavadas con PBS a 4°C . Las larvas fueron removidas de PBS y incubadas con 500 μL de tripsina al 0,25% (GIBCO, Thermo fisher, 25200056) a 4°C . Las larvas fueron disgregadas con micropipeta de 1 mL en hielo por 10 minutos, o hasta observar el esqueleto de cartílago en las larvas. La reacción fue detenida por adición de 1 mL de

DMEM con 10% SFB, y centrifugadas a 6.000 g por 2 minutos. El sobrenadante fue descartado, y el pellet fue resuspendido en 1 mL de PBS a 4°C. Este procedimiento fue realizado dos veces, y posteriormente la solución resultante fue filtrada con mallas de nylon de 40 o 70 μm en tubos de citometría. Las células fueron analizadas por citometría, y la población de células GFP+ fueron seleccionadas en base a viabilidad, tamaño, granulosidad, y en base a una alta emisión de fluorescencia. Las células GFP+ aisladas fueron recibidas directamente en 500 μL de TRIZOL (Thermo fisher) a 4°C, y guardadas a -80°C hasta el aislamiento del RNA.

4.9 Protocolo de extracción de RNA a partir de células GFP-/GFP+

Las muestras a -80°C fueron descongeladas en hielo, y se les añadió 200 μL de cloroformo. Las muestras fueron agitadas en vortex por 15 seg, y se dejaron reposar en hielo por 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 g por 15 minutos a 4°C. La fase superior acuosa fue transferida a un tubo de 1,5 mL autoclavados o libre de RNAasas, y el mismo volumen de isopropanol a 4°C fue añadido (aprox. 500 μL). Las muestras fueron incubadas a -20 °C por 2 horas, y centrifugadas a 13.000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el pellet lavado por vortex con una solución de etanol al 75% (preparado en aguda DEPC o ultra pura). Las muestras fueron centrifugadas a 8.000 g por 8 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Las muestras fueron invertidas y dejadas a temperatura ambiente hasta volatilizar el solvente (aprox. 10 minutos), y el pellet fue resuspendido en 10 μL de agua ultra pura. Las muestras fueron incubadas 10 minutos a 65°C e inmediatamente puestas sobre hielo 10 minutos.

Una alícuota de 0,5 μL fue extraída a la que se le añadió el mismo volumen de agua ultra pura, y se utilizó para medir la concentración y calidad del RNA obtenido mediante un nanodrop (Thermo Fisher).

4.10 Protocolo de amplificación de RNA.

Para la amplificación de las muestras biológicas de RNA total a secuenciar se utilizó un kit comercial (Complete Whole Transcriptome Amplification Kit, Sigma).

4.11 Protocolo de qRT-PCR.

Para los experimentos de evaluación de expresión de transcritos en tiempo real se utilizó un kit comercial para generar cDNA a partir de muestras de RNA (iScript™ cDNA Synthesis Kit). Brevemente, para la reacción de síntesis se utilizaron 4 μL de del mix de reacción iScript 5x, más 1 μL de transcriptasa reversa iScript, más el volumen necesario de muestra de RNA para lograr 1 μg , y la reacción fue llevada a un volumen final de 20 μL con agua libre de nucleasas (Thermo fisher). El protocolo de reacción en el termociclador incluyó 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y al final de la reacción de llevo a 4°C. El cDNA obtenido fue diluido agregando 100 μL de agua libre de nucleasas. Para la reacción de qPCR, se utilizaron 5 μL de cDNA diluido, más 5 μL de partidores (concentración 1,2 μM) más 10 μL de SYBER green (SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit) en placas de reacción de qPCR (Biorad). Las reacciones fueron realizadas al menos en triplicado para cada experimento independiente. Los partidores utilizados para OLFM4 (F:

TTGGGCCAGTGTGTCTGTAA; R: GCTGATGTGGATCTGGACCT). El resto de los partidores utilizados en nuestros estudios fueron obtenidos de Gallardo y col., (*no publicado*).

4.12 Protocolo de secuenciación del transcriptoma de neutrófilos mediante RNA- HiSeq

Tres réplicas biológicas de ARN total de neutrófilos en condiciones de homeostasis y tres réplicas biológicas en condiciones de tratamiento con CuSO₄ de RIN mayores a 7,0 fueron utilizadas para la secuenciación. Para la evaluación de la calidad de las muestras 10 ng de RNA fueron analizada mediante electroferogramas (Agilent 2100 Bioanalyzer). Para el análisis se consideraron los ARN mensajeros (selección por poli-A), y fragmentos de ~175 pares de bases fueron generados y procesados por ambos extremos (paired-end) mediante el programa *v4 chemistry* (2x126) en un Illumina HiSeq2500 (magnitud de cobertura — ~40M lecturas por muestra). El procedimiento de preparación y secuenciación de las muestras fue realizado por el centro de secuenciación del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*NIH Intramural Sequencing Center, NISC*). Los datos generados fueron ensamblados utilizando el programa Top Hat y alineados contra el genoma de pez cebra Zv9.

4.13 Protocolo de aislamiento de células hematopoyéticas murinas

Para el aislamiento de las células de médula ósea 1 ratón fue sacrificado por experimento. En breve, un animal fue sacrificado mediante exposición a CO₂ y posterior dislocación cervical. Ambas extremidades traseras fueron extraídas, y ambas tibias y fémures fueron aislados y removidos de tejido muscular. Los huesos fueron machacados con un crisol y mortero sobre una solución salina MACS a 4°C (PBS, 0,5% SFB, 2mM EDTA) hasta extraer todo el líquido rojo (3 lavados con PBS). La suspensión celular obtenida fue filtrada en mayas de nylon de 40 o 70 μm , y se llevó a un volumen de 50 mL con solución MACS a 4°C. 10 μL fueron extraídos, y se determinó la concentración celular mediante la utilización de una cámara Neubauer. La suspensión celular fue centrifugada a 300 g por 10 minutos a 4°C, y resuspendida en la solución MACS a 4°C para lograr una concentración de 10⁷ células cada 40 μL . Para el enriquecimiento de células madre y progenitoras se utilizó un kit comercial (Lineage Cell Depletion Kit, mouse. Miltenyi Biotec). Para la reacción, ocho tubos de 1,5 mL conteniendo 40 μL de la suspensión celular obtenida fueron incubados con 10 μL del cocktail de anticuerpos asociados a biotina (biotin antibody cocktail), más 10 μL del anticuerpo anti Ter-119 (Ebioscience, 13-5921-81). Las muestras fueron incubadas a 4°C por 15 minutos, y posteriormente se añadieron 30 μL de solución MACS, más 20 μL de anticuerpos anti biotina asociados a microesferas metálicas (anti biotin microbeads). Las muestras se incubaron 20 minutos a 4°C, y posteriormente todas las reacciones fueron recolectadas en un tubo cónico de 50 mL, y se llevó a un volumen final de 25 mL con solución

MACS. El tubo fue centrifugado a 300 g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, y el pellet fue resuspendido en 4 mL con solución MACS. Para la separación mediante selección negativa, 8 columnas de separación por afinidad magnética (Negative selection LD columns from MACS, Miltenyi Biotec) fueron montadas en un campo magnético de separación (QuadroMACS™ Separator, Miltenyi Biotec), y fueron cebadas con 3 mL de solución MACS. Posteriormente, la suspensión celular fue homogenizada, y 500 μ L fueron agregados a cada columna de separación, y el flujo descendente fue recolectado en hielo. Las columnas fueron lavadas 4 veces con 3 mL de solución MACS cada vez, y el flujo descendente fue recolectado cada vez. Las 8 suspensiones celulares obtenidas fueron centrifugadas a 300 g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, y los pellet celulares fueron reñuidos y resuspendidos en 1 mL de PBS en un tubo cónico de 15 mL. Para el marcaje fluorescente de las células, se añadió 1-3 μ L de sonda de emisión fluorescente azul (Cell trace Violet, Molecular probes), y se incubó 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió 1 mL de SFB (concentrado), y se incubó 10 minutos a 37°C. Las células fueron llevadas a un volumen final de 10 mL con PBS, y se centrifugó a 300 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron las células en 50-100 μ L con PBS.

4.14 Protocolo de aislamiento de neutrófilos murinos de médula ósea

El procedimiento de obtención de neutrófilos procede igualmente como descrito en 3.11, pero involucró la utilización de un kit de separación de neutrófilos por selección negativa. (Neutrophil Isolation Kit, mouse, Miltenyi Biotec).

4.15 Protocolo de trasplante de células de mamífero en embriones de pez cebra

Embriones de peces cebra fueron recolectados y dejados a temperatura ambiente para retrasar su desarrollo, y ampliar el estadio que permite el xenotrasplante. Para la microinyección, agujas de borosilicato de filamento de DO: 1 mm, DI: 0.5 mm, y largo de 10 cm fueron utilizadas. El programa para generar las agujas (Sutter instruments, model P-200) utilizó los siguientes parámetros: Heat: 350, Fil: 4, Vel: 5, Del: 225, Pul: 150. Para el trasplante, los embriones fueron recolectados y situados sobre la tapa de una placa petri de plástico conteniendo un portaobjetos. Se removió todo el medio de los embriones de la placa, y se alinearon contra el portaobjeto. El corion de los embriones fue atravesado con la aguja, y las células de mamífero fueron inyectadas directamente en el blastodermo de los embriones. Los embriones transplantados fueron colocados en placas petri de 100 mm con medio E3 e incubados a 28° o 30°C. Al día siguiente, los embriones muertos fueron descartados, y el corion de los animales transplantados fue removido manualmente, o por tratamiento con pronasa (1mg/mL).

V. RESULTADOS

5.1 Evaluar muerte celular de neutrófilos en inflamación inducida por infección y lesión.

A fin de inducir inflamación aguda por infección y lesión se implementaron metodologías experimentales previamente descritas en la literatura para el modelo de pez cebra. Larvas transgénicas reporteras de neutrófilos *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron lesionadas por transección de la aleta caudal para inducir inflamación por lesión (Mathias y col., 2006), o infectadas intramuscularmente en los somitos dorsales caudales con el patógeno intracelular *S. Typhimurium* para inducir inflamación por infección (Benard y col., 2012).

Para comparar infiltración y muerte celular de neutrófilos en ambos contextos y asociar posibles diferencias encontradas principalmente al tipo de inductor de inflamación, y no a diferencias en la magnitud de la inflamación, se establecieron condiciones experimentales de infección que tuviesen una magnitud de infiltración de neutrófilos comparable con la de transección de la aleta caudal. La lesión por transección de la aleta caudal evidencia en el máximo de infiltración un promedio de 15 células GFP+ en un área de 9 mm² 6 a 9 horas post transección (Fig. 3A). La inyección de 100 U.F.C. entre los somitos dorsales evidencia en el máximo de infiltración un promedio de 18 células en un área de 9 mm² GFP+ 3 a 6 horas post inyección (Fig. 3B). Si bien el número de células reclutadas en promedio es similar en ambos casos, tanto la cinética de reclutamiento como de resolución se evidencia más rápida para la condición de infección.

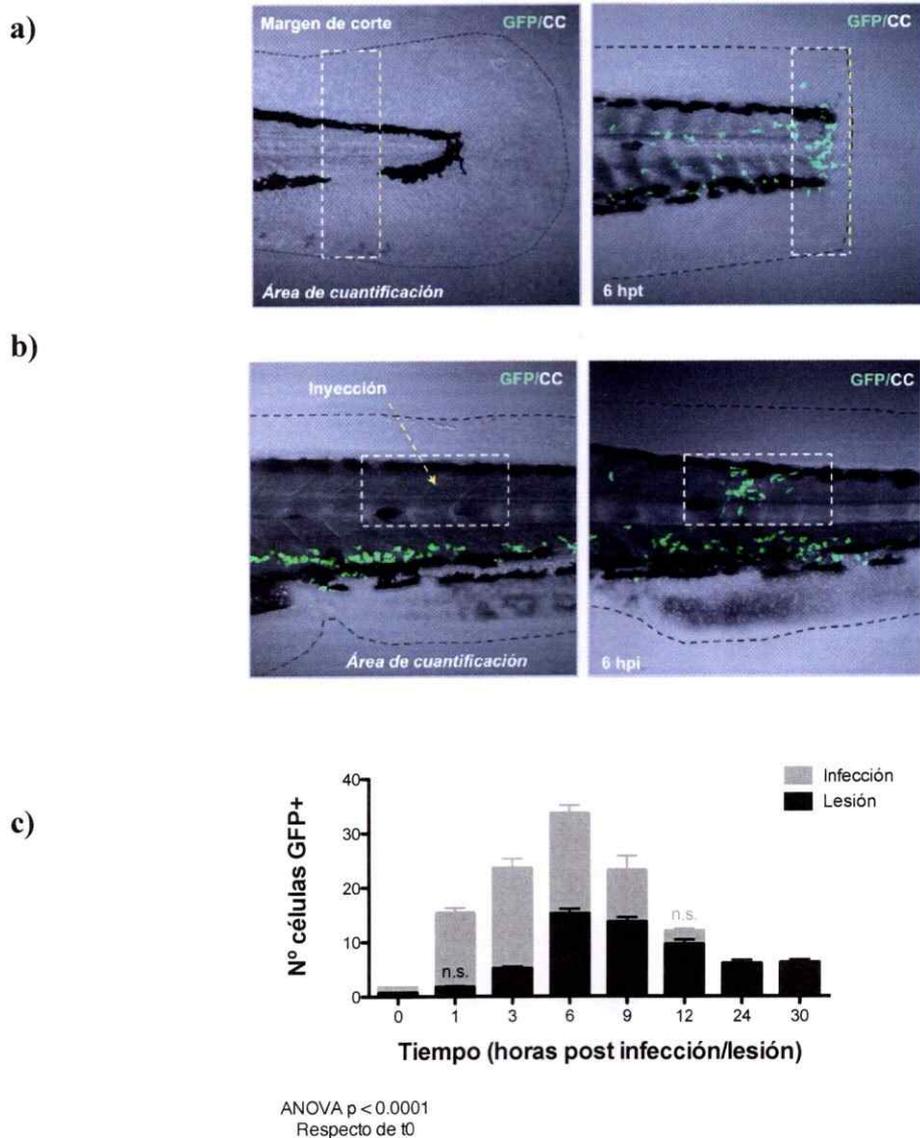


Figura 3. Establecimiento de condiciones experimentales de inflamación aguda inducida por infección versus lesión tisular de magnitud de infiltración neutrófilica comparables. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron lesionadas por **a)** transección de la aleta caudal (línea punteada amarilla), o **b)** infectadas por inyección intramuscular con 100 U.F.C. de *S. Typhimurium*. Se muestran imágenes confocales con proyecciones de z-stack representativas de la condición control (paneles izquierdos) y en el máximo de infiltración (paneles derechos). **c)** Se cuantificó a los tiempos indicados el número de neutrófilos infiltrados dentro del área demarcada por el área línea blanca punteada (~9 mm²). Los gráficos representan los resultados de 3 experimentos independientes con el promedio \pm error estándar para cada tiempo post-daño. GFP: *green fluorescent protein*; CC: campo claro. Barra de escala = 100 μ m.

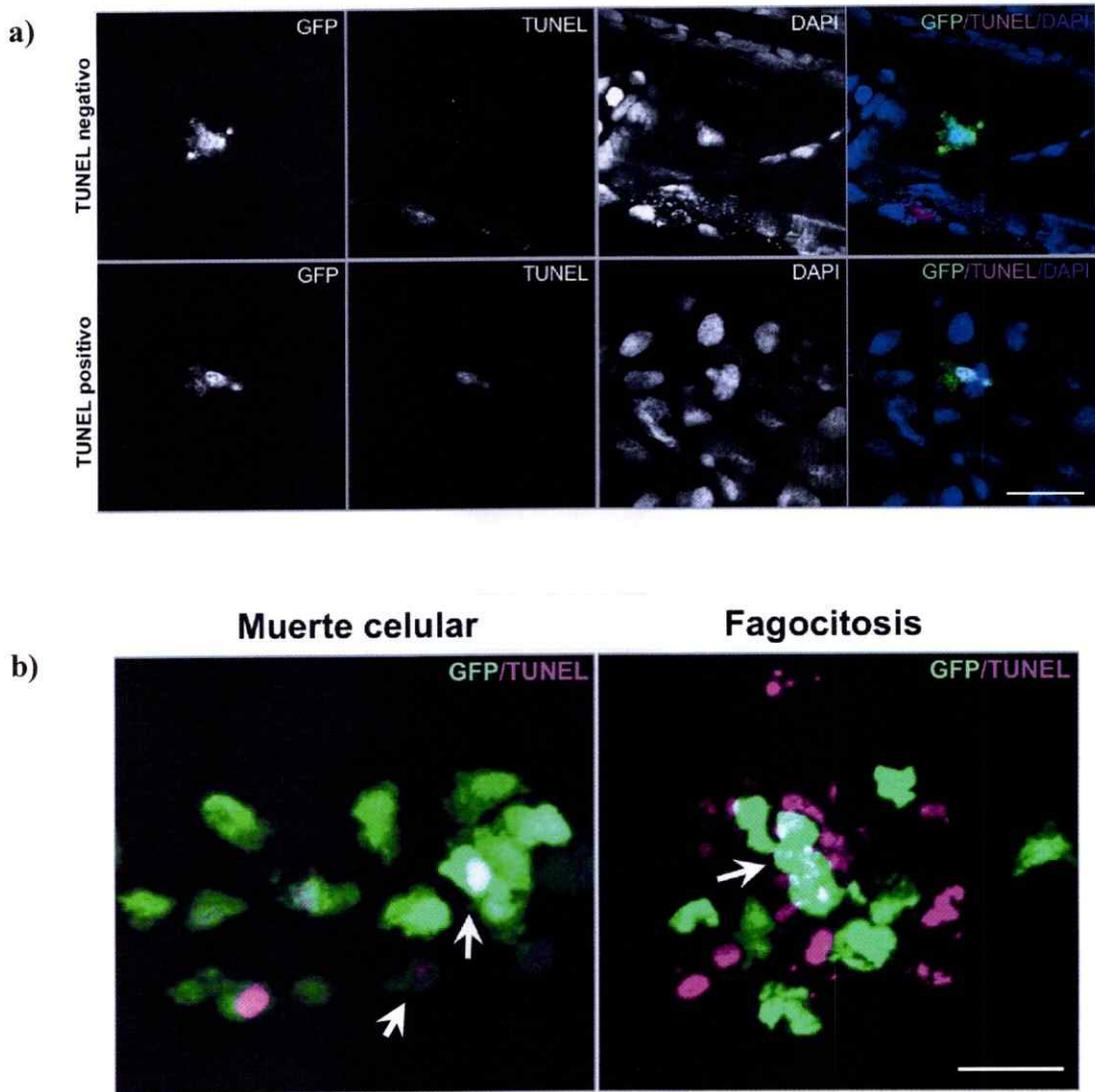


Figura 4. Detección e identificación de neutrófilos en distintos procesos biológicos durante inflamación aguda inducida por infección. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron inyectadas con 100 U.F.C. de *S. Typhimurium*, procesadas por inmunohistoquímica TUNEL/anti-GFP y visualizadas mediante microscopía confocal con proyecciones de z-stack. **a)** Visualización de un neutrófilo activado TUNEL negativo (GFP+/TUNEL-, panel superior) y un neutrófilo en proceso de muerte celular TUNEL positivo (GFP+/TUNEL+, panel inferior). **b)** Identificación y distinción de neutrófilos GFP+/TUNEL+ en procesos de muerte celular (panel izquierdo) y en fagocitosis de restos celulares (panel derecho). Barras de escala = 10 μ m.

Para evaluar y detectar muerte celular de neutrófilos *in situ* en ambas condiciones inflamatorias se realizaron ensayos de inmunohistoquímica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). La técnica fue seleccionada ya que permite detectar muerte celular independiente del mecanismo (e.g. apoptosis, necrosis, piroptosis, etc.) (Grasl-Kraupp, y col., 1995; Fink y Cookson., 2005). La evaluación en inflamación por infección permitió identificar mediante visualización por microscopía confocal células GFP+/TUNEL- y células GFP+/TUNEL+ (**Fig. 4A**). Adicionalmente, permitió distinguir neutrófilos GFP+/TUNEL+ en procesos de muerte celular versus neutrófilos, probablemente, en procesos de fagocitosis de restos celulares (**Fig. 4B**).

La evaluación a lo largo de toda la cinética de infiltración de neutrófilos en inflamación por infección evidencia la detección de células GFP+/TUNEL+ en el sitio de inyección, y exclusivamente dentro de las primeras horas de infiltración (**Fig. 5**). Sin embargo, la evaluación a lo largo de toda la cinética de infiltración en inflamación por transección de la aleta caudal se caracteriza por evidenciar neutrófilos alrededor del margen de la lesión únicamente en procesos de fagocitosis de restos celulares TUNEL+ (**Fig. 6**). En general, los resultados de la evaluación por TUNEL en infección con 100 U.F.C. evidencia la detección *in situ* de un intervalo de 0 a 3 células con morfología apoptótica por larva infectada, y sin detección para la condición de transección de la aleta caudal (**Fig. 7**).



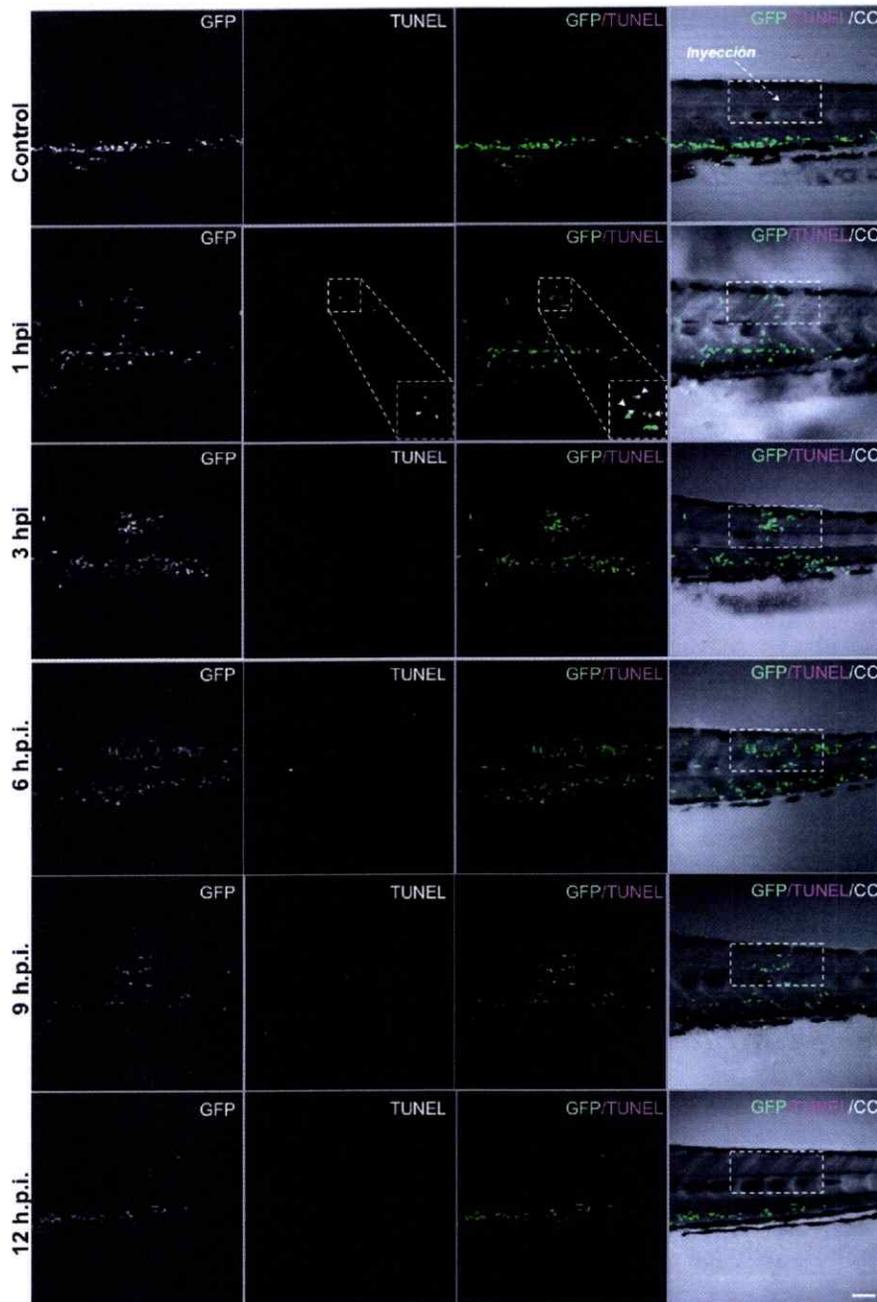


Figura 5. Neutrófilos mueren localmente dentro de las primeras horas de infiltración inducida por infección. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron lesionadas por inyección intramuscular con 100 U.F.C. de *S. Typhimurium*, fijadas a los tiempos indicados, procesadas por inmunohistoquímica anti-GFP/TUNEL y visualizadas mediante microscopía confocal con proyecciones de z stack. Neutrófilos TUNEL+ son indicados por flechas blancas. Barras de escala = 100 μ m.

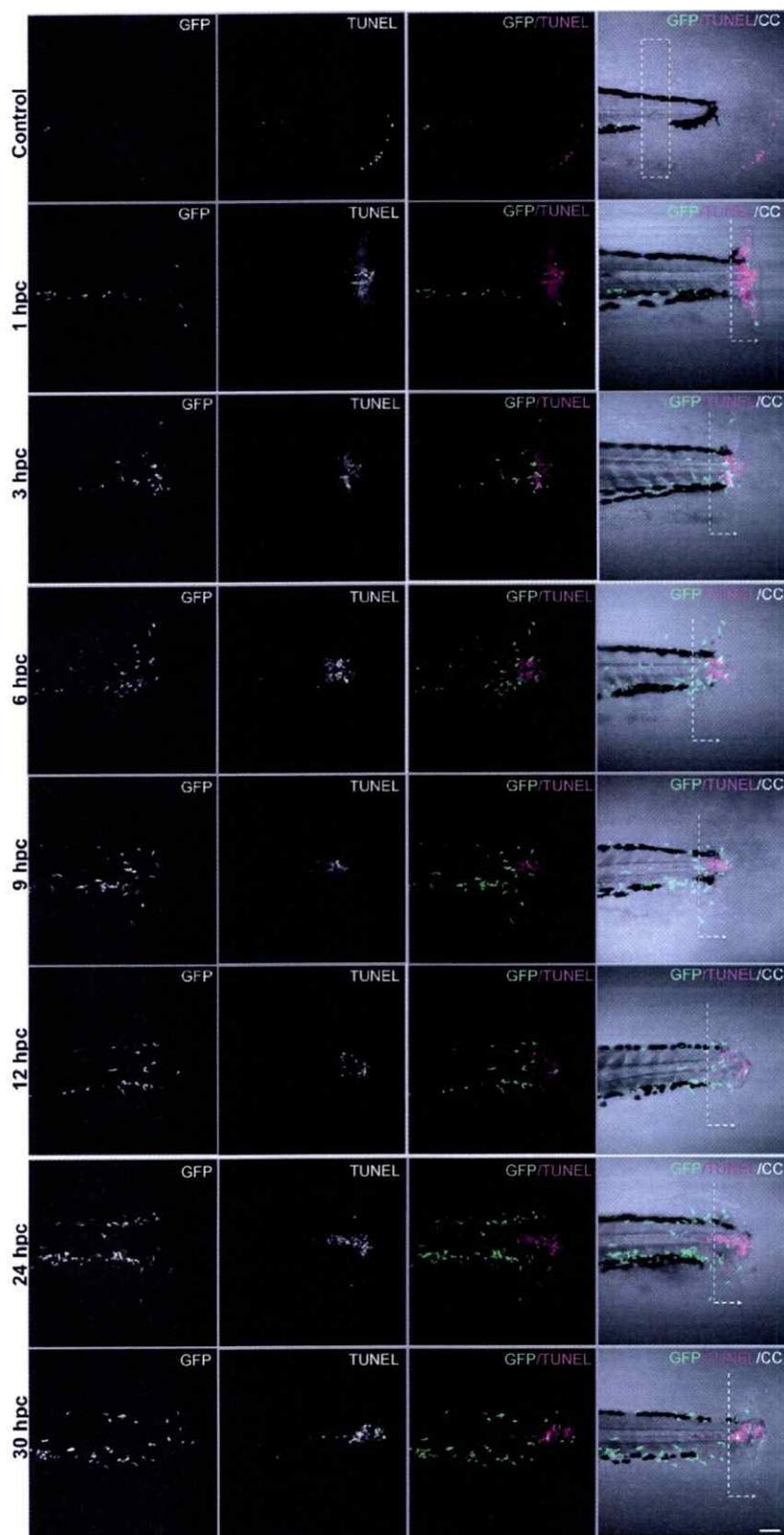


Figura 6. La inflamación por lesión inducida por transección de la aleta caudal no evidencia neutrófilos en procesos de muerte. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron lesionadas por transección de la aleta caudal, fijadas a los tiempos indicados, procesadas por inmunohistoquímica anti-GFP/TUNEL y visualizadas mediante microscopía confocal con proyecciones de z stack. Barras de escala = 100 μ m. (*imágenes en pág. anterior*).

Considerando que la literatura describe que macrófagos, células del mismo linaje mieloide, activan el programa apoptótico al fagocitar patógenos bacterianos (*Frankenberg y col., 2008*), se consideró evaluar si la muerte celular detectada en neutrófilos podría estar a su vez asociada a la presencia y fagocitosis de patógenos. Para esto se realizaron experimentos de inyección con concentraciones crecientes de *S. Typhimurium*, y se evaluó por TUNEL la presencia de neutrófilos en procesos de muerte mostrando una correlación positiva entre la magnitud de la infiltración de células GFP⁺, el tiempo de resolución y el N° de células GFP⁺/TUNEL⁺ detectadas versus las U.F.C. de *S. Typhimurium* inyectadas (**Fig. 8a y b**). Estos resultados sugieren que, en larvas de pez cebra, la muerte *in situ* de neutrófilos durante el proceso inflamatorio está asociada exclusivamente a la presencia de patógenos bacterianos.

5.2 Evaluar el transcriptoma de neutrófilos en inflamación por lesión.

Los mecanismos moleculares que programan la infiltración, función y remoción de neutrófilos en infección han sido ampliamente descritos. Sin embargo, los mecanismos que programan sus funciones en inflamación por lesión son escasamente conocidos.

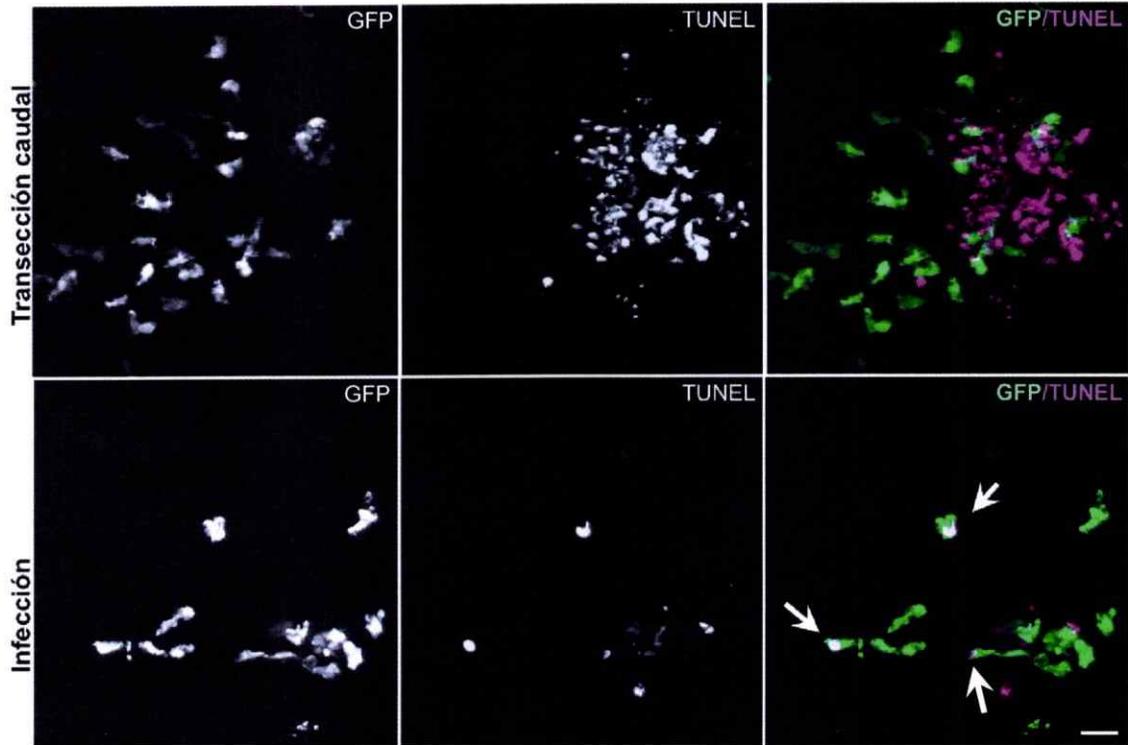
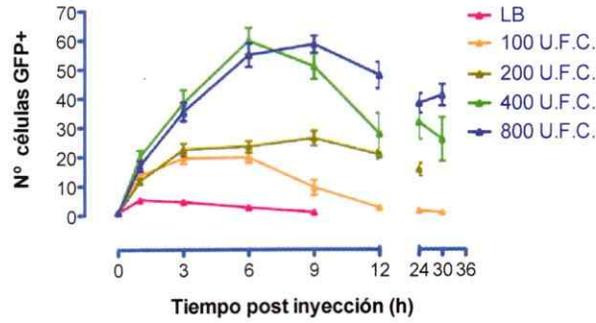


Figura 7. Detección de neutrófilos en procesos de muerte únicamente en inflamación por infección. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron lesionadas por transección de la aleta caudal o inyectadas con 100 U.F.C. de *S. Typhimurium*. 6 horas post lesión o inyección fueron fijadas y procesadas por inmunohistoquímica anti-GFP/TUNEL. La visualización mediante microscopía confocal con proyecciones de z stack de neutrófilos infiltrados en la zona de lesión por transección de la aleta caudal (panel superior) o infiltrados por infección (panel inferior) evidencia la detección de neutrófilos en procesos de muerte (GFP+/TUNEL+, flechas blancas) únicamente en el contexto de inyección con *S. Typhimurium*. Barra de escala = 10 μ m.

a)



b)

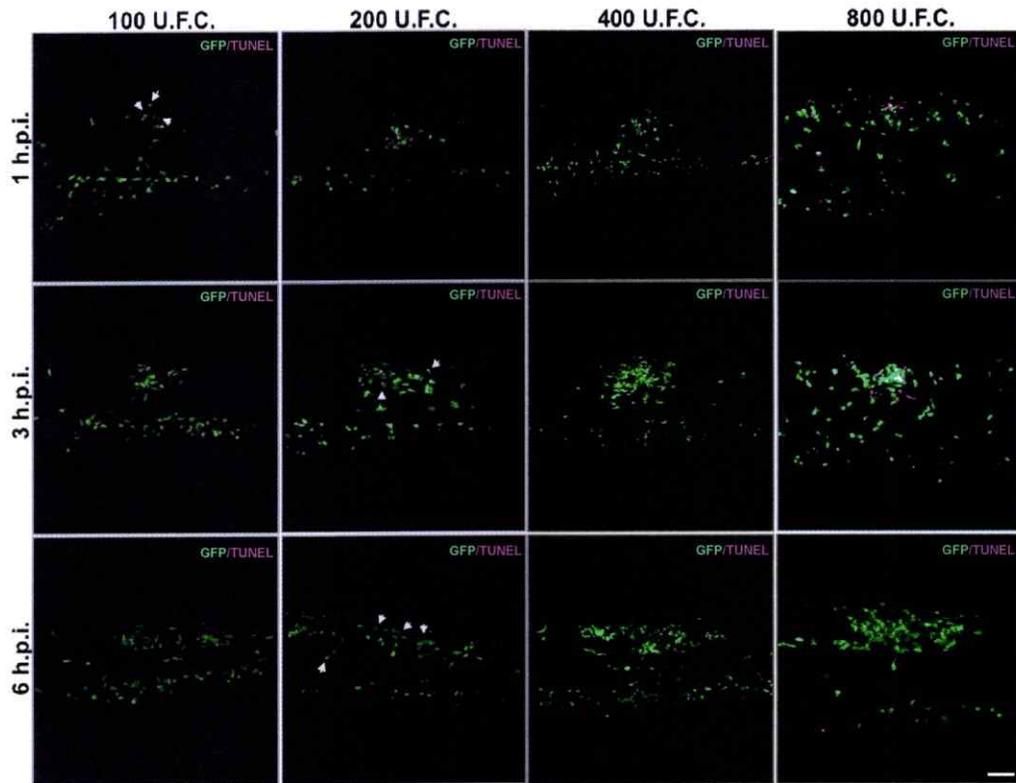


Figura 8. Un aumento en el número de bacterias inyectadas aumenta el número de neutrófilos en procesos de muerte. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron inyectadas con LB o 100, 200, 400 u 800 U.F.C. de *S. Typhimurium*, fijadas a los tiempos indicados, procesadas por inmunohistoquímica anti-GFP/TUNEL, y visualizadas mediante microscopía confocal con proyecciones de z stack. **a)** Cuantificación del reclutamiento de neutrófilos a lo largo del tiempo para las distintas condiciones de inyección. Promedio +/- error estándar. **b)** Imágenes representativas del reclutamiento de neutrófilos bajo las condiciones experimentales señaladas. Neutrófilos TUNEL+ son señalados con flechas blancas. Barra de escala = 100 μ m.

Para determinar que genes podrían ser responsables en las diferencias encontradas en neutrófilos en ambos contextos inflamatorios nos propusimos identificar aquellos genes que son expresados diferencialmente en neutrófilos en infección versus lesión. Con este propósito, se determinó evaluar el transcriptoma de neutrófilos activados en condiciones de inflamación aguda inducida por lesión por tratamientos con sulfato de cobre.

El sulfato de cobre induce inflamación por citotoxicidad en órganos mecanosensoriales expuestos a lo largo de la piel en el cuerpo de larvas de pez cebra (*d'Aleçon y col., 2010*). Experimentos previos en nuestro laboratorio evidenciaron que este tratamiento induce modulación transcripcional de neutrófilos de pez cebra (*Gallardo y col., no publicado*). Para obtener una lista representativa de los genes expresados en neutrófilos activados en inflamación por lesión se determinó el transcriptoma de neutrófilos en estado de homeostasis y activados por tratamiento con sulfato de cobre.

Para el aislamiento de neutrófilos a partir de larvas *tg(mpx:GFP)*, se preparó una suspensión celular de entre 100 a 150 larvas de 3 dpf, y usando citometría de flujo y FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) se aislaron células GFP+/GFP- (**Fig. 9a**). Posteriormente, se evaluó la expresión de transcritos específicos (*mpx* y *egfp*) y no específicos (*sox2*) de neutrófilos mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR) para evaluar el método de separación. La evaluación de las poblaciones GFP+ versus GFP- obtenidas después del aislamiento, evidenció una tendencia en la sobre-representación de los transcritos de *egfp* y *mpx* en

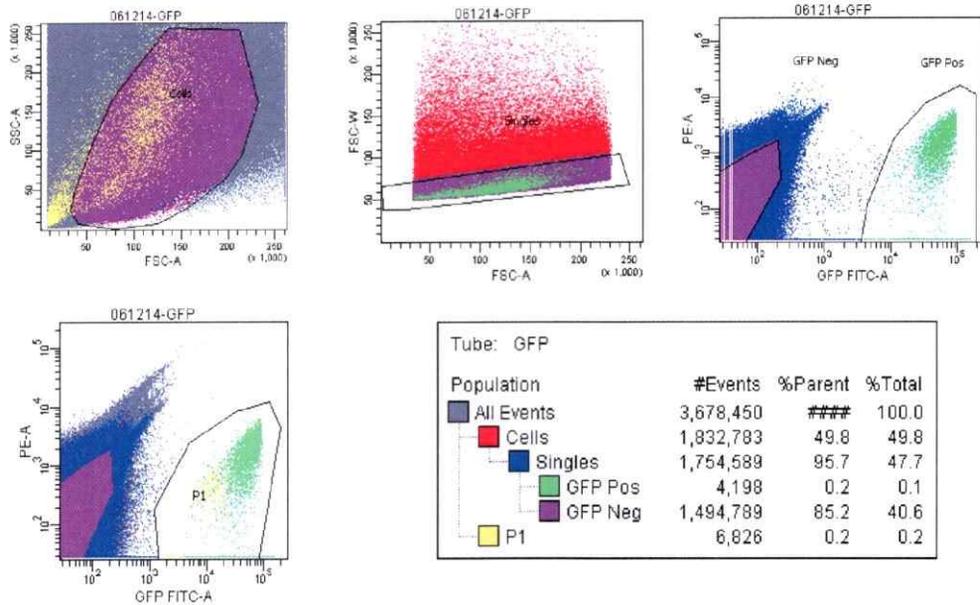
células GFP+ y sin cambio para *Sox2* (Fig. 9b), resultados que sugieren que la metodología empleada permite enriquecer neutrófilos a partir de larvas *tg(mpx:GFP)*.

Para secuenciar el transcriptoma de neutrófilos en homeostasis y activados por tratamiento con CuSO₄, se realizaron 37 experimentos independientes de extracción del ARN total de células GFP+ a partir de 100 -150 larvas en condiciones de homeostasis, y 100 - 150 larvas tratadas con CuSO₄ 50 µM por 2 horas. Un análisis de calidad del ARN total aislado para cada una de las 74 muestras obtenidas se llevo a cabo mediante electroforesis capilar (*Agilent Bioanalyzer*), y se seleccionaron aquellas muestras con valores de integridad RIN (*RNA integrity number*) superiores a 7,0 para la secuenciación. En total, 3 réplicas biológicas de ARN de neutrófilos en homeostasis, y 3 réplicas biológicas de ARN de neutrófilos en condición de tratamiento fueron seleccionadas para la evaluación (Tabla 1 y Fig. 10).

Tabla 1. Cantidad y valores de RIN para el ARN de cada replica biológica en homeostasis y tratamiento seleccionadas para ser secuenciadas.

Muestras biológicas	Réplica biológica 1	Réplica biológica 2	Réplica biológica 3
Homeostasis	238.8 ng, RIN = ~ 8.3	250 ng, RIN = 7.4	264.9 ng, RIN = 9.0
Tratamiento CuSO ₄	257 ng, RIN = 9.2	256 ng, RIN = 8.6	241 ng, RIN = 7.0

a)



b)

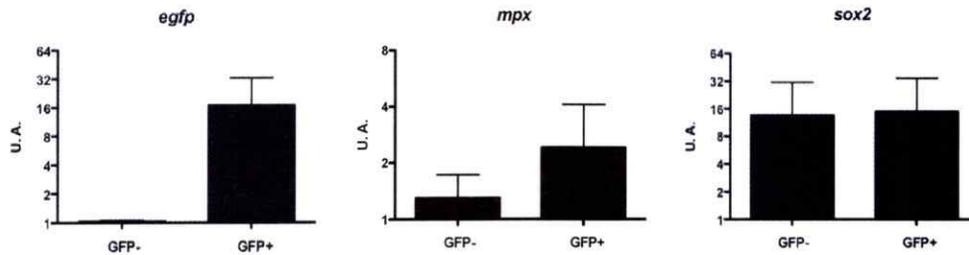


Figura 9. La citometría de flujo con separador celular (FACS) permite aislar neutrófilos a partir de larvas *tg(mpx:GFP)*. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron dissociadas mediante tratamiento con tripsina-EDTA al 0.25%, resuspendidas en PBS, filtradas por mallas de 7 micrones, y la suspensión celular resultante analizada por citometría de flujo. **a)** Gráficos de citometría representativos de la estrategia utilizada para aislar células GFP+. Células viables individuales GFP+ fueron seleccionadas en base a viabilidad, tamaño, granulosidad, y en base a una alta emisión de fluorescencia. **b)** Cuantificación mediante qRT-PCR de los transcritos de *egfp*, *mpx* y *sox2* en las suspensiones celulares GFP+ versus el control (células GFP-) evidencian enriquecimiento de células GFP+ post-aislamiento. Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

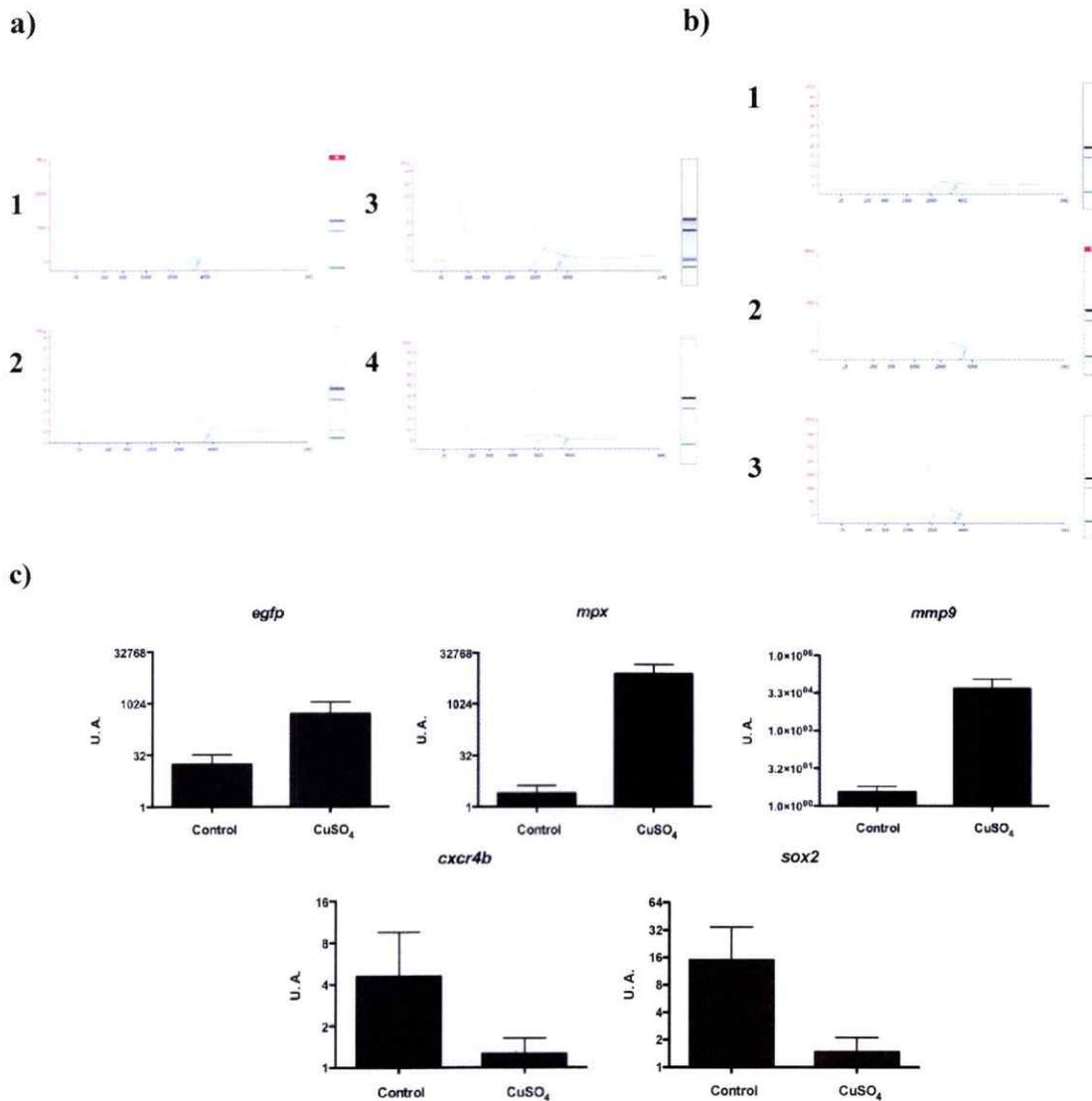


Figura 10. El tratamiento con CuSO₄ en larvas de pez cebra induce modulación transcripcional de neutrófilos activados. Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron incubadas con CuSO₄ 50 μ M por 2 horas. Células GFP⁺ fueron aisladas mediante FACS, y se extrajo su ARN mediante Trizol. **a)** Electroferogramas de las muestras seleccionadas de ARN de alta integridad para las tres réplicas biológicas para el control (muestras 1+2, 3 y 4) y **b)** tratados con CuSO₄ (muestras 1-3) para secuenciación y análisis mediante RNA-seq. **c)** Cuantificación mediante qRT-PCR de los transcritos de *egfp*, *mpx*, *cxcr4b*, *sox2* y *mmp9* en las muestras seleccionadas para homeostasis versus tratamiento con CuSO₄, sugieren modulación transcripcional descrita en la bibliografía para neutrófilos activados.

A partir de cada réplica biológica seleccionada, se aislaron 8,8 ng de ARN y se trataron con un kit de amplificación de ARN total (*WTA2, whole RNA amplification kit*) para evaluar por qRT-PCR la presencia de transcritos específicos relacionados al proceso inflamatorio. Los transcritos de *egfp*, *mpx* y *mmp9* muestran una tendencia a la sobre-representación en la condición de tratamiento con CuSO_4 , mientras que los transcritos de *cxcr4b* y *sox2* presentan la disminución en su representación. Estos resultados sugieren una modulación de la actividad transcripcional en neutrófilos activados por tratamiento con CuSO_4 con respecto al control (**Fig. 10c**).

Posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación de las muestras biológicas de ARN mediante tecnología de alta resolución (*RNA-HiSeq*). El procedimiento y preparación de las muestras fue realizado por el centro de secuenciación del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*NIH Intramural Sequencing Center, NISC*). Para el análisis se consideraron los ARN mensajeros (selección por poli-A), y fragmentos de ~175 pares de bases fueron generados y procesados por ambos extremos (paired-end) mediante el programa *v4 chemistry (2x126)* en un Illumina HiSeq2500 (magnitud de cobertura — ~40M lecturas por muestra). Los datos generados fueron ensamblados utilizando el programa Top Hat y alineado contra el genoma de pez cebra *Zv9* (**Fig. 11a**). Un análisis general de los transcritos presentes en las librerías generadas para neutrófilos en homeostasis y tratamiento, revelaron la expresión de genes relacionados a procesos biológicos de inflamación, inmunidad, metabolismo, apoptosis y tráfico vesicular, entre otros (**Fig. 11b**).

a)

Lectura/Muestra	Control 1	Control 2	Control 3	Tratado 1	Tratado 2	Tratado 3
Replica técnica 1	87.75%	81.65%	81.56%	77.87%	89.41%	51.97%
Replica técnica 2	87.68%	82.02%	81.07%	76.59%	89.34%	48.48%

b)

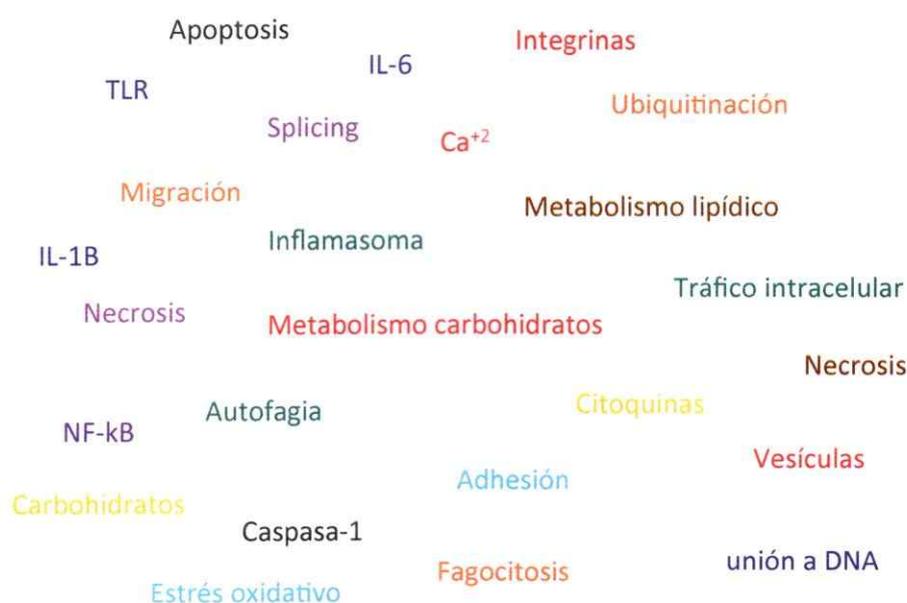
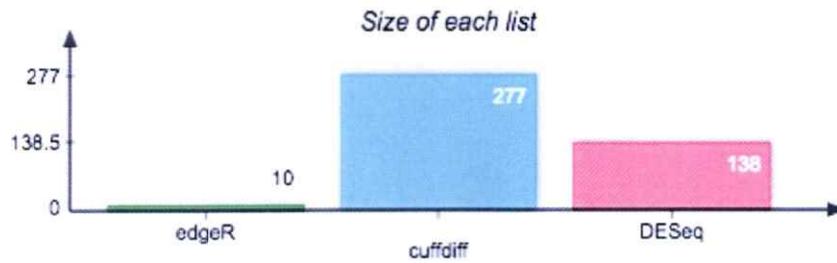


Figura 11. Determinación de los ARN mensajeros de neutrófilos en condiciones de homeostasis y en tratamiento con CuSO₄ mediante RNA-Hiseq. Los resultados de la secuenciación fueron ensamblados utilizando Top Hat y alineados contra el genoma de zebrafish Zv9. **a)** Resultados del porcentaje de alineamiento de las 3 replicas biológicas en homeostasis y tratamiento contra el genoma de zebrafish versión Zv9, evaluado mediante 2 réplicas técnicas. **b)** Análisis de las librerías generadas evidencia la existencia de transcritos de genes relacionados a diversos procesos biológicos.

Para comparar la expresión transcripcional diferencial de neutrófilos en homeostasis versus tratamiento con sulfato de cobre, se contrastaron las librerías generadas mediante tres programas; DESeq, cuffdiff y edgeR, los cuales ocupan distintos criterios para el análisis de expresión diferencial (*Syednasrollah y col., 2015*). Los tres análisis revelan un patrón de expresión con números variables de genes diferencialmente expresados (**Fig. 12a**). Una comparación de los resultados obtenidos entre los tres análisis entre sí, revela genes diferencialmente expresados en los 3 análisis, con genes comunes para al menos dos análisis, y 4 genes apareciendo como diferencialmente expresados bajo los 3 análisis (*itgam*, *URB2*, *mctp1b* y *tpst2*) (**Fig. 12b**). *Itgam* es una integrina de función ampliamente caracterizada en inflamación en mamíferos, mientras que los genes *URB2*, *mctp1b* y *tpst2* no tienen función descrita hasta la fecha.

Un análisis de los genes que son revelados como diferencialmente expresados en neutrófilos en homeostasis versus activados por sulfato de cobre, por ejemplo, mediante el programa EdgeR, revela una lista de genes asociados a procesos de migración, adhesión y muerte celular entre otros, con un 23% de genes con función desconocida o no descrita (**Fig. 13**). Estos resultados sugieren la existencia de un patrón de expresión representativo de genes expresados en neutrófilos de pez cebra en condiciones de homeostasis y activados por tratamiento con CuSO_4 , que serán utilizados posteriormente para la evaluación de su expresión en distintos contextos inflamatorios.

a)



b)

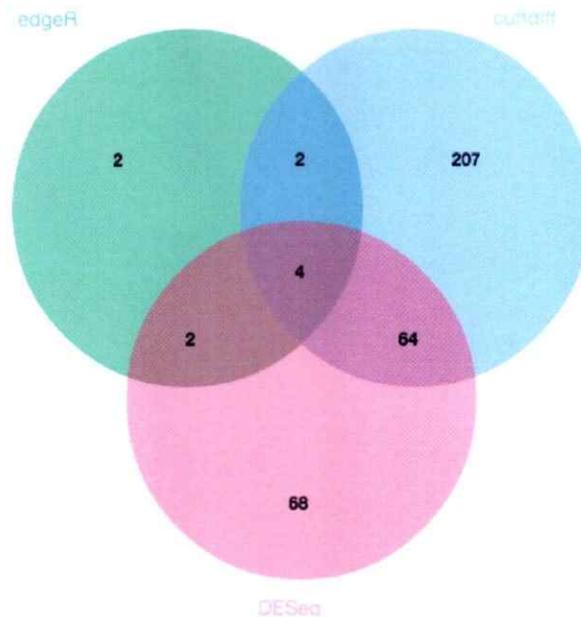


Figura 12. Análisis de expresión diferencial de neutrófilos en homeostasis versus activados por citotoxicidad inducida por tratamiento con CuSO₄. Se secuenciaron los ARN mensajeros de neutrófilos en homeostasis y en tratamiento, se ensamblaron usando TopHat y alineados contra el genoma de zebrafish Zv9. **a)** Análisis de expresión diferencial de las librerías generadas mediante tres algoritmos, edgeR, cuffdiff y DESeq generan distintas listas de genes diferencialmente expresados. El gráfico muestra el número de genes diferencialmente expresados para cada análisis. **b)** Diagrama de Venn generado para identificar genes comunes dentro los tres programas utilizados para el análisis de expresión diferencial.

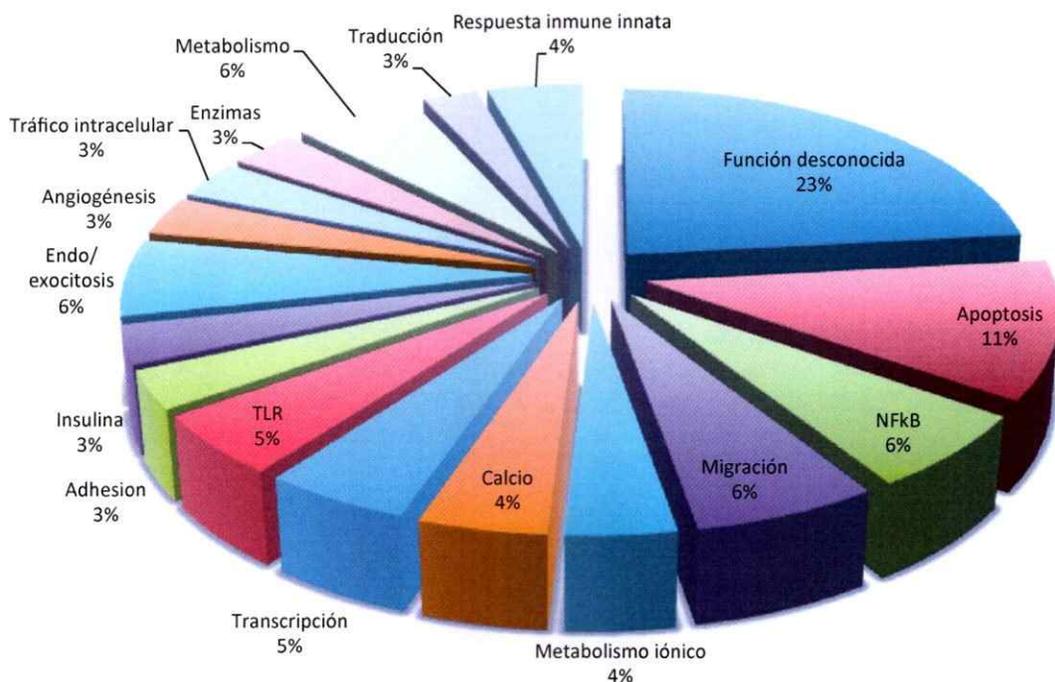


Figura 13. El análisis de expresión diferencial de neutrófilos en condiciones de homeostasis versus tratamiento con CuSO₄ evidencia modulación transcripcional de neutrófilos activados. Los resultados de la secuenciación fueron ensamblados utilizando TopHat y alineados contra el genoma de zebrafish Zv9. El análisis de expresión diferencial se realizó comparando las librerías generadas para las replicas biológicas en homeostasis versus tratamiento mediante el algoritmo DESeq. El gráfico fue diseñado representando la agrupación de términos biológicos funcionales generales que se desprenden a partir del análisis de expresión diferencial de transcritos expresados en homeostasis versus tratamiento con CuSO₄.

5.3 Identificar genes diferencialmente expresados en infección versus lesión.

El identificar los genes que diferencialmente expresados por neutrófilos activados, ya sea por infección o lesión, es importante para descubrir y entender las diferencias de las funciones ejecutadas por esta células en cada contexto inflamatorio, sino que también podría ayudar a encontrar nuevos blancos terapéuticos que permitan promover la remoción de neutrófilos, por ejemplo, en patologías de inflamación crónica, sin modificar su capacidad de respuesta frente a patógenos invasores durante una infección.

Con el objetivo de identificar genes responsables de las diferencias encontradas en muerte celular de neutrófilos en inflamación por infección versus lesión, se realizó un estudio bibliográfico en inmunidad en mamíferos para seleccionar genes candidatos para el análisis. Olfactomedin-4 (Olfm4) fue escogido como relevante para evaluar su expresión en inflamación por infección versus lesión. La proteína es constitutivamente expresada en la médula ósea, tracto gastrointestinal, próstata y particularmente en neutrófilos (*Liu y col., 2010; Clemmensen y col., 2012*). De manera interesante, ha sido asociada a la regulación de la función bactericida de neutrófilos, y de la apoptosis en células mieloides, sugiriendo participación del proceso resolutorio de inflamación por infección (*Liu y col., 2010; Liu y col., 2012*). Por otro lado, su expresión ectópica ha sido vinculada a cánceres de diversa etiología (*Guette y col., 2015*). Estos antecedentes experimentales sugieren que una correcta expresión de OLFM4 es fundamental para la mantención de la homeostasis del cuerpo.

Para evaluar la expresión de OLFM4 en distintos contextos inflamatorios, se buscó el ortólogo de mamífero en pez cebra. Para esto se realizó un análisis filogenético de secuencias de proteína para Olfm4 en diversas especies. Los resultados del análisis establecen que la proteína de pez cebra identificada en la base de datos *Uniprot* como F1QXE0, es la que se encuentra evolutivamente más emparentada con la proteína de Olfm4 en mamíferos. Un análisis de homología para el dominio funcional de Olfm4 en humanos y pez cebra establece un 32,4% de identidad entre ellas (**Fig. 14 y 15**). Estos resultados sugieren que la función de Olfm4 se ha mantenido conservada.

<i>Humano</i>	1	SCGHGGVVNISKPSVVQLNWR-GFSYLYGAWGRDYSPOHPNKGLYWVA-PLNTDGRLE	58
		SC H G++ I KP V QLN ++ YG WG+D P ++ +YW + +T +	
<i>Pez cebra</i>	1	SCKHAGILKIGKPVVSQNLNADLNGAFKYGGWGD SKPLSGSESMYWYSGSSDTLVSKISQ	60
<i>Humano</i>	59	YRLYNL-----DLLLLYINAR-ELRITYGQSGTAVYNNMYVNMVNTGNIARVNLTT	111
		Y Y TL LLY++ + + R G G+ V NN+Y + +A+ N+T+	
<i>Pez cebra</i>	61	YSAYYTLITRQSFKAHLLYVDRQYDWR---GAGNNYVVRENNLYYQYRSPFAMAKFNMTS	117
<i>Humano</i>	112	NTIAVTQTLPNAAAYNNRFSYANVAWQDIDFAVDENGLWVIYSTEASTGNMVISKLNDDTL	171
		+ T+ +P A+ +FSY A Q++DEA DE+GLWV Y+T S G +V+ K+N+ +	
<i>Pez cebra</i>	118	AKVE-TKVVPKAS--TQFSYHYSANQNLDFAADESGLWVTYATAESNGTLVLGKINEQSF	174
<i>Humano</i>	172	QVLNTWYTKQYKPSASNAFMVCGVLYATRMTNTRTEEIFYFYDNTGKEGKLDIVMHKMQ	231
		V W T +K S +NAFM+CGVLYATR+++T TEEIFY YDT +E + I K Q	
<i>Pez cebra</i>	175	TVEEVWQTSIFKQSVTNAFMICGVLYATRSDVTHTEEIFYTYDTTKNQESHVSIRFEKFO	234
<i>Humano</i>	232	EKVQSINYNPFDQKLYVYNDGYLLNYDL	259
		+ ++YNP DQKLY++N+GY + Y+L	
<i>Pez cebra</i>	235	DFYVYLDYNPADQKLYMFNNGYVYTYNL	262

Figura 15. El análisis de homología de secuencias del dominio funcional de OLFM4 de humano y pez cebra determinó un 39% de identidad entre ellas. Análisis mediante el programa de alineamiento de secuencias de proteína BLASTP (NCBI) entre el dominio funcional de OLFM4 en humanos (Q6UX06) y en pez cebra (F1QXE0) determinó un porcentaje de identidad de un 39% entre ellas. Posiciones con un signo (+) corresponden a aminoácidos homólogos y posiciones sin letras corresponden a aminoácidos distintos.

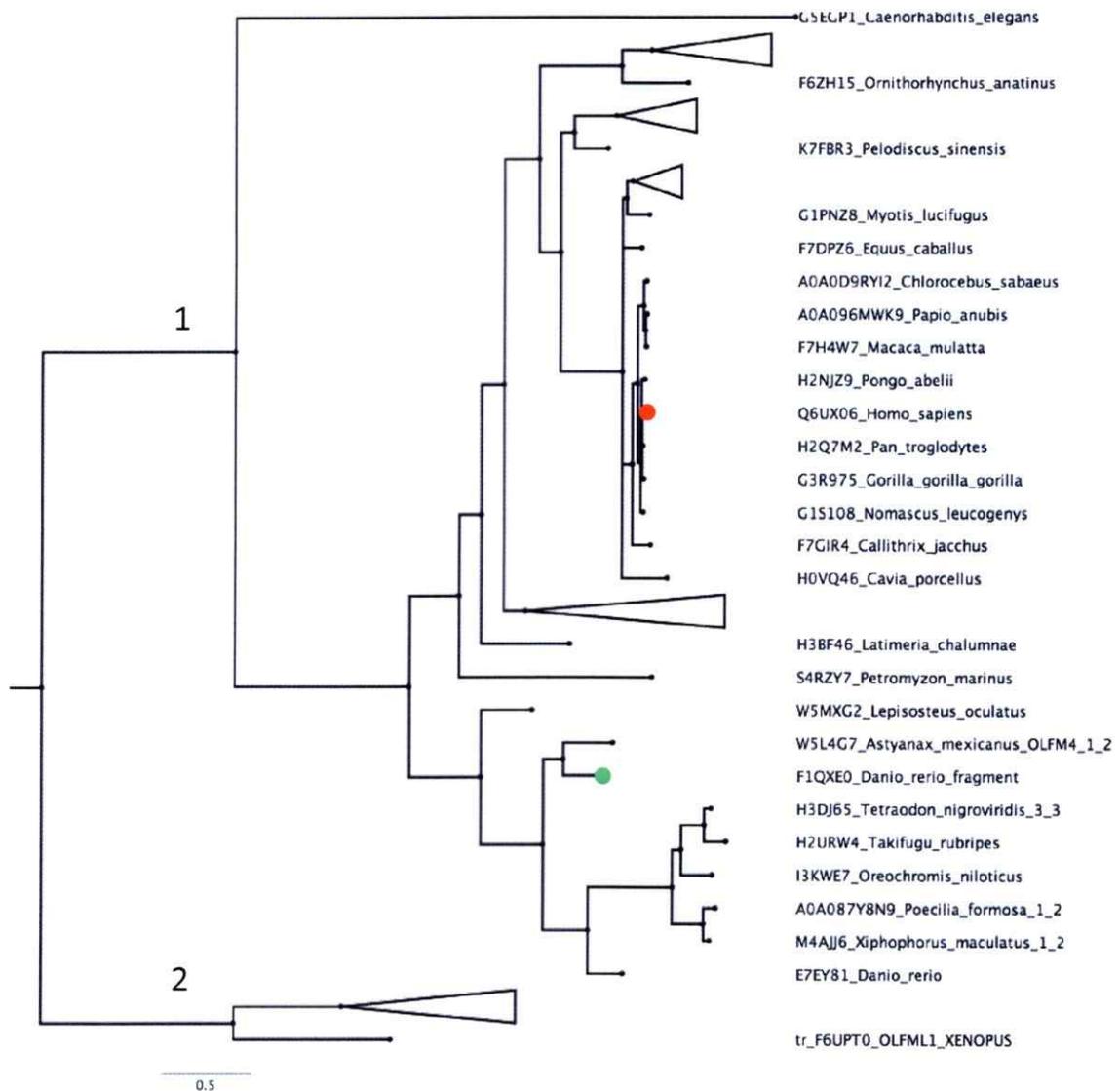
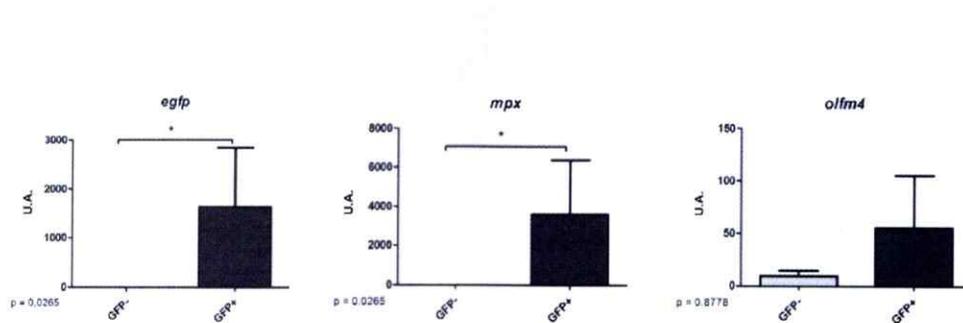


Figura 14. Identificación del ortólogo de OLFM4 en pez cebra. a) Árbol filogenético generado por inferencia bayesiana de las secuencias aminoacídicas de la familia OFLM4 (Rama 1). Las secuencias de OLFM1 de humano, xenopus, ratón fueron utilizadas como grupo externo enraizante (Rama 2). El árbol muestra 2 variantes de OFLM4 para *Danio rerio*, de ellas la variante con código Uniprot F1QXE0 (círculo verde) se encuentra evolutivamente más emparentada con las secuencias de vertebrados superiores incluyendo OLFM4 de *Homo sapiens* (círculo rojo).

Para evaluar si el gen OLFM4 es expresado en neutrófilos de pez cebra, se aislaron células GFP+/GFP- a partir larvas *tg(mpx:GFP)* mediante citometría de flujo con separador celular (FACS), y se evaluó su expresión mediante qRT-PCR. El análisis evidencia una sobre-representación de *Olfm4* en células GFP+ (**Fig. 16a**).

a)



b)

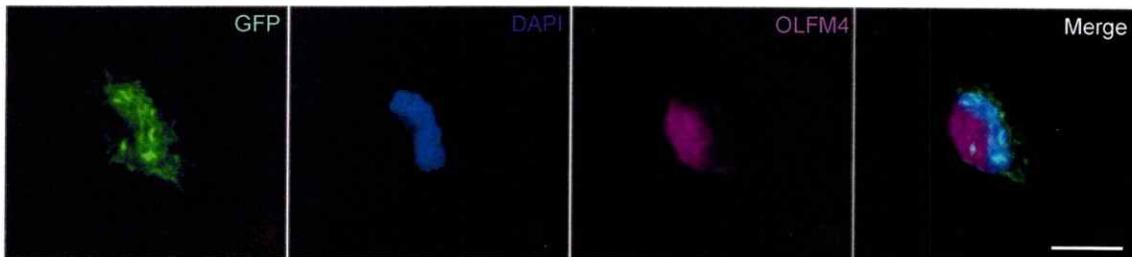


Figura 16. OLFM4 es transcrito y expresado en neutrófilos en pez cebra. Células GFP+ fueron aisladas mediante FACS a partir de larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf y fueron procesadas con Trizol para la obtención del ARN o procesadas por inmunocitoquímica. **a)** Cuantificación mediante qRT-PCR de los transcritos de *egfp*, *mpx* y *olfm4* en las poblaciones GFP+ versus GFP- evidencian una sobre-representación de *olfm4* en células GFP+. Test estadístico Mann Whitney, N=3. **b)** Inmunocitoquímica contra Olfm4 en cultivo primario de células de riñón de peces *tg(mpx:GFP)* adultos evidencia reactividad del anticuerpo contra la proteína humana en células GFP+ de pez cebra. Barra de escala = 5 μ m.

Para evaluar si se puede detectar Olfm4 a nivel de proteína en neutrófilos, se preparó un cultivo primario a partir de células de riñón de peces *tg(mpx:GFP)* adultos. La evaluación mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo contra la proteína humana evidencia la detección de Olfm4 en células GFP+ de pez cebra (**Fig. 16b**). Estos resultados en su conjunto sugieren que neutrófilos de pez cebra expresan OLFM4 a nivel de transcrito y proteína.

Considerando que: nuestros resultados previos establecieron que la muerte de neutrófilos está asociada a inflamación por infección, que OLFM4 es un regulador del proceso apoptótico y es expresado en neutrófilos, se evaluó si OLFM4 podría ser un gen diferencialmente expresado en neutrófilos en una infección versus una lesión. Para esto se evaluó la expresión de su transcrito y la proteína en inflamación inducida por infección con *S. Typhimurium*, e inflamación por lesión inducida por tratamiento con CuSO₄. Para esto larvas *tg(mpx:GFP)* fueron infectadas en la vesícula ótica con 100 U.F.C., o tratadas con CuSO₄ 50 µM por 2 horas. Los análisis evidencian una sobre-representación de OLFM4 tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína en infección con *S. Typhimurium*, y sin cambio significativo en la condición de tratamiento con sulfato de cobre (**Fig. 17**). Estos resultados sugieren que OLFM4 tiene una función específica en neutrófilos en inflamación inducida por infección. Evaluar la contribución de su pérdida o ganancia de función durante el proceso inflamatorio infeccioso ayudaría a determinar su función.

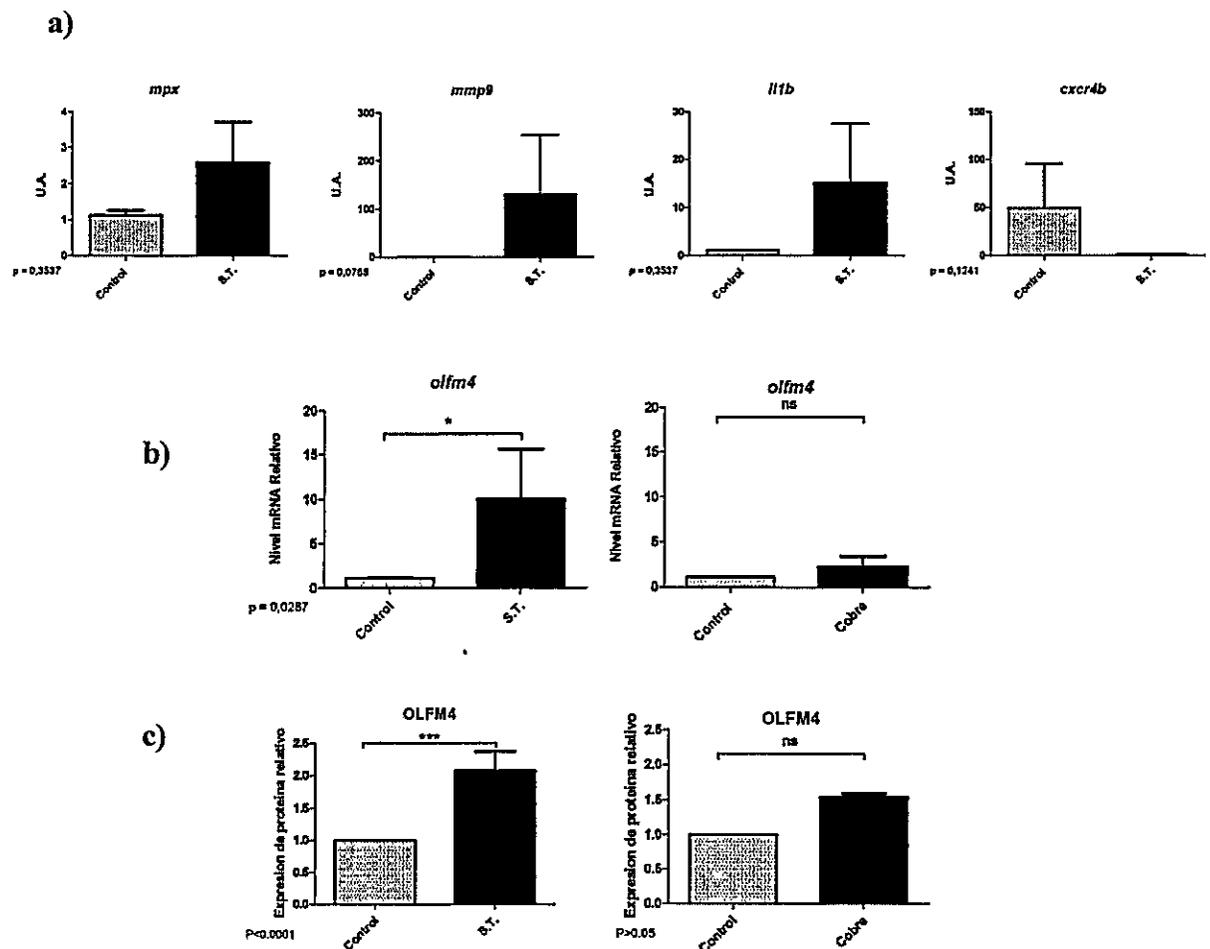


Figura 17. *Olfm4* es diferencialmente expresado en neutrófilos en inflamación inducida por infección versus lesión. a) Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron infectadas con *S. Typhimurium*, y posteriormente células GFP+ fueron separadas mediante FACS para extraer el ARN total mediante tratamiento con Trizol. Cuantificación por qRT-PCR de los transcritos de *mpx*, *mmp9*, *il1b* y *cxcr4b* en células GFP+ sugieren una modulación de la actividad transcripcional de neutrófilos bajo estas condiciones experimentales. b) Larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron infectadas con *S. Typhimurium* o incubadas con CuSO_4 100 μM por 2 horas, y células GFP+ fueron separadas mediante FACS para extraer el ARN total mediante tratamiento con Trizol. Evaluación de *Olfm4* evidencia aumento transcriptional significativo únicamente en inflamación por infección. c) Aumento en la traducción de *Olfm4* analizado por western blot sugieren un aumento de la traducción de *Olfm4* únicamente en la condición de infección. Análisis estadísticos realizados mediante el test Mann Whitney.

Estos resultados de OLMF4 se suman a la lista de genes descritos como diferencialmente expresados en neutrófilos en contexto de lesión versus infección. Considerando que neutrófilos poseen una carga intracelular altamente tóxica no sólo para patógenos sino también para tejidos del hospedero, la permanencia excesiva de éstos en tejidos inflamados podría conducir a la generación de inflamación crónica. Por estos motivos, es relevante evaluar la contribución de la pérdida de función de genes importantes para la función de neutrófilos durante distintos contextos inflamatorios.

La vía de señalización CXCL12/CXCR4 ha sido descrita como fundamental para el proceso de regulación de la homeostasis de neutrófilos en mamíferos. Neutrófilos expresan el receptor CXCR4 y migran hacia tejidos expresando el ligando CXCL12. La vía de señalización está asociada al desarrollo de la hematopoyesis definitiva, y en la regulación de la liberación de neutrófilos hacia el flujo sanguíneo desde la médula ósea (*Link, 2005*). La importancia de este eje de señalización en la regulación de la función de neutrófilos se evidencia en donde una mutación con ganancia de función del receptor CXCR4 genera el denominado síndrome de WHIM (*warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis*), el cual se caracteriza por generar neutropenia al inducir la inmovilización de neutrófilos desde la médula ósea imposibilitando sus funciones (*Dotta y col., 2011*).

La contribución de la vía de señalización en la homeostasis de neutrófilos ha sido ampliamente descrita. Sin embargo, su contribución durante el proceso inflamatorio ha sido escasamente documentado. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio

han demostrado que peces con una pérdida de función del receptor de CXCR4b (*cxcr4b*^{t26035/t26035}) evidencian un mayor número de neutrófilos circulantes, y a la vez, evidencian un mayor número de neutrófilos reclutados hacia un daño por transección de la aleta caudal. Estos resultados demuestran que la vía de señalización CXCR4/CXCL12 es fundamental para regular la infiltración de neutrófilos a tejidos dañados. Considerando estos antecedentes, se determinó evaluar la contribución de la pérdida de función del receptor CXCR4b en neutrófilos en un contexto de inflamación por infección. Para esto, larvas mutantes *cxcr4b*^{t26035/t26035} fueron inyectadas en la vesícula óptica con 100 U.F.C. de *S. Typhimurium*, y se cuantificó cada 3 horas el reclutamiento de neutrófilos desde el inicio de la infiltración hasta la resolución. El análisis evidencia que la pérdida de función de CXCR4b en larvas de pez cebra no altera el proceso de inflamación neutrofílica inducida por infección con *S. Typhimurium* (Fig. 18). Estos resultados sugieren que la vía de señalización CXCR4b/CXCL12 es fundamental para la regulación de la infiltración de neutrófilos en lesión tisular, y no en infección.

Estos resultados demuestran la importancia de una correcta expresión de genes involucrados en la regulación de la homeostasis en neutrófilos durante inflamación. Para evaluar la contribución de la pérdida de función de otros genes expresados en neutrófilos en busca de reguladores maestros en su reclutamiento tanto como en su remoción, los genes OLFM4, ICAM-1, CD44, e ITGAM fueron escogidos como relevantes para el análisis, y se diseñaron vectores para generar animales mutantes de estos genes mediante tecnologías CRISPR/Cas9.

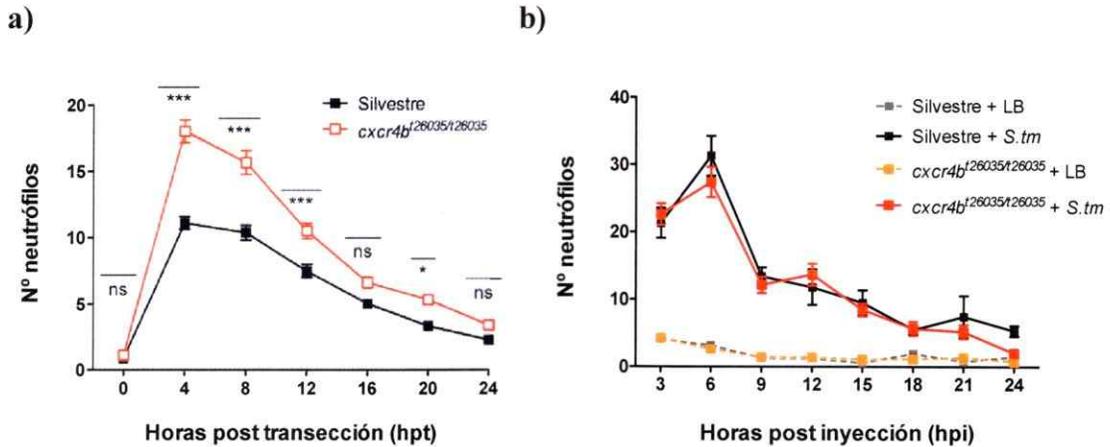


Figura 18. El eje de señalización SDF1/CXCR4b limita el reclutamiento de neutrófilos en inflamación inducida por lesión, y no por infección. Larvas mutantes para CXCR4b fueron lesionadas por transección de la aleta caudal o infección ótica. **a)** Cuantificación de neutrófilos detectados mediante histoquímica (*Sudan Black*) en inflamación por transección de la aleta caudal en larvas mutantes y larvas control (silvestres) evidencian mayor reclutamiento en la condición mutante. **b)** Cuantificación de neutrófilos detectados mediante histoquímica (*Sudan Black*) en inyección con 100 U.F.C. de *S. Thyfimurium* en la vesícula ótica en mutantes de CXCR4b no exhibe diferencias respecto del control (silvestre).

Para la generación de los mutantes, los ortólogos de los genes seleccionados por literatura fueron identificados en pez cebra. Para cada gen, dos exones (el primero y uno intermedio) fueron escogidos como regiones del ADN codificante para ser mutados. Las secuencias de los exones seleccionados fueron evaluadas mediante herramientas de bioinformática para seleccionar regiones de 20 pares de bases dentro de los exones que tuviesen una mínima probabilidad de generar mutaciones inespecíficas por homología de secuencia con el resto del genoma de pez cebra. Las secuencias seleccionadas finalmente fueron utilizadas para el diseño de los vectores guía *in vitro* utilizados en el sistema CRISPR/Cas9. Se ejemplifica el análisis realizado para OLFM4 (**Fig. 19**).

a)

Primer exón Olfm4 (97pb)

TCTGAGGAGAAGCTCATATTGTGGACTCATGATGATGATGATGAAGATCCTCCTGCTGTCCGT
CTTCATGCTCGCGGCTCCGGCTCAGGCCTGGCTG

Resultado del análisis de secuencia del primer exon:

- crispr.mit.edu/job/2855084844544285

Tercer exón (213 pb)

CTCAGCAGCCTGAAGGTTGAGCTGGTGGTTCTCCTGGGGAGTCTCTCCAACCTGACGGCCCC
GCTGGAGGTTCTGGAGAGCGGACCGGACAAATACATCAAGCTGGAGTTCGAGCTGCTGCGG
ATGGAGCTGAGGGAGTTCGAGGCTCTGGTCACGCAGATCAAACATCACTGAACTCCTCCTCC
AGCGCCTTCGACAGTCTCTACGCTGAG

Resultado del análisis de secuencia del tercer exon:

- crispr.mit.edu/job/6424665701062822

b)

OLF4 t1 (primer exón)

taatacgactcactataggGCTGTCCGTCTTCATGCTCGgttttagagctagaaatagc

OLF4 t2 (tercer exón)

taatacgactcactatagGGAGGTTCTGGAGAGCGGACgttttagagctagaaatagc

Figura 19. Uso de tecnología CRISPR/Cas9 para generar mutantes de Olfm4. La secuencia de ADN de Olfm4 presente en la base de datos de Ensembl (ENSDARG00000041960) fue utilizada para obtener la secuencia del a) primer y tercer exón, los cuales fueron elegidos para ser mutados. El análisis de las secuencias a mutar mediante CRISPR/Cas9 se realizó mediante el software CRISPR design (<http://crispr.mit.edu>). b) Las secuencias seleccionadas fueron utilizadas para el diseño de los constructos guía utilizados para inducir las mutaciones. Las regiones coloreadas (roja y amarilla) representan la secuencias de 20 pares e bases elegidas por el software como de alta especificidad y baja probabilidad de generar mutaciones adicionales inespecíficas (*off-targets*) en el resto del genoma de zebrafish Zv9.

5.4 Establecer xenotransplantes para evaluar la función de neutrófilo de mamífero en larvas de pez cebra.

Considerando que el modelo de pez cebra se ha establecido exitosamente para evaluar hematopoyesis e inflamación con resultados extrapolables a la especie humana, nos propusimos implementar una metodología para generar peces cebra quiméricos con células de médula ósea de mamífero, y así poder utilizar las ventajas que ofrece el modelo de pez cebra para visualizar y estudiar directamente procesos asociados a la dinámica de células hematopoiéticas e inmunes de mamífero *in vivo* sin mayores intervenciones.

Con este objetivo, establecimos un protocolo para aislar células de médula ósea de ratón y transplantarlas en embriones de pez cebra. El protocolo consiste en sacrificar un ratón para posteriormente remover ambas extremidades traseras. Las extremidades son removidas del tejido muscular para aislar los fémures y tibias. Los huesos son machacados con un mortero y crisol en una solución salina para recoger y mantener las células de la médula ósea. La suspensión celular es filtrada a través de mallas de nylon, y es posteriormente incubada con un cocktail de anticuerpos para mediante selección negativa, remover células diferenciadas y generar una suspensión celular enriquecida en células hematopoiéticas madre y progenitoras. Las células son marcadas con una sonda vital fluorescente, y posteriormente transplantadas directamente en el blastodermo de embriones de pez cebra en estadio de blástula (Fig. 20). Para favorecer la visualización y monitoreo de las células murinas dentro de los embriones en etapas posteriores, los experimentos fueron llevados a cabo en animales mutantes de células pigmentadas *nacre^{-/-}* (Lister y col., 1999).

Con la metodología desarrollada, una persona individual puede transplantar hasta 700 embriones en 3 horas, generando alrededor de 500 embriones viables al día siguiente. A los 3 dpf menos del 5% de los embriones transplantados evidenciaron anomalías morfológicas (**Fig. 21**).

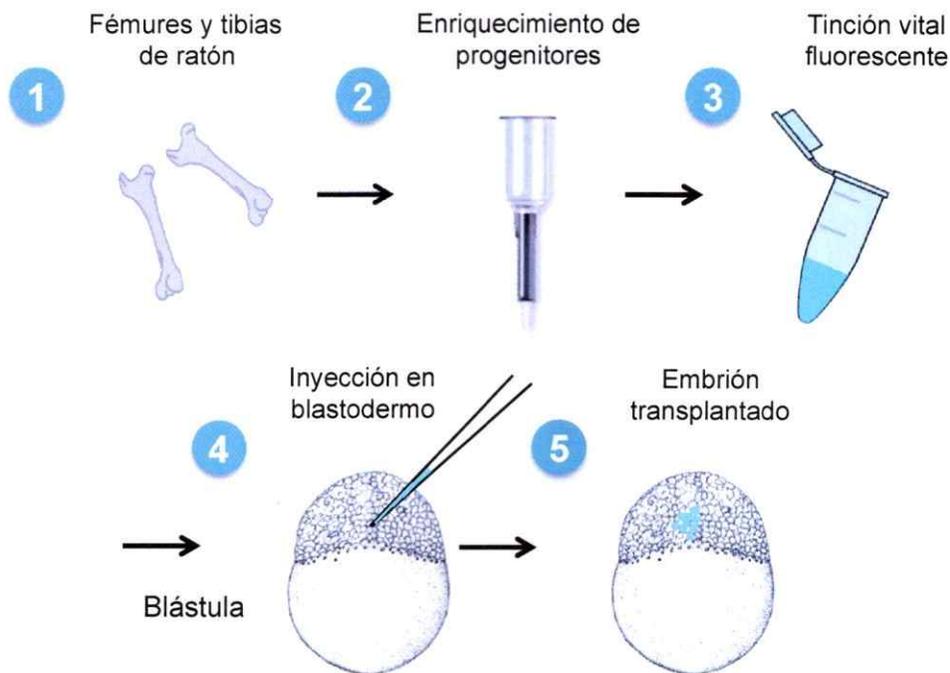


Figura 20. Metodología establecida para transplantar células murinas de médula ósea en embriones de pez cebra. Fémures y tibias de ratón fueron extraídos post-mortem (1), y se preparó una suspensión de células de médula ósea enriquecidas en células madre y progenitoras mediante selección negativa (2). Las células fueron marcadas con una sonda fluorescente de emisión a 450 nm (emisión de color azul) (3), y posteriormente inyectadas en el blastodermo de embriones en estadio de blástula (4).

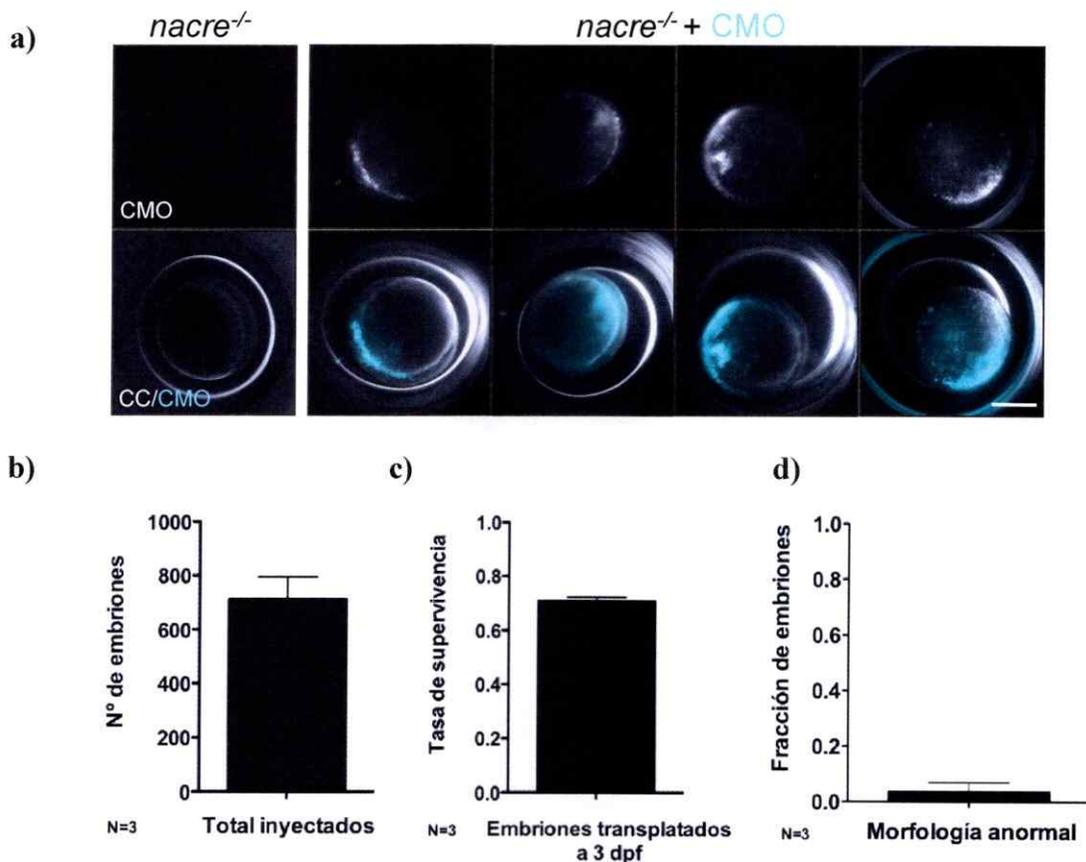


Figura 21. Cuantificación de parámetros de la metodología establecida para transplantar células murinas de médula ósea en embriones de pez cebra. Fémures y tibias de ratón fueron extraídas post-mortem, y se preparó una suspensión de células de médula ósea enriquecidas en células madre y progenitoras mediante selección negativa. Las células fueron marcadas con una sonda fluorescente de emisión a 450 nm (emisión de color azul), y posteriormente inyectadas en el blastodermo de embriones en estadio de blástula. **a)** Imágenes de microscopía de fluorescencia pseudo-coloreadas representativas de embriones post-transplante. Se cuantificó **b)** el número máximo de embriones que pueden ser trasplantados mediante la estrategia en 3 horas, y **c)** la tasa de supervivencia y **d)** de morfología anormal evaluado a 3 dpf CMO: células murinas de médula ósea, CC: campo claro. Barra de escala = 250 μ m.

La metodología desarrollada genera múltiples animales transplantados con cantidades variables de células murinas (**Fig. 22**).

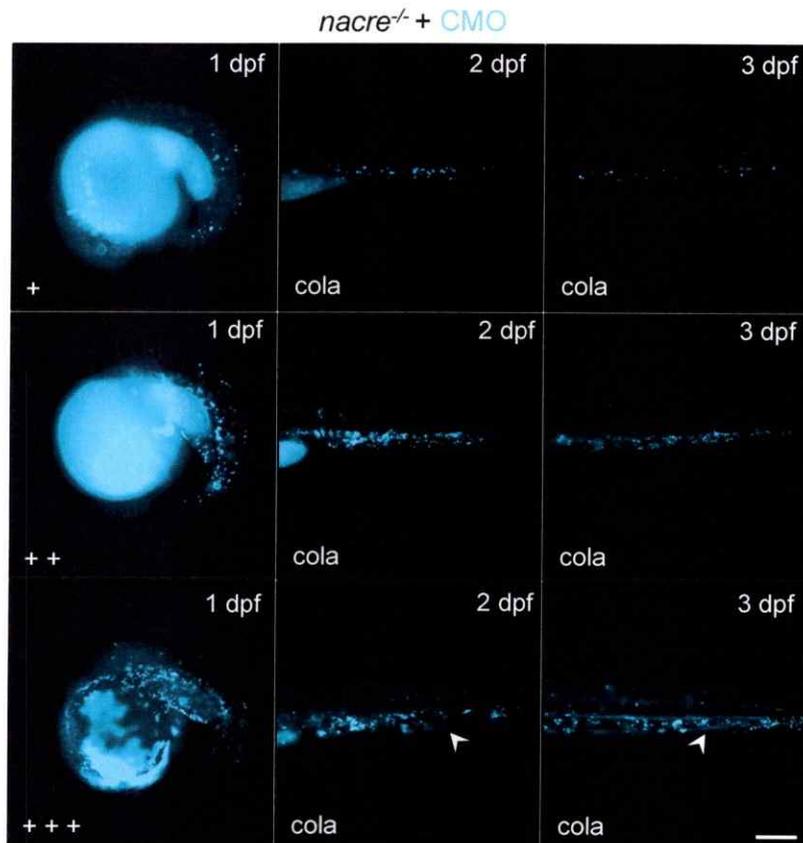


Figura 22. El trasplante en el blastodermo de embriones de pez cebra genera animales quiméricos con distintas cantidades de células murinas transplantadas. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) fueron transplantados con células murinas de médula ósea y visualizados 1, 2 y 3 dpf. Imágenes de microscopía pseudo-coloreadas representativas de embriones en estadio de 1 (paneles izquierdos), 2 (paneles centrales) y 3 (paneles derechos) dpf con un menor (+) o mayor (+++) número de células transplantadas. Cabeza de flechas señalan embriones con células en circulación. CMO: células murinas de médula ósea. Barra de escala = 200 μ m.

La visualización de los embriones transplantados a lo largo del desarrollo evidencia a las células murinas localizándose a 1 d.p.f, alrededor del ojo en el cuerpo anterior, y, probablemente, dentro de la masa celular intermedia en el cuerpo posterior (**Fig. 23**).

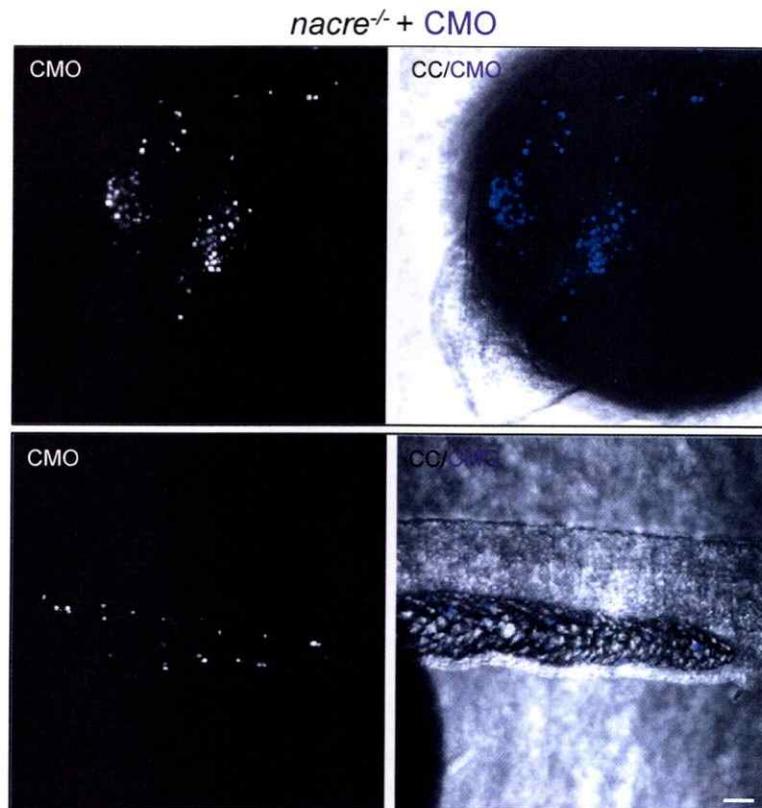


Figura 23. Distribución de las células murinas en embriones de pez cebra transplantados de 1 día post fertilización. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos *nacre*^{-/-} fueron transplantados con células murinas de médula ósea y visualizados 1 dpf. Imágenes de microscopía confocal con proyecciones de z stack pseudo-coloreadas representativas de embriones en estadio de 1 dpf, evidenciando células murinas distribuidas alrededor de los ojos en el cuerpo anterior (panel superior), y dentro de la masa celular intermedia en el cuerpo medio (panel inferior) de embriones transplantados. CMO: células murinas de médula ósea. Barra de escala = 50 μ m.

Para estudiar la dinámica de interacción de las células murinas con el tejido hematopoyético primitivo caudal, y el tejido endothelial vascular del pez a lo largo de la embriogénesis, se llevaron a cabo transplantes en peces transgénicos reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* (Huang y col., 2005). Una cuantificación a los 2 dpf determinó que un 80% de los embriones transplantados presentaban células murinas residentes en la islote sanguíneo posterior (tejido hematopoyético primitivo caudal en desarrollo). La cuantificación a los 3 dpf, sin embargo, determinó que un 90% de los animales transplantados presentaban células en el tejido hematopoyético caudal (Fig. 24). Estos resultados sugieren que células murinas activamente detectan señales que las hacen migrar y ser retenidas en el tejido hematopoyético caudal en desarrollo en larvas de pez cebra.

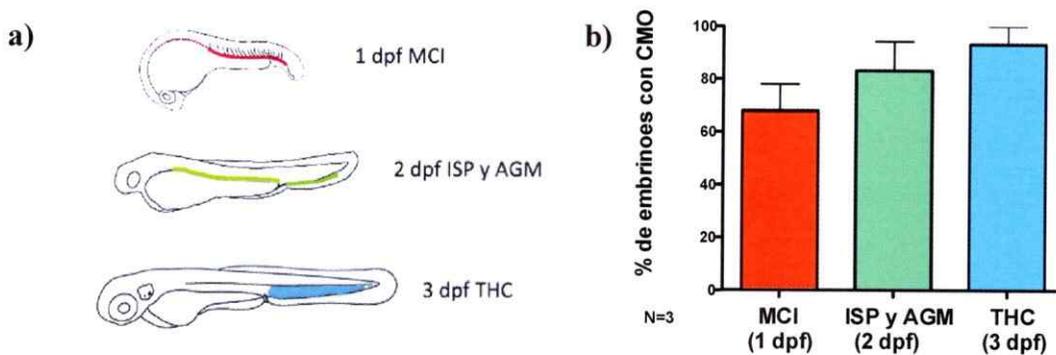


Figura 24. Células murinas de médula ósea responden activamente a señales emanadas del tejido hematopoyético caudal de larvas de pez cebra. Embriones de pez cebra fueron transplantados con células murinas de médula ósea y visualizados 1, 2 y 3 dpf. **a)** Diagrama mostrando los tejidos señalados en el cuerpo de los embriones a 1, 2 y 3 dpf. **b)** Cuantificación del número de embriones que presentaban célula murinas en los tejidos señalados a lo largo del desarrollo evidencia un incremento en el número de animales con células residentes en el tejido hematopoyético en desarrollo. CMO: células murinas de médula ósea; MCI: masa celular intermedia; ISP: islote sanguíneo posterior; AGM: aorta-gonadal-mesonefros; THC: tejido hematopoyético caudal. *Imágenes adaptadas de Rombout y cols., 2005.*

El número de células que logran ser incorporadas al cuerpo de peces cebras con esta metodología es cuantioso. Para descartar que células murinas pudiesen estar fusionándose con células del pez posterior al trasplante, o que exista una transferencia de la sonda fluorescente hacia células del pez, se aislaron células de médula ósea de un ratón transgénico fluorescente verde (*ubi-GFP*), se marcaron con la sonda fluorescente azul, y se transplantaron en peces transgénicos fluorescentes rojos *tg(ubi:mcherry)* (Ellet y col., 2011). Análisis por microscopía y citometría de flujo establecen que eventos de fusión son escasos, y no existe prácticamente transferencia de la marca fluorescente a células del pez (**Fig. 25**).

De manera interesante, a los 3 dpf, algunos embriones transplantados evidencian células murinas dentro de los conductos pronéfricos y lóbulos tímicos, sugiriendo que ciertas células murinas son capaces de recapitular la ruta de migración de células madre y progenitoras para dar origen a la hematopoyesis definitiva, que comienza a los 3 d.p.f en el riñón y timo en larvas de pez cebra (Paik y Zon, 2010) (**Fig. 26**).

Posteriormente, se procedió a analizar la población de células murinas residentes en el tejido hematopoyético caudal en larvas de 3 dpf. Análisis realizados por citometría de flujo y microscopía confocal permitieron comparar morfología y tamaño celular entre células murinas y células endógenas. Las células murinas de médula ósea son levemente más grandes que las células de pez, y presentan morfología similar que las células endógenas del tejido hematopoyético caudal (**Fig. 27**).



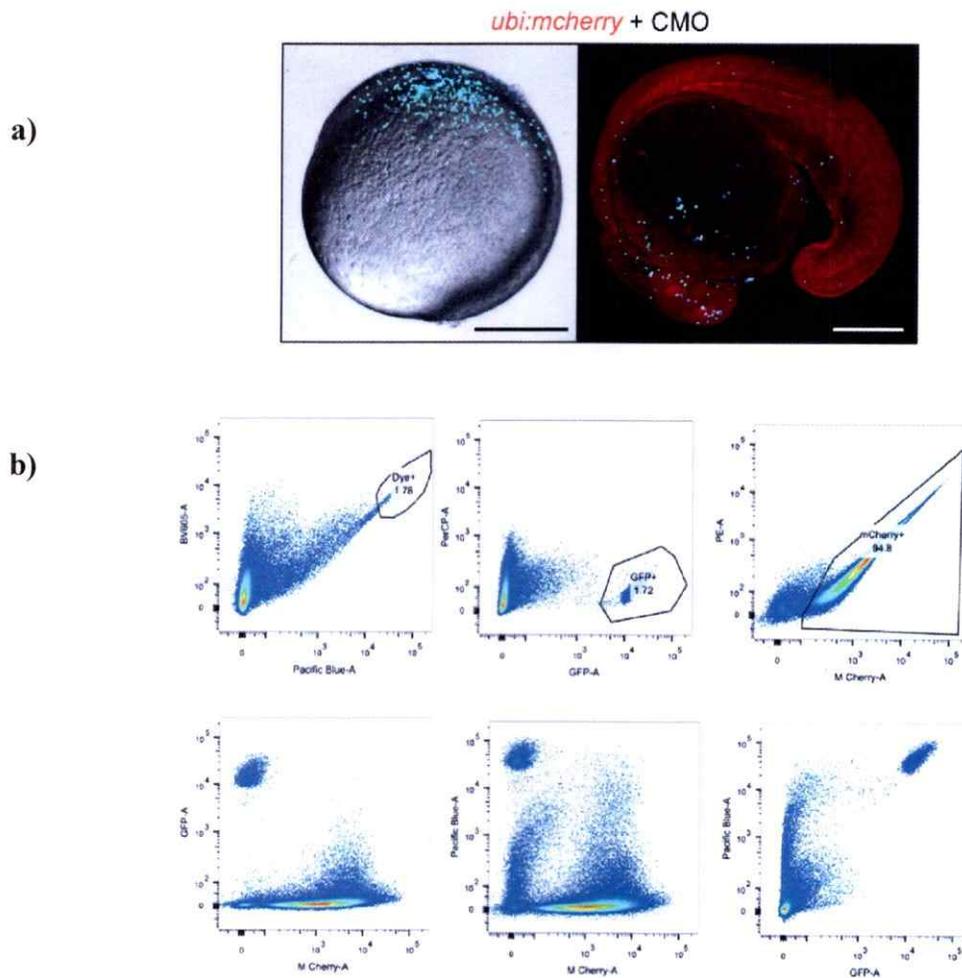


Figura 25. Células murinas de médula ósea no evidencian eventos de fusión, ni transferencia de tinción a células endógenas. Embriones de pez cebra transgénicos rojos *tg(ubi:mcherry)* fueron transplantados con células murinas de médula ósea transgénicas verdes ubi-GFP y marcadas con tinción fluorescente azul. **a)** Imágenes confocales de un embrión transplantado en estadio de gástrula (panel izquierdo) y 24 h.p.f (panel derecho) no evidencian células azules, verdes y rojas (emisión blanca). **b)** Se seleccionaron 12 larvas transplantadas a 48 h.p.f., y se preparó una suspensión celular de larvas completas que fueron analizadas mediante citometría de flujo. Gráficos representativos del análisis demuestran que prácticamente todas los eventos verdes son azules, evidenciando que la tinción fluorescente marca todas las células transplantadas. El análisis también muestra que la mayoría de los eventos azules son verdes, sugiriendo pocas células muertas perdiendo expresión GFP, y algunos eventos azules son también rojos, sugiriendo que células muertas son eliminadas por células endógenas. Finalmente, pocos eventos aparecen como rojos, verdes y azules sugiriendo escasos eventos de fusión.

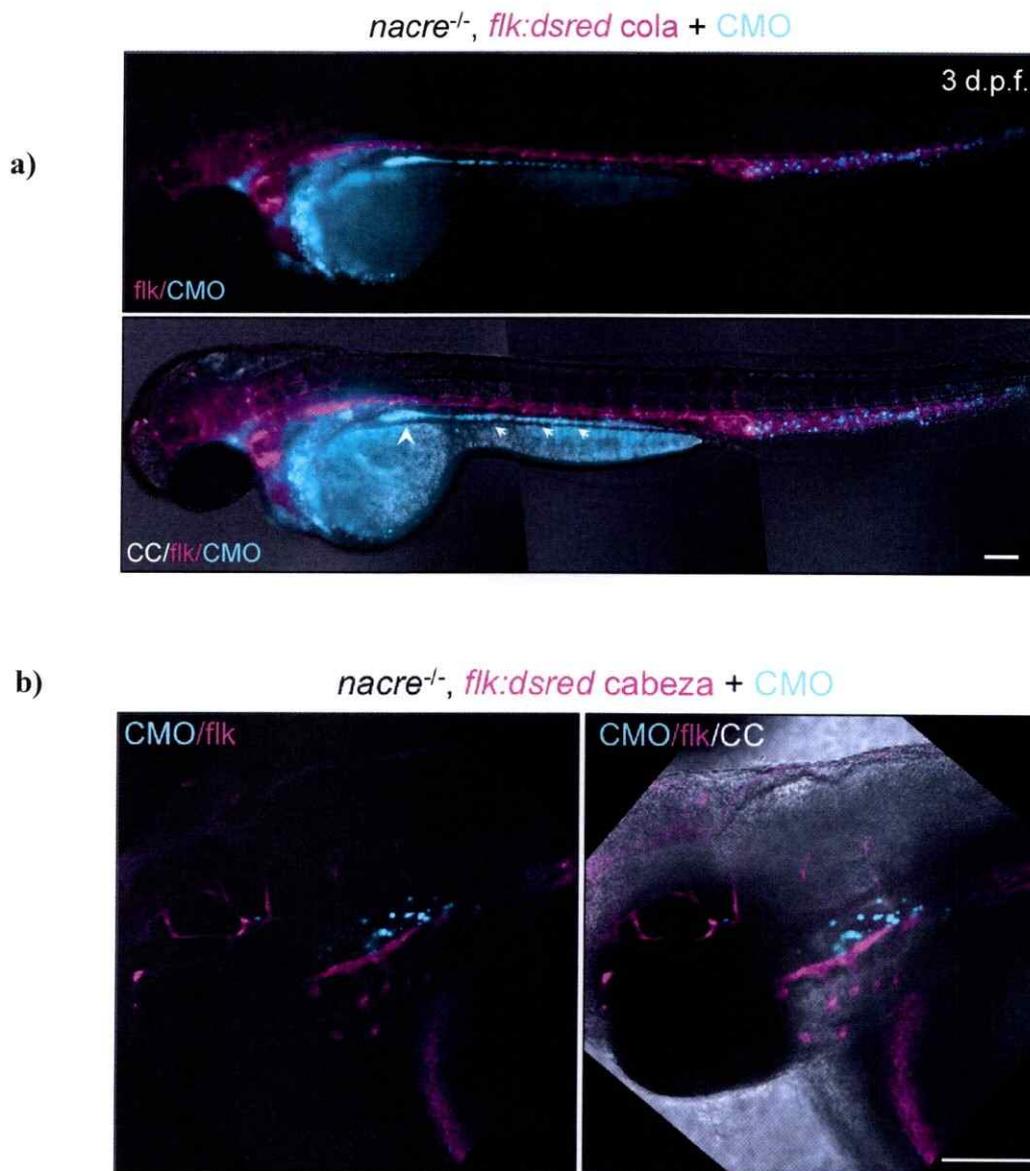
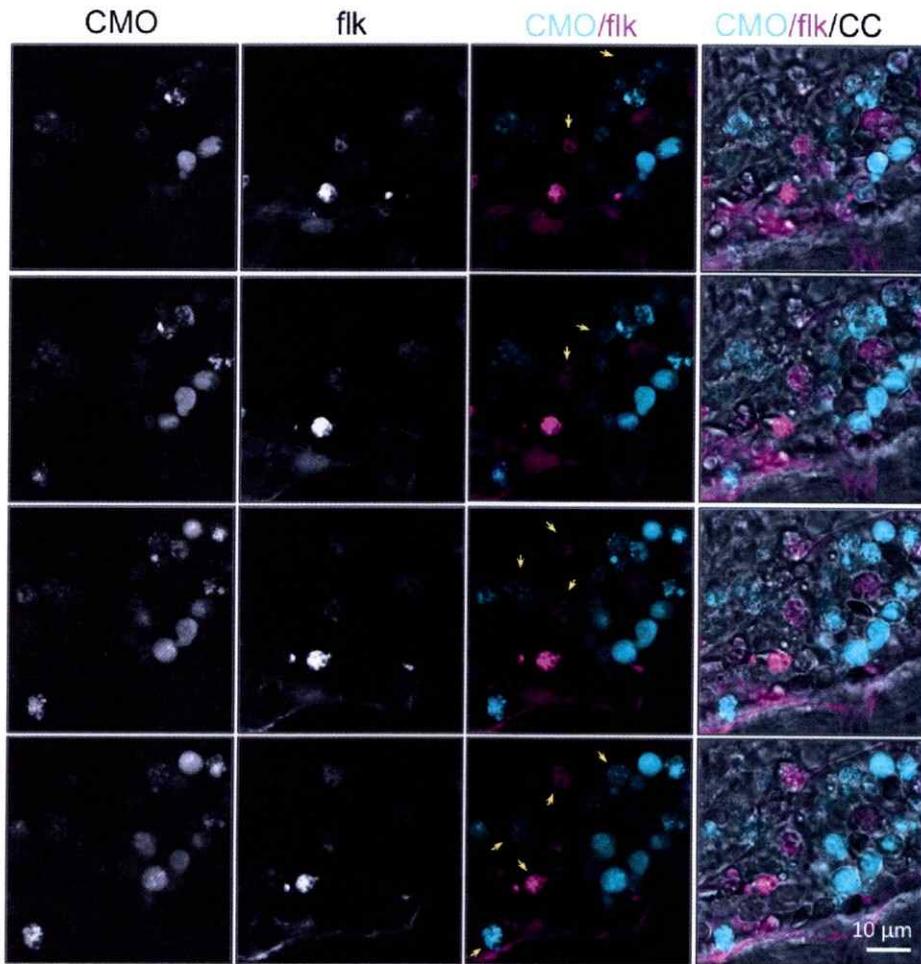
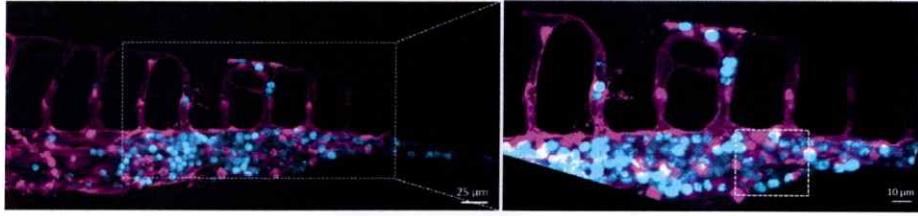


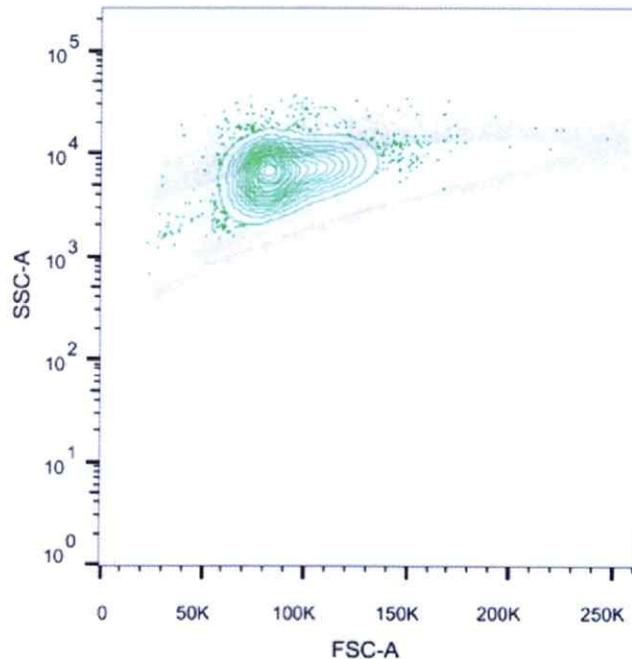
Figura 26. Células murinas de médula ósea se localizan en los conductos pronéfricos, rudimento de riñón y lóbulos tímicos en larvas de 3 días post fertilización. Embriones de pez cebra fueron transplantados con células murinas de médula ósea y visualizados 3 dpf. Imágenes de epifluorescencia representativas de larvas presentando células murinas dentro de **a)** los conductos pronéfricos (3 flechas blancas), rudimento de riñón (cabeza de flecha) y **b)** lóbulo tímico izquierdo en desarrollo a 3 dpf (imagen confocal con proyecciones de z stack). CMO: células murinas de médula ósea. Barra de escala panel superior = 100 μ m, panel inferior = 135 μ m.

a)

nacre^{-/-}, *flk:dsred* *cola* + CMO



b)



	Sample Name	Subset Name	Count
■	EMBRYO_UBI+GFP+_005.fcs	GFP+	6208
■	EMBRYO_UBI+GFP+_005.fcs	Live cells	360646

Figura 27. Las células murinas de médula ósea son ligeramente más grandes que las células de pez cebra. Células de médula ósea de ratón fueron aisladas, eliminadas de células maduras, marcadas con una sonda vital fluorescente y transplantadas en animales *nacre^{-/-}, flk:dsred*. **a)** El tejido hematopoyético caudal fue visualizado 3 dpf mediante microscopía confocal. Imágenes de alta magnificación con proyecciones de z stack pseudo-coloreadas evidencian células murinas en el tejido hematopoyético con diferentes niveles de emisión de fluorescencia, y con morfología similar a células endógenas (panel derecho, flechas amarillas). **b)** Células de médula ósea de un ratón transgénico (ubi-GFP) fueron aisladas, eliminadas de células diferenciadas, marcadas con una sonda vital fluorescente y transplantadas en animales transgénicos *tg(ubi:mcherry)*. A los 2 dpf, 12 embriones transplantados fueron seleccionados, y una suspensión celular de cuerpo completo fue analizada mediante citometría de flujo. Análisis de los parámetros físicos de tamaño y granulosidad (FSC y SSC) muestran que células murinas (eventos verdes) son ligeramente más grandes que células del pez (eventos grises). CMO: células murinas de médula ósea.

Para evaluar los tipos celulares murinos residentes en el tejido hematopoyético caudal de larvas transplantadas, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica. En larvas de pez cebra, a los 3 dpf existe principalmente proliferación de células madre hematopoiéticas, mielopoyesis y eritropoyesis. En consideración, se evaluaron marcadores de proliferación, de muerte celular, y de células madre hematopoiéticas y mieloides exclusivos para proteínas murinas. Los resultados indican las células murinas transplantadas en los que embriones presentan marcadores de células en proliferación activa, de células madre y progenitoras, y células de linaje granulocítico en el tejido hematopoyético caudal de larvas de pez cebra, con escasas células evidenciando muerte celular (**Fig. 28 y 29**).

Con el objetivo de evaluar la hematopoyesis endógena en larvas transplantadas se realizaron trasplantes en líneas transgénicas reporteras de neutrófilos *tg(mpx:gfp)* y macrófagos *tg(mpeg1:mcherry)*. Estos experimentos evidencian que la hematopoyesis endógena no se encuentra impedida, con macrófagos y no neutrófilos mostrando en algunos casos internalización de restos celulares murinos (**Fig. 30**). Experimentos realizados con células murinas transgénicas ubi-GFP sugieren que macrófagos son capaces de reconocer a células exógenas probablemente en procesos de muerte, y eliminarlas. Si bien existe muerte de algunas células murinas, éstas pueden ser visualizadas y distinguidas dentro de los embriones hasta 6 dpf (**Fig. 31**).

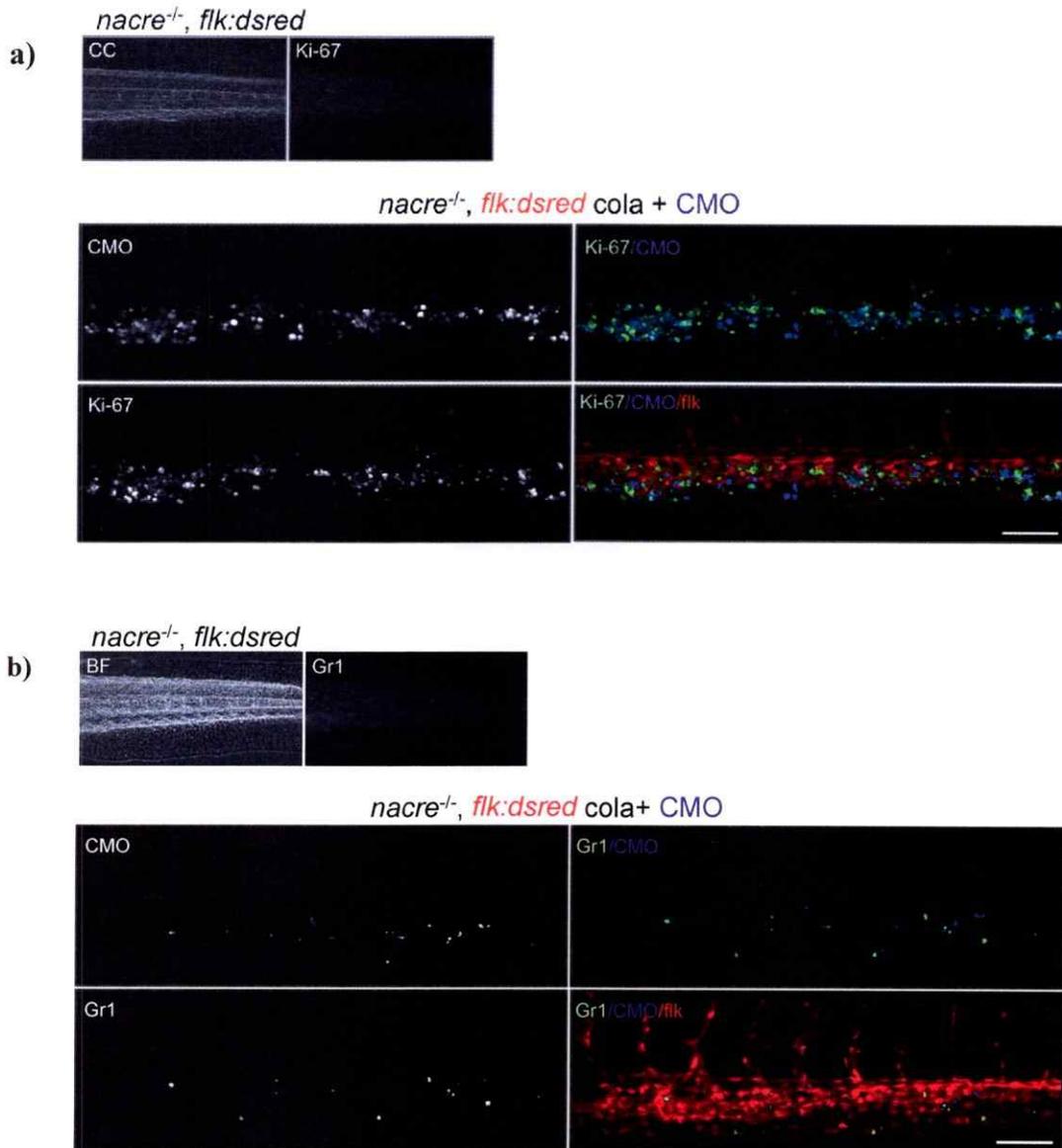


Figura 28. Células murinas en el tejido hematopoyético caudal evidencian marcadores de proliferación activa y de células madre y progenitoras. Células murinas de médula ósea fueron transplantadas en embriones de pez cebra *nacre*^{-/-}, *flk:dsred* y fijados con PFA a los 3 dpf **a)** Inmunohistoquímica contra la proteína murina Ki-67 asociada a proliferación activa evidencia reactividad con algunas células en el THC. **b)** Inmunohistoquímica contra la proteína murina c-kit relacionada a células madre hematopoiéticas evidencia reactividad con células en el THC. Controles de larvas sin transplante de células murinas fueron utilizadas como control negativo para cada anticuerpo (esquina superior izquierda). PFA: para-formaldehído. THC: tejido hematopoyético caudal. Barras de escala = 100 μ m.

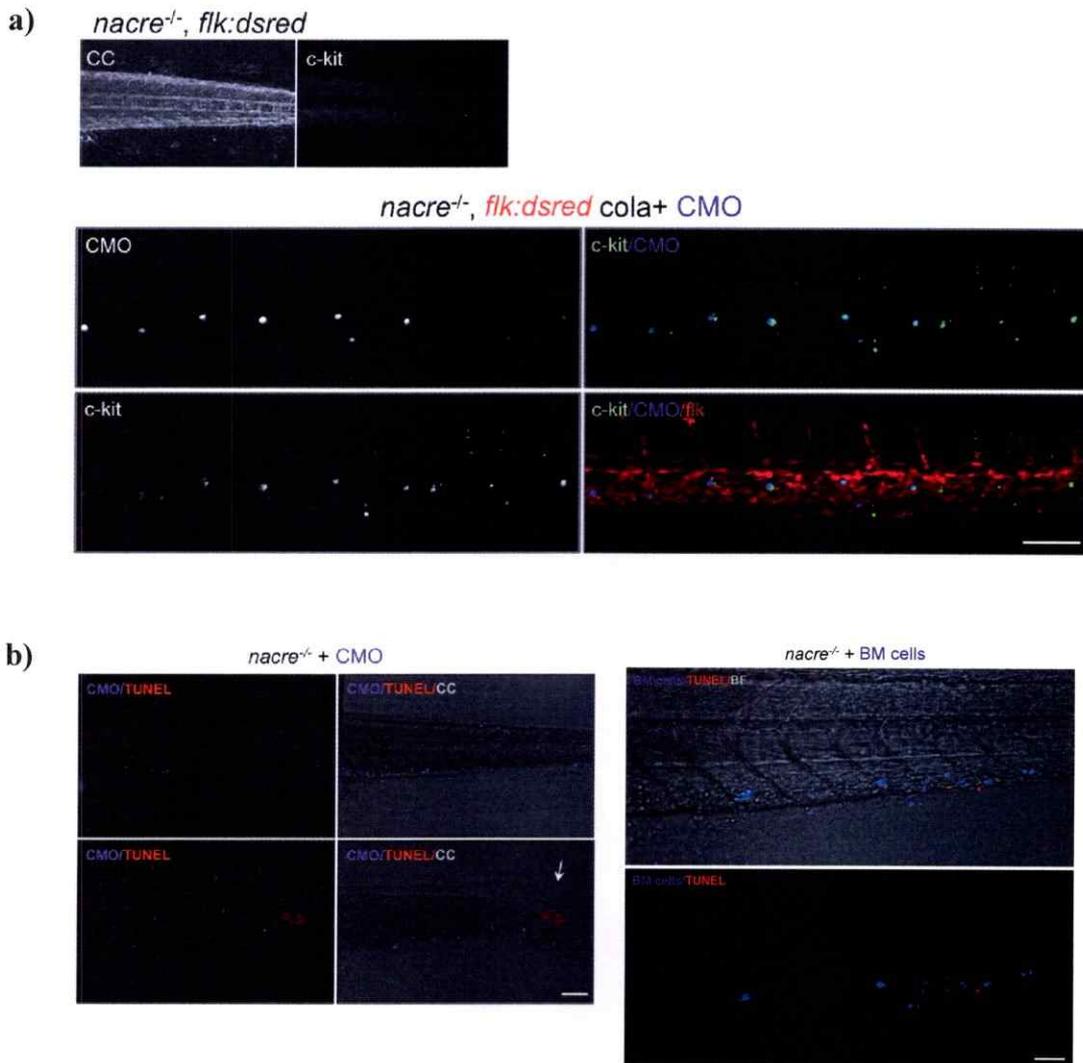
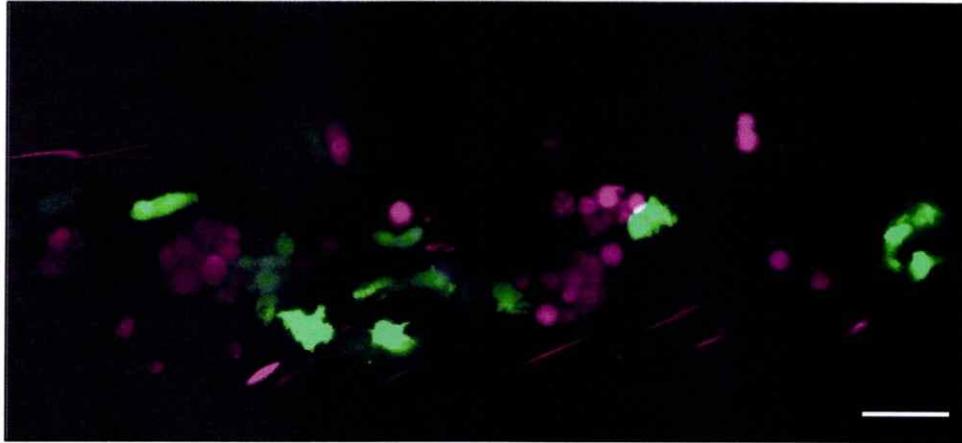


Figura 29. Células murinas en el tejido hematopoyético caudal evidencian marcadores de granulocitos, con pocas células evidenciando muerte celular. Células murinas de médula ósea fueron transplantadas en embriones de pez cebra *nacre*^{-/-}, *flk:dsred* y fijados con PFA a los 3 dpf **a)** Inmunohistoquímica contra la proteína murina Gr1 relacionada a linaje granulocítico evidencia reactividad con células residentes en el THC. Control en larvas sin transplante de células murinas fueron utilizadas como control negativo (esquina superior izquierda). **b)** Inmunohistoquímica TUNEL para evaluar muerte celular evidencia escasa reactividad en el THC de larvas transplantadas (panel superior derecho), y en cambio si evidencia reactividad en larvas transplantadas y dañadas (panel inferior derecho, flecha blanca). Magnificación del THC de larvas transplantadas (panel izquierdo). PFA: para-formaldehído. THC: tejido hematopoyético caudal. Barras de escala = 100 μ m.

a)

mpx:gfp + CMO



b)

mpeg1:mcherry + CMO

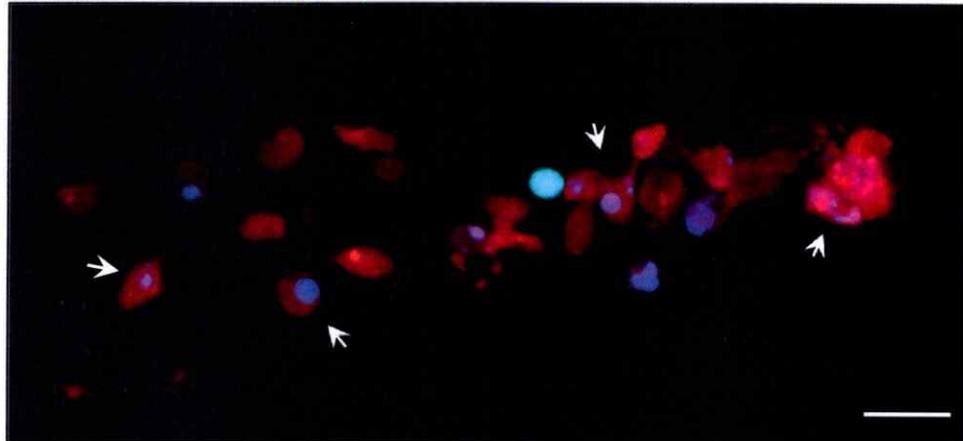


Figura 30. Macrófagos endógenos de pez cebra evidencian co-localización con células murinas. a) Embriones de pez cebra reporteros de neutrófilos *tg(mpx:gfp)* fueron transplantados con células de médula ósea y el THC fue visualizado mediante microscopía confocal con proyecciones de z stack. b) Embriones de pez cebra reporteros de macrófagos *tg(mpeg1:mCherry)* fueron transplantados con células murinas de médula ósea verdes (ubi-GFP), marcadas con tinción fluorescente azul y visualizados mediante microscopía confocal con proyecciones de z stack. Flechas blancas indican co-localización de macrófagos con células murinas sólo azules, sugiriendo que células murinas en procesos de muerte pierden expresión de GFP, y son eliminadas por células endógenas. Barras de escala = 20 μ m.

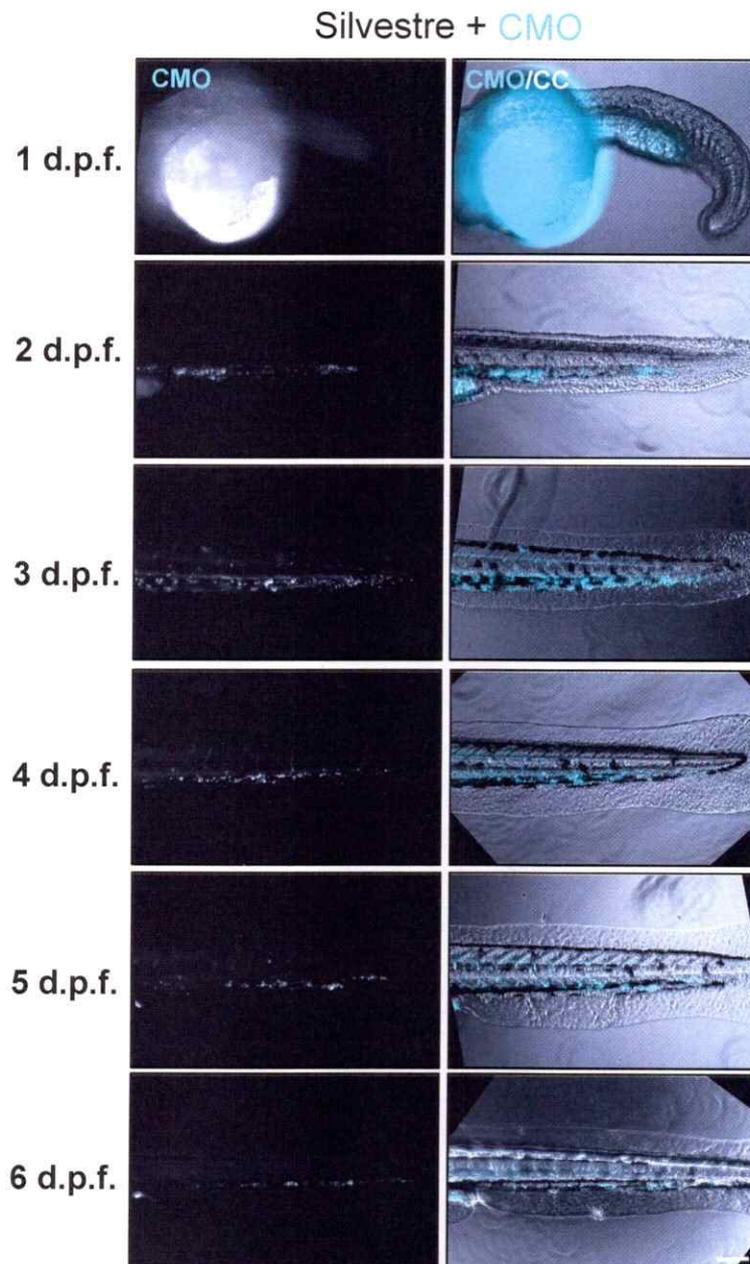


Figura 31. Células murinas pueden ser visualizadas en embriones transplantados hasta 6 días post fertilización. Células murinas de médula ósea fueron transplantadas en embriones silvestres y visualizados mediante microscopía de epifluorescencia. Imágenes pseudo-coloreadas de un embrión individualmente visualizado desde 1 hasta 6 dpf CMO: células murinas de médula ósea. Barra de escala = 100 μ m.

Posteriormente, utilizamos animales xenotransplantados para estudiar la dinámica de las células murinas dentro de los embriones. La visualización *in vivo* de embriones transplantados a 20 hpf evidencia a células murinas migrando en conjunto con la oleada de macrófagos endógenos primitivos por sobre el vitelo (*Herbomel y col., 1999*) (**Fig. 32**).

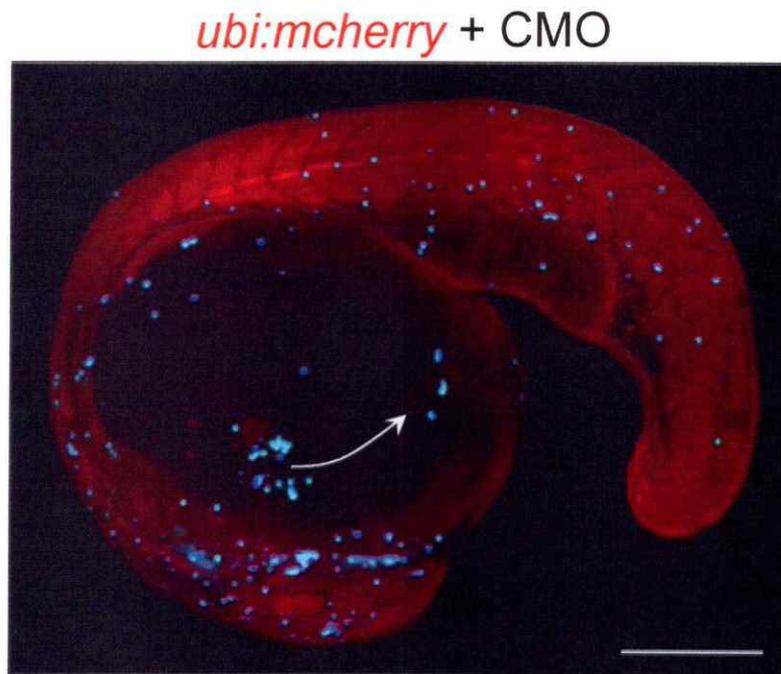


Figura 32. Células murinas migran sobre el vitelo en conjunto con la oleada de macrófagos primitivos. Células de médula ósea de un ratón transgénico (actina:GFP) fueron aisladas, eliminadas de células maduras, marcadas con una sonda vital fluorescente (azul) y transplantadas en animales transgénicos *tg(ubi:mcherry)*. Video de un embrión de 20 h.p.f. transplantado con células murinas de médula ósea evidencia la migración desde anterior a posterior (flecha blanca) de las células murinas junto con la oleada de macrófagos endógenos primitivos. Barra de escala = 200 μ m.

La visualización *in vivo* de los animales transplantados permitió evidenciar a las células murinas dentro del sistema circulatorio desde 1 d.p.f, independiente del número de células transplantadas, con un 15% de los peces transplantados (alrededor de 50 a 75 embriones por experimento) presentando un número elevado de células murinas en circulación (Fig. 22). La visualización de un embrión de 2 dpf evidencia a células murinas circulando por todo el cuerpo de la larva (Fig. 33). La visualización a mayor aumento evidencia a las células en circulación con distintas velocidades, con algunas células adherentes al tejido endotelial vascular (Fig. 34). La visualización del tejido hematopoyético caudal evidencia a las células murinas móviles y dinámicas, sugiriendo interacciones activas con el nicho hematopoyético (Fig. 35).

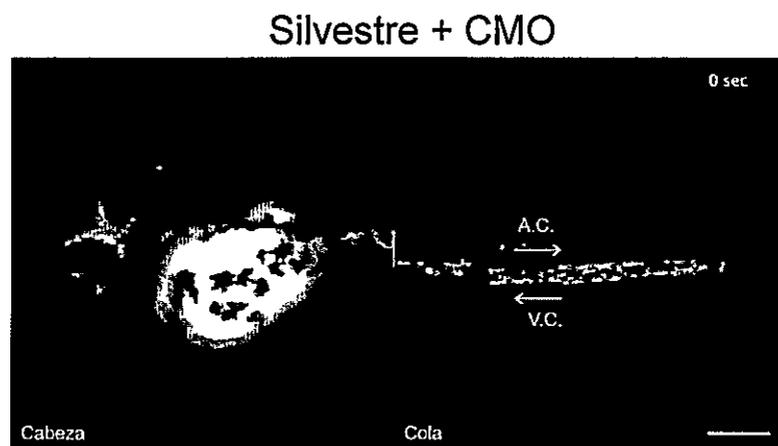


Figura 33. Células murinas de médula ósea circulan por todo el cuerpo de embriones de pez cebra. Embriones de pez cebra fueron transplantados con células murinas de médula ósea y se registró mediante microscopía de epifluorescencia (video) la circulación de células murinas en el cuerpo anterior (cabeza) y posterior (cola) de un embrión transplantado de 3 dpf. Flechas indican dirección flujo sanguíneo. A.C.: aorta caudal, V.C.: vena caudal. Barra de escala = 250 μ m.

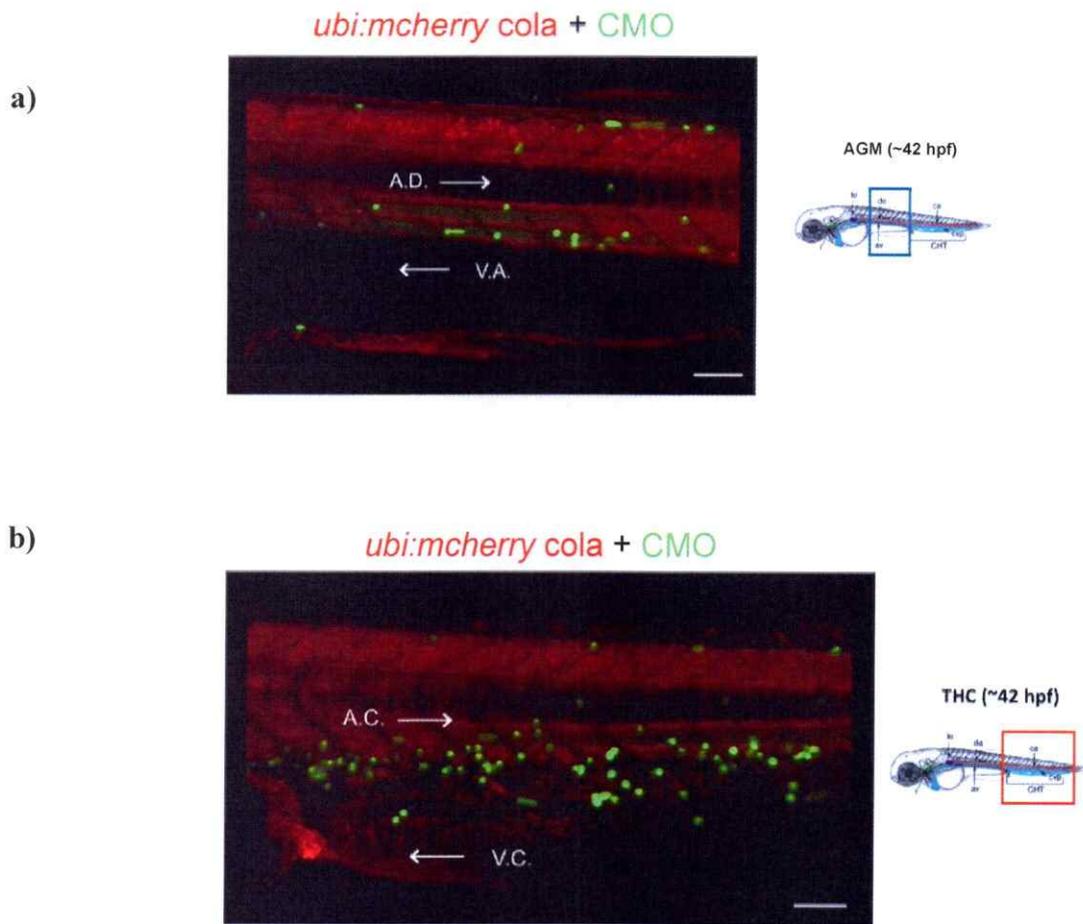


Figura 34. Células murinas de médula ósea en circulación evidencian interacción y adhesión con el endotelio vascular. Embriones de pez cebra *tg(ubi:mcherry)* fueron transplantados con células murinas de médula ósea transgénicas (*ubi-GFP*) y se registró mediante microscopía confocal la circulación de células murinas en la región de la aorta-gonadal- mesonefros (AGM) y en el tejido hematopoyético caudal (THC). Videos construidos mediante microscopía confocal. Flechas indican dirección del flujo sanguíneo. A.D: aorta dorsal; V.A.: vena axial; A.C: aorta caudal; V.C.: vena caudal. Barra de escala: 50 μ m.

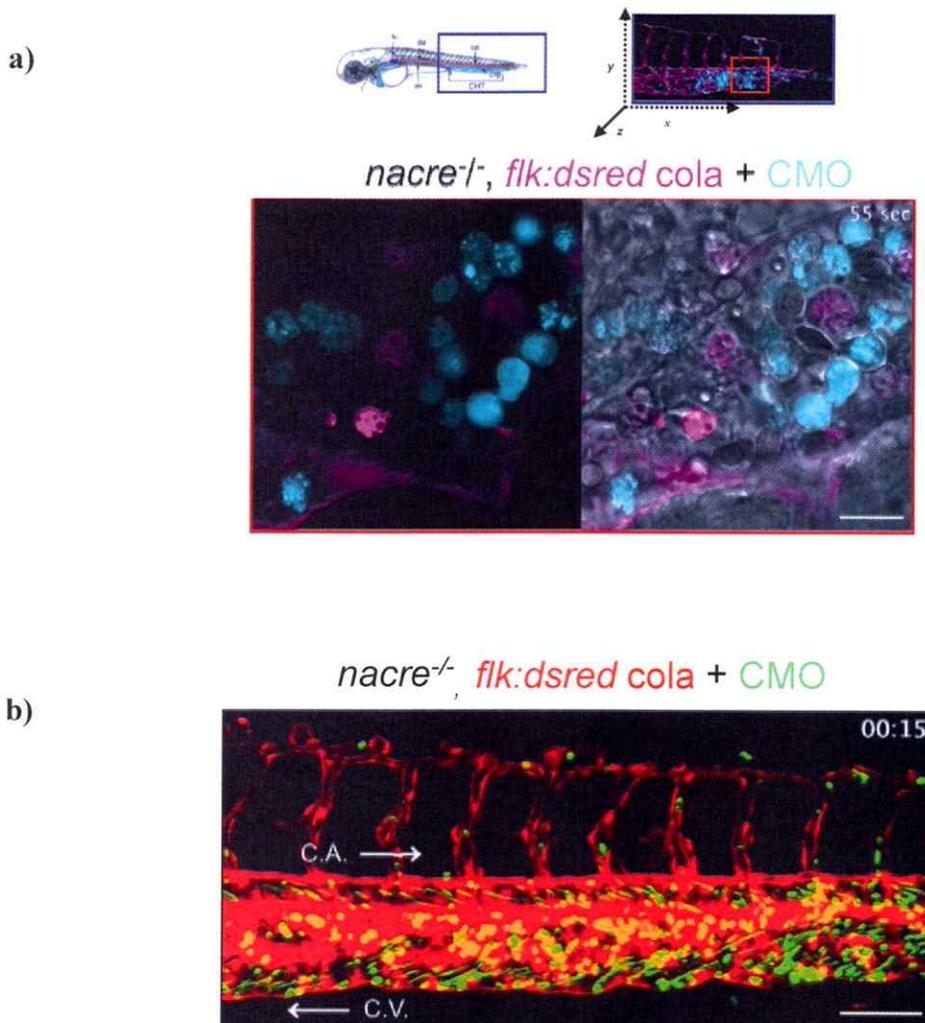


Figura 35. Células murinas de médula ósea residentes en el tejido hematopoyético caudal de larvas de pez cebra son móviles. **a)** Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) y reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* fueron transplantedados con células murinas de médula ósea y visualizadas 3 dpf. Video construido a partir de imágenes con proyecciones de z-stacks pseudo-coloreadas de la sección enmarcada en rojo a lo ancho del tejido hematopoyético caudal constantemente por 5 minutos (diagrama superior). Barra de escala = 10 μ m. **b)** Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) y reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* fueron transplantedados con células murinas de médula ósea. Video construido de imágenes confocales con proyecciones de z-stack pseudo-coloreadas tomadas cada 5 minutos durante 1,5 horas. A.C: aorta caudal; V.C.: vena caudal. Barra de escala = 100 μ m.

Para evaluar si las células murinas de médula ósea en el pez cebra son capaces de responder a una infección bacteriana, larvas transplantadas fueron infectadas con una cepa clínicamente aislada de *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de humanos de alta relevancia clínica (Munoz-Price y col., 2013). Para favorecer la respuesta de las células murinas las larvas fueron infectadas y posteriormente incubadas a 30°C. La infección intramuscular con *K. pneumoniae* indujo cambios en la concentración de células murinas en el tejido hematopoyético caudal en comparación con larvas no infectadas. Cinco horas post-infección, el tejido hematopoyético se evidenció drásticamente disminuido de células murinas (Fig. 36), y 24 horas post-infección, células murinas se vieron localizadas en el sitio de inyección (Fig. 37).

Para visualizar la dinámica e interacción de células murinas con células bacterianas *in vivo*, se infectó la vesícula ótica de una larva transplantada de 3 dpf con una cepa transgénica del aislado clínico de *K. pneumoniae* expresando una proteína fluorescente roja. La visualización comenzando 9 horas post-infección, evidencia a células murinas migrando e interactuando con las células bacterianas (Fig. 38), con algunas células murinas evidenciando carga bacteriana intracelular sugiriendo que células murinas en larvas de pez cebra son capaces de detectar y fagocitar células bacterianas.

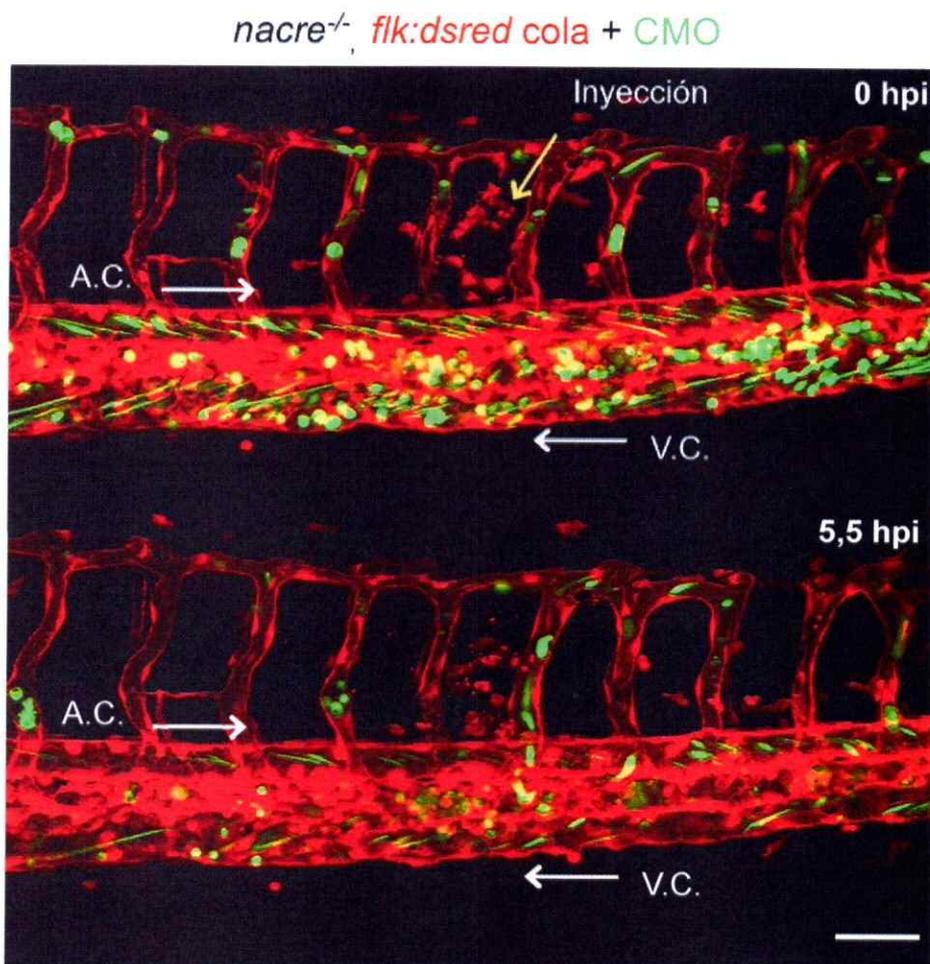


Figura 36. Las células murinas residentes del tejido hematopoyético caudal disminuyen su concentración significativamente en solo 5 horas tras una infección intramuscular con *K. pneumoniae*. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) y reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* fueron transplantados con células murinas de médula ósea. El embrión fue infectado mediante inyección intramuscular con 100 U.F.C. de *K. pneumoniae* rojas (pRSET-tdTomato) y visualizado 0 y 5,5 horas post infección (hpi, panel superior e inferior, respectivamente) mediante microscopía confocal. Video construido de imágenes confocales con proyecciones de z-stack tomadas cada 5 minutos durante 5,5 horas. A.C.: aorta caudal; V.C.: vena caudal. Flechas indican dirección del flujo sanguíneo. Barra de escala = 50 μ m.

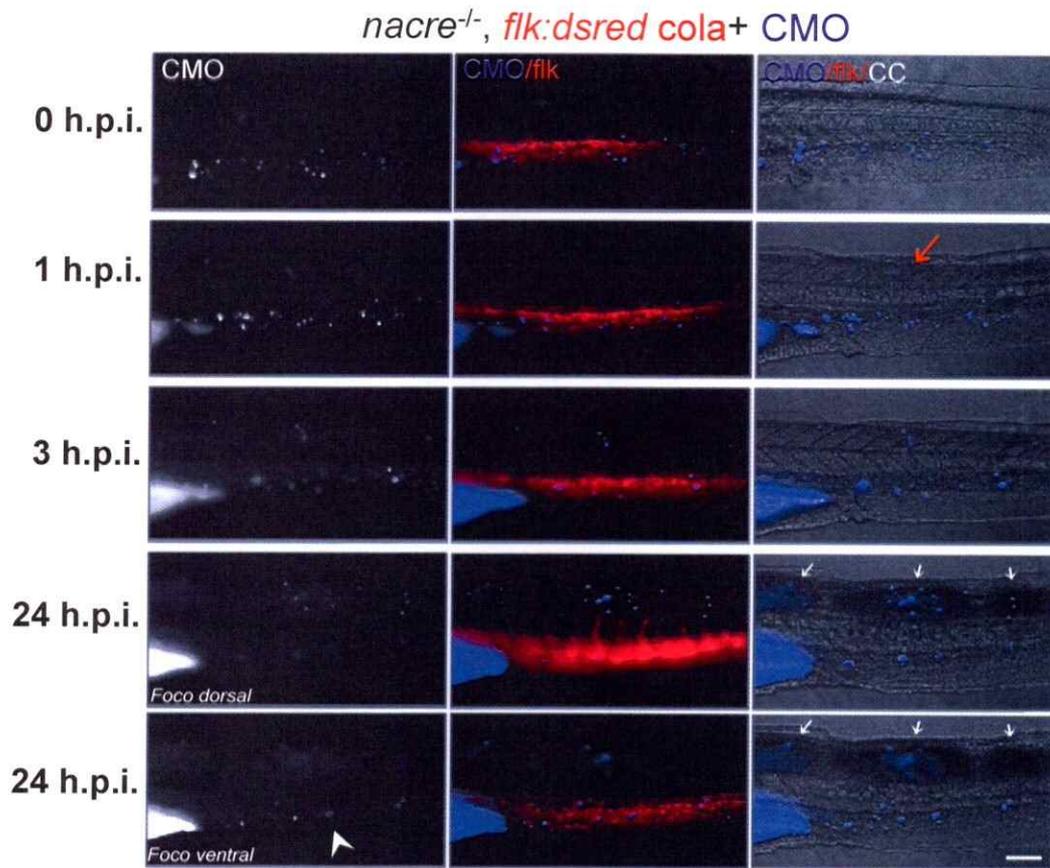


Figura 37. Células murinas co-localizan en el sitio de inyección de *K. pneumoniae* 24 horas post infección. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) y reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* fueron transplantados con células murinas de médula ósea, y 3 dpf fueron infectadas mediante inyección intramuscular (flecha roja) con 500 U.F.C. de *K. pneumoniae*. Los embriones fueron visualizados mediante epifluorescencia a los tiempos indicados. Flechas blancas señalan tejido necrotizado, y cabeza de flecha muestra una disminución de células murinas en el tejido hematopoyético caudal 24 horas post infección (h.p.i.). Barra de escala = 100 μ m.

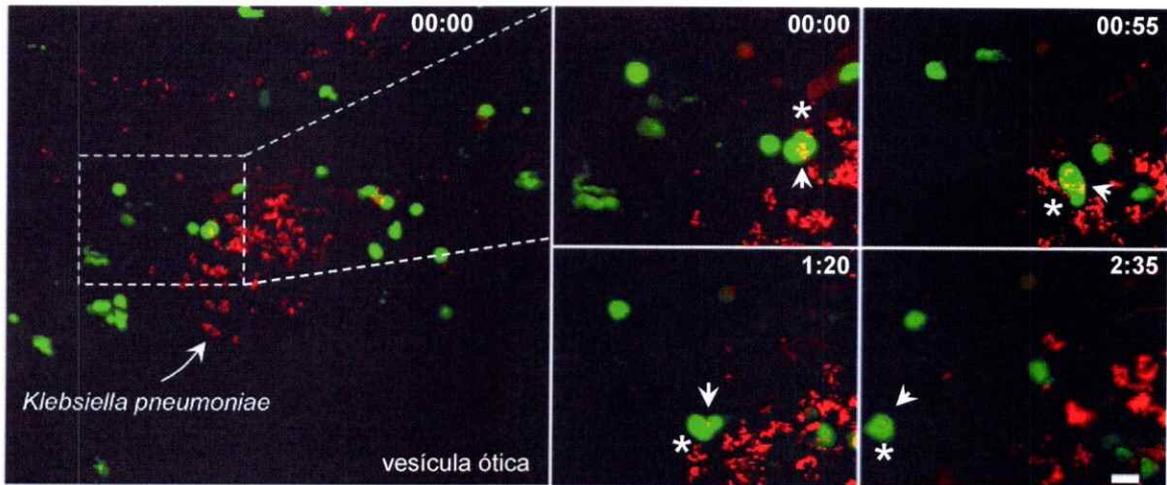


Figura 38. Visualización *in vivo* de células murinas participando del proceso inflamatorio asociado a una infección de vesícula ótica inducida con *K. pneumoniae*. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) y reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* fueron transplantados con células murinas de médula ósea. El embrión fue infectado mediante inyección en la vesícula ótica con ~500 U.F.C. de *K. pneumoniae* rojas (pRSET-tdTomato) y visualizado mediante microscopía confocal 9 y 10,5 horas post-infección (hpi, panel superior e inferior, respectivamente). Imágenes obtenidas a partir de un video construido de imágenes confocales con proyecciones de z-stack tomadas cada 5 minutos durante 9,5 horas. Flechas indican células bacterianas (panel superior) y célula murinas con carga bacteriana intracelular (panel inferior). Barra de escala = 10 μ m.

Para evaluar si con la metodología desarrollada se podría a su vez transplantar y estudiar la dinámica de células de médula ósea humanas, se transplantaron células provenientes de la línea celular promielocítica HL-60 (**Fig. 39**). Los resultados demuestran que estas células también son incorporadas al cuerpo en desarrollo del pez, y migran hacia el tejido hematopoyético sugiriendo que con esta metodología se puede emplear a su vez para estudiar procesos hematopoyéticos e inflamatorios relacionados a la especie humana.

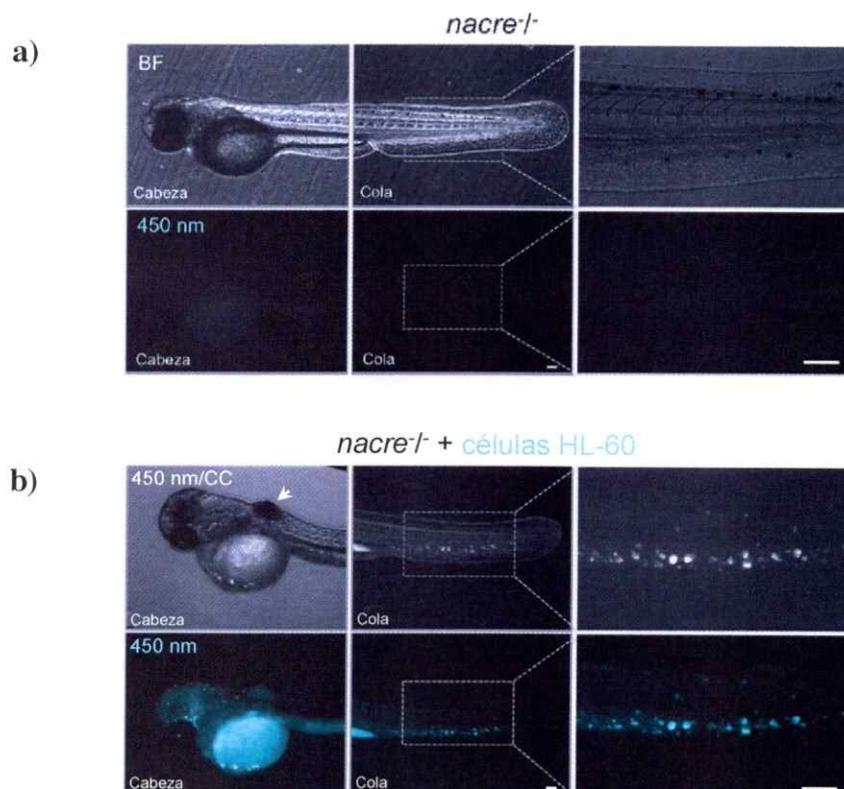


Figura 39. Células de leucemia humana co-localizan en el tejido hematopoyético caudal en embriones de 3 dpf. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) fueron transplantados con células promielocíticas de la línea celular HL-60 y visualizados 3 dpf. Flecha blanca indica la presencia de un tumor en el cuerpo anterior de la larva transplantada. Barras de escala = 135 μ m.

VI. DISCUSIÓN

El proceso inflamatorio es considerado un evento esencial responsable de los acontecimientos posteriores que conllevan a la generación de una respuesta inmune adaptativa, y/o a la reparación y regeneración de tejidos.

El descubrimiento de la inmunización a mediados del siglo XVIII condujo a una revolución en el mundo científico, que comprendió rápidamente la relevancia de enfocar la investigación en los mecanismos detrás de la adquisición de inmunidad. El mayor impacto de su desarrollo hasta nuestro días destaca, entre otros, el aumento en la expectativa de vida de la población mundial, al permitir el desarrollo de vacunas contra un sin número de patógenos de alta mortandad (i.e. viruela) que, en ese entonces, se consideraban un problema mayor de salubridad. Por estos motivos, el proceso inflamatorio “primitivo” fue entonces relevado a un segundo plano.

Estos avances y progresos en la medicina contemporánea, sin embargo, han tenido como consecuencia el surgimiento de nuevas patologías asociadas al envejecimiento. Enfermedades tales como el Alzheimer, Parkinson, aterosclerosis, obesidad, diabetes, enfermedades respiratorias, y muchas formas de cáncer, son patologías asociadas a la vida moderna donde la inflamación es un componente importante de la fisiopatología de la enfermedad (*McGeer y McGeer, 2004; Egger y Dixon, 2014*).

Estas denominadas patologías de inflamación crónica se caracterizan por ser de larga duración con una progresión lenta. Los tejidos afectados son reconocidos por el sistema inmune como defectuosos, induciendo para-inflamación, un tipo de respuesta inflamatoria de magnitud leve que en el tiempo es uno de los mayores responsables de la destrucción colateral sobre los tejidos. Por estos motivos, la investigación biomédica actual se ha visto forzada a precisar su conocimiento respecto del proceso inflamatorio “arcaico” en busca de terapias que detengan la destrucción de los tejidos.

6.1 Evaluar muerte celular de neutrófilos en inflamación inducida por infección y lesión.

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre el desarrollo de la respuesta inflamatoria proviene de contextos infecciosos. Los procesos inflamatorios asociados a una lesión estéril, o a un tejido disfuncional, sin embargo, son escasamente comprendidos. En esta tesis doctoral hemos enfocado nuestros esfuerzos en estudiar los mecanismos que programan la función y remoción de neutrófilos en inflamación por lesión versus una infección.

Dentro de las múltiples variables que pueden ser estudiadas que influyen sobre la respuesta inflamatoria, hemos escogido estudiar los neutrófilos ya que (1) son las primeras células en ser reclutadas, (2) lo hacen en mayor número, y (3) su contenido intracelular es altamente nocivo tanto a patógenos como a células del huésped. Por estas razones, basado en estos antecedentes se podría deducir fácilmente que una desregulación en su función podría tener consecuencias severas.

En efecto, varias enfermedades existen en donde una pérdida o ganancia de función de neutrófilos conducen a la generación de infecciones recurrentes y/o a un impedimento en la regeneración de tejidos. Aún más, diversas patologías de inflamación crónica destacan a neutrófilos como los mayores responsables de los daños colaterales sobre los tejidos inflamados (*Lekstrom-Himes y Gallin, 2000; Yamamoto-Furusho y Kurszenik, 2003; Brown y col., 2006; Yamamoto-Furusho y Podolsky, 2007; Hallet y col, 2008; Khor y col., 2011, Kennedy y DeLeo, 2009; Fox y col, 2010; Nathan y Ding, 2010; Wright y col., 2010; Fournier y col., 2012; Lucas y col., 2013*). Estos antecedentes confirman y destacan la relevancia de una correcta regulación de la función de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria.

La evidencia actual describe que dependiendo de un contexto de lesión o infección, ocurren distintos mecanismos moleculares que promueven la infiltración de neutrófilos a sitios de inflamación. Por lo tanto, es lógico argüir que podrían existir diferencias, a su vez, en los mecanismos que programan sus funciones y median su remoción. Identificar diferencias en cómo neutrófilos son programados y cesan sus funciones durante una infección versus una lesión, podría contribuir a la generación de nuevos blancos terapéuticos que permitan, por ejemplo, disminuir el daño colateral asociado a patologías de inflamación crónica sin comprometer la capacidad de defensa del organismo frente a una infección.

Existe evidencia hoy en día de al menos 3 mecanismos por los cuales neutrófilos cesan sus funciones y son removidos de tejidos infiltrados. La apoptosis *in situ*, (considerado como el mecanismo principal), la migración retrógrada transendotelial y la remoción mediante exudados inflamatorios. Éstos últimos han sido evidenciados principalmente en patologías pulmonares, por lo que bien podría ser un mecanismo específico órgano-tisular. Sin embargo, el contexto fisiológico por el cual neutrófilos retornan al flujo sanguíneo en oposición a la muerte programada, es desconocida. Es importante mencionar que en el ámbito evolutivo se considera una interrogante, dada la importancia que presentan los neutrófilos para la defensa del organismo, que la evolución haya seleccionado mecanismos de eliminación de estas células antes que la disminución de su actividad citotóxica (Amulic y col., 2012).

En este trabajo consideramos que este en efecto este podría no ser el caso, y basado en que: (1) una infección en un organismo debe ser contenida, (2) que la muerte de células inmunes esta asociada a procesos infecciosos, (3) a que células inmunes son eliminadas a través de exudados inflamatorios en infección, y (4) que en contextos de inflamación por lesión neutrófilos retornan al flujo vascular, conjeturamos que la muerte *in situ* de neutrófilos podría ser un fenómeno particular asociado a un contexto infeccioso, el cual podría haber surgido frente a una presión selectiva como un mecanismo que favorece la contención de la diseminación bacteriana. La existencia de patógenos intracelulares que han evolucionado mecanismos para evadir respuestas inmunes y favorecer su

supervivencia intracelular (dentro de las cuales se incluye la modulación del proceso de muerte celular), favorecen esta hipótesis (Guiney, 2005).

No obstante, la dificultad experimental que impone el estudio de neutrófilos *in vivo* ha retardado la evaluación de estos procesos. En lo esencial, el sistema hematopoiético e inmune de vertebrados se encuentra conservado, por lo tanto en esta tesis hemos utilizado el modelo de pez cebra para evaluar en un contexto *in vivo* sin mayores intervenciones, si es que existen diferencias en los mecanismos de remoción de neutrófilos en un contexto de inflamación inducida por infección versus una lesión.

Para evaluar esta idea, realizamos ensayos de detección de muerte de neutrófilos en contexto de lesión por transección de la aleta caudal, versus un contexto de infección inducida a través de una inyección intramuscular con *S. Typhimurium* (S.tm). Para asociar las posibles diferencias encontradas al inductor de la inflamación, y no a diferencias en la magnitud de inflamación, establecimos condiciones de infección de magnitud de infiltración de neutrófilos comparables a la de la transección de la aleta caudal. La transección de la aleta caudal induce un reclutamiento de 15 neutrófilos en promedio en el máximo de infiltración. La inyección intramuscular con 100 U.F.C. de S.tm induce la infiltración de 18 neutrófilos en promedio en el máximo de infiltración (Fig. 3). Si bien el número de neutrófilos reclutados en cada contexto inflamatorio es similar, bajo estas condiciones tanto la cinética de reclutamiento como la de resolución se evidenciaron más rápidas para la infección.

Que el máximo de infiltración se alcance más rápido para la infección podría deberse principalmente a que el foco de infección se encuentra más cercano al tejido hematopoyético caudal, lo que disminuye la distancia de tráfico de neutrófilos al foco de inflamación en comparación con la transección de la aleta caudal. Sin embargo, PAMPs derivados de bacterias podrían también estar induciendo el reclutamiento más rápido de neutrófilos, tal como se ha descrito por ejemplo, al promover su migración intraepitelial directa hacia el foco de inflamación (*McDonald y Kubes, 2012*).

En infección con 100 UFC de *S.tn* 18 células infiltradas en un área de 9 mm² resuelven a las 12 horas. Para la transección caudal 15 células infiltradas en un área de 9 mm² resuelven posterior a 30 horas (**Fig. 3**). Que el tiempo de resolución sea prolongada en la transección de la aleta caudal con respecto a la infección podría estar asociado al proceso de regeneración. Al ser un fenómeno que requiere un tiempo extendido, la presencia de células inmunes podría contribuir al proceso regenerativo no sólo al remover restos celulares y tisulares, sino adicionalmente al proveer un mecanismo de defensa local transitorio hasta la restauración de la barrera epitelial. Sin embargo, hay que realizar experimentos adicionales para validar esta idea.

Considerando que el número máximo de neutrófilos infiltrados en cada contexto inflamatorio es similar, estos resultados permiten evidenciar que existen diferencias importantes en la cinética de infiltración de neutrófilos dependiendo de la naturaleza del inductor de inflamación. En infiltración en infección se observa por ser una respuesta

rápida, con la eliminación eficaz del inductor de inflamación. La infiltración en lesión, en cambio, se caracteriza por ser una respuesta de infiltración lenta, con una permanencia y resolución prolongada.

Para evaluar los mecanismos que median la remoción de neutrófilos en ambos contextos inflamatorios utilizamos ensayos de TUNEL como metodología experimental, ya que permite detectar muerte celular independiente de su origen (*Grasl-Kraupp, y col., 1995; Fink y Cookson., 2005*). La técnica aplicada en larvas de pez cebra permitió detectar y diferenciar neutrófilos en procesos de muerte versus, probablemente, en fagocitosis de restos celulares y tisulares (**Fig. 4**).

Nuestros resultados indican la detección de neutrófilos en procesos de muerte únicamente en el contexto de infiltración por infección, particularmente dentro de las primeras horas de infiltración. La evaluación en el contexto de lesión se caracterizó únicamente por evidenciar neutrófilos en procesos de remoción de restos celulares (**Fig. 5 y 6**). Estos resultados se condicen con experimentos describiendo que sólo un 4% de neutrófilos infiltrados activan apoptosis tras una transección de la aleta caudal de larvas de pez cebra (*Loynes y col., 2010*).

Es interesante destacar que la muerte de neutrófilos fue detectada dentro de los primeras horas de infiltración (**Fig. 5**) lo que va en contraposición con el concepto de que la muerte celular está asociada a la remoción de neutrófilos durante la resolución de la inflamación, y que tiende a asociarse como un evento final dentro de la cinética de

infiltración. Adicionalmente, el número de neutrófilos detectados en procesos de muerte fue bajo en comparación con el número máximo de células reclutadas. Para larvas inyectadas con 100 U.F.C., se detectó un intervalo de 0 a 3 células en procesos de muerte por larva infectada, con un promedio de 18 células reclutadas en el máximo de infiltración (**Fig. 7**). Estos resultados no son de extrañar, no obstante, si se considera que se ha descrito que 1 neutrófilo individual en larvas de pez cebra puede fagocitar hasta 200 células de *E.coli* en sólo 30 minutos (*Colucci-Guyon y col., 2011*). Estos antecedentes permiten explicar no sólo que la muerte de neutrófilos sea detectada en bajos números en larvas inyectadas con 100 U.F.C., sino también que sean detectados exclusivamente dentro de las primeras horas de infiltración. Esto a su vez podría contribuir a la observación de una cinética de remoción más rápida para el caso de infección versus la lesión. Sin embargo, por otro lado, también sugieren que en infección no sólo ocurre muerte de neutrófilos, sino que la migración retrógrada también puede ser evidenciada como un mecanismo de remoción de neutrófilos desde los tejidos infectados. Esto explicaría, por ejemplo, la descripción de neutrófilos migrando e induciendo la proliferación en tejidos linfáticos en respuesta a patógenos (*Hampton y col., 2015*).

Nuestros experimentos asocian una correlación positiva entre la magnitud de la infiltración, tiempo de resolución, y el N° de neutrófilos en procesos de muerte detectados versus la carga bacteriana inyectada (**Fig. 8**). Si bien el aumento en la magnitud de infiltración de neutrófilos era esperable frente a un aumento en la carga

bacteriana, estos resultados sugieren que existe un número mínimo de células bacterianas fagocitadas para la inducción de muerte celular en neutrófilos. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis habría que demostrar que neutrófilos efectivamente están fagocitando bacterias, y que la muerte celular detectada ocurre como consecuencia de la fagocitosis.

Dentro del fenómeno estudiado, hay que considerar también la contribución de otras células en pez cebra las cuales también podrían estar fagocitando *S.tn* y así enmascarando el efecto evaluado sobre neutrófilos. Por ejemplo, macrófagos han sido tradicionalmente descritos como fagocitos activos en infección con *S.tn* (Guiney, 2005). Otros tipos celulares del sistema inmune innato descritos en mamífero que participan en una infección bacteriana, tales como células dendríticas y células natural killer, no se encuentran presentes en el estadio de desarrollo de larvas de pez cebra utilizadas para nuestros experimentos, lo que permite limitar la interpretación de los fenómenos observados principalmente a la contribución de neutrófilos y macrófagos (Torraca y col., 2014).

Respecto a la muerte celular inducida por *S.tn*, experimentos de infección en modelo murino han descrito que la fagocitosis de *S.tn* por macrófagos induce la activación del inflamosoma NLRC4. Esto conduce a la activación de caspasa-1, la que a su vez activa el programa de muerte celular por piroptosis. Este es un tipo de muerte celular programada pro-inflamatoria que ha evolucionado específicamente en células del

sistema inmune, que promueve la exposición de las células bacterianas fagocitadas a gránulos citotóxicos liberados por neutrófilos en el foco de inflamación (*Miao y col., 2010*).

Experimentos recientes en modelo murino han descrito que neutrófilos con carga bacteriana intracelular en focos de inflamación con *S.tm*, inducen la activación del inflamosoma NLRC4 con la subsecuente activación de caspasa-1. Sin embargo, esta no es conducente a piroptosis, ni a otro tipo de muerte celular (*Chen y col., 2014*). Estas diferencias observadas con respecto a nuestros resultados en neutrófilos de pez cebra podrían explicarse por diversos motivos. Sin embargo, lo más probable es que estos resultados estén reflejando diferencias propias de la respuesta inflamatoria frente a *S.tm* en un teleosteo versus un mamífero. Al ser *S.tm* es un patógeno exclusivo de mamíferos, la historia evolutiva de su interacción patógeno-huésped podría haber seleccionado la sobrevivencia de neutrófilos como un factor que favorece la contención de la infección. La infección intramuscular de *S.tm* en larvas de pez cebra, por otro lado, es una condición artificial. No obstante, si bien la muerte celular de neutrófilos no es evidenciada en infección con *St.m* en modelo murino, si es importante destacar que la muerte celular si se ha mantenido conservada como mecanismo fundamental de la interacción *S.tm*-huésped; la muerte de macrófagos infectados con *S.tm* sigue siendo fundamental para la supervivencia frente a *S.tm*. (*Fink y Cookson, 2007*). En este sentido, en larvas de peces cebra, el rol de muerte celular frente a un patógeno intracelular podría estar siendo

ejecutado por neutrófilos. Sería interesante evaluar si en peces cebra, la muerte de neutrófilos y macrófagos ocurre por igual frente a *S.tn*.

Como se ha descrito, los neutrófilos pueden activar distintos programas de muerte dependiendo del contexto fisiológico o patológico (*e.g.* apoptosis, necrosis, ETosis, autofagia), para poder precisar el tipo de muerte que activan neutrófilos en infección con *S.tn* en larvas de pez cebra, se debe evaluar la modulación de la expresión de proteínas específicas representativas de cada programa de muerte celular (*Geering y Simon, 2011*).

Es interesante analizar que el dogma de la inmunología consideró hasta no mucho tiempo atrás; que neutrófilos son removidos de tejidos inflamados únicamente mediante apoptosis (*Savill y col., 1989*). Esta noción era lógica de asumir si se considera que diariamente 10^{11} neutrófilos humanos mueren por apoptosis, y éste constituye el mecanismo fundamental intrínseco que regula el número basal de neutrófilos circulantes. Adicionalmente, de manera relevante en inflamación, este mecanismo provee una forma eficiente y segura de eliminación de su contenido intracelular citotóxico en tejidos infiltrados (*Geering y Simon, 2011*).

En esta tesis conjeturamos que la muerte neutrófilos *in situ* en el foco de inflamación podría ser un mecanismo exclusivo en infección el que podría haber surgido frente a una presión selectiva que favoreciese la contención de una diseminación bacteriana. Nuestros resultados efectivamente demuestran que la muerte celular de neutrófilos *in situ* en focos de inflamación está asociada exclusivamente a la presencia de patógenos bacterianos.

Para poder generalizar estos resultados, sin embargo, es necesario realizar una evaluación en distintos contextos inflamatorios de lesión tanto como de infección, y corroborar estos resultados en modelo de mamífero. Adicionalmente, hay que considerar la contribución del sistema inmune adaptativo en estos fenómenos observados. No obstante, la evidencia recopilada hasta el día de hoy en diversos contextos infecciosos está demostrando que la muerte celular podría no ser un proceso exclusivo para células del sistema inmune, sino que a su vez podría ser un mecanismo conservado a lo largo de la evolución como propio del organismo como un mecanismo de defensa fundamental frente a una infección.

Por ejemplo, una de las respuestas anti-microbiales más ancestrales conocidas consiste en la eliminación de la célula infectada mediante muerte celular programada. Esto no sólo asegura la muerte del agente infeccioso, sino también asegura la eliminación del nicho patogénico (*Zitvogel y Kroemer, 2008*). Frente a este escenario, ya no se vuelve tan sorprendente entender que a nivel general, una de las formas de activar el programa apoptótico, propio de todo tipo celular, incluya la liberación de moléculas derivadas del sistema mitocondrial.

Dada la antigüedad en escala evolutiva de las interacciones patógeno-huésped, y de la existencia de diversos patógenos como células que participan e influyen sobre la respuesta inflamatoria, es comprensible evidenciar que la función que desempeñan células inmunes en cada contexto infeccioso presente una programación de defensa

específica, no sólo a nivel de cada célula individual, sino también para cada patógeno en particular. Aún más, frente a este escenario, es posible considerar que estas interacciones podrían haber tenido un impacto profundo no sólo a nivel celular, sino también a nivel del desarrollo órgano-tisular. Órganos expuestos al ambiente externo podrían haber evolucionado estrategias específicas similares a las del sistema inmune, que les permitan la eliminación de células infectadas a nivel tisular. Los tejidos epiteliales pulmonares y del lumen gastrointestinal, entre otros, son tejidos con contacto directo al ambiente externo los cuales frente a una infección, permiten la descarga inocua de exudados inflamatorios hacia el medio exterior. La importancia que tiene la muerte celular programada en células epiteliales del lumen intestinal en la regulación de la homeostasis inmune ha sido ampliamente descrita (*Hasumann, 2010; Peterson y Artis, 2014*). De esta forma entonces, tiene sentido evidenciar que estos epitelios se caractericen por tener una alta tasa de recambio basal, curiosamente, tal cual las células del sistema inmune innato.

2. Evaluar el transcriptoma de neutrófilos en inflamación por lesión.

Nuestros resultados anteriores demostraron la existencia de diferencias en la permanencia y remoción de neutrófilos de tejidos inflamados dependiendo de la naturaleza del inductor de inflamación. Con el objetivo de identificar genes responsables de estas diferencias, se determinó analizar el transcriptoma de neutrófilos activados en un contexto de lesión, y seleccionar genes para comparar su expresión versus un contexto de infección.

Para poder analizar el ARN de neutrófilos a partir de larvas transgénicas *tg(mpx:GFP)*, utilizamos una estrategia metodológica que incluye citometría de flujo con separador celular (FACS) para aislar neutrófilos en base a su emisión de fluorescencia, y posteriormente extraer su ARN mediante tratamiento con Trizol (Fig. 9a). La evaluación de transcritos específicos de neutrófilos mediante qRT-PCR en las poblaciones de células GFP+ versus GFP- aisladas mediante esta metodología, evidenciaron un aumento en la representación de los transcritos de *mpx* y *egpf* en la población GFP+. Si bien el transcrito de *mpx* se evidencia a su vez representado en menor grado en células GFP-, podría estar reflejando la contribución de otras células que expresan menores niveles de mieloperoxidasa, tales como macrófagos (McMillen y col., 2005). La evaluación de un gen no específico de neutrófilos, *Sox2*, se evidencia sin cambio en ambas poblaciones (Fig. 9b). Estos resultados demuestran que la metodología empleada permite enriquecer neutrófilos a partir de larvas de pez cebra.

Basado en antecedentes previos obtenidos en nuestro laboratorio, optamos por utilizar tratamientos con sulfato de cobre para inducir inflamación por lesión y analizar el transcriptoma de neutrófilos en larvas de pez cebra. Este tratamiento fue escogido entre otros a en base a que: (1) se ha demostrado que induce modulación transcripcional de neutrófilos de pez cebra, y (2): en términos metodológicos, este tratamiento permite la utilización de una cohorte de animales cuantiosa. Esto fue un aspecto extremadamente importante de considerar teniendo en cuenta que para la secuenciación, era necesario contar con una cantidad de ARN mínimo de 200 nanogramos, con un valor de integridad

superior a 7 (RIN > 7.0) para cada réplica biológica a secuenciar. La separación de neutrófilos totales a partir de 100-150 larvas, permitía aislar alrededor de 20.000 células GFP+, las cuales rendían cerca de 200 ng de ARN, de los cuales había que separar al menos 10 ng para la evaluación de su integridad. Con estos antecedentes, en teoría, la realización de 6 experimentos independientes de separación hubiesen sido suficientes para la secuenciación.

Sin embargo, para obtener 3 réplicas biológicas en homeostasis y 3 réplicas biológicas en tratamiento de al menos 200 ng con un valor de RIN superior a 7, fue necesario realizar el experimento de incubación con sulfato de cobre y posterior aislamiento y evaluación del ARN de neutrófilos, 37 veces. Esto se debió principalmente a la dificultad que implicó obtener ARN de buena calidad mediante el aislamiento de neutrófilos por FACS. Estas son células particularmente delicadas de trabajar debido a su contenido intracelular altamente tóxico. Para limitar la degradación de su ARN durante el proceso de separación, las células fueron recibidas directamente en Trizol. Si bien existen otras metodologías para el aislamiento de ARN (*e.g.* columnas de separación por afinidad), este reactivo fue seleccionado entre otros porque era el que permitía obtener un mayor rendimiento en la separación.

A su vez, existían alternativas más sencillas para obtener los 200 ng de ARN a partir de neutrófilos, por ejemplo, mediante la amplificación del ARN total aislado mediante kits enzimáticos comerciales. Sin embargo, estos no generan un producto de amplificación

que sea 100% representativo de las especies que son encontradas en muestras biológicas no amplificadas. Por estos motivos, se optó por realizar el experimento de separación la cantidad de veces que fuesen necesarias para obtener el ARN de calidad y cantidad para la secuenciación sin mayores manipulaciones. En consecuencia, con la metodología empleada, nuestros análisis debiesen ser más precisos y fidedignos de neutrófilos para cada condición.

Para constituir las 6 muestras biológicas para la secuenciación, se seleccionó ARN de alta calidad de experimentos independientes en 3 réplicas biológicas en condiciones de homeostasis (control), y 3 réplicas biológicas en tratamiento con sulfato de cobre (activados) (**Tabla 1** y **Fig. 10 a y b**). Hay que destacar, que en estas condiciones experimentales, las réplicas biológicas son representativas de al menos 200 animales para cada condición.

Para evaluar si en las muestras seleccionadas para la secuenciación se evidenciaba modulación transcripcional de neutrófilos, se analizó mediante qRT-PCR la expresión de los transcritos de *mmp9*, *mpx*, *egfp*, *sox2* y *cxcr4b* en las muestras control versus tratamiento (**Fig. 10 c**). Los resultados indican que los transcritos de la metaloproteína 9 (*mmp9*), mieloperoxidasa (*mpx*) y la proteína fluorescente verde (*egfp*) se evidencian como sobre-representados en el tratamiento con sulfato de cobre. La metaloproteína 9 y la mieloperoxidasa son genes descritos que aumentan su expresión en neutrófilos activados (*Christoffersson y col., 2012*). Los transcritos de *egfp* también se evidencian

sobre-representados debido probablemente a que su expresión está regulada por el promotor de la mieloperoxidasa (*mpx:GFP*). *Cxcr4* evidencia una disminución de su representación en neutrófilos activados. CXCR4 es un receptor que regula la homeostasis de neutrófilos circulantes. Su disminución está asociada a neutrófilos activados, lo que permite su egreso desde el nicho hematopoiético hacia el flujo sanguíneo (*Eash y col., 2009*).

De manera muy interesante, nuestros análisis revelan una disminución de la representación de *Sox2* en neutrófilos activados por sulfato de cobre. *Sox2* ha sido recientemente descrito como un factor fundamental de la respuesta antimicrobial ante una infección. *Sox2* funciona como sensor intracelular de DNA microbial en neutrófilos y su activación induce cascadas de señalización fundamentales para la respuesta antimicrobial frente a *Listeria monocytogenes* (*Xia y col., 2015*). Estos antecedentes sugieren que *Sox2* podría ser un gen diferencialmente expresado en inflamación por lesión versus una infección. Para corroborar esta hipótesis, sin embargo, habría que evaluar la expresión de *Sox2* frente a una infección en neutrófilos de larvas de pez cebra. Estos antecedentes demuestran, no obstante, que las muestras biológicas seleccionadas para la secuenciación evidencian modulación transcripcional de neutrófilos en condiciones de tratamiento con sulfato de cobre.

Para la secuenciación de las muestras mediante RNA-Hiseq se consideraron únicamente los ARN mensajeros. Las secuencias obtenidas de las muestras biológicas fueron

ensambladas y constituidas en librerías utilizando el programa bioinformático Top Hat y el genoma anotado de pez cebra versión N° 9 (Zv9). Las librerías generadas evidenciaron distintos porcentajes de representatividad en el genoma. Las librerías de las réplicas biológicas en tratamiento N° 1 y 3 evidenciaron el menor porcentaje de alineamiento (**Fig. 11 a**), con el resto de las librerías evidenciando un porcentaje de alineamiento mayor a un 77%. Este menor porcentaje de representatividad para las muestras en tratamiento 1 y 3 podría deberse a la presencia de contaminación, en donde un porcentaje de la librería presenta secuencias de transcritos que no alinean en el genoma de pez cebra. Una forma de evaluar el origen del contaminante consiste en contrastar las librerías generadas contra el genoma de distintas especies (*e.g.* bacterias, humanos, etc.). También, la presencia de DNA genómico podría ser responsable que de las muestras en general no tengan un porcentaje de alineamiento mayor a un 90%, considerado dentro de lo normal.

Una evaluación general de términos biológicos funcionales que pueden ser inferidos a partir de las librerías generadas evidencia la existencia de transcritos relacionados a diversos procesos relacionados a la biología de neutrófilos, incluyendo a los procesos de apoptosis, inflamosoma, adhesión, señalización de receptores de tipo Toll, NF- κ B, IL-1b, tráfico de vesículas y metabolismo, entre otros (**Fig. 11b**).

Para realizar un análisis de expresión diferencial de genes expresados en neutrófilos en homeostasis versus activados por tratamiento con sulfato de cobre, las librerías fueron

analizadas con los programas DESeq, cuffdiff y edgeR. Estos programas utilizan distintos criterios para la evaluación, y por ende entregan listas con un número distinto de genes que se revelan como diferencialmente expresados. El análisis por Cuffdiff entrega un total de 277 genes, DESeq entrega 138 genes y EdgeR, el más estricto en su evaluación, entrega sólo 10 genes como diferencialmente expresados (Fig. 12a). No obstante, un análisis de comparación entre las 3 listas revela que al menos 72 genes son revelados como diferencialmente expresados en al menos dos análisis, con los genes ITGAM, URB2, mctp1b y tpst2 apareciendo como diferencialmente expresados bajo los 3 análisis (Fig. 12b). La función de los genes URB2, mctp1b y tpst2 no han sido descritos a la fecha.

ITGAM codifica a la proteína que es una subunidad del complejo funcional alfa-M beta-2, también conocido como el antígeno de macrófagos-1 (Mac-1) o CD11b. La función de esta proteína ha sido ampliamente caracterizada en neutrófilos, y se ha descrito previamente el aumento de su transcripción en neutrófilos activados (*Wittmann y col., 2004*). De manera interesante, esta proteína fue descrita como diferencialmente expresada en neutrófilos en contexto de lesión versus infección en modelo murino. La pérdida de función de la proteína se evidenció esencial para el reclutamiento de neutrófilos en inflamación por lesión, y no en infección (*McDonald y col., 2010*). Nuestros resultados evidencian una modulación en la expresión de MAC-1 en neutrófilos en contexto de lesión en larvas de pez cebra. Sería interesante evaluar si la expresión de MAC-1 en neutrófilos es aumentada en lesión y no infección. A su vez,

sería interesante evaluar si la expresión de CD44, el cual es únicamente expresado en contexto de infección en modelo murino, es a su vez evidenciado como sobre-expresado en contexto de infección y no en lesión en neutrófilos en pez cebra. Estos resultados podrían estar evidenciando mecanismos diferenciales básicos de reclutamiento de neutrófilos en distintos contextos inflamatorios como conservados.

Respecto de nuestros análisis de expresión diferencial, el número de genes revelados como diferencialmente expresados bajo los tres análisis son significativamente diferentes entre si. Adicionalmente, el número de genes que aparecen como diferencialmente expresados son bajos en comparación con el número de genes que aparecen como expresados a nivel de transcrito en homeostasis (miles). Una evaluación más precisa de las librerías generadas para la condición de tratamiento evidencia diferencias significativas entre las tres réplicas biológicas constituidas. Al no ser suficientemente similares entre si, generan inconsistencias en los análisis estadísticos utilizados para la evaluación de expresión diferencial. Ya que las librerías generadas para la condición de homeostasis si son similares entre si, estas diferencias detectadas en las librerías de las muestras en tratamiento probablemente estén reflejando una gran variabilidad biológica de neutrófilos aislados bajo estas condiciones. Ya que la metodología utilizada para separar neutrófilos a partir de larvas de pez cebra no distingue entre neutrófilos activados versus en homeostasis, y los neutrófilos activados en las larvas en tratamiento por sulfato de cobre no corresponden a un 100% del total, la mezcla de neutrófilos en homeostasis y activados en las muestras tratadas probablemente sean las responsables de las

inconsistencias detectadas en las librerías generadas. Para evitar estas inconsistencias en el futuro y poder obtener resultados más precisos, habría que emplear una metodología que permitiese seleccionar y secuenciar el ARN exclusivamente de neutrófilos activados. Sin embargo, hay que considerar también que estos resultados podrían estar evidenciando la existencia de poblaciones heterogéneas de neutrófilos activados bajo estas condiciones.

Ya que (1): en general, más del 77% de las librerías generadas alinean con el genoma de pez cebra, (2): hay más de 70 genes que son revelados como diferencialmente expresados en más de dos criterios de análisis, y (3): dentro de estos se revelen genes descritos previamente como diferencialmente expresados en neutrófilos activados, nuestros resultados sugieren la existencia de un transcriptoma representativo de neutrófilos de peces cebra en condiciones de homeostasis y activados por inflamación por lesión.

Una evaluación más precisa de términos funcionales biológicos que se desprenden de la evaluación diferencial mediante el programa DEseq, de criterio medianamente estricto, evidenciaron la modulación de diversos procesos en neutrófilos activados por tratamiento con sulfato de cobre. La lista incluye procesos relacionados a la respuesta inmune innata, migración celular, metabolismo, tráfico vesicular, metabolismo iónico, procesos mediados por influjos de calcio, apoptosis, vías de señalización NF-kB y receptores de tipo Toll, entre otros. De manera interesante, un 23% de los genes



modulados en neutrófilos activados en inflamación por lesión con sulfato de cobre tienen función desconocida o no descrita a la fecha (**Fig. 13**).

Los procesos de apoptosis, migración, de la vía de señalización NF- κ B y receptores de tipo Toll, metabolismo y tráfico de vesículas constituyen los grupos funcionales de mayor modulación en neutrófilos activados por tratamiento con sulfato de cobre, con una representación para cada proceso mayor al 5% del total modulado.

Los receptores de tipo Toll son los encargados del reconocimiento de DAMPs y PAMPs. La vía de señalización NF- κ B es considerada una vía prototípica de neutrófilos activados en inflamación, regulando diversos procesos biológico celulares (*Lawrence, 2009*). El tráfico vesicular y degranulación corresponde a uno de los procesos característicos de neutrófilos activados (*Krueger y col., 2015*), y la apoptosis es un proceso fundamental en la regulación de la homeostasis de neutrófilos circulantes (*Geering y Simon, 2011*). Estos antecedentes sugieren la regulación de procesos clásicos de neutrófilos activados en nuestras condiciones experimentales.

Un 6% de los genes revelados como diferencialmente expresados apuntan a transcritos asociados a la vía de señalización NF- κ B, la cual entre otras cosas, está vinculada a la sobrevivencia de neutrófilos activados. Por otro lado, un 11% de los genes evidenciados como diferencialmente expresados están asociados a la regulación del proceso apoptótico. Ya que neutrófilos expresan constantemente proteínas inductoras de la apoptosis, sería interesante evaluar si la modulación de estos genes en neutrófilos

activados por sulfato de cobre promueven la inhibición o activación de la apoptosis. De manera interesante, nuestros experimentos evaluando detección de anexina V no evidencian un aumento significativo en la muerte de neutrófilos inducida por tratamiento con sulfato de cobre (**Fig. Suplementaria 1**). Estos resultados coinciden con la noción generalmente aceptada de que neutrófilos activados en inflamación están promovidos a la sobrevida (*Amulic, 2012*).

Nuestros resultados evidencian, a su vez, que un 6% de los genes modulados representan genes asociados a procesos metabólicos. Los procesos metabólicos energéticos que dan sustento a neutrófilos activados han sido escasamente descritos, pero su importancia ha quedado evidenciada en experimentos demostrado que un impedimento en el metabolismo de carbohidratos tiene consecuencias severas en neutrófilos. Por ejemplo, una deficiencia en el transportador de glucosa-6-fosfato en humanos induce neutropenia, con neutrófilos alterados en su capacidad de detonación oxidativa (*respiratory burst*), quimiotaxis y movilización de calcio (*Jun y col., 2014*). De manera interesante, esta deficiencia induce también un aumento en la apoptosis, sugiriendo que un aumento en la actividad glicolítica podría ser promotora de la sobrevida de neutrófilos. La importancia del metabolismo de carbohidratos se evidencia adicionalmente en nuestro análisis, al revelar un 3% de genes asociados a procesos biológicos regulados por insulina en neutrófilos activados.

Procesos asociados a la señalización de calcio representan un 4% de los genes modulados en neutrófilos en tratamiento con sulfato de cobre. Calcio es un regulador fundamental de la respuesta inflamatoria en neutrófilos. El influjo de calcio intracelular regula la iniciación y modulación de la mayoría de las respuestas biológicas funcionales en neutrófilos, incluyendo quimiotaxis, fagocitosis, degranulación y detonación oxidativa (*Naccache, 2013*).

Nuestros resultados evidencian, a su vez, la modulación de genes asociados a la angiogénesis. Hoy es generalmente aceptado el rol que presentan neutrófilos promoviendo la angiogénesis en contextos fisiológicos tanto como patológicos (*Kolaczowska y Kubes, 2012*). De manera interesante, nuestros resultados evidenciaron un aumento en MAC-1 y MMP-9 en neutrófilos activados por sulfato de cobre, los cuales son marcadores distintivos de neutrófilos pro-angiogénicos (**Fig. 10 c**) *Cauwe y col., 2009; Christoffersson y col., 2012*).

En conclusión, nuestros análisis del transcriptoma de neutrófilos en homeostasis versus activados por sulfato de cobre evidencian la modulación de una gran diversidad de procesos asociados a neutrófilos activados ampliamente descritos en la bibliografía. En consecuencia, gracias a estos análisis se cuenta con vasta información detallada respecto de diversos genes que regulan la función de neutrófilos no sólo en condición de homeostasis, sino activados en inflamación por lesión. Con esta información se podría eventualmente analizar la función de genes específicos para diversos procesos biológicos

fundamentales de neutrófilos activados en inflamación, y evaluar, por ejemplo, la contribución de su pérdida de función en distintos contextos inflamatorios. A su vez, consideramos una lista interesante de genes modulados en neutrófilos activados con función desconocida o no descrita a la fecha.

3.- Identificar genes diferencialmente expresados en infección versus lesión.

Olfactomedin 4 (Olfm4) se escogió como un gen interesante de evaluar su expresión en un contexto de infección versus una lesión. La proteína se encuentra expresada en neutrófilos humanos, entre otros, y se ha asociado a la regulación del proceso apoptótico en células mieloides. Basado en estos antecedentes y en nuestros resultados anteriores, conjeturamos que Olfm4 podría ser un gen que regulase procesos de muerte de neutrófilos en un contexto de infección.

Con el objetivo de estudiar su expresión en diversos contextos inflamatorios se buscó el ortólogo de Olfm4 de mamífero en pez cebra. La evaluación de las secuencias de proteína para Olfm4 en varias especies identificó una secuencia en *Danio rerio* como emparentada a la proteína de mamífero (*Uniprot* F1QXE0) (**Fig. 14**). El análisis de identidad entre esta secuencia de proteína y Olfm4 en humanos evidenció un 32% de identidad (**Fig. 15**), sugiriendo que la proteína identificada como F1QXE0 corresponde al ortólogo de Olfm4 de mamífero en pez cebra, y sugieren que su función se ha mantenido conservada.

Un análisis de evaluación de su expresión en larvas de pez cebra evidencian que Olfm4, tal como en neutrófilos humanos, se encuentra expresado en neutrófilos de pez cebra a nivel de transcrito y proteína (**Fig. 16**). Es interesante destacar que la proteína en pez cebra fue detectada mediante la utilización de un anticuerpo generado contra la proteína humana. Estos antecedentes sugieren que el epítipo de reconocimiento se encuentra conservado en ambas especies, permitiendo la utilización del anticuerpo generado contra la proteína humana para estudiar la función de Olfm4 en modelo de pez cebra.

Para evaluar si existe una modulación de su expresión en distintos contextos inflamatorios, se realizaron experimentos de lesión por tratamiento con sulfato de cobre para inducir inflamación por lesión, e infección en la vesícula ótica con *S.tn* para inducir inflamación por infección. Nuestros resultados previos evidenciaron modulación transcripcional de neutrófilos activados por sulfato de cobre (**Fig. 10 c**). Un análisis de expresión de transcritos específicos de neutrófilos activados en inflamación por infección evidencian, a su vez, la modulación de la actividad transcripcional de neutrófilos en contexto de infección inducida con *S.tn* (**Fig. 17 a**).

La evaluación de Olfm4 a nivel de transcrito y proteína en ambos contextos inflamatorios evidenciaron un aumento significativo en su expresión únicamente en inflamación por infección (**Fig. 17 b y c**). Estos resultados sugieren que Olfm4 podría tener una función específica en neutrófilos activados en un contexto de infección. La identificación de una sobre-expresión de Olfm4 en enfermedades de inflamación

intestinal, y en pacientes con infección con *Helicobacter pylori* favorecen esta hipótesis (Liu y col., 2010b).

Aún más, existen antecedentes adicionales que favorecen esta hipótesis. Por ejemplo, experimentos han demostrado que infección por *Helicobacter pylori* en epitelio gastrointestinal induce la activación de los receptores intracelulares NOD1 y NOD2, los cuales promueven la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y Olfm4, el cual en cambio, funciona como un regulador negativo de la vía mediante su interacción inhibitoria con ambos receptores, NOD1 y NOD2. Experimentos realizados en ratones mutantes con pérdida de función de Olfm4, evidenciaron una disminución en la colonización gastrointestinal por *Helicobacter*, lo que estaba correlacionado con un aumento en la infiltración de células inmunes y secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Liu y col., 2010b). Estos antecedentes sugieren que Olfm4 tiene un rol promotor de la resolución de la inflamación tras una infección con *Helicobacter pylori*. Ya que en estos animales mutantes la infiltración de células inmunes se vio incrementada frente a una infección, podría ser a su vez que Olfm4 esté promoviendo la resolución de la inflamación adicionalmente, a través de la inducción de muerte *in situ* de neutrófilos infectados. Experimentos demostrando que la expresión de Olfm4 induce la apoptosis en células mieloides favorecen esta hipótesis (Liu y col., 2010a).

Recordando nuestra conjetura propuesta anteriormente, tejidos sujetos a constante interacción con patógenos bacterianos podrían haber evolucionado estrategias similares a

las del sistema inmune como mecanismo de resistencia frente a una infección. De manera interesante, Olfm4 se ha descrito como constitutivamente expresado en epitelio del tracto gastrointestinal, próstata y médula ósea. Dado que estos tejidos se encuentran en constante recambio celular, sería interesante evaluar si un aumento en la expresión de Olfm4, además de promover muerte celular en neutrófilos, pudiese estar promoviendo la regeneración tisular en tejidos infectados. Promover la regeneración y restauración de la barrera epitelial es fundamental para la contención de la infección. De manera interesante, Olfm4 ha sido descrito como un marcador distintivo de células madre epiteliales del tracto gastrointestinal. Aún más, estudios recientes han demostrado que proteínas conteniendo dominios tipo olfactomedin juegan un rol importante en la regulación del ciclo celular, migración y diferenciación en diversos tipos celulares. Por estos motivos, la sobre-expresión de Olfm4 se ha visto asociada no sólo a enfermedades de inflamación crónica, sino a su vez a la generación de tumores de diversa etiología (*Liu y col., 2010; Guette y col., 2015*).

Dada esta gran diversidad de procesos fundamentales en las que Olfm4 participa, es probable que distintas funciones sean ejercidas en distintos tipos celulares. Cómo esta diversidad de funciones son ejecutadas por Olfm4 constituyen una interrogante. Una posibilidad podría estar en que dependiendo de su nivel de expresión y localización subcelular, sus funciones podrían tener consecuencias distintas. Por ejemplo, el aumento en la expresión de Olfm4 ha evidenciado una capacidad de regulación intracrina mediante su asociación a receptores intracelulares NOD1 y NOD2. Sin embargo, la proteína

también puede ser secretada a nivel de la matriz extra-celular, lo que podría proveer un mecanismo de regulación autocrino y paracrino a nivel celular local. Estas diferencias en su localización subcelular podrían traducirse en diferentes efectos dependiendo del tipo celular estimulado y el receptor activado. De esta forma, se podría explicar la diversidad de funciones que Olfm4 presenta a nivel tisular local, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal.

No obstante, nuestros resultados se restringen a detectar un aumento de la expresión de Olfm4 en neutrófilos en un contexto de infección. Nuestros antecedentes en general sugieren que Olfm4 podría ser un gen que promueve la apoptosis de neutrófilos en el foco de inflamación. Para corroborar esta hipótesis, sin embargo, hay que demostrar que la expresión de Olfm4 en neutrófilos es conducente a muerte celular. Dado nuestros resultados anteriores, sería interesante evaluar si la muerte celular detectada en neutrófilos en infección con *S.tn* ocurre como consecuencia de la expresión de Olfm4. Una forma de evaluar esto incluye la realización de experimentos de pérdida de función de Olfm4. Con el objetivo de realizar estos experimentos generamos peces cebra mutantes para Olfm4 mediante tecnologías CRISPR/Cas9 (Fig. 19). De ser Olfm4 responsable de la muerte de neutrófilos por *S.tn*, en los animales mutantes infectados se debería evidenciar que la muerte de neutrófilos *in situ* está impedida, o retrasada.

Estos resultados evidenciados para Olfm4 se suman a la lista de genes que se han descrito como diferencialmente expresados en neutrófilos en distintos contextos

inflamatorios (*McDonald y Kubes, 2012*). Ya que estas células son altamente citotóxicas tanto a patógenos como a células del hospedero, es relevante estudiar si la pérdida de función de uno de estos genes puede conducir a la generación de inflamación crónica.

Experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio determinaron que una pérdida de función de uno de los reguladores maestros de la homeostasis de neutrófilos, CXCR4b, inducía un aumento en el número de neutrófilos circulantes, y esto inducía un aumento en el número de neutrófilos reclutados tras una lesión por transección de la aleta caudal en larvas de peces cebra. Estos resultados demostraron la importancia de una correcta regulación en el número de neutrófilos circulantes en contextos de inflamación por lesión.

Para evaluar la contribución de la pérdida de función de este receptor en condiciones de inflamación por infección, larvas mutantes para el receptor CXCR4b fueron infectadas con *S.tn* y se registró el número de neutrófilos infiltrados en el tiempo. Nuestros resultados evidencian que la pérdida de función de CXCR4b no presenta diferencias significativas en la cinética de reclutamiento y remoción neutrófilos en infección por *S.tn* (**Fig. 18**). Estos datos sugieren que CXCR4b es innecesario o redundante para una correcta regulación en la infiltración y remoción de neutrófilos en inflamación con *S.tn*.

Estos antecedentes demuestran que la pérdida de función en uno de los mecanismos que limita el número de neutrófilos circulantes induce un aumento significativo en la infiltración de neutrófilos a focos de inflamación por lesión tisular. Esto podría promover

la perpetuación de la inflamación al inducir un daño tisular excesivo. Sería interesante evaluar cómo este aumento en la infiltración de neutrófilos condiciona, por ejemplo, la infiltración subsecuente de macrófagos, o la cinética de regeneración tisular. De manera interesante, el fenotipo de neutrófilos expresando MAC-1, Gr+, MMP-9^{hi}, y CXCR4^{hi} se han descrito como pro-angiogénicos. Adicionalmente, neutrófilos CXCR4^{hi}, son asociados a poblaciones senescentes (*Christoffersson y col., 2012; Krueger y col., 2015*). Estos antecedentes podrían estar dando cuenta de que neutrófilos infiltrados en inflamación por lesión podrían resolver volviendo al flujo sanguíneo, y ser CXCR4 el mecanismo que favorece esta situación. Por ejemplo, dependiendo del tipo de estimulación neutrófilos activados podrían internalizar el receptor, y con el tiempo, su reciclaje a la membrana plasmática podría promover su retorno al flujo vascular y posterior eliminación. Sin embargo, neutrófilos cuya estimulación induzca la degradación de CXCR4 (por ejemplo en infección), podrían impedir su retorno al flujo sanguíneo y promover su eliminación tisular local. Se ha demostrado que dependiendo del estímulo, CXCR4 es internalizado, degradado o reciclado (*Mines y col., 2009; Pelekanos y col., 2014*). Sería interesante evaluar como el tráfico intracelular de CXCR4b en neutrófilos de pez cebra tiene injerencia en el tráfico de neutrófilos circulantes y su supervivencia.

Por otro lado, nuestros resultados evidencian que CXCR4b en cambio, es innecesario o redundante para la correcta infiltración de neutrófilos a focos de infección. Estos antecedentes podrían estar evidenciando la importancia que supone una correcta

regulación en la infiltración de células inmunes a un nicho infeccioso. Un exceso de neutrófilos en un foco de infección, por ejemplo, podría estar promoviendo una destrucción de tejido innecesaria que podría dar fácil acceso a los patógenos a capas más profundas de tejido y favorecer su diseminación. Por estos motivos, la interacción patógeno-hospedero podría haber evolucionado mecanismos redundantes y compensatorios que impidan una infiltración excesiva de neutrófilos frente a una infección, y promuevan la restauración rápida de la barrera epitelial (por ejemplo, a través de la sobre-expresión y secreción de OLFM4).

En general, nuestros resultados en su conjunto evidencian la existencia de distintos mecanismos por los cuales neutrófilos son reclutados y ejecutan sus funciones dependiendo del inductor de la inflamación. A su vez, demuestran que la pérdida de función en uno de estos mecanismos puede modular significativamente el número de neutrófilos infiltrados a focos de inflamación. En base a estos antecedentes decidimos evaluar la contribución de la pérdida de función de moléculas relevantes que regulan el tráfico y remoción de neutrófilos en distintos contextos de inflamación. Con este objetivo, se seleccionaron genes por bibliografía, y se diseñaron herramientas moleculares para generar animales mutantes de los genes seleccionados mediante tecnologías CRISPR/Cas-9 en peces cebra (**Fig. 19**). El estudio de estos animales podría contribuir a la identificación de genes fundamentales en la regulación del tráfico y remoción de neutrófilos en distintos contextos de inflamación.

4.- Establecer xenotransplantes para evaluar la función de neutrófilos de mamífero en larvas de pez cebra.

Nuestros resultados anteriores suman evidencia experimental demostrando la existencia de mecanismos y moléculas conservadas en la regulación de la homeostasis y tráfico de neutrófilos en pez cebra. Sin embargo, para poder generalizar nuestros descubrimientos éstos deben ser corroborados en modelo de mamífero.

Con el objetivo de acelerar el estudio de la hematopoyesis e inmunidad con aplicaciones clínicas se han generado ratones humanizados. Estos animales pueden ser generados entre otros, por ejemplo, mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas a embriones de ratones en estadio temprano de desarrollo (*Shultz y col., 2012*). Estos animales son únicos al permitir el estudio de células humanas en un contexto *in vivo*. Aún más, estos animales son únicos al permitir la evaluación de polimorfismos identificados únicamente en la especie humana que están asociados a la generación de enfermedades de inflamación crónica (*Khor y col., 2011*). El éxito en la supervivencia y diferenciación de las células humanas en el cuerpo de estos animales ha demostrado el grado de conservación de moléculas regulando la hematopoyesis.

Basado en este principio, y con el objetivo de acelerar el estudio de la biología del neutrófilo nos propusimos implementar una metodología para generar peces cebra quiméricos de tejido hematopoyético. La generación de estos animales podría permitir visualizar y evaluar sin mayores intervenciones el tráfico y biología de neutrófilos de mamífero en un contexto *in vivo*.

Con este objetivo implementamos un protocolo que incluye 4 pasos generales: (1) el aislamiento post-mortem de células de médula ósea de ratones, (2): el enriquecimiento de células madre y progenitoras mediante selección negativa, (3): marcaje fluorescente de las células enriquecidas, y (4): el trasplante en el blastodermo de embriones de pez cebra en estadio entre 3 y 5 horas post fertilización (hpf) (**Fig. 20**). Si bien existían alternativas para generar estos animales quiméricos, por ejemplo, mediante el trasplante de las células directamente al flujo sanguíneo, esta metodología limita el número de animales que pueden ser transplantados, y restringe la evaluación a fenómenos post-desarrollo del tejido hematopoyético caudal. Con nuestra estrategia implementada, una persona individual puede transplantar más de 700 animales en 3 horas, lo que genera alrededor de 500 animales viables dentro de los cuales, menos de un 5% evidencia anomalías morfológicas (**Fig. 21**).

Ya que la cantidad de células que pueden ser transplantadas con este método es cuantiosa, realizamos experimentos que descartaron que la tinción celular utilizada para marcar las células murinas se estuviese transfiriendo a las células endógenas, o que estuviesen ocurriendo eventos de fusión entre las células murinas y endógenas (**Fig. 25**). En consecuencia, nuestra metodología constituye un método simple, eficiente y efectivo que permite la generación de un vasto número de animales quiméricos.

Nuestra técnica implementada genera animales con números variables de célula murinas transplantadas en el cuerpo de los embriones. Algunos animales presentan una vasta

cantidad de células murinas, mientras que otros presentan números reducidos (Fig. 22). Esta heterogeneidad en el número de células transplantadas es propia del método, y se debe principalmente a que las agujas de micro-inyección utilizadas para el trasplante no tienen un orificio en el extremo de inyección de diámetro constante. Esto se traduce en una variabilidad en el volumen de inyección a lo largo del proceso (varias agujas de inyección son utilizadas normalmente durante el proceso de trasplante). A su vez, la suspensión de células murinas dentro de la aguja de inyección tienden a variar su concentración por el efecto de gravedad, lo que se traduce en una variabilidad en el número de células inyectadas en función del tiempo.

Si bien esto implica una imprecisión en el número de células transplantadas por embrión, al permitir la generación de animales con un número variable de células murinas, podría facilitar el estudio de distintos fenómenos. Por ejemplo, un número reducido de células murinas podría permitir la evaluación y seguimiento de células individuales durante todo el proceso inflamatorio. Por otro lado, animales con un gran número de células murinas podría facilitar, por ejemplo, la cuantificación robusta y precisa de un proceso de infiltración a focos de inflamación.

La visualización de los animales quiméricos a lo largo del desarrollo evidencia a las células murinas dinámicas, co-localizando con tejidos específicos dentro del cuerpo del embrión desde 1 dpf. La visualización a 1 dpf evidencia a las células localizadas alrededor de los ojos en el cuerpo anterior, y alrededor de la masa celular intermedia en

el cuerpo medio y posterior de los embriones (**Fig. 23**). Ya que más de un 70% de los animales transplantados presenta esta distribución (**Fig. 24**), esto sugiere que las células murinas detectan señales que las hacen co-localizar con estos tejidos.

Uno de los factores que podría estar promoviendo la localización de las células murinas alrededor de los ojos corresponde al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Esta proteína se ha descrito como un factor que induce el reclutamiento de macrófagos tejido residentes en el epitelio en desarrollo en el cuerpo anterior de los embriones de pez cebra (*Herbomel y col., 2001*). A su vez, se ha descrito que la expresión de SDF-1 en el cuerpo anterior es fundamental para el desarrollo de la microglia, células retinales y angiogénesis (*Unoki y col., 2010*). Este factor podría ser uno de los responsables de la localización de las células murinas alrededor de los ojos. SDF-1 es una molécula prototípica asociada a la homeostasis de células hematopoyéticas en su nichos respectivo. Por estas razones, probablemente esta molécula sea a su vez uno de los responsables de la localización de las células murinas en la masa celular intermedia, y posteriormente, en el tejido hematopoyético caudal (THC) en los embriones. Esta hipótesis es reforzada por estudios recientes demostrando que la migración al THC de células sanguíneas cancerígenas humanas xenotransplantadas en larvas de pez cebra, dependen de la expresión de SDF-1, entre otros (*Sacco y col., 2016*). A su vez, nuestros resultados evidencian que las células murinas activamente detectan señales emanadas del THC que las hacen migrar y ser retenidas (**Fig. 24**). Estos resultados sugieren fuertemente que SDF-1 podría ser un componente responsable de

este fenómeno observado, sin embargo, habría que demostrar, a su vez, que es expresado en la masa celular intermedia en estadios más tempranos de desarrollo. Independiente de lo anterior, por supuesto, es probable que otras moléculas estén contribuyendo en este fenómeno.

De manera interesante, las células murinas pudieron ser visualizadas, en algunos casos, dentro de los túbulos pronéfricos y alrededor de los rudimentos del riñón y timo (**Fig. 26**). Esto podría sugerir que algunas células podrían estar siguiendo la ruta de migración de células madre hematopoyéticas para dar origen a la hematopoyesis definitiva (*Bertrand y col., 2008*). Ya que este fenómeno fue evidenciado en baja frecuencia (menos de un 10% de los animales quiméricos), podría estar reflejando la baja representatividad de células madre hematopoyéticas en células de la médula ósea de mamíferos (1 célula entre 10.000 células residentes en la médula ósea). Para corroborar estos antecedentes, sin embargo, habría que utilizar marcadores para evidenciar co-localización de estos órganos con células murinas, y confirmar a su vez que las células murinas en cuestión corresponden a células madre hematopoyéticas. Adicionalmente, habría que descartar que el fenómeno observado pudiese estar ocurriendo en algunos embriones como un fenómeno de eliminación de restos celulares murinos por parte del riñón .

La comparación de las células residentes del THC en animales quiméricos evidencian a las células murinas con niveles de emisión de fluorescencia variables, ligeramente más

grandes que las células endógenas y con morfología similar (**Fig. 27**). A su vez, una evaluación de los tipos celulares colonizando el THC evidencia células murinas con marcadores de proliferación activa, de células hematopoyéticas madre y progenitoras, y de células de linaje granulocítico (**Fig. 28 y 29**). Estos antecedentes sugieren por un lado, que las células madre y progenitoras podrían estar proliferando en embriones de pez cebra. Ya que la sonda vital utilizada para visualizar las células murinas dentro de los embriones permite la evaluación de eventos de proliferación en base a que la división celular divide equitativamente la sonda fluorescente, y a la existencia de células que evidencian niveles de emisión de fluorescencia heterogéneos en la THC, favorecen esta hipótesis. A su vez, en algunos embriones transplantados se puede evidenciar una deformación del THC por lo que bien podría ser un exceso en la proliferación celular local (**Fig. Suplementaria 2**). Esto podría estar ocurriendo como un fenómeno autónomo celular, como podría también estar siendo inducido por moléculas emanadas del THC.

Que las células murinas residentes del THC estén evidenciando marcadores de linaje granulocítico podría deberse a varios factores. Por un lado, nuestro protocolo para aislar células madre y progenitoras es preparativo y no analítico, lo que implica que en el proceso de separación podrían haber células diferenciadas contaminantes transplantadas que podrían haber migrado al THC. Experimentos nuestros han demostrado que células diferenciadas (i.g. neutrófilos) transplantadas mediante esta metodología también migran al el THC (**Fig. Suplementaria 3**). Sin embargo, podría ser también que las células

progenitoras estuviesen diferenciando a células de linaje mieloide en el THC de larvas de peces cebra. Esta hipótesis es sustentada por experimentos recientes demostrando que células madre hematopoyéticas humanas transplantadas se diferencian a linaje mieloide en larva de pez cebra (*Staal y col., 2016*). Esto podría ser posible ya que se ha demostrado que este es fundamentalmente un proceso autónomo celular (*Avellino y col., 2016*). Sin embargo, podría ser también que el THC estuviese liberando moléculas promotoras de la diferenciación. Independiente del caso, nuestros resultados demuestran que la mielopoyésis en células murinas puede ser estudiada *in vivo* mediante esta metodología. Si la mielopoyesis es llevada a completitud, debe ser, sin embargo, evaluado.

Un seguimiento de los animales quiméricos a lo largo del desarrollo evidencia que las células transplantadas pueden ser visualizadas hasta 6 dpf (**Fig. 31**). Nuestros análisis han demostrado que el trasplante de células murinas no impiden la hematopoyesis endógena, y demuestran que las células murinas podrían estar muriendo y siendo reconocidas y eliminadas por macrófagos, y no neutrófilos (**Fig. 30**). Macrófagos han sido descrito como las células clásicas en eliminar células muertas mediante un mecanismo no pro-inflamatorio (*Brouckaert y col., 2004*). Sin embargo, nuestros experimentos de evaluación de muerte celular mediante TUNEL no evidencian números significativos de células en procesos de muerte evaluado a los 3 dpf (**Fig. 28**). Estos resultados en su conjunto sugieren que las células murinas en el tiempo están muriendo y siendo eliminadas por células endógenas. Este fenómeno podría estar siendo influenciado, por ejemplo, por efecto de la temperatura. Nuestros experimentos han

demostrado que un aumento en la temperatura de incubación de las quimeras de 28°C a 30°C evidenció un aumento en la supervivencia de los animales y de las células murinas (datos no mostrados). En base a estos resultados, el trasplante en animales mutantes de células sanguíneas y un aumento de la temperatura de incubación de las quimeras podría favorecer el rendimiento de la generación de estos animales, tanto como la supervivencia de las células murinas en los peces. Bajo nuestras condiciones experimentales, sin embargo, la realización de experimentos en las quimeras deben ser realizados idealmente hasta 4 dpf.

Experimentos visualizando el comportamiento *in vivo* de las células murinas en los animales quiméricos de 1 dpf evidenció a las células murinas migrando a lo largo del vitelo en lo largo de la ruta de macrófagos endógenos primitivos (*Herbomel y col., 1999*) (**Fig. 32**). Esto podría sugerir que las células murinas detectan señales tempranas que las hacen migrar activamente por el vitelo de los embriones. Sin embargo, habría que descartar que las células estén siendo arrastradas pasivamente por los macrófagos endógenos en migración.

La visualización a 2 dpf evidencia a las células murinas en circulación a lo largo de todo el cuerpo de la larva (**Fig. 33**). Su visualización a mayor aumento evidencia a las células murinas en circulación con diferentes velocidades, con algunas células adheridas al endotelio vascular. Estos resultados sugieren que la población de células murinas en circulación es heterogénea, con algunas células expresando moléculas de adhesión

vascular en la membrana plasmática (**Fig. 34**). Esto podría sugerir la existencia de células murinas activadas, por el proceso de aislamiento desde la médula ósea, o por el reconocimiento de moléculas exógenas en el cuerpo del pez, entre otros. Es importante destacar que la adhesión de células sanguíneas al endotelio vascular en mamíferos ocurre en secciones especializadas denominadas arteriolas, las cuales constituyen un nicho propicio para la extravasación de células inmunes a tejidos inflamados. En larvas de pez cebra, la adhesión vascular es observada en arterias y venas principales del organismo. Esto podría deberse principalmente a que estos vasos sanguíneos son lo suficientemente angostos para favorecer el contacto con la pared endotelial. Sin embargo, también podría estar evidenciando que en ese estadio de desarrollo, la vasculatura de las larvas de pez cebra presentan características similares a la de las terminaciones especializadas vasculares en mamífero. Si bien esta es una condición artificial, nuestros resultados sugieren que estos animales quiméricos pueden ser utilizados para evaluar la adhesividad de células murinas expresando distintas moléculas de adhesión al endotelio vascular.

La visualización de las quimeras en el nicho hematopoyético evidencia también a las células murinas dinámicas. La visualización de las células murinas en tiempo real y durante 1,5 horas evidencia la existencia de interacciones activas que retienen a las células murinas en el nicho hematopoyético (**Fig. 35**). Estos resultados demuestran la existencia de moléculas conservadas en la migración y mantención de células hematopoyéticas en el nicho hematopoyético en vertebrados que pueden ser estudiados en modelo de pez cebra.

Para evaluar si las células derivadas de la médula ósea de ratón transplantadas en peces cebra pueden responder a un estímulo inflamatorio realizamos experimentos de infección con *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno humano de alta relevancia clínica (Munoz-Price y col., 2013). Nuestros resultados evidenciaron que las células murinas disminuyen drásticamente sus números en el THC durante 5 horas post infección en comparación con animales no infectados (Fig. 36). Estos resultados podrían sugerir que las células murinas, independiente de su fenotipo, están egresando del THC en respuesta a la infección, tal como previamente se ha descrito en modelo murino (Sugiyama y Nagasawa, 2011; Amulic y col., 2012). Sin embargo, hay que evaluar también la contribución de la activación de células fagocíticas endógenas del THC que pudiesen estar acentuando la eliminación de las células murinas en el nicho hematopoyético en contexto de inflamación.

Nuestros resultados evidencian también que las células murinas tardan tiempo extendido en responder a las señales pro-inflamatorias. Células endógenas son visualizadas infiltradas en el foco de infección en menos de 30 minutos, y sin embargo, las células murinas no se observadas infiltradas al menos dentro de las primeras 5 horas post infección (Fig. 36). Esto podría estar reflejando la existencia de impedimentos que favorezcan la respuesta de las células murinas, como por ejemplo, la disminución de la temperatura (óptimo a 37°C), o moléculas que promuevan la extravasación y degradación de la lámina basal y parénquima. Por otro lado, esto podría deberse principalmente a que, en principio, la mayor parte de las células transplantadas en los

embriones provienen de células de médula ósea madre y progenitoras. La ineficiencia en la respuesta podría estar asociada a la existencia de células con niveles de diferenciación intermedios o incompletos.

No obstante, ya que los animales infectados presentan células murinas en el foco de infección 24 horas post inyección, si bien toman un tiempo extendido en responder, en estas condiciones las células murinas son capaces de detectar y migrar a focos infecciosos (Fig. 37). Adicionalmente, la visualización *in vivo* de una infección óptica en animales quiméricos evidenció a las células murinas interactuando y rastreando células bacterianas, con incluso algunas células evidenciando carga intracelular bacteriana (Fig. 38). Estos antecedentes son sorprendentes de evidenciar dado el fenotipo de las células de origen, y la considerable disminución de la temperatura, y en su conjunto sugieren que las células murinas derivadas de médula ósea son capaces de responder, migrar y fagocitar células bacterianas en un pez cebra.

Si bien existen ciertos inconvenientes y desventajas, como por ejemplo el tiempo extendido que las células toman en responder frente a una infección bacteriana, la eficiencia de la respuesta de estas células en el pez cebra podrían eventualmente ser mejoradas. Por ejemplo, la utilización de animales mutantes de células sanguíneas podrían mejorar la respuesta de las células murinas frente a una infección al no existir competencia de células endógenas. Uno podría a su vez, generar peces transgénicos que favorezcan la respuesta de las células murinas en el pez, por ejemplo, como se ha

realizado en ratones humanizados (*Ito y col., 2012*). A su vez, uno podría eventualmente transplantar células diferenciadas; con esta metodología hemos demostrado que neutrófilos también pueden ser transplantados e igualmente migran hacia el THC en peces cebra. Aún más, estos resultados pueden ser extendidos a células sanguíneas humanas, ampliando la utilización de la técnica para la evaluación de diversos tipos celulares y especies (**Fig. 39**).

Bajo este principio, se vuelve atractivo evaluar si en peces adultos inmunosuprimidos se podría reconstituir la médula de riñón y timo con células hematopoyéticas humanas o murinas. Estos experimentos podrían permitir el estudio de la hematopoyesis definitiva, la evaluación de la conservación de células y moléculas del sistema hematopoyético, y de manera interesante, la dinámica de células de origen linfoide. La existencia de peces cebra mutantes de melanóforos y otros tipos de células pigmentadas (*Casper*) permitirían realizar estos ensayos en un contexto totalmente transparente (*White y col., 2008*).

Estos resultados en su conjunto constituyen pruebas de principio sólidas que establecen que larvas de pez cebra pueden ser utilizadas para estudiar la dinámica de células sanguíneas de mamífero en peces cebra. Ya que se ha demostrado recientemente que células sanguíneas humanas transplanta en pez cebra modulan su programa transcripcional frente a moléculas emanadas en el pez cebra (*Sacco y col., 2016*), nosotros concebimos que esta técnica puede ser utilizada para la evaluación de la contribución de genes autónomos o no autónomos celulares en diversos procesos tales

como la migración, inducción de tolerancia e interacciones patógeno-hospedero, entre otros. Finalmente, la eficiencia del método implementado podría posibilitar la evaluación a gran escala de drogas modificando diversos procesos, o ensayos específicos para pacientes con una metodología experimental rápida y sencilla y de menor costo.

VII. CONCLUSIONES

1. Para un mismo número de neutrófilos reclutados, la respuesta a una infección es rápida mientras que a una lesión es prolongada.
2. La muerte *in situ* de neutrófilos ocurre al inicio de la infiltración en inflamación por infección y no en lesión.
3. Se describió el transcriptoma representativo de neutrófilos en homeostasis y activados en inflamación por lesión.
4. Se identificó a *Olfm4* como un gen diferencialmente expresado en neutrófilos activados en inflamación por infección versus lesión.
5. Se determinó que *CXCR4b* es innecesario o redundante para el reclutamiento de neutrófilos en inflamación por infección versus lesión.
6. Se implementó una metodología simple, eficiente y robusta, que permite la generación de embriones de peces cebra quiméricos con células hematopoyéticas de mamífero, los cuales pueden ser utilizados para la evaluación y visualización *in vivo* y en tiempo real de procesos relacionados a la hematopoyesis, inmunidad y enfermedades infecciosas de células de mamífero.

VIII. Reconocimientos y colaboraciones

- Para la realización de los experimentos de evaluación del transcriptoma de neutrófilos se contó con la colaboración del Dr. Leonardo Valdivia, *University College London*, y la Dra. Viviana Gallardo y el Dr. Shawn Burgess del *National Institutes of Health, N.I.H.*
- El procesamiento y análisis de datos del *RNA-seq* de neutrófilos fueron realizados en colaboración con Natalia Rojas y el Dr. Alex Di Genova del Centro de modelamiento matemático (CMM) y Centro de Regulación del Genoma (CRG) de la Universidad de Chile.
- La realización de los experimentos de evaluación de *Olfm4* y *CXCR4b* se realizó en colaboración con el Dr. (c) Oscar Peña, *University College London*, y la estudiante de pregrado Salomé Muñoz, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- La generación de animales quiméricos fue realizada en colaboración con la Dra. Anne Clatworthy, Dr. Christoph Ernst, Dr. Humberto Jijon y la Dra. Deborah Hung del *Department of Molecular Biology, Center for Computational and Integrative Biology* y *Department of Microbiology and Immunobiology, Massachusetts General Hospital*, y del Dr. Elliott J. Hagedorn, Dr. Jonathan E. Henninger, Dr. Brian Li, Dra. Raquel Riquelme y el Dr. Leonard I. Zon del *Stem Cell Program and Division of Hematology/Oncology, Boston Children's Hospital and Dana-Farber Cancer Institute, Howard Hughes Medical Institute, Harvard Stem Cell Institute, Harvard Medical School*.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. **Abraham C, Cho JH. (2009).** Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 36:2066-78.
2. **Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM. (2013).** Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther.* 139:189-212.
3. **Amulic, Borko, Christel Cazalet, Garret L. Hayes, Kathleen D. Metzler, and Arturo Zychlinsky. (2012).** Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30:459-89.
4. **Avellino R, Havermans M, Erpelinck C, Sanders MA, Hoogenboezem R, van de Werken HJ, Rombouts E, van Lom K, van Strien PM, Gebhard C, Rehli M, Pimanda J, Beck D, Erkeland S, Kuiken T, de Looper H, Gröschel S, Touw I, Bindels E, Delwel R. (2016).** An autonomous CEBPA enhancer specific for myeloid-lineage priming and neutrophilic differentiation. *Blood. pii: blood-2016-01-695759.*
5. **Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. (2011).** Cell death and infection: A double-edged. *J Cell Biol. Dec 12;195(6): 931-42.*
6. **Bannenberg G, Serhan CN. (2010).** Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta.* 1801(12):1260-73.
7. **Barton, M. Gregory. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 118(2): 413-420.
8. **Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. (2012).** Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol. (11): 120134.*
9. **Beuzon, C.R.; Meresse, S.; Unsworth, K.E.; Ruiz-Albert, J.; Garvis, S.; Waterman, S.R.; Ryder, T.A.; Boucrot, E.; Holden, D.W. (2000).** Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J, 19 (13), 3235-3249.*
10. **Benard EL, van der Sar AM, Ellett F, Lieschke GJ, Spaink HP, Meijer AH. (2012).** Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J Vis Exp. Mar 15;(61). pii: 3781*

11. **Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, et al. (2001)** Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*; 98:643e51.
12. **Bobe, J. and Goetz, F. W. (2001).** Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 475-481.
13. **Bertrand JY1, Kim AD, Teng S, Traver D. (2008)** CD41+ cmyb+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Development.* 135(10):1853-62.
14. **Borregaard N. (2010).** Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity.* 2010 Nov 24;33(5):657-70.
15. **Bratton DL, Henson PM. (2011).** Neutrophil clearance: when the party is over, clean- up begins. *Trends Immunol.* 32(8):350-7.
16. **Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu MN, Haegeman G, D'Herde K, Vandenabeele P. (2004)** Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell.* Mar;15(3):1089-100.
17. **Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. (2006).** Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 368(9530):157- 69.
18. **Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, Stone PC, Salmon M, Matharu NM, Vohra RK, Nash GB, Rainger GE. (2006).** Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol.* 79(2):303-11.
19. **Bueno, S.M.; Tobar, J.A.; Iruretagoyena, M.I.; Kalergis, A.M. (2005).** Molecular interactions between dendritic cells and Salmonella: escape from adaptive immunity and implications on pathogenesis. *Crit Rev Immunol.*, 25 (5), 389-403.
20. **Cauwe B, MartensE, ProostP, Opdenakker G. (2009).** Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr Biol (Camb)*;1(5-6):404-426.
21. **Casadevall A.** Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:19-33.

22. **Chen GY, Nuñez G. (2010).** Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* (12):826-37.
23. **Clemmensen SN, Bohr CT, Rørvig S, Glenthøj A, Mora-Jensen H, Cramer EP, Jacobsen LC, Larsen MT, Cowland JB, Tanassi JT, Heegaard NH, Wren JD, Silahatoglu AN, Borregaard N. Clemmensen SN¹, Bohr CT, Rørvig S, Glenthøj A, Mora-Jensen H, Cramer EP, Jacobsen LC, Larsen MT, Cowland JB, Tanassi JT, Heegaard NH, Wren JD, Silahatoglu AN, Borregaard N. (2012).** Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J Leukoc Biol;* 91(3): 495-500.
24. **Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. (1977).** Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 24;270(5635):347-9.
25. **Colucci-Guyon E, Tinevez JY, Renshaw SA, Herbomel P. (2011).** Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J Cell Sci;*124(Pt 18):3053-9.
26. **Cotran RS, Kumar V, Collins T. (1999).** Robbins Pathologic Basis of Disease. *WB Saunders: Philadelphia; p1425.*
27. **Coughlan AM, Freeley SJ, Robson MG. (2012).** Humanised mice have functional human neutrophils. *J Immunol Methods;* 385(1-2):96-104.
28. **Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, Brissova M, Powers AC, Opdenakker G, Phillipson M. (2012).** VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood. Nov 29;*120(23):4653-62.
29. **d'Alençon CA, Pena OA, Wittmann C, Gallardo VE, Jones RA, Loosli F, Liebel U, Grabher C, Allende ML. (2010).** A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol.* 8:151.
30. **Deng Q, Harvie EA, Huttenlocher A. (2012).** Distinct signalling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury. *Cell Microbiol.* 14(4):517- 28.
31. **Dotta L, Tassone L, Badolato R. (2011).** Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med;*11(4):317-25.

32. **Eash** KJ, Means JM, White DW, Link DC. (2009) CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*;113(19):4711-9.
33. **El Kebir** D, Filep JG. (2010). Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal*. 10:1731-48.
34. **Ellett** F., Pase L., Hayman J. W., Andrianopoulos A., Lieschke G. J. (2011). Mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* 117, e49-e56. doi:10.1182/blood-2010-10-314120.
35. **Egger** G, Dixon J. (2014). Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*.;2014:731685.
36. **Fink**, S. y Cookson, B. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and immunity*, Apr., p. 1907-1916.
37. **Fink**, S. y Cookson, B. (2007). Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. *Cellular Microbiology* 9(11), 2562-2570.
38. **Fournier** BM, Parkos CA. (2012). The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. (4):354-66.
39. **Fox** S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*. 2(3):216-27.
40. **Frankenberg** T, Kirschnek S, Häcker H, Häcker G. (2008). Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria. *Eur J Immunol*. Jan;38(1):204-15.
41. **Fridlender** ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, et al. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16: 183-194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017
42. **Gaines** P, Chi J, Berliner N. (2005). Heterogeneity of functional responses in differentiated myeloid cell lines reveals EPRO cells as a valid model of murine neutrophil functional activation. *J Leukoc Biol*. 77(5):669-79.

43. **Garlichs** CD, Eskafi S, Cicha I, Schmeisser A, Walzog B, Raaz D, Stumpf C, Yilmaz A, Bremer J, Ludwig J, Daniel WG. (2004). Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes. *J Leukoc Biol*; 75(5):828-35.
44. **Geering** B. y Simon H.U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death and Differentiation* 18, 1457–1469.
45. **Goldsmith** JR, Jobin C. (2012). Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology. *J Biomed Biotechnol*. 817341.
46. **Guiney**, D.G. (2005). The Role of Host Cell Death in Salmonella Infections. *CTMI* 289:131–150.
47. **Guette** C, Valo I, Vétillard A, Coqueret O. (2015). Olfactomedin-4 is a candidate biomarker of solid gastric, colorectal, pancreatic, head and neck, and prostate cancers. *Proteomics Clin Appl*; 9(1-2):58-63.
48. **Grasl-Kraupp** B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. May;21(5):1465-8.
49. **Gray** C, Loynes CA, Whyte MK, Crossman DC, Renshaw SA, Chico TJ. (2011). Simultaneous intravital imaging of macrophage and neutrophil behaviour during inflammation using a novel transgenic zebrafish. *Thromb Haemost*. 105(5):811-9.
50. **Grayfer**, L. and Belosevic, M. (2009). Molecular characterization of novel interferon gamma receptor 1 isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) and goldfish (*Carassius auratus* L.). *Mol. Immunol*. 46, 3050-3059.
51. **Hallett** JM, Leitch AE, Riley NA, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. (2008). Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 29(5):250-7.
52. **Hampton** HR, Bailey J, Tomura M, Brink R, Chtanova T. (2015). Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat Commun*; 6:7139.
53. **Hauert** AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. (2002). Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol*. 34(7):838-54.

54. **Hausmann M. (2010).** How Bacteria-Induced Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells Contributes to Mucosal Inflammation. *Int J Inflam. Jul 6;2010:574568. doi: 10.4061/2010/574568.*
55. **Hasenberg A, Hasenberg M, Männ L, Neumann F, Borkenstein L, Stecher M, Kraus A, Engel DR, Klingberg A, Seddigh P, Abdullah Z, Klebow S, Engelmann S, Reinhold A, Brandau S, Seeling M, Waisman A, Schraven B, Göthert JR, Nimmerjahn F, Gunzer M. (2015).** Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods; 12(5):445-52.*
56. **Hashim, S.; Mukherjee, K.; Raje, M.; Basu, S.K.; Mukhopadhyay, A. (2000).** Live Salmonella modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem, 275 (21), 16281-16288.*
57. **Henry KM, Loynes CA, Whyte MK, Renshaw SA. (2013).** Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *J Leukoc Biol. [Epub ahead of print].*
58. **Herbomel P, Thisse B, Thisse C. (1999).** Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development 1999;126:3735e45.*
59. **Herbomel P, Thisse B, Thisse C. (2001).** Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol; 238(2):274-88.*
60. **Huang H, Zhang B, Hartenstein PA, Chen JN, Lin S. (2005).** NXT2 is required for embryonic heart development in zebrafish. *BMC Dev. Biol.;5:7.*
61. **Jawad I, Lukšić I, Rafnsson SB. (2012).** Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health. (1):10404.*
62. **Jun HS, Weinstein DA, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. (2014).** Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood; 123(18):2843-53.*
63. **Kennedy AD, DeLeo FR. (2009).** Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res. 43(1-3):25-61.*
64. **Khor B, Gardet A, Xavier RJ. (2011).** Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature. 474(7351):307-17.*

65. **Kolaczowska E, Kubes P. (2012).** Angiogenic neutrophils: a novel subpopulation paradigm. *Blood*. 120(23):4455-7.
66. **Kobayashi, Yoshiro. (2015).** Neutrophil biology: and up-date. *EXCLI Journal*; 14:220-227 – ISSN 1611-2156.
67. **Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, Benarafa C, Roos D, Skokowa J, Hartl D. (2015).** Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog. Mar 12;11(3):e1004651.*
68. **Kolaczowska E, Kubes P. (2012).** Angiogenic neutrophils: a novel subpopulation paradigm. *Blood*; 120(23):4455-7.
69. **Kumar, V., Cotran, (2003).** R. S. & Robbins, S. L. *Robbins Basic Pathology (Saunders).*
70. **Labbé K. and Saleh M. (2011).** Pyroptosis: A Caspase-1-Dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection. *I. Couillin et al. (eds.), The Inflammasomes, Progress in Inflammation Research, 17 DOI 10.1007/978-3-0348-0148-5_2, Springer Basel AG,*
71. **Laing, K. J., Purcell, M. K., Winton, J. R. and Hansen, J. D. (2008).** A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC Evol. Biol.* 8, 42.
72. **Lam SH, Chua HL, Gong Z, Wen Z, Lam TJ, Sin YM. (2002).** Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. *Developmental Dynamics* 2002;225:87e94.
73. **Lawrence T. (2009).** The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Dec;1(6):a001651.
74. **Lekstrom-Himes, J. A., and Gallin, J. I. (2000).** Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 343, 1703–14.
75. **Li P, Lahvic JL, Binder V, Pugach EK, Riley EB, Tamplin OJ, Panigrahy D, Bowman TV, Barrett FG, Heffner GC, McKinney-Freeman S, Schlaeger TM, Daley GQ, Zeldin DC, Zon LI. (2015).** Epoxyeicosatrienoic acids enhance embryonic haematopoiesis and adult marrow engraftment. *Nature* 523, 468–471.

76. **Lieschke, G.J., Oates, A.C., Crowhurst, M.O., Ward, A.C., and Layton, J.E. (2001).** Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98, 3087–3096.
77. **Lieschke, G. J. and Trede, N. S. (2009).** Fish immunology. *Curr. Biol.* 19, R678-R682.
78. **Link, D.C., (2005).** Neutrophil homeostasis: a new role for stromal cell-derived factor-1. *Immunol. Res.* 32, 169–78.
79. **Liongue, C., Hall, C. J., O'Connell, B. A., Crosier, P. and Ward, A. C. (2009).** Zebrafish granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling promotes myelopoiesis and myeloid cell migration. *Blood* 113, 2535-2546.
80. **Lister JA, Robertson CP, Lepage T, Johnson SL, Raible DW. (1999).** Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development.* Sep;126(17):3757-67.
81. **Liu W, Lee HW, Liu Y, Wang R, Rodgers GP. (2010a).** 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.* Dec 2;116(23):4938-47.
82. **Liu W, Yan M, Liu Y, Wang R, Li C, Deng C, Singh A, Coleman WG Jr, Rodgers GP. (2010b).** Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 15;107(24):11056-61.
83. **López-Muñoz, A., Sepulcre, M. P., Roca, F. J., Figueras, A., Meseguer, J. and Mulero, V. (2011).** Evolutionary conserved pro-inflammatory and antigen presentation functions of zebrafish IFN γ revealed by transcriptomic and functional analysis. *Mol. Immunol.* 48, 1073-1083.
84. **Loynes CA, Martin JS, Robertson A, Trushell DM, Ingham PW, Whyte MK, Renshaw SA. (2010).** Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *J Leukoc Biol.* Feb;87(2):203-12.
85. **Lucas, C.D., Allen, K. C., Dorward, D. A., Hoodless, L. J., Melrose, L. A., Marwick, J. A., Tucker, C. S., Haslett, C., Duffin, R., Rossi, A. G. (2013).** Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway. *FASEB J.* 27, 000 – 000.

86. Luo HR, Loison F. (2008). Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol.* Apr;83(4):288-95.
87. Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–31.
88. Masumoto, J., Zhou, W., Chen, F. F., Su, F., Kuwada, J. Y., Hidaka, E., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Ngo-Hazelett, P. et al. (2003). Caspy, a zebrafish caspase, activated by ASC oligomerization is required for pharyngeal arch development. *J. Biol. Chem.* 278, 4268-4276.
89. Majno, G. & Joris, I. *Cells, Tissues and Disease* (Oxford Univ. Press, 2004).
90. Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A. (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol.* 80(6):1281-8.
91. McDonald, B., McAvoy, E. F., Lam, F., Gill, V., de la Motte, C., Savani, R. C., and Kubes, P. (2008). Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med* 205, 915–27.
92. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 330(6002):362-6.
93. McDonald B, Kubes P. (2011). Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J Mol Med.* 89(11): 1079-88.
94. McDonald B, Kubes P. (2012). Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. *Toxicol Pathol.* 40(2):157-65.
95. McGeer PL, McGeer EG. (2004). Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci.* Dec;1035:104-16.
96. McGrath EE, Marriott HM, Lawrie A, Francis SE, Sabroe I, Renshaw SA, Dockrell DH, Whyte MK. (2011). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates inflammatory neutrophil apoptosis and enhances resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 90(5):855-65.

97. **McMillen TS, Heinecke JW, LeBoeuf RC. (2005).** Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. *Circulation* May 31;111(21):2798-804.
98. **Meeker ND, Trede NS. (2008).** Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol.* 32(7):745-57.
99. **Medina C, Royo JL. (2013).** Zebrafish as a model organism to study host-pathogen interactions. *Methods. pii: S1046-2023(13)00116-3.*
100. **Medzhitov, Ruslan (2008).** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454.
101. **Medzhitov, Ruslan. (2010).** Inflammation: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 140.
102. **Menezes, G. B., Lee, W. Y., Zhou, H., Waterhouse, C. C., Cara, D. C., and Kubes, P. (2009).** Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol* 183, 7557–68.
103. **Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E., Wewers, M.D., and Aderem, A. (2010).** Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 11, 1136–1142.
104. **Millius A, Weiner OD.** Manipulation of neutrophil-like HL-60 cells for the study of directed cell migration. (2010). *Methods Mol Biol.* 591:147-58.
105. **Mines MA, Goodwin JS, Limbird LE, Cui FF, Fan GH. (2009).** Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK activation. *J Biol Chem.* Feb 27;284(9):5742-52.
106. **Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. (2013).** Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* Sep; 13(9):785-96
107. **Naccache, P. (2013).** Signalling in Neutrophils: A Retro Look. ISRN Physiology. Article ID 986320.

108. **Nathan, C. (2006).** Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173–82.
109. **Nathan, C. (2002).** Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852.
110. **Nathan C, Ding A. (2010).** Nonresolving Inflammation. *Cell. Mar 19;140(6):* 871-82.
111. **Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. (2009).** A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature ;459(7249):996- 9.*
112. **Novoa B, Figueras A. (2012).** Zebrafish: Model for the Study of Inflammation and the Innate Immune Response to Infectious Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 946:253-75.
113. **Oehlers, S. H., Flores, M. V., Hall, C. J., O’Toole, R., Swift, S., Crosier, K. E. and Crosier, P. S. (2010).** Expression of zebrafish cxcl8 (interleukin-8) and its receptors during development and in response to immune stimulation. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 352-359.
114. **Oehlers, S. H., Flores, M. V., Hall, C. J., Swift, S., Crosier, K. E. and Crosier, P. S. (2011).** The inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility genes NOD1 and NOD2 have conserved anti-bacterial roles in zebrafish. *Dis. Model. Mech.* 4, 832-841.
115. **Paik EJ, Zon LI. (2010).** Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol.;*54(6-7):1127-37.
116. **Pelekanos RA, Ting MJ, Sardesai VS, Ryan JM, Lim YC, Chan JK, Fisk NM. (2014).** Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. *BMC Cell Biol.* May 16;15:15.
117. **Peri, Francisca. (2010).** Breaking ranks: how leukocytes react to developmental cues and tissue injury. *Curr Opin Genet Dev.*20(4):416-9.
118. **Peterson LW, Artis D. (2014).** Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol;*14(3):141-53. doi: 10.1038/nri3608.
119. **Phillipson M, Kubes P. (2011).** The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.;* 17(11):1381-90.

120. **Pober, J. S. & Sessa, W. C. (2007).** Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev. Immunol.* 7, 803–815.
121. **Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK. (2006).** And transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood.* 108(13):3976-8.
122. **Renshaw SA, Trede NS. (2012).** A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis Model Mech;* 5(1):38-47.
123. **Robertson AL, Holmes GR, Bojarczuk AN, Burgon J, Loynes CA, Chimen M, Sawtell AK, Hamza B, Willson J, Walmsley SR, Anderson SR, Coles MC, Farrow SN, Solari R, Jones S, Prince LR, Irimia D, Rainger GE, Kadirkamanathan V, Whyte MK, Renshaw SA. (2014).** A zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism. *Sci Transl Med.* Feb 26;6(225):225ra29.
124. **Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. (2010).** The Sterile Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol.* 28:321-42.
125. **Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, Strowig T, Gearty SV, Teichmann LL, Saito Y, Marches F, Halene S, Palucka AK, Manz MG, Flavell RA.** Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol.* 2014 Apr;32(4):364-72.
126. **Sacco A, Roccaro AM, Ma D, Shi J, Mishima Y, Moschetta M, Chiarini M, Munshi N, Handin RI, Ghobrial IM. (2016).** Cancer Cell Dissemination and Homing to the Bone Marrow in a Zebrafish Model. *Cancer Research* 76 (2); 1–9.
127. **Sadik CD, Kim ND, Luster AD. (2011).** Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* Oct;32(10):452-60.
128. **Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. (1989).** Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest;* 83(3):865-75.
129. **Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. (2003).** Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care.* (4):291- 307.
130. **Serhan CN. (2010).** Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol.* 177(4):1576-91.

131. **Serhan, C. N. (2007)**. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 101–137
132. **Serhan, C. N. & Savill, J. (2005)**. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* **6**, 1191–1197
133. **Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV and Greiner DL. (2012)**. *Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges*. *Nat Rev Immunol.* Nov;12 (11):786-98
134. **Silva MT. (2010)**. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J Leukoc Biol.* 89(5):675-83.
135. **Smith, A.C.; Heo, W.D.; Braun, V.; Jiang, X.; Macrae, C.; Casanova, J.E.; Scidmore, M.A.; Grinstein, S.; Meyer, T.; Brumell, J.H. (2007)**. A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Cell Biol,* 176 (3), 263-268.
136. **Staal FT , Spaink HP and Fibbe WE. (2016)**. Visualizing human HSC trafficking in vivo using a zebrafish xenograft model. *Stem Cells Dev.* Feb 15;25(4):360-5
137. **Starnes TW, Huttenlocher A. (2012)**. Neutrophil Reverse Migration Becomes Transparent with Zebrafish. *Adv Hematol.* 398640.
138. **Sullivan C, Kim CH. (2008)**. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol.* (4):341-50.
139. **Sugiyama T, Nagasawa T. (2011)**. Emergency evacuation! Hematopoietic niches induce cell exit in infection. *Immunity.* Apr 22;34(4):463-5.
140. **Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. (2004)**. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood.* Jul 15;104(2):565-71.
141. **Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. (2001)**. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Oct;281(4):L913-21.
142. **Swirski FK, Nahrendorf M. (2013)**. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science.* 339(6116):161-6.

143. **Tabas I, Glass CK. (2013).** Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 339(6116):166-72.
144. **Torraca V, Masud S, Spaink HP, Meijer AH. (2014).** Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Dis_Model Mech*. Jul;7(7):785-97.
144. **Traver D, Herbomel P, Patton EE, Murphey RD, Yoder JA, Litman GW, et al. (2003).** The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Advances in Immunology*; 81:253e330.
146. **Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. (2004).** The Use of Zebrafish to Understand Immunity. *Immunity*. (4):367-79.
147. **Uller L, Persson CG, Erjefält JS. (2006).** Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both?. *Trends Pharmacol.;* 27(9):461-6.
148. **Unoki N, Murakami T, Nishijima K, Ogino K, van Rooijen N, Yoshimura N. (2010).** SDF-1/CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul;51(7):3362-71.
149. **van der Sar, A. M., Stockhammer, O. W., van der Laan, C., Spaink, H. P., Bitter, W. and Meijer, A. H. (2006).** MyD88 innate immune function in a zebrafish embryo infection model. *Infect. Immun*. 74, 2436-2441.
150. **Voskoboynik A, Norma F Neff, Debashis Sahoo, Aaron M Newman, Dmitry Pushkarev, Winston Koh, Benedetto Passarelli, H Christina Fan, Gary L Mantalas, Karla J Palmeri, Katherine J Ishizuka, Carmela Gissi, Francesca Griggio, Rachel Ben-Shlomo, Daniel M Corey, Lolita Penland, Richard A White, III, Irving L Weissman,* and Stephen R Quake. (2013).** The genome sequence of the colonial chordate, *Botryllus schlosseri*. *eLife.*; 2: e00569.
151. **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.
152. **White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessling W, Burns CE, Zon LI. (2008).** Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*. Feb 7;2(2):183-9.
153. **Westerfield, M. (2000).** The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*) 4th ed. *University of Oregon Press*.

154. **Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, Fröhlich D. (2004).** Cytokine upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. *Cytometry A*. Jan;57(1):53-62.
155. **Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA, Nourshargh S. (2011).** The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol*. 12(8):761-9.
156. **Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. (2010).** Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 49(9):1618-31.
157. **Wittmann C., Reischl M., Asmi H., Mikut R., Liebel U., Grabher C., (2012).** Facilitating drug discovery: an automated high-content inflammation assay in zebrafish. *J. Vis. Exp.* (65), e4203, DOI: 10.3791/4203.
158. **Xia P, Wang S, Ye B, Du Y, Huang G, Zhu P, Fan Z. (2015).** Sox2 functions as a sequence-specific DNA sensor in neutrophils to initiate innate immunity against microbial infection. *Nat Immunol*. Apr;16(4):366-75.
159. **Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR. (2003).** Crohn's disease: innate immunodeficiency?. *World J Gastroenterol*. 12(42):6751-5.
160. **Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. (2007).** Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 13(42):5577-80.
161. **Zheng Y, Gardner SE, Clarke MC. (2011).** Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (12):2781-6.
162. **Zitvogel L. y Kroemer G. (2008).** The immune response against dying tumor cells: avoid disaster, achieve cure. *Cell Death and Differentiation* 15, 1-2; doi: 10.1038/sj.cdd.4402267.

X. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

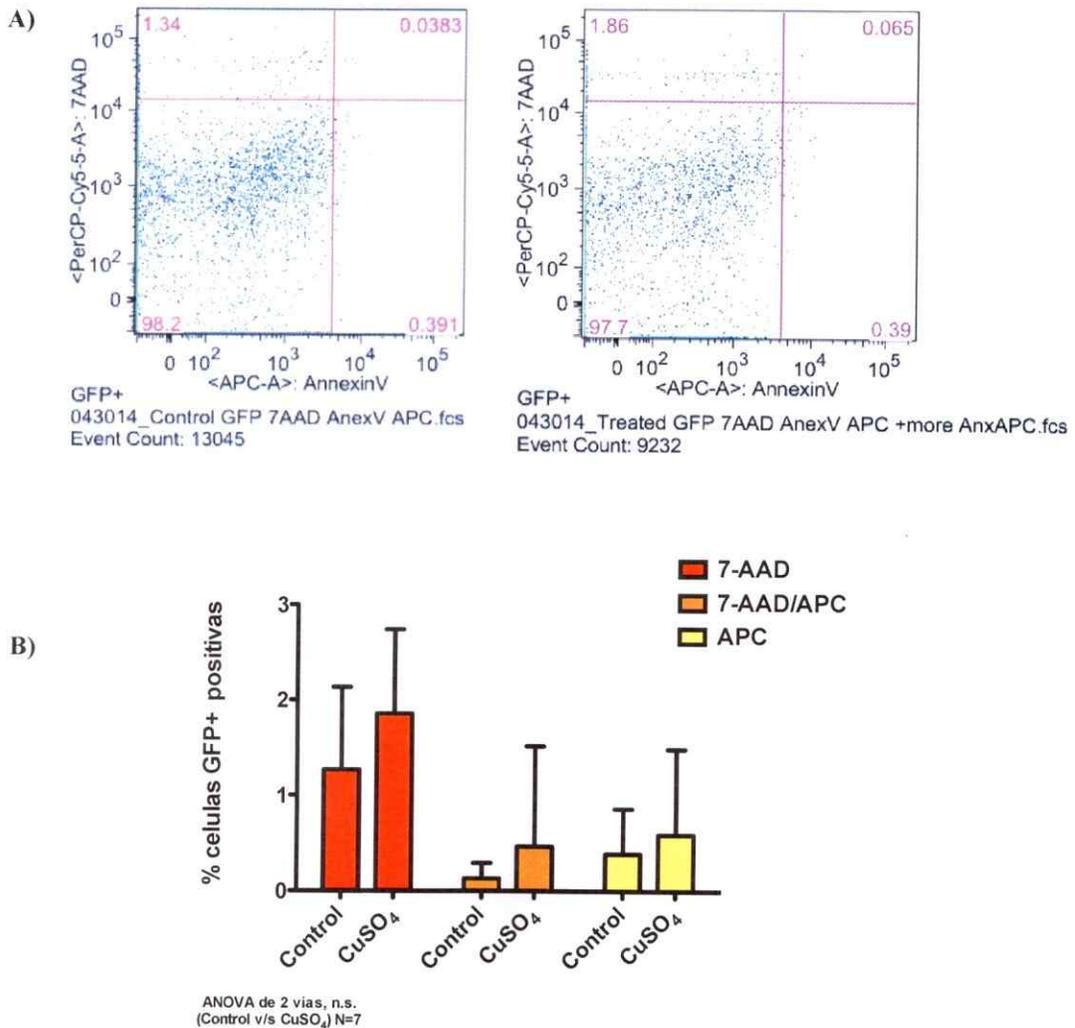


Figura suplementaria 1. Inflamación estéril inducida por citotoxicidad por tratamiento con CuSO₄ no evidencia un aumento significativo en la detección de neutrófilos en apoptosis. 100 larvas *tg(mpx:GFP)* de 3 dpf fueron incubadas con CuSO₄ 50 uM por 2 horas. Post tratamiento se preparó una suspensión celular de larvas completas, la cual fue incubada con 7-AAD y Anexina-V, y posteriormente analizada por citometría de flujo. **A)** Gráficos representativos de la población total de células GFP⁺ del control sin tratamiento (izquierda) y tratado con CuSO₄ (derecha). **B)** Análisis comparativo entre el control versus el tratamiento de 7 experimentos independientes.

Nacre^{-/-} + CMO

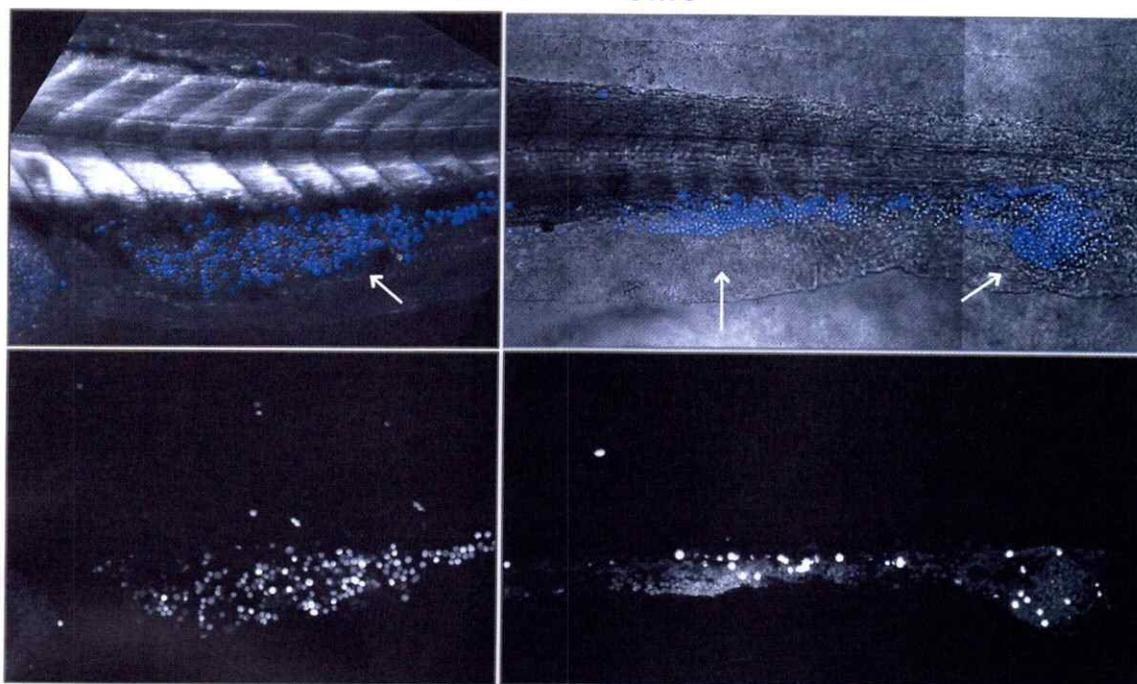


Figura suplementaria 2. Exceso de células murinas residentes en el tejido hematopoiético caudal genera deformación local del tejido y cuerpo posterior de embriones de pez cebra. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) fueron transplantados con células murinas de médula ósea. Imágenes confocales con proyecciones de z-stacks de 2 embriones con exceso de células murinas en el tejido hematopoiético caudal evidenciando deformación local (flechas blancas).

nacre^{-/-}, *flk:dsred* *cola* + CMO

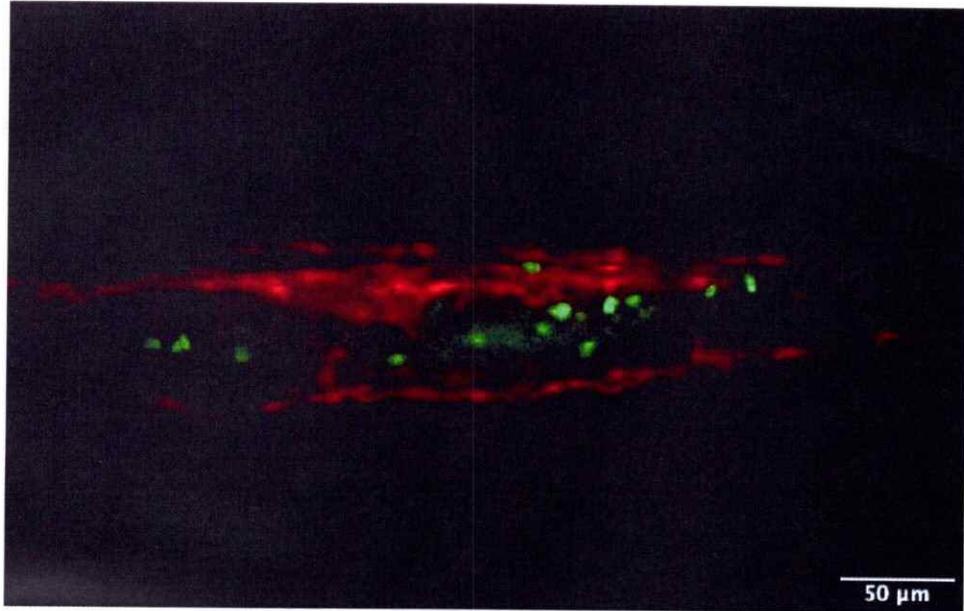


Figura suplementaria 3. Neutrófilos murinos de médula ósea co-localizan con el tejido hematopoyético caudal en embriones de 2 dpf. Embriones de pez cebra mutantes para melanóforos (*nacre*^{-/-}) y reporteros de vasculatura *tg(flk:dsred)* fueron transplantados con neutrófilos murinos de médula ósea (sonda CFSE verde), y visualizados mediante microscopía confocal.