



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

“Rol de los receptores Cxcr2 y Gcsfr en la migración de neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético a los vasos sanguíneos en pez cebra”

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Director de tesis:

Dra. Carmen Gloria Feijóo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad: Andrés Bello

Karina Bravo Tello
Santiago, Chile.
Enero, 2018.



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Rol de los receptores Cxcr2 y Gcsfr en la migración de neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético a los vasos sanguíneos en pez cebra

Karina Bravo Tello

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión de la Directora de Tesis Dra Carmen Gloria Feijóo, en el laboratorio de Inmunología en Peces, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello. Ha sido aprobado por los miembros de la Comisión de Seguimiento y Evaluación, Dra. Pilar Ulloa y Dr. Rodrigo Pacheco.

Dra. Carmen Gloria Feijóo
Directora de Tesis

Dra. Pilar Ulloa
Comisión de Tesis

Dr. Rodrigo Pacheco
Comisión de Tesis

Santiago-Chile
2018

Agradecimientos

A mis padres, por preocuparse de que tuviera estudios y por criarme de la mejor manera que pudieron. Especiales agradecimientos a mi padre, por consentirme y regalónearme toda la vida, en especial estos últimos años. En este punto también le agradezco a mis bebés peludos varios, que cumplieron con distraerme cada vez que el estrés me podía. Lo arreglaban todo con un ronroneo, un movimiento de cola o alguna maldad. También a mi familia en general; primos, abuelos, sobrinos, ahijada, etc. ¡Los amo!

A Jaime Espina por hacerme creer que las nuevas generaciones de científicos serán más generosas y solidarias con su conocimiento, gracias infinitas por todas las veces que te quedaste hasta tarde explicándome cosas que no podía entender, y por siempre responder cada una de las veces que te moleste con dudas “nefastas” jajaja. A Cristian Marchant por su paciencia gigante conmigo y disponibilidad de ayudar y aportar con nuevas ideas cuando uno ya está muy cerrado. A Mario Caruffo, por ser como uno hermano mayor y aconsejarme en TODO, sos grande pitufin!. Y finalmente a Camila José Solís Cascante, para ti solo tengo agradecimientos infinitos por elegir trabajar conmigo, por enseñarme todo lo que sabías laboralmente, por retarme cuando lo merecía... era necesario para abrir los ojos, gracias infinitas también por impulsarme a ser más sociable y a salir más de mi mundo, por preocuparte hasta de cosas que no te correspondían, sin ti en lab definitivamente habría matado a alguien durante este último tiempo, ¡gracias, gracias, gracias!

A los amigos que hice gracias a esta estresante carrera, creo que fue una de las mejores cosas que obtuve durante todos estos años: Sebastián Henríquez, Esteban Figueroa, Víctor Alegría, Marcela Catalán y María Jesús Friedli. Gracias por soportarme.

A la Dra. Feijóo, por ser además de una jefa, una guía. En especial durante mis primeros dos años en el laboratorio, donde además pudo explotar su faceta psicóloga-consejera conmigo. Lamento todas las canas verdes que le provoqué. Y le agradezco de corazón todo lo que me ha ayudado.

A mis dos queridos y maravillosos profesores: Jorge Vallejos y Gina Campos, a ustedes sí que les debo el estar en esta etapa de mi vida, el haber podido defender sin desmayarme, el haber ido empoderándome poco a poco, y el saber que la inteligencia emocional es primordial en una persona. Aprendí a ser feliz gracias a ustedes, y nunca me voy a cansar de agradecerles por creer tanto en mí y en mis capacidades. ¡Los quiero!

Finalmente, a David, a ti que afortunadamente (para ti) llegaste cuando ya tenía este camino muy avanzado. Te agradezco por nuestras conversaciones y risas eternas, por tu preocupación y por calmarme con tan solo mirarme y por redefinir mi concepto de “felicidad máxima”.

Índice

Resumen	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Inflamación.....	7
Neutrófilos.....	7
Migración de neutrófilos: señales mediadoras.....	9
Migración de neutrófilos en pez cebra.....	13
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Diseño experimental.....	17
Estandarización de tipos de daño (severo y leve) utilizados.....	17
Materiales y métodos.....	18
Mantenimiento y cuidados de peces.....	18
Generación de daño leve y severo.....	18
Cuantificación de neutrófilos en región dorsal y región del daño.....	18
Cuantificación de neutrófilos en circulación sanguínea.....	19
Microinyección de morfolidos.....	19
Inhibición farmacológica.....	19
RT-PCR.....	19
Imágenes.....	20
Estadística.....	20
Resultados.....	21
Objetivo 1.....	24
Objetivo 2.....	27
Discusión.....	30
Participación de Gcsfr en la migración de neutrófilos a los vasos sanguíneos.....	30
Participación de Cxcr2 en la migración de neutrófilos a los vasos sanguíneos	31
Conclusión.....	32
Bibliografía.....	33

Resumen

En mamíferos, la migración de neutrófilos durante un proceso de inflamación está regulada por la vía de señalización GCSF-GCSFR. Esta citoquina y su receptor permiten la salida de los neutrófilos desde los tejidos hematopoyéticos después de un daño estéril. En pez cebra, Gcsf-Chr19 controla el proceso mencionado anteriormente, pero se desconoce si esta citoquina se une a Gcsfr para ello. Además, el receptor Cxcr2 también participa en este proceso regulando la entrada de neutrófilos a los vasos sanguíneos, pero en presencia de patógenos. Debido a las posibles diferencias en las vías de señalización que regulan la inflamación por daños estériles y aquellas provocadas por patógenos, además de la posible diferencia entre mamíferos y peces, determinamos la función de Cxcr2 y Gcsfr en la migración de neutrófilos a través de los vasos sanguíneos después de un daño estéril.

Para ello realizamos dos tipos de daños estériles (severo y leve) en larvas de pez cebra Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴. Donde desarrollamos análisis de falta función ya sea por la microinyección de un morfolino contra Gcsfr o por la incubación con SB225002 (inhibidor químico de Cxcr2) y monitoreamos la migración de neutrófilos a distintas regiones de interés durante 3 horas.

Nuestros resultados indicaron que Cxcr2 favorece la entrada de los neutrófilos a los vasos sanguíneos, así como también la llegada de estos al área inflamada en el caso de un daño estéril. Con respecto a Gcsfr nuestros resultados indican que este receptor no participa en la entrada de los neutrófilos a los vasos sanguíneos al desencadenarse un daño estéril, pero si está involucrado indirectamente en la direccionalidad de éstos al área dañada.

Abstract

In mammals, the migration of neutrophils during an inflammation process is regulated by the GCSF-GCSFR signaling pathway. This cytokine and its receptor allow the exit of neutrophils from hematopoietic tissues after sterile damage. In zebrafish, Gcsf-Chr19 controls the process mentioned above, but it is unknown if this cytokine binds to Gcsfr for it. In addition, the Cxcr2 receptor also participates in this process by regulating the entry of neutrophils into the blood vessels, but in the presence of pathogens. Due to the possible differences in the signaling pathways that regulate inflammation due to sterile damage and those caused by pathogens, in addition to the possible difference between mammals and fish, we determine the function of Cxcr2 and Gcsfr in the migration of neutrophils through the blood vessels after sterile damage.

To achieve this goal, we performed two types of sterile damage (severe and mild) in larvae of zebrafish Tg (Bacmpx: GFP)ⁱ¹¹⁴. Where we developed lack function analysis either by the microinjection of a morpholino against Gcsfr or by incubation with SB225002 (chemical inhibitor of Cxcr2) and we monitored the migration of neutrophils to different regions of interest for 3 hours.

Our results indicated that Cxcr2 favors the entry of neutrophils into the blood vessels, as well as the arrival of these to the inflamed area in the case of sterile damage. With respect to Gcsfr our results indicate that this receptor does not participate in the entry of neutrophils into the blood vessels when sterile damage is unleashed, but is indirectly involved in the directionality of these to the damaged area.

Introducción

Inflamación

La inflamación es una respuesta adaptativa coordinada inmediata por parte del cuerpo frente a estímulos o condiciones nocivas, tales como la presencia de patógenos o tejidos dañados. Si dicha respuesta es de corta duración (inflamación aguda), se producirá la infiltración de leucocitos al área dañada, donde la remoción del estímulo permitirá que ocurra la resolución de la inflamación y con ello el término del proceso. En el caso contrario, esto es si el estímulo persiste en el tiempo, se desencadenará una inflamación crónica, que provocará mayor destrucción de tejidos a largo plazo imposibilitando la resolución del proceso inflamatorio (Nathan C., 2002). Cabe destacar que cuando la inflamación es provocada por trauma, daño isquémico, o por daño inducido químicamente, se denomina daño estéril, debido a que como su nombre lo indica, ocurre en ausencia de patógenos o microorganismos (Chen G. Y Nuñez G., 2010). Este daño gatilla la respuesta inflamatoria principalmente por muerte celular, donde las células necróticas son las responsables de desencadenar dicha respuesta (Mc Donald *et al.*, 2010).

La función principal de un proceso inflamatorio es resolver la infección o retirar el tejido dañado y regresar a un estado de homeóstasis (Kumar *et al.*, 2003). Para que esto ocurra, células del sistema inmune innato envían señales, mediadas por receptores, que inician una cascada inflamatoria que ayudará a contener la infección o favorecer la reparación del daño y además activarán la respuesta inmune adaptativa que fortalecerá y continuará el proceso (Medzhitov, R., 2007).

Neutrófilos

En mamíferos, la respuesta inflamatoria aguda requiere de la participación de diferentes tipos celulares en el sitio afectado. Así, el reconocimiento inicial estará mediado por macrófagos y mastocitos residentes de tejido, los cuales producen una serie de mediadores inflamatorios con el objetivo de atraer otros tipos celulares, principalmente neutrófilos, al daño (Nathan C., 2006).

Los neutrófilos son las primeras células inmunes en migrar luego de un estímulo nocivo. En mamíferos, éstos se diferencian en la médula ósea, lugar donde permanecen la mayor parte de su vida, ya que en condiciones fisiológicas solo un pequeño número se encuentra en circulación (menos del 2%) (Link *et al.*, 2002; Summers *et al.*, 2010). El desplazamiento de los neutrófilos desde la médula ósea al lugar afectado es regulado por señales inflamatorias donde las citoquinas y en especial las quimioquinas juegan un rol fundamental. Estas proteínas se activan en cascadas de manera secuencial, uniéndose a receptores de membrana presentes en los neutrófilos para ejercer su función quimioattractante (Sadik *et al.*, 2011). Es así como por medio de la acción de diferentes quimioquinas los neutrófilos enfrentan tres etapas para lograr una migración exitosa al lugar del daño: 1.- Salida desde la médula ósea al torrente sanguíneo; 2.- Migración por torrente sanguíneo y extravasación; 3.- Migración final para llegar al sitio afectado (Figura 1).

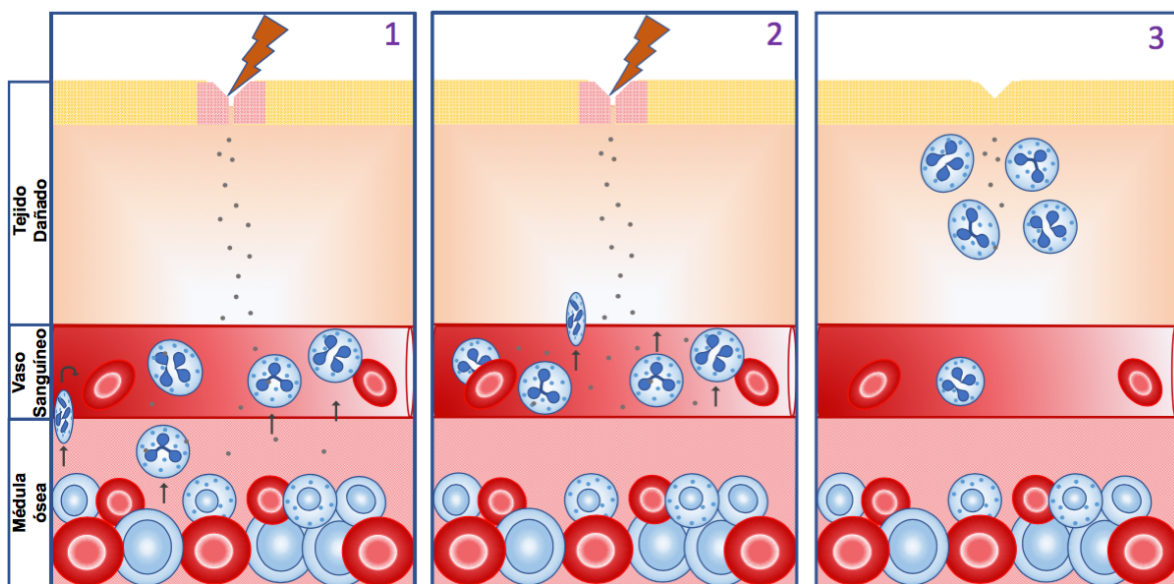


Figura 1: Diagrama de la migración de neutrófilos en condición de inflamación en ratón.

A grandes rasgos, al detectar las señales proinflamatorias, los neutrófilos salen de la región hematopoyética donde estaban retenidos e ingresan al torrente sanguíneo donde permanecen hasta realizar la extravasación cerca del tejido afectado y migrar hacia su destino final (Serhan C. y Savill J. 2005). Al llegar al sitio afectado, los

neutrófilos realizan un reconocimiento, ya sea por contacto directo con el patógeno, restos celulares de tejidos dañados o a través de los mediadores secretados por las células residentes del tejido inflamado. Finalmente, comienza una fase resolutive y reparativa, en donde neutrófilos y macrófagos fagocitan patógenos, debris celular y células muertas, secretando al mismo tiempo otras citoquinas y factores de crecimiento que promueven el reordenamiento del tejido, formación de nuevos vasos sanguíneos, proliferación de fibroblastos y deposición de colágeno con el fin de reparar el tejido dañado llevándolo nuevamente a una condición de homeostasis. (Nathan C., 2002; Serhan C. y Savill C., 2005; Nathan C., 2006; Chen G. y Nuñez G., 2010).

Migración de neutrófilos: salida desde el territorio hematopoyético hacia el torrente sanguíneo y sus señales mediadoras.

Para ir un paso más allá en el entendimiento de la migración de los neutrófilos, es importante conocer más en detalle cómo se regula este proceso a nivel molecular.

Como se mencionó previamente, existe un fino balance entre el número de neutrófilos presentes en la médula ósea y los que se encuentran en circulación. Dicho balance es regulado por la acción de la citoquina G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) y su receptor G-CSFR. El cual forma parte de los receptores de citoquinas de clase 1, teniendo un rol primordial en la hematopoyesis, además de estar presente en la superficie de varios tipos celulares dentro de los que se cuentan neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, monocitos y progenitores mieloides (Layton y Hall, 2006; Liongue et al., 2009; Pazhakh et al., 2017).

Esta vía de señalización controla tanto la señal que favorece la retención de neutrófilos en la médula ósea, como la vía que facilita su entrada a los vasos sanguíneos (Semerad et al., 2002).

Es así como la vía de retención está compuesta por el ligando CXCL12, una quimioquina que es secretada en altas cantidades por los osteoblastos presentes en la médula ósea, y el receptor CXCR4 (Link C., 2015). Dicho receptor está acoplado a proteína G y se encuentra presente en células hematopoyéticas (progenitores hematopoyéticos, neutrófilos, linfocitos, megacariocitos y monocitos), además de

expresarse en células estromales donde se incluyen osteoblastos y células endoteliales (Dar *et al.* 2005).

Por el contrario, la vía de entrada a los vasos sanguíneos está compuesta CXCR2, presente mayoritariamente en los neutrófilos (Eash *et al.*, 2010).

Así, en condiciones de homeostasis los osteoblastos secretan altos niveles de CXCL12, y su receptor CXCR4 se expresa en altos niveles en neutrófilos (Kim H *et al.*, 2006). Al unirse CXCL12 a CXCR4 se promueve la retención de estos granulocitos, por lo que se mantienen arrestados en la médula ósea (Suratt *et al.*, 2004). Por su parte, los niveles de expresión de G-CSF son casi nulos, al igual que los de CXCL1/2 y su receptor CXCR2 (Eash *et al.*, 2010) (Figura 2).

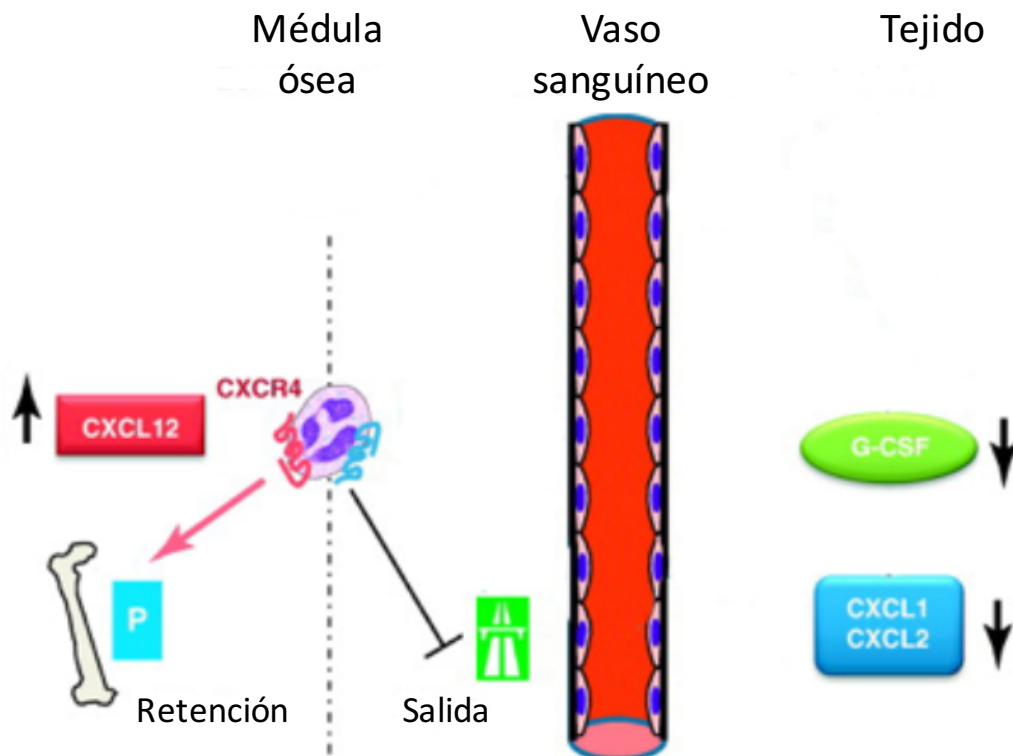


Figura 2: Diagrama de la regulación de neutrófilos en condición de homeostasis en ratón. La vía de señalización CXCL12-CXCR4 está altamente expresada manteniendo a los neutrófilos retenidos en la médula ósea. Adaptado de Sadik *et al.*, 2011

Por el contrario, al generarse un proceso inflamatorio, se requiere aumentar la cantidad de neutrófilos en circulación por lo que éstos deben ser liberados desde la médula ósea. Con este fin aumenta rápidamente la expresión de G-CSF (Demetri y Griffin, 1991; Wagner *et al.*, 2008) provocando la disminución del número de osteoblastos presentes en la médula ósea, lo que implica una disminución de los niveles de CXCL12 (Link *et al.*, 2002; Wengner *et al.*, 2008; Eash *et al.*, 2010). A su vez, el aumento de G-CSF provoca el clivaje y la internalización de CXCR4 imposibilitándolo de unirse al poco CXCL12 existente (Nagasane *et al.* 2002; Eash *et al.*, 2010) perdiendo fuerza la señal de retención (Figura 3). Dentro de los ensayos que soportan esta premisa, se observó que en ratones que presentaban mutaciones en CXCR4, o donde se inhibía químicamente este receptor, existía una movilización espontánea de neutrófilos hacia los vasos sanguíneos (Ma *et al.*, 1999; Liles *et al.*, 2003; Broxmeyer *et al.* 2005; Eash *et al.* 2009;).

De forma paralela, G-CSF también actúa sobre las células endoteliales, promoviendo el aumento en la expresión de CXCL1/2, así como también el aumento de la expresión de su receptor CXCR2 en la membrana de los neutrófilos (Lloyd *et al.*, 1995; Nagasane *et al.* 2002), favoreciendo la entrada de neutrófilos a la circulación sanguínea (Figura 3). Ensayos que apoyan esta afirmación muestran que ratas *knock out* para CXCR2 presentan una severa disminución en la migración de neutrófilos hacia los sitios de inflamación (Cacalano *et al.*, 1994). Además, se ha reportado que neutrófilos que no expresan CXCR2 presentan una baja adhesión al endotelio y una menor infiltración a la región dañada (McDonald *et al.*, 2010). Del mismo modo, la inhibición química de CXCR2, reduce significativamente la migración y quimiotaxis de neutrófilos al lugar del daño (White *et al.*, 1998).

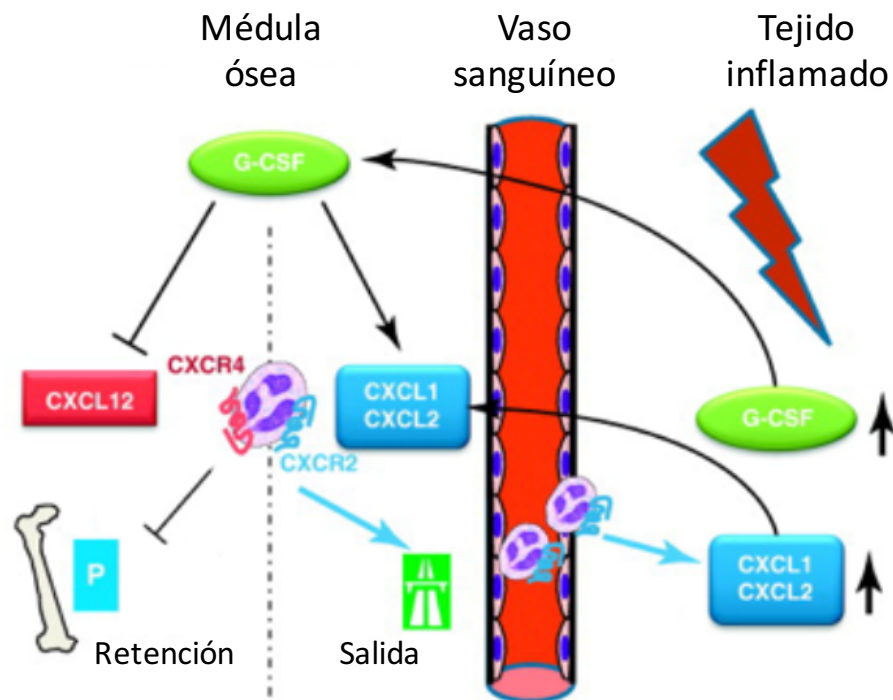


Figura 3: Diagrama de la regulación de neutrófilos en condición de inflamación en ratón. Al aumentar los niveles de G-CSF, aumentan también los niveles de las quimioquinas CXCL1 y 2, concomitante a la disminución de CXCL12, por lo que se inhibe la vía de retención y se favorece la salida de los neutrófilos desde la médula ósea al torrente sanguíneo. Adaptado de Sadik *et al.*, 2011

Es importante destacar que existe una diferencia entre las señales que regulan la migración de los neutrófilos entre humanos y los modelos murinos, puesto que el ligando de CXCR2 en humanos es CXCL8 y no CXCL1 y 2 como es el caso en ratón.

Esta diferencia representa un problema a la hora de realizar estudios para el entendimiento detallado de este proceso con proyecciones biomédicas (Van Damme *et al.*, 1989). Es así como surge la necesidad de encontrar un modelo alternativo de estudio que tenga un repertorio molecular equivalente al presente en humanos.

Migración de neutrófilos en pez cebra

En peces, el sistema inmune innato cobra un rol fundamental para la supervivencia durante las primeras etapas de desarrollo, puesto que su sistema inmune adaptativo aparece más tarde, en estadios larvales. En el caso del pez cebra, el sistema inmune innato (específicamente macrófagos y neutrófilos) se encuentra activo a partir de las 20 horas post fertilización (hpf) aproximadamente (Lieschke *et al*, 2007; Martin *et al*, 2009), a diferencia del sistema inmune adaptativo, el cual se encuentra activo después de los 10 días post fertilización (dpf).

Si bien durante la última década se ha profundizado enormemente en el conocimiento existente sobre la respuesta inmune innata en pez cebra, especialmente en la regulación de la migración de neutrófilos durante un proceso inflamatorio, la mayoría de los estudios se han focalizado en la etapa final; la llegada a la zona afectada, por lo que hay un desconocimiento de la biología que regula las primeras etapas de este proceso.

En pez cebra la granulopoyesis ocurre en el tejido caudal hematopoyético (TCH), territorio ubicado entre la arteria y vena caudal, en la región ventral de la cola del embrión (Figura 4). En condición de homeostasis, al igual que en mamíferos, los neutrófilos se encuentran retenidos en la región hematopoyética por la acción de Cxcr4 y Cxcl12 (Walters *et al.*, 2010; Paredes-Zúñiga S. *et al.*, 2017).

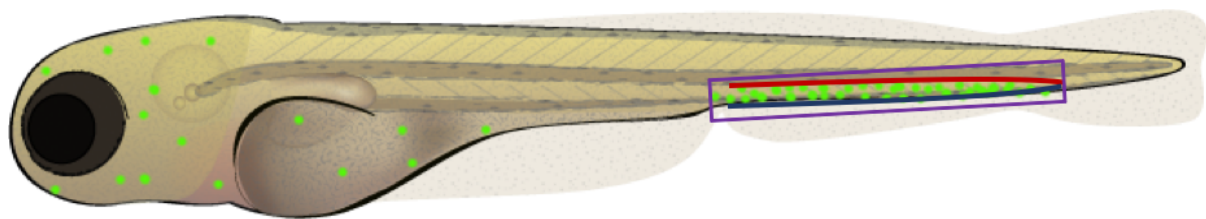


Figura 4: Vista lateral de una larva a las 48 horas post fecundación (hpf) donde los puntos verdes representan a los neutrófilos, retenidos en el tejido caudal hematopoyético (TCH, recuadro morado). En rojo la arteria caudal y en azul la vena caudal, ambas delimitan el TCH.

Respecto a GCSF, existen 2 parálogos en pez cebra, uno ubicado en el cromosoma 12 (Gcsf-chr12), y otro ubicado en el cromosoma 19 (Gcsf-chr19). En el

caso de su receptor, Gcsfr, existe solo un parólogo en su genoma (Stachura *et al.*, 2013). En relación a la movilización de neutrófilos, antecedentes previos indican que Gcsf-chr19, y no Gcsf-chr12, regula la migración de estas células a la circulación sanguínea durante una inflamación estéril. Además, se ha demostrado que los niveles transcripcionales de Gcsf-chr19 aumentan significativamente desde los 30 minutos después de realizarse un daño severo (Galdames *et al.*, 2014).

Por otra parte, antecedentes provenientes del grupo de Liongue y colaboradores (2009), indican que Gcsfr no participaría en la regulación de la migración de neutrófilos luego de un daño mecánico. Esto, ya que al generar un daño en la aleta ventral de una larva de pez cebra, se observó que los neutrófilos migraban hacia dicho daño tanto en ausencia como en presencia de este receptor. Es importante hacer notar que, a nuestro juicio, el diseño experimental utilizado en este trabajo no fue el adecuado, ya que se realizó un modelo de daño que no gatilla migración por los vasos sanguíneos, proceso en el que participaría la vía de Gcsf-Gcsfr. Así mismo, el hecho de que Gcsf-chr19 regule la migración de neutrófilos a los vasos sanguíneos y que exista solo un homólogo para GCSFR en pez cebra, sugiere que Gcsfr si podría estar involucrado en el proceso mencionado.

En relación al homólogo de la vía de señalización de CXCL8-CXCR2, se ha descrito que está presente en pez cebra y que ambos genes participan en la regulación de la migración de neutrófilos, al menos en la etapa final de llegada al daño. CXCL8 se encuentra duplicado en el genoma del pez cebra, y ambos parálogos, Cxcl8a y Cxcl8b, están involucrados en la migración de neutrófilos hacia el daño (Deng *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013) pero se desconoce específicamente en cual etapa del proceso de migración es en la que participan, y sólo se ha descrito que Cxcl8a se une a Cxcr2.

En relación al receptor Cxcr2, se ha observado que larvas de pez cebra morfantes para esta proteína presentan un menor movimiento de neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético hacia una zona infectada (Deng *et al.*, 2013). De la misma forma al incubar larvas con un inhibidor de Cxcr2, se observó un menor reclutamiento de neutrófilos en un área infectada y en un área dañada en comparación a los controles (Oliveira *et al.*, 2013). Lo que confirma que la vía de señalización Cxcr2/Cxcl8a regula la migración de los neutrófilos en la última etapa, tanto en una infección como en un daño

mecánico. Es importante destacar que se desconoce cuál es el papel que desempeña Cxcr2 en la etapa inicial de migración, es decir, la entrada de los neutrófilos a los vasos sanguíneos luego de ser liberados del tejido hematopoyético.

De los antecedentes expuestos, surge la siguiente pregunta acerca de la función de los dos receptores, Gcsfr y Cxcr2, en un daño estéril:

¿Participan Gcsfr y Cxcr2 en la regulación de la migración de neutrófilos desde el tejido hematopoyético a los vasos sanguíneos luego de un daño estéril en pez cebra?

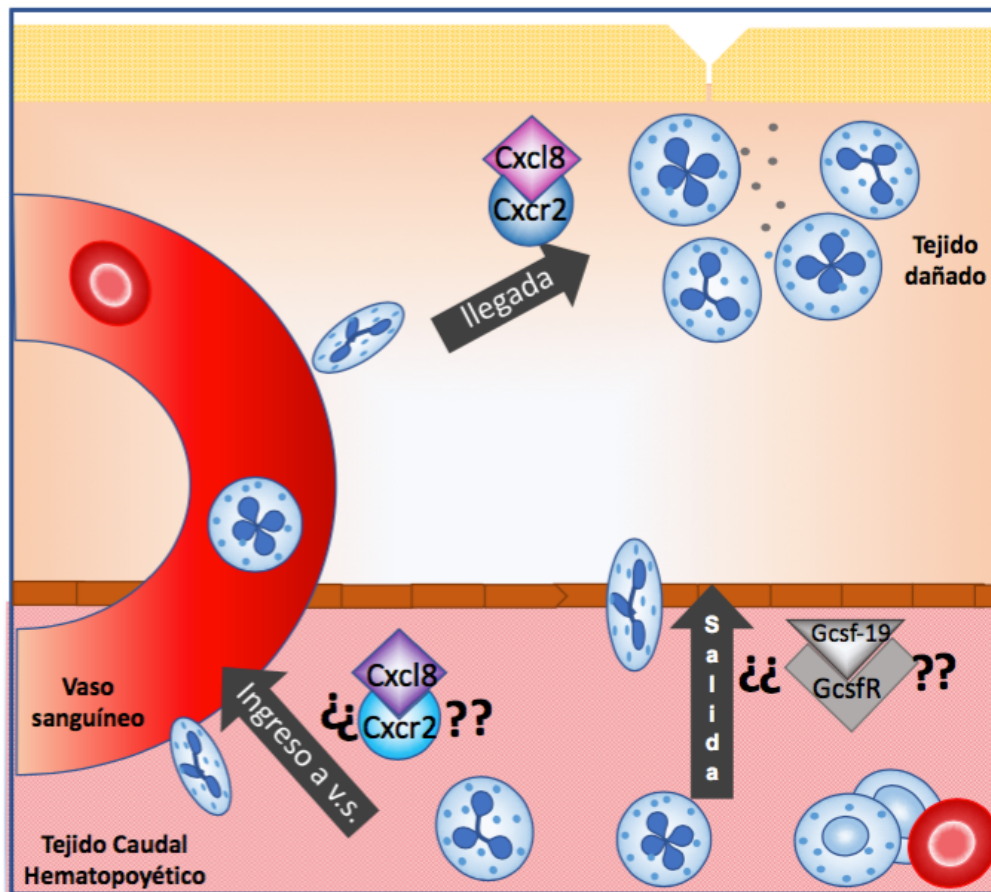


Figura 5: Modelo resumen de la vía pro migratoria de los neutrófilos en pez cebra, donde se sabe que Cxcl8-Cxcr2 participan en la llegada de los neutrófilos al daño. Pero se desconoce si además Gcsf-19-GcsfR participan en la salida de los neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético, y si además Cxcl8-Cxcr2 participan en el ingreso de los neutrófilos a los vasos sanguíneos.

Hipótesis

“En pez cebra, la migración de neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético a los vasos sanguíneos está favorecida por la acción de Cxcr2 y Gcsfr luego de un daño estéril”.

Objetivo general

Determinar si en un proceso de inflamación estéril el ingreso de los neutrófilos a los vasos sanguíneos es mediado por Cxcr2 y Gcsfr.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar la función de Gcsfr en la salida de neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético durante un proceso de inflamación estéril severo y leve.
- 2.- Determinar la función de Cxcr2 en la entrada de los neutrófilos a los vasos sanguíneos durante un proceso de inflamación estéril severo y leve.

Diseño experimental

Estandarización de tipos de daño (severo y leve) utilizados.

Para desarrollar los objetivos planteados se utilizaron larvas de la línea transgénica $Tg(Bacmpx:GFP)^{i114}$, las cuales tienen los neutrófilos marcados fluorescentemente verde (Renshaw *et al.*, 2006). A los 2 días post fertilización (dpf) se seleccionaron aquellas larvas que poseían menos de 2 neutrófilos fuera del tejido caudal hematopoyético (Figura 5 A), sin tomar en cuenta los neutrófilos presentes en la cabeza, con el fin de asegurar que los individuos utilizados en cada ensayo no tuvieran el sistema inmune innato previamente activado.

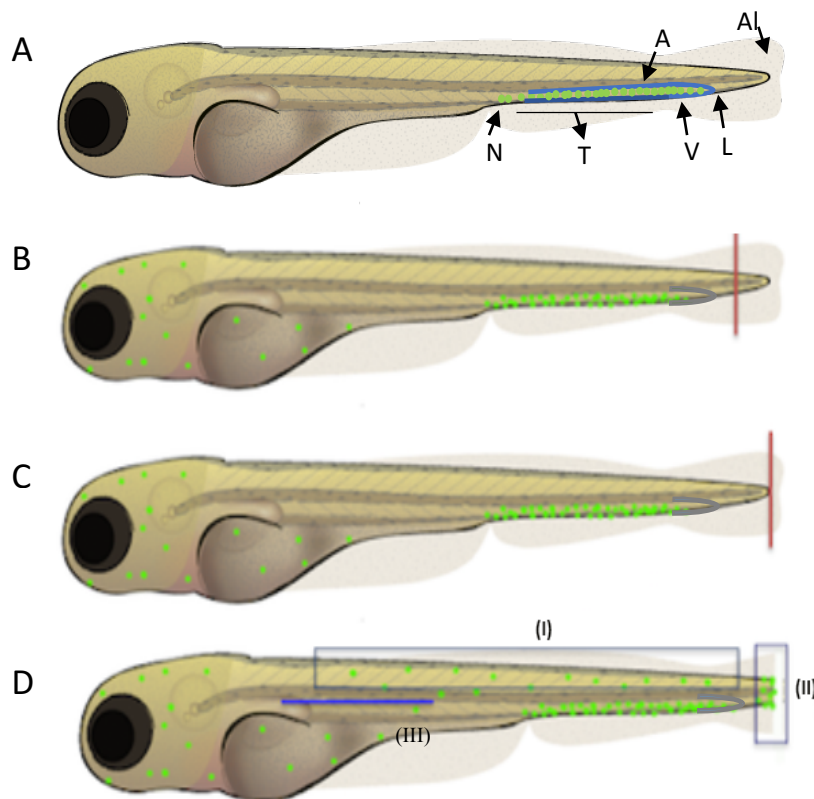


Figura 6: Modelos de daño. (A) Vista lateral de una larva $Tg(Bacmpx:GFP)^{i114}$ a las 48 horas post fecundación (hpf) donde los puntos verdes representan los neutrófilos (N) retenidos en el tejido caudal hematopoyético (T). Se observa la aleta caudal (AI), arteria caudal (A), vena caudal (V) y el *loop* circulatorio (L). (B) Modelo de daño severo; la amputación realizada incluye músculo y aleta caudal. (C) Modelo de daño leve; la amputación realizada solo incluye la aleta caudal. (D) Regiones donde se cuantificó la migración de neutrófilos: (I) región dorsal, y (II) región del daño. La línea azul representa la zona donde se realizó el conteo en circulación (III).

El modelo de daño severo consistió en la amputación de la aleta caudal incluyendo tejido muscular (Figura 5 B) acorde a lo previamente descrito por Elks y colaboradores (2011). Por otro lado, para generar el daño leve se realizó la amputación de la aleta caudal, pero esta vez sin incluir tejido muscular (Figura 5 C). En ambos casos, para cuantificar el número de neutrófilos movilizados se consideraron 3 regiones de interés (Figura 5 D); la región dorsal (I), la región del daño (II), y el torrente sanguíneo (III).

Materiales y métodos

1.-Mantenición y cuidados de peces

Se obtuvieron las ovas a partir de la cruce de peces de la línea transgénica Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴, los cuales fueron mantenidos según el protocolo establecidos por Westerfield (1994). Los embriones se recolectaron por desove natural, y fueron mantenidos en placas Petri con medio E3 (5 mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,33 mM de MgSO₄, a pH 7,0) suplementado con azul de metileno al 0,001%, con un máximo de 50 individuos por placa.

2.- Generación de daño leve y severo

Para realizar los dos tipos de daño descritos en la figura 5, se realizó la amputación de la aleta caudal con o sin músculo, según fue el caso. Se anestesiaron las larvas seleccionadas con triclaína 0,017% (Sigma) y bajo un microscopio de disección se amputó el tejido con un bisturí estéril.

3.- Cuantificación de neutrófilos en región dorsal y región del daño

Se tomaron fotografías de cada individuo montado en agarosa al 2% en E3 a 1, 2 y 3 horas post daño (hpd) con el fin de determinar el número de neutrófilos presentes en la región dorsal, y en la región del daño. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software ImageJ y el método descrito previamente por Ellet y Lieshcke (2012). Brevemente, el software por medio de una unidad arbitraria (Leukocyte units, LU)

permite determinar el número de neutrófilos presentes en cada área definida en relación al número total de neutrófilos presentes en la larva.

4.- Cuantificación de neutrófilos en circulación sanguínea

Se realizaron *time lapse* de 3 horas de cada individuo para el ensayo de Gcsfr (larvas microinyectadas), y *time lapse* de 1 hora (a la 1, 2 y 3 hpd) para el ensayo de inhibición de Cxcr2. Las larvas se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 2% en medio E3. Para el análisis de los datos se realizaron quimografías mediante el software FIJI según lo descrito por Deng y colaboradores (2013).

5.- Microinyección de morfolinós

Para el ensayo de falta de función de Gcsfr se microinyectó el morfolino de *splicing* de secuencia: 5' - GAACTGGCGGATCTGTAAAGACAAA - 3' (Gene tools), el cual fue inyectado al estadio de 1 célula en una concentración de 1ng/embrión con un microinyector MPPI-3 (Applied Scientific). Dicho morfolino se une entre el intrón 3 y el exón 3 imposibilitando el correcto *splicing* de este gen. Este morfolino se encontraba ya validado por el grupo de Liongue y colaboradores (2009). Por lo que el fenotipo y concentración a utilizar estaban claramente descritos.

6.- Inhibición farmacológica.

Para el ensayo de falta de función de Cxcr2, se utilizó el inhibidor químico SB225002 (Calciobiochem) a una concentración de 5 μ M en E3 con 1% de DMSO (Winkler) según lo descrito previamente por Deng y colaboradores (2013). Las larvas fueron incubadas durante 30 minutos en el inhibidor, para luego realizar el daño correspondiente. Posteriormente se mantuvieron en dicho inhibidor hasta el final del ensayo. Dada la labilidad de este compuesto, este fue renovado cada una hora.

7- RT-PCR.

Para comprobar la eficiencia del morfolino inyectado, se realizó daño severo a larvas de 48 hpf controles y morfantes y luego se les extrajo el ARN 2 horas después de realizado el daño. La extracción de ARN total se obtuvo utilizando el reactivo Trizol

(Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de las muestras de ARN en una reacción de transcripción inversa usando Super Script II RT (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante y utilizando partidores oligo-dT. El PCR se realizó utilizando GoTaq Green Master Mix 2X (Promega) donde se utilizó β -*actin* como gen de referencia: Partidor forward: 5'-CCCAAGGCCAACAGGGAAAA-3' , Partidor reverse: 5'-GGTGCCCATCTCCTGCTCAA-3'. Y para observar la presencia o ausencia de gcsf partidor forward: 5'- GACTGGAGCATCATCGTGTGG- 3' y Partidor reverse: 5'- CCTGAACAGGATTCCAGTCAC – 3'

8.- Imágenes

Todas las imágenes y *time lapse* de esta tesis fueron capturadas con una cámara Q Imaging modelo MicroPublisher 0.5 RTV acoplada a una lupa estereoscópica Olympus modelo SZX16 y utilizando el programa Q Capture Pro 6. Para los Time lapse, se tomaron imágenes en intervalos de 13 segundos durante las 3 hpd

9.- Estadística

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Prism 6 (GraphPad software), mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados

Para llevar a cabo los objetivos planteados en esta tesis, como primera actividad se estandarizaron los tipos de daño a utilizar, denominados severo y leve. Se consideró un daño severo a aquel que es capaz de gatillar la migración de neutrófilos tanto por el tejido intersticial (matriz extracelular) como por la circulación sanguínea (Galdames *et al.*, 2014). En este tipo de daño se activa la transcripción de la citoquina Gcsf-Chr19, entre otras (Galdames *et al.*, 2014). Para esto, se realizó un corte en la región caudal de larvas Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴ de 48 hpf, donde se cuantificó el número de neutrófilos que llegó a la región del daño mediante *time lapse* durante las 3 primeras horas posteriores a la realización del daño. Los resultados obtenidos muestran que a la 1 hora post daño (hpd) se encuentran aproximadamente 7 neutrófilos en el daño y que estos aumentan significativamente hasta las 3hpd (Figura 6, 7C). Así mismo, en los *time lapse* realizados se logró observar que la migración de neutrófilos hacia el daño es exclusivamente por la matriz extracelular durante la primera hora, y después tanto matriz extracelular como por torrente sanguíneo.

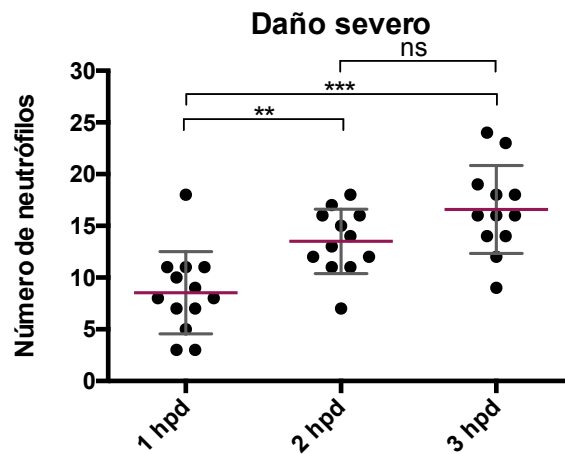


Figura 7: Migración de neutrófilos durante un daño severo. Se muestra el número de neutrófilos presentes en la región del daño a 1, 2 y 3 horas post daño (hpd). **p value<0,01, ***p value<0,001

Por otro lado, un daño leve es aquel dónde los neutrófilos se desplazan exclusivamente por la matriz extracelular para llegar a la zona afectada. Así, en este tipo de daño no se activa la transcripción de *Gcsf-Chr19* (Galdames et al., 2014). Al inicio de la realización de esta tesis ya existían algunos modelos de daño leve (Galdames *et al.*, 2014; Liongue *et al.*, 2009), pero ninguno era comparable al daño severo antes descrito, dado que la distancia entre el TCH y el daño era mucho menor. Con la finalidad de encontrar un modelo de daño leve donde la única variable existente con respecto al daño severo sea la intensidad de éste y por ende la señalización gatillada, se probaron distintas estrategias resultando ser más adecuada la amputación de la aleta caudal sin la inclusión del tejido muscular.

Al realizar el daño leve, pudimos observar que a 1hpd había llegado al área afectada un promedio de 2 neutrófilos, cantidad que aumentó levemente a las 3hpd, donde el promedio fue aproximadamente de 4 (Figura 7 A-C). Al comparar la migración a la región afectada entre daño severo y leve, se pudo observar que la cantidad de neutrófilos reclutados fue considerablemente menor durante el daño leve (Figura 7 B). Es importante destacar que los *time lapse* realizados en el modelo de daño leve confirmaron lo esperado en relación a la vía usada por los neutrófilos para su migración, siendo ésta exclusivamente por la matriz extracelular (Figura 7).

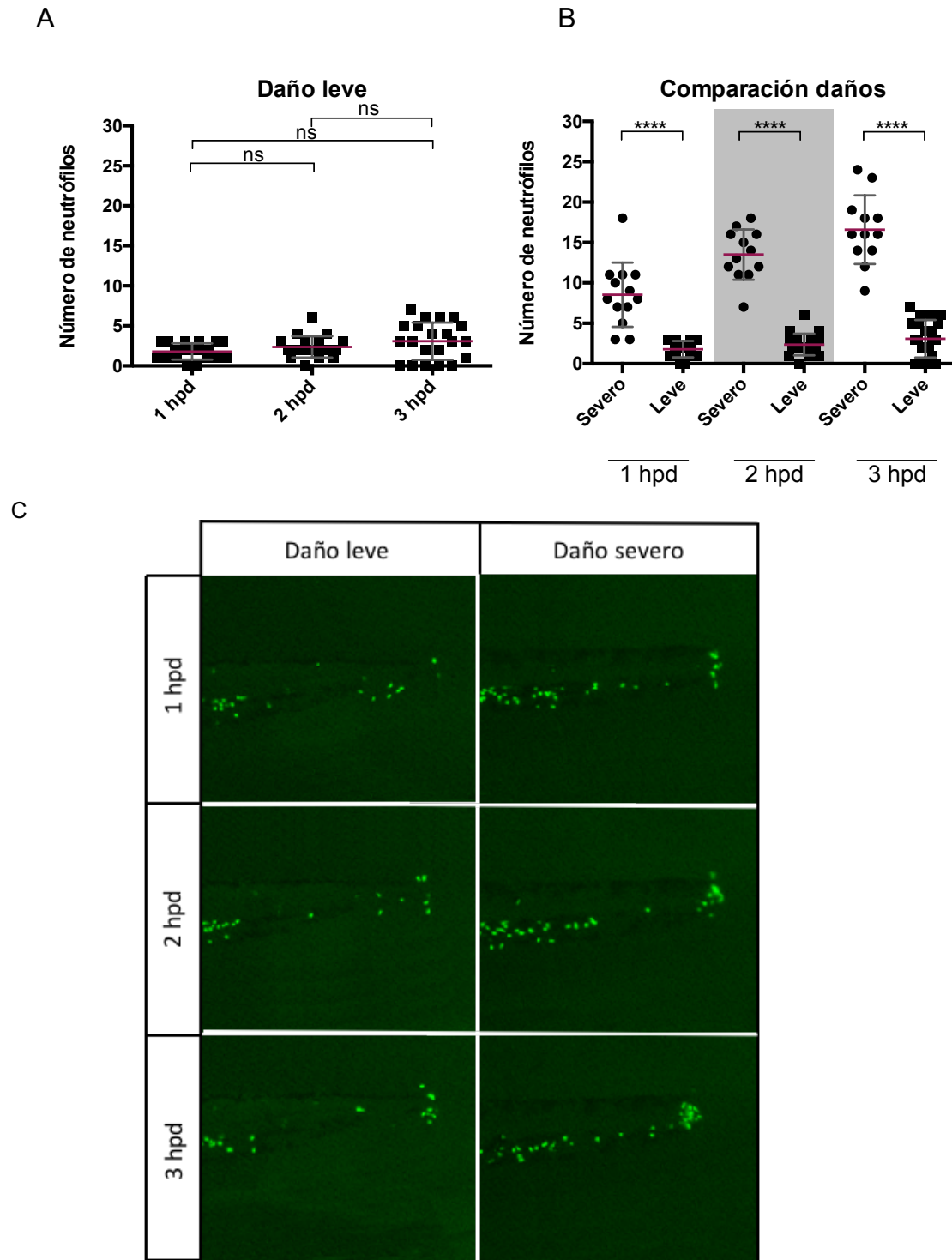


Figura 8: Migración de neutrófilos durante un daño leve. (A) Se muestra el número de neutrófilos presentes en la región del daño a 1, 2 y 3 horas post daño (hpd). (B) Comparación del número de neutrófilos movilizados entre el modelo de daño leve y severo. (C) Imágenes que muestran la migración de neutrófilos en larvas $Tg(Bacmpx:GFP)^{114}$ durante las primeras 3 horas post daño (hpd). ****p value<0,0001.

Objetivo 1.- Determinar la función de Gcsfr en la salida de neutrófilos desde el tejido caudal hematopoyético durante un proceso de inflamación estéril severo y leve.

Para determinar la participación de Gcsfr en la migración de neutrófilos se realizaron ensayos de falta de función mediante la microinyección de morfolinós (MO). Específicamente, se microinyectó un MO de *splicing* en embriones Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴ al estadio de 1 célula y luego a las 48h se seleccionaron aquellas larvas que presentaban menos de 30 neutrófilos en el tejido caudal hematopoyético (TCH), fenotipo caracterizado de este MO (Liongue et al., 2009). Para comprobar la eficiencia del MO se realizó un RTPCR (Figura 8) donde se observó la banda correspondiente al mRNA de *gcsfr* en embriones controles, y la desaparición de ésta en embriones morfantes.

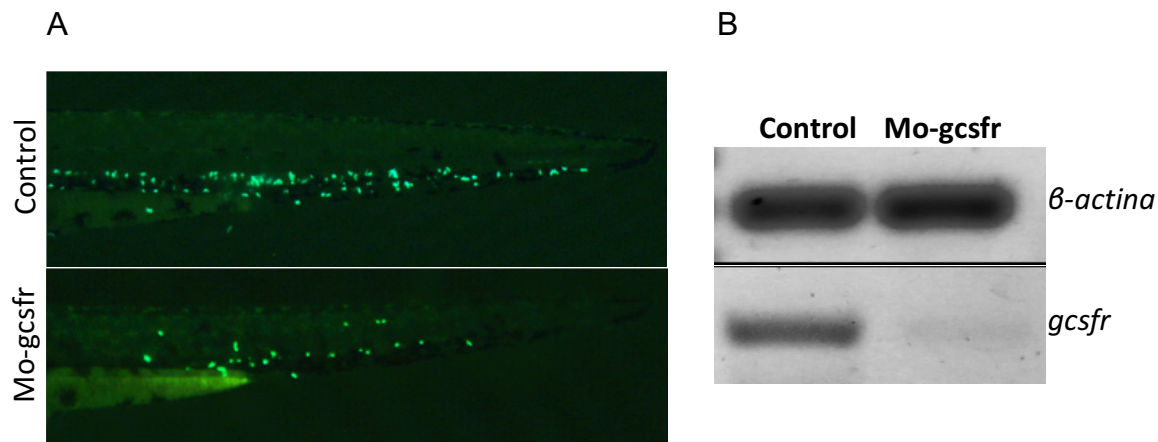


Figura 9: (A) Fenotipo de larvas Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴ control y morfante, donde se logra observar la disminución de neutrófilos en el tejido caudal hematopoyético. (B) Electroforesis en gel de agarosa de un RT-PCR realizado a partir de RNA total extraído de larvas control o morfantes para Gcsfr. Se puede observar las bandas de un PCR realizado a los grupos control y morfantes para Gcsfr, donde se comprueba la clara disminución del mensajero de *gcsfr* en las larvas inyectadas. Se utilizó β -actina como control de carga.

Una vez comprobada la eficiencia del MO, se realizó el ensayo de activación de la migración de neutrófilos en un modelo de daño severo en larvas morfantes para *gcsfr*. Los resultados obtenidos mostraron que durante las 3 horas de monitoreo fue posible observar un mayor porcentaje de neutrófilos en el área dorsal de las larvas inyectadas en comparación al control (Figura 9 B y C). En cuanto a los neutrófilos que llegaron al

daño, fue posible ver una clara disminución en las larvas morfantes, condición que se mantuvo a lo largo de todo el ensayo (Figura 9 B y D). Finalmente, la cuantificación del porcentaje de neutrófilos presentes en sangre indicó que no hay diferencias significativas entre los dos grupos, a pesar de existir una tendencia a que el número de neutrófilos sea mayor en individuos morfantes (Figura 9 B y E).

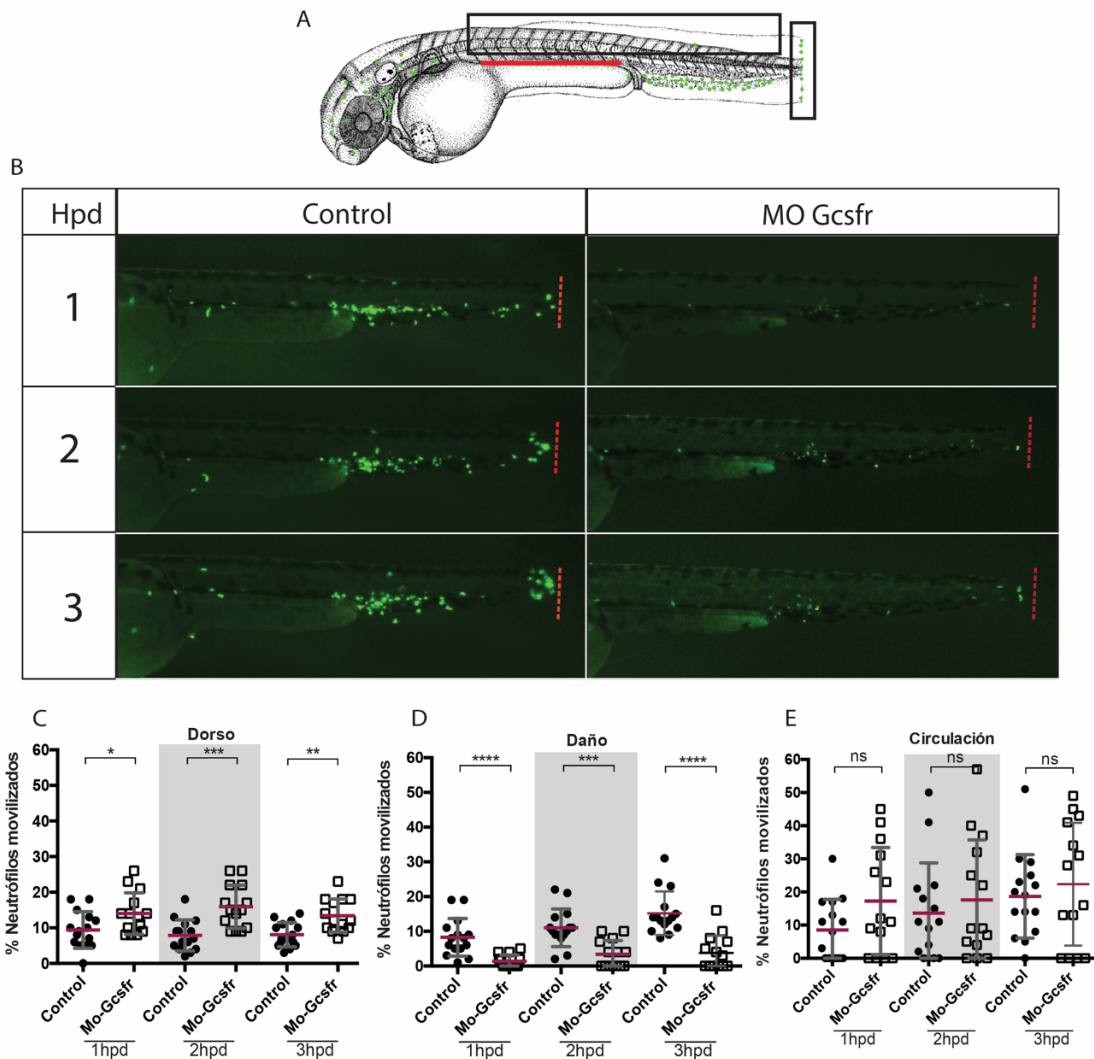


Figura 10: Migración de neutrófilos durante un daño severo. (A) Esquema de un embrión de 48 hpf donde se resaltan las zonas a cuantificar; región dorsal, región del daño, y circulación sanguínea (línea roja). (B) Imágenes que muestran la migración de neutrófilos tanto en embriones control como en morfantes $Tg(Bacmpx:GFP)^{i114}$ durante las primeras 3 horas post daño (hpd). (C-E) Cuantificación del porcentaje de los neutrófilos que migraron a la región dorsal (C), a la región del daño (D), y por la circulación sanguínea (E) a las 1, 2 y 3 hpd. *p value <0,05, **p value<0,01, ***p value<0,001, ****p value<0,0001.

Al realizar el ensayo de falta de función en daño leve, se pudo observar en la cuantificación en el dorso, que no existían diferencias significativas entre las larvas control y morfantes (Figura 10 B y C). Por el contrario, si se observó una disminución significativa en la cantidad de neutrófilos que llegó al daño en larvas morfantes comparado con larvas control (Figura 10, B y D).

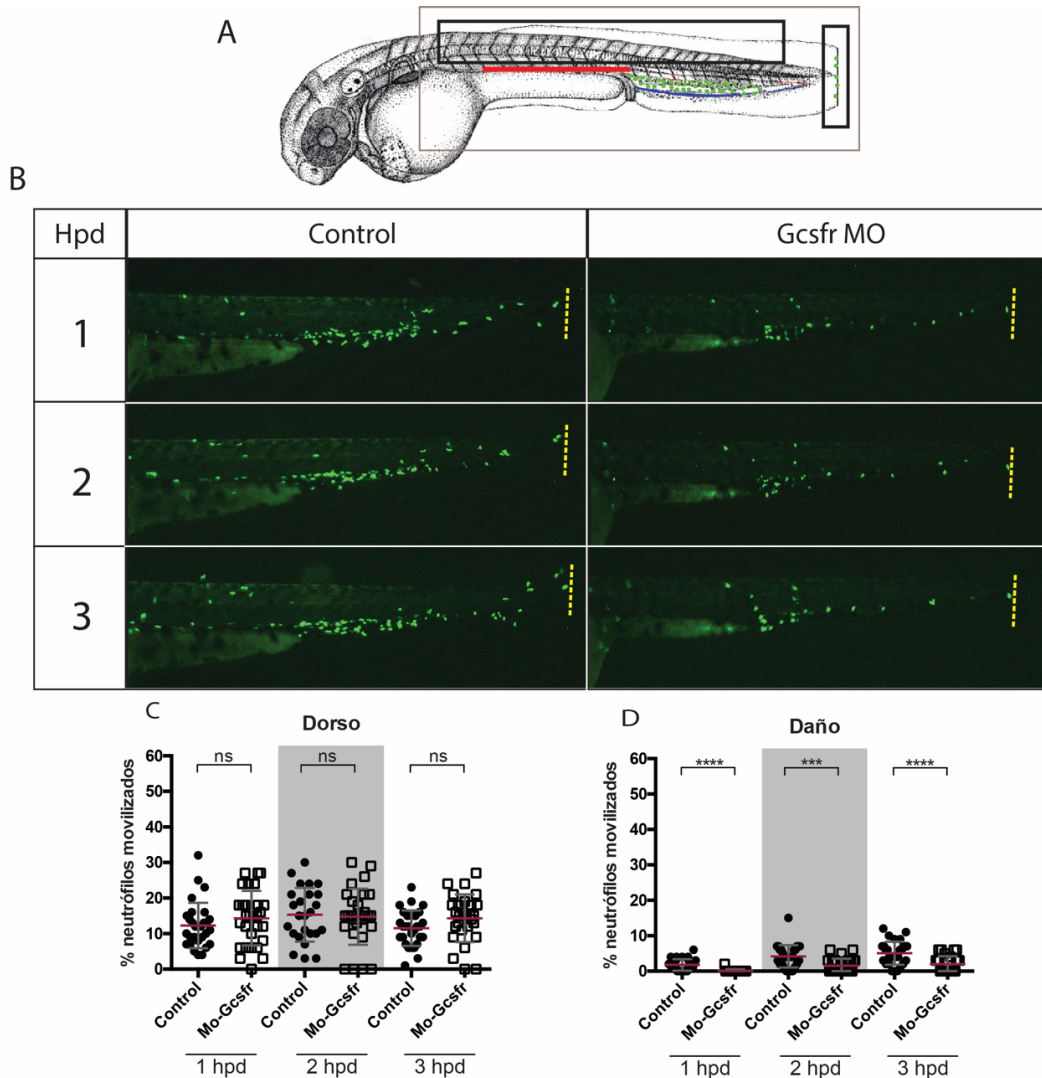


Figura 11: Migración de neutrófilos durante un daño leve. (A) Esquema de larva de 48 hpf en posición lateral donde se marca en recuadros negros la zona dorsal y el área dañada como áreas donde se cuantificará la presencia de neutrófilos. (B) Imágenes que muestran la migración de neutrófilos tanto en embriones control como en morfantes $Tg(Bacmpx:GFP)^{i114}$ durante las primeras 3 horas post daño (hpd). (C-D) Cuantificación del porcentaje de los neutrófilos que migraron al dorso (C) y al daño durante 1, 2 y 3 horas post daño (hpd). ***p value<0,001, ****p value<0,0001.

Objetivo 2.- Determinar la función de Cxcr2 en la entrada de los neutrófilos a los vasos sanguíneos durante un proceso de inflamación estéril severo y leve.

Para determinar la función del receptor Cxcr2 en la migración de los neutrófilos durante un proceso inflamatorio, se inhibió químicamente este receptor mediante el uso del fármaco SB225002. Larvas transgénicas Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴ fueron preincubadas en medio E3 con el inhibidor durante 30 minutos para posteriormente realizar el daño, ya fuese severo o leve. Luego de esto, se monitoreó la migración de neutrófilos durante 3 horas en el dorso, daño y circulación (Figura 11 A), periodo en el cual las larvas permanecieron en el medio con SB225002.

Los resultados obtenidos en el modelo de daño severo indicaron que no existe diferencia en el número de neutrófilos presente en el dorso entre larvas control y experimentales durante las 3 horas monitoreadas (Figura 11 C). Por el contrario, el número de neutrófilos que llegó al área dañada es significativamente menor en aquellos embriones tratados con el inhibidor en comparación al control. Esta diferencia se mantiene durante las primeras 3 hpd (Figura 11 B, D). Finalmente, al observar los neutrófilos en circulación se pudo determinar que posterior a 1 hpd, el número de neutrófilos presentes en circulación fue significativamente menor en aquellos embriones tratados con inhibidor (Figura 11 E).

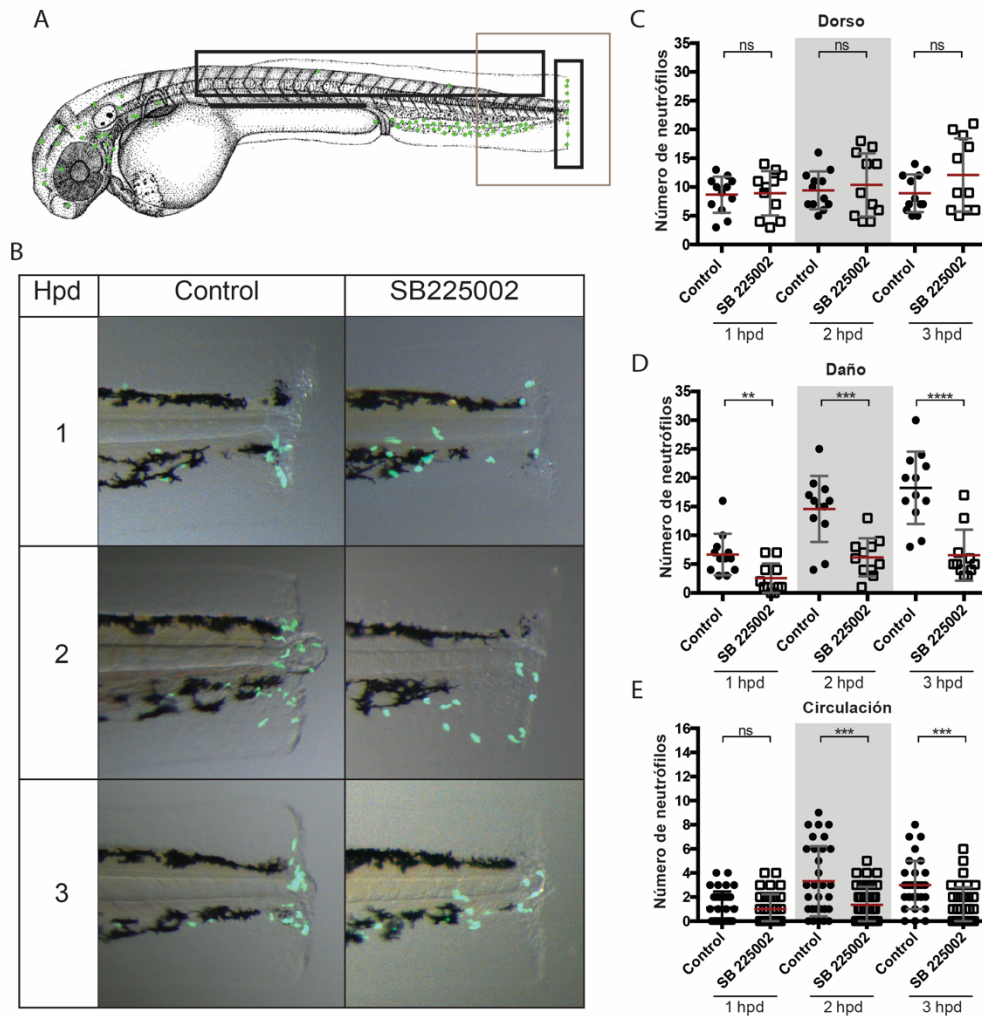


Figura 12: Migración de neutrófilo durante daño severo. (A) Esquema de larva de 48 hpf en posición lateral donde se marca en recuadros negros la zona dorsal y el área dañada, y en una línea negra la circulación, como las zonas en las que se cuantificará la presencia de neutrófilos. (B) Cola de larva *Tg(Bacmpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* de 48 hpf después de realizar daño severo. (C-E) Cuantificación de los neutrófilos que migraron al dorso (C), al daño (E), y que viajaban por la sangre durante 1, 2 y 3 horas post daño (hpd). **p value<0,01, ***p value<0,001, ****p value<0,0001

Por otro lado, en los ensayos de migración utilizando el modelo de daño leve (Figura 12 A), pudimos observar que el número de neutrófilos presentes en el dorso de larvas tratados con el inhibidor fue similar al control, por lo que no existen diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 12, C). En relación a la cantidad de neutrófilos presentes en el daño, se pudo observar que fue significativamente menor en aquellas

larvas tratadas con el inhibidor en comparación a la situación control, situación que se mantuvo durante las 3 horas analizadas (Figura 12 D).

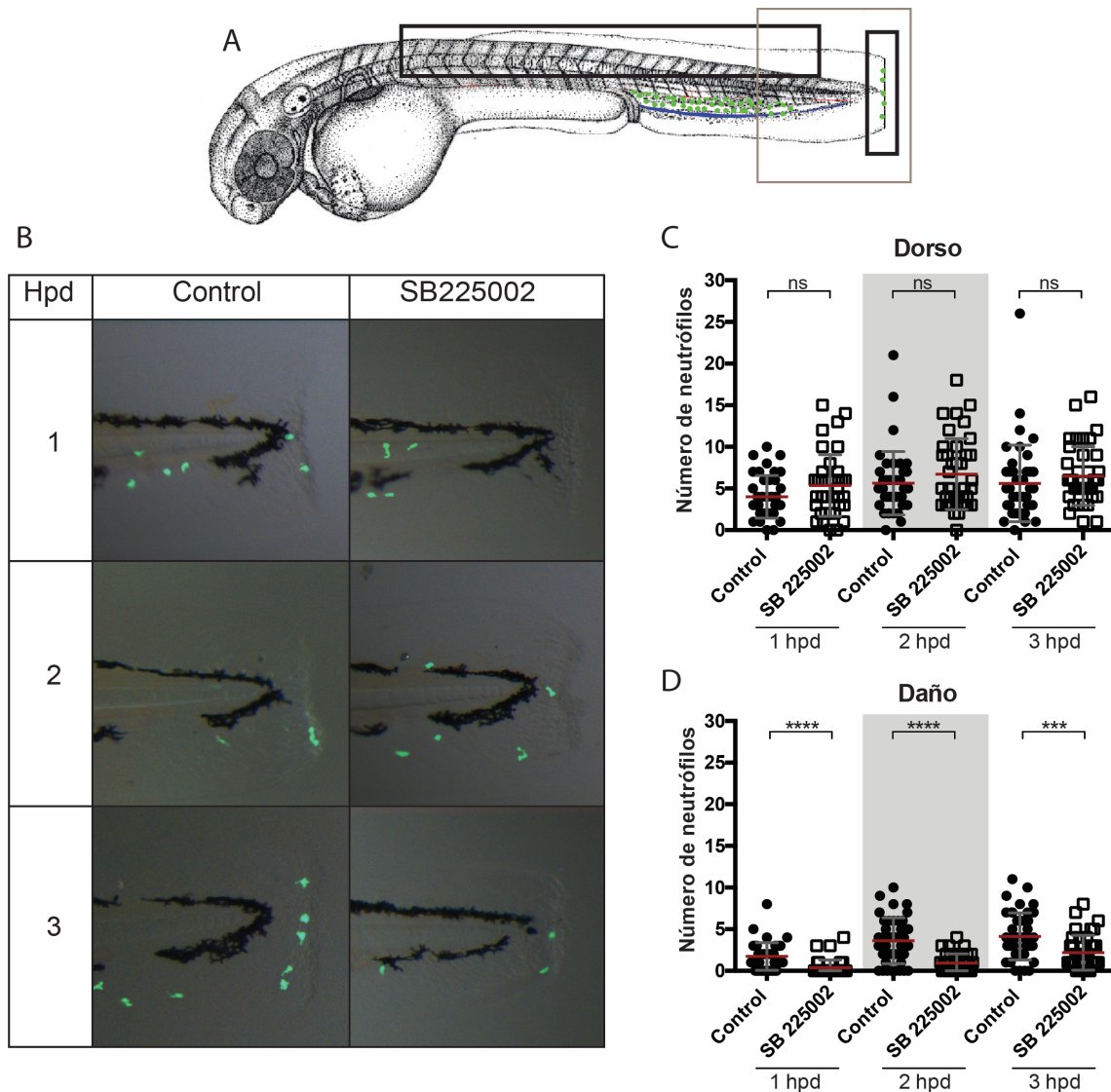


Figura 13: Migración de neutrófilo durante daño leve. (A) Esquema de larva de 48 hpf en posición lateral donde se marca en recuadros negros la zona dorsal y el área dañada, como las zonas en las que se cuantificará la presencia de neutrófilos. (B) Cola de larva $Tg(Bacmpx:GFP)^{i114}$ de 48 hpf después de realizar daño severo. (C-D) Cuantificación de los neutrófilos que migraron al dorso (C), y al daño (D) durante 1, 2 y 3 horas post daño (hpd). ***p value<0,001, ****p value<0,0001

Discusión

Tanto GCSFR como CXCR2 juegan un rol crucial en migración de neutrófilos durante un proceso inflamatorio en mamíferos, favoreciendo su salida desde el tejido hematopoyético y su entrada a la circulación sanguínea. Previo al desarrollo de esta tesis, no existían antecedentes respecto a la función de ambos receptores en el mencionado proceso en peces. Así, durante este trabajo determinamos que Cxcr2 participa en la regulación de la entrada de neutrófilos a los vasos sanguíneos, y por el contrario Gcsfr solo estaría relacionado con la direccionalidad de los neutrófilos al daño.

Respuesta de neutrófilos frente a distintos estímulos: daños leve y severo.

El primer resultado obtenido tiene relación con la diferencia existente entre los modelos de daño leve y severo y la cantidad de neutrófilos que responde en cada caso. Pudimos observar que, en el caso del daño leve, el promedio a las 3 h es de 4 neutrófilos en el daño, a diferencia del modelo de daño severo donde encontramos 17 neutrófilos en la misma hora. Esta diferencia demuestra que efectivamente el organismo reconoce como distintos a estos dos modelos de daño.

Participación de Gcsfr en la migración de neutrófilos a los vasos sanguíneos.

En relación a la función de Gcsfr, los resultados obtenidos indican que este gen no estaría involucrado en el ingreso de los neutrófilos a los vasos sanguíneos, puesto que, en ausencia de él, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos en circulación en comparación al de las larvas control. Por otro lado, si observamos una participación de Gcsfr en la llegada de los neutrófilos al daño y en la direccionalidad de estos mismos hacia dicha área, puesto que cuando no está Gcsfr hay un mayor porcentaje de neutrófilos en el dorso y menor porcentaje en el daño. En otras palabras, los neutrófilos que debían dirigirse al área dañada, perdieron direccionalidad o no recibieron una señal correcta indicando donde debían abandonar la circulación sanguínea por lo que salieron azarosamente al dorso, entre otros tejidos. Estos resultados no concuerdan con lo publicado en mamíferos por el grupo de Lieschke *et al.* (1994), donde demuestran que en ausencia de la vía GCSF/GCSFR los ratones sufren una severa neutropenia. Una posible explicación a esto es que el tipo de análisis

realizado no es comparable. En nuestro caso, los resultados están graficados como porcentaje de neutrófilos movilizados, con el fin de identificar si verdaderamente existe una migración menor de neutrófilos en el morfante, o si vemos una menor migración debido a que la cantidad total de neutrófilos es menor y por ende la “disponibilidad” de neutrófilos para migrar también. Es importante destacar que, en el modelo de daño leve, donde no hay migración de neutrófilos por los vasos sanguíneos para alcanzar la zona afectada, también observamos participación de Gcsfr en la regulación de la llegada de neutrófilos al daño. Esta situación podría indicar que en pez cebra Gcsfr tiene una función distinta a mamíferos o que su efecto en la migración es indirecto y se relaciona con el número total de neutrófilos disponibles para responder a un estímulo. Así, el organismo detectaría que hay menos neutrófilos en la zona hematopoyética permitiendo entonces la salida de un menor número de estas células.

Participación de Cxcr2 en la migración de neutrófilos a los vasos sanguíneos y al daño.

Los resultados obtenidos en relación a Cxcr2 indican claramente que este receptor participa en la regulación de la llegada de los neutrófilos al daño. Ya que, al encontrarse inhibido, se observa una disminución significativa de los neutrófilos que alcanzan el tejido dañado, lo que concuerda con lo observado previamente en pez cebra por el grupo de Deng (2013) y por el grupo de De Oliveira (2013). Por otro lado, Cxcr2 también controlaría la entrada de neutrófilos a los vasos sanguíneos ya que se observa una clara disminución de los neutrófilos presentes en circulación en el grupo inhibido. Resultados previos de nuestro laboratorio (Galdames *et al.*, 2014), indican que, durante un proceso inflamatorio gatillado por un daño severo, la migración de neutrófilos a través de los vasos sanguíneos aumenta significativamente a partir de la segunda hora post daño. Así, los resultados obtenidos en esta tesis estarían en línea con lo previamente reportado. Según lo descrito en ensayos realizados en mamíferos, existe consenso en que CXCR2 está directamente relacionado con la señalización promigratoria de los neutrófilos, ya que se ha visto que neutrófilos que carecen de este receptor, presentan una disminución notoria en alcanzar un área inflamada (Devalaraja *et al.*, 2000; Von Vietinghoff *et al.*, 2010). Es importante destacar que observamos una tendencia a un mayor número de neutrófilos en la región del dorso en ausencia de Cxcr2 (no

significativa), sugiriendo que parte de la baja de neutrófilos en el área dañada se debe a que éstos no pudieron ingresar a los vasos sanguíneos para migrar a dicha área, pero como la señal de retención ya se encontraba inhibida, estos se podrían haber movilizado desde el tejido caudal hematopoyético por la matriz azarosamente hacia el dorso o cualquier otro tejido cercano. Finalmente, dado que y colaboradores (2013) obtiene similares resultados, pero en un modelo inflamatorio gatillado por una infección en pez cebra, sugerimos que la función de Cxcr2 sobre los neutrófilos es conservada independiente del estímulo que active la respuesta inflamatoria.

Conclusión

- 1.- Gcsfr no participa en la regulación de la entrada de neutrófilos a los vasos sanguíneos durante un proceso inflamatorio estéril. Por el contrario, si regula su llegada a la zona dañada.
- 2.- Cxcr2 participa tanto en la regulación de la entrada de neutrófilos a los vasos sanguíneos como en su llegada al área dañada durante un proceso inflamatorio estéril.

Bibliografía

Bennet C., Kanki J., Rhodes J., Liu T., Paw B., Kieran M., Langenau D., Delahaye-Brown A., Zon L., Fleming M., Look T. (2001). Myelopoiesis in zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* 98. 643-651.

Cacalano G., Lee J., Ryan A., Pitts-Meek S., Hultgren B., Wood W., Moore M. (1994). Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* 265. 682-684.

Chen G., Núñez G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10. 826-837.

Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, Margalit R, Zsak M, Nagler A, Hardan I et al (2005) Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol* 6:1038–1046

De Oliviera S., Reyes-Aldasoro C., Candel S., Renshaw S., Mulero V., Calado A. (2013). CXCL8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol*. 190. 4349-43459.

Demetri G., Griffin J. (1991) Granulocyte Colony-Stimulating factor and its receptor. *Blood* 78. 2791-2808.

Deng Q., Sarris M., Bennin D. Green J., Herbomel P., Huttenlocher A. (2013). Localized bacterial infection induces systemic activation of neutrophils through CXCR2 signaling in zebrafish. *J Leukoc Biol*.93. 761-769.

Devalaraja R. M., Nanney L. B, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja M. N, and Richmond A. (2000). Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 115: 234-244.

Eash K., Greenbaum A., Gopalan P., Link D. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* 120. 2423-2432.

Elks P. M., Loynes A. C, Renshaw S. A. (2001). Measuring inflammatory cell migration in zebrafish. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols.* Chapter 18.

Ellet F. Lieschke G. (2011). Computational quantification of fluorescent leukocyte numbers in zebrafish embryos. *Methods Enzymol.* 506. 425-435.

Galdames J., Zuñiga-T C., Reyes A., Feijoo CG. (2014). Gcsf-chr19 promotes neutrophil migration to damages tissue through blood vessels in zebrafish. *J. Immunol.* 193. 372-378.

Kim H., De La Luz Sierra M., Williams C., Gulino A., Tosato G. (2006). G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 198. 812-820.

Kumar V., Cotran R., Robbins S.L. (2003). *Robbins Basic Pathology.* 8th edition. Elsevier Health.

Layton J., Hall N. (2006). The interaction of G-CSF with his receptor. *Front Biosci.* 11. 3181-3189.

Lieschke G. J., Grail D., Hodgson G. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency and impaired mobilization. *Blood* 84. 1737-1746.

Lieschke G. J., Currie P. D. (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.*8: 353-367.

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-J Hematol.* 113: 2535-2546.

Link D., Semerad C, Liu F., Gregory A., Stumpf K. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity.*17. 413-423.

Link D., (2015). Regulation of Hematopoiesis by CXCL12/ CXCR4 Signaling. Chapter 30. Targeted Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *Current Cancer Research.* Springer, New York, NY. 593-605.

Liu F., Wu H., Wesselschmidt R., Kornaga T., Link DC. (1996). Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor deficient mice. *Immunity* 5. 491-501.

Lloyd A., Biragyn A. Johnston J., Taub D., Xu L., Michiel D., Sprenger H., Oppenheim J., Kelvin D. (1995). Granulocyte colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 270. 28188-28192.

Majno,G y Joris,I. (2004). Cells, tissues and disease, principles of General Pathology. 2nd Edition. Oxford Univ. Press.

Martin J. S, Renshaw S. A. (2009) Using in vivo zebrafish models to understand the biochemical basis of neutrophilic respiratory disease. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 830-837.

Mayani H., Flores E., Pelayo R., Montesinos J., Flores P., Chavez A. (2007). Hematopoiesis. *Cancerología* 2. 95-107.

McDonald B., Pittman K., Menezes G., Hirota S., Slaba I., Waterhouse C., Beck P., Maruve D., Kubes P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330. 361-366.

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449. 819-826.

Nagasane H., Miyamasu M., Yamaguchi M., Imanishi M., Tsuni N., Matsushima K., Yamamoto ., Morita Y., Hirai K. (2002). Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 71. 711-717.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature Rev. Immunol* 420. 846-842

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and oportunities. *Nature Rev. Immunol.* 6. 173-182.

Paredes-Zúñiga, S., Morales, R.A., Muñoz-Sánchez, S., Muñoz-Montecinos C., Parada M., Tapia K., Rubilar C., Allende MA., Peña O. (2017). CXCL12a/CXCR4b acts to retain neutrophils in caudal hematopoietic tissue and to antagonize recruitment to an injury site in the zebrafish larva. *Immunogenetics* 69: 341-349.

Pazhakh V, Clark S, Keightley MC, Lieschke GJ. (2017). A GCSFR/CSF3R zebrafish mutant models the persistent basal neutrophil deficiency of severe congenital neutropenia. *Scientific Reports*. 2017; 7:44455.

Renshaw S. A., Loynes C. A., Trushell D. M. I., Elworthy S., Ingham P. W. and Whyte M. K. B. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood-J Hematol.* 108: 3976-3978

Semerad C., Liu F., Gregory AD., Stumpf K., Link D. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17. 413-423.

Semerad C., Christopher M., Liu F., Short B., Simmons P., Winkler I., Levesque J., Chappel J., Ross F., Link D. (2005) G-CFS potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 106. 3020-3027.

Sadik C.D., Kim N.D. and Luster A.D. (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32. 452-460.

Serhan, C. And Savill, J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunol.* 6. 1191-1197.

Stachura D., Svoboda O., Lau R., Balla K., Zon L., Bartunek P., Traver D. (2011). Clonal analysis of hematopoietic progenitor cells in the zebrafish. *Blood* 118. 1274 1282.

Stachura D., Svoboda O., Campbell C., Espín-Palazón R., Lau R., Zon L., Bartunek P., Traver D. (2013). The zebrafish granulocyte colony-stimulating factors (Gcsfs): Two paralogous cytokines and their roles in hematopoietic development and maintenance. *Blood* 122. 3918-3928.

Summers C., Rankin S., Condliffe A., Singh N., Peters A., Chilvers E. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.*31. 318-324.

Suratt B., Petty j., Young S., Malcolm k., Lieber J., Nick J., Gonzalo J., Henson P., Worthen G. (2004). Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 104. 565-571.

Van Damme J., Decock B., Conings R., Lenaerts J., Opdenakker G., Billiau A. (1989). The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. *Eur. J. Immunol* 19. 1189-1194.

Von Vietinghoff S., Asagiri M, Azar D, Hoffmann A, and Ley K. (2010). Defective regulation of CXCR2 facilitates neutrophil release from bone marrow causing spontaneous inflammation in severely NF-kappa B-deficient mice. *J Immunol*. 185: 670-678.

Walters KB, Green JM, Surfus JC, Yoo SK, Huttenlocher A (2010) Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood* 116:2803–2811

Wengner A., Pitchford S., Furze R., Rankin S. (2008). The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 111. 42-49.

Westerfield, M. (1994) *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of the Zebrafish (Danio rerio)*, 5th ed. Eugene: University of Oregon Press.

Westerfield M., Zon L. I, Detrich H. W. (2009). *Essential zebrafish methods: Cell & Developmental biology*. Academic Press. London.

White J., Lee J., Young P., Hetrtzberg R., Jurewicz A., Chaikin M., Wissowson K., Foley J., Marton L., Griswold D., Sarau H. (1998). Identification of a potent selective non-peptide CXCR2 Antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem*. 273. 10095-10098.