

**Caracterización de los macrófagos del pez cebra en eventos de
inflamación por daño tisular**

Tesis

Entregada a La

Universidad de Chile

En Cumplimiento Parcial de los Requisitos

Para Optar al Grado de

Doctor en Ciencias, Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

Rodrigo Alonso Morales Castro

Julio, 2018

Director de Tesis Dr:

Miguel Luis Allende Connelly

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 el candidato

RODRIGO ALONSO MORALES CASTRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 31 de mayo del 2018.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Luis Allende Connelly

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. María Rosa Bono Merino

Dr. Álvaro Alberto Glavic Maurer

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez

Dra. Carmen Gloria Feijóo García

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie (1867 – 1934)



Nací el 25 de abril de 1989. Oriundo de Recoleta, Santiago, ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en el año 2007, egresando de ésta el año 2011. Realicé mi tesis de pregrado en el área de la inmunología, trabajando con muestras humanas bajo la supervisión del Dr. Juan Carlos Aguillón en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, titulándome de la carrera el año 2013. Ese mismo año entré al programa de Doctorado en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, y luego de realizar rotaciones en cultivo celular y en inmunología en ratones, decidí continuar investigando el sistema inmune, pero esta vez en un modelo diferente a los que trabajé previamente, que es el pez cebra, y bajo la supervisión del Dr. Miguel Allende. Con este modelo he podido aprender y perfeccionar una enorme variedad de técnicas y estrategias experimentales, que pretendo aplicar en mi vida científica futura.

AGRADECIMIENTOS

A Miguel por la confianza depositada en mí durante todos los años que pasé en su laboratorio.

A la Comisión de Tesis por su aportes y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio de Miguel que estuvieron durante mi estadía, y también a todos los que pasaron por los laboratorios de Biología del Desarrollo en el edificio Biología-Milenio.

A mi familia y amigos.

A todos quienes me acompañaron y apoyaron durante este camino.

ÍNDICE

Índice.....	iii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Tabla de Abreviaciones.....	x
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
3.1. Inflamación y sistema inmune.....	4
3.2. Macrófagos: orígenes y distribución en el organismo.....	6
3.3. Función de los macrófagos en la respuesta inflamatoria.....	9
3.4. Pez cebra como modelo para el estudio de la respuesta inflamatoria.....	12
3.5. Caracterización de los macrófagos en el pez cebra.....	14
3.6. Función de los macrófagos en la regeneración de tejidos en el pez cebra.....	18
4. Hipótesis del trabajo.....	23
5. Objetivos.....	24
5.1. Objetivo General.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24
5.2.1. Objetivo específico 1.....	24
5.2.2. Objetivo específico 2.....	24

5.2.3. Objetivo específico 3	24
6. Materiales y métodos	25
6.1. Material biológico	25
6.2. Amputación de la aleta caudal en larvas de pez cebra y cuantificación de células inmunes reclutadas en el sitio de daño	26
6.3. Seguimiento temporal de macrófagos mediante time lapse	27
6.4. Análisis de circularidad de los macrófagos en larvas	29
6.5. Inyección de liposomas de clodronato	29
6.6. Cuantificación de la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra	30
6.7. Proliferación celular e inmunofluorescencia de larva completa	30
6.8. Análisis de muerte celular	32
6.9. Detección de especies reactivas de oxígeno	32
6.10. Expresión génica medida mediante PCR cuantitativo	33
6.11. Análisis estadístico	34
7. Resultados	35
7.1. Identificar y clasificar las poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra y examinar su comportamiento durante una respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular	35
7.1.1. Identificación y clasificación de poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra	35
7.1.2. Comportamiento de las poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra durante una respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular	38

7.1.3. Reclutamiento de macrófagos en larvas mutantes para csf1ra	39
7.1.4. Reducción parcial de macrófagos en larvas de pez cebra	44
7.2. Evaluar la contribución de las distintas poblaciones de macrófagos del pez cebra a la regeneración de tejidos.....	49
7.2.1. Cuantificación de la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra.	49
7.2.2. Regeneración de la aleta caudal en larvas mutantes panther	50
7.2.3. Regeneración de la aleta caudal en larvas tratadas con Lipo-clodronato.....	51
7.3. Establecer la relación de las poblaciones de macrófagos identificadas con la regulación de moléculas pro-inflamatorias durante la regeneración de tejidos en larvas de pez cebra.....	57
7.3.1. Proliferación y muerte celular ante la amputación de la aleta caudal en larvas	57
7.3.2. Acumulación de especies reactivas de oxígeno en mutantes panther	58
7.3.3. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en mutantes panther ante la amputación de la aleta caudal	60
8. Discusión.....	63
8.1. Heterogeneidad de los macrófagos en larvas de pez cebra	63
8.2. Reclutamiento y función de los macrófagos periféricos durante una respuesta inflamatoria	65
8.3. Importancia de los macrófagos periféricos en la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra	68

8.4. Macrófagos periféricos y el control del ambiente pro-inflamatorio	70
8.5. Modelo propuesto.....	75
9. Conclusiones	78
10. Referencias	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de método de daño generado por la amputación de la aleta caudal.	27
Figura 2. Clasificación de los macrófagos de larvas de pez cebra respecto a su localización en la región posterior.....	37
Figura 3. Visualización de las células inmunes reclutadas ante un evento inflamatorio en larvas de pez cebra	38
Figura 4. Seguimiento temporal del reclutamiento de macrófagos periféricos y CHT- residentes al sitio del daño generado por la amputación de la aleta caudal en larvas de 72hpf.....	40
Figura 5. Cuantificación del número de macrófagos en la región posterior de larvas mutantes <i>panther</i>	41
Figura 6. Reclutamiento de macrófagos en larvas <i>panther</i> luego de la amputación de la aleta caudal.....	42
Figura 7. Cantidad y reclutamiento de neutrófilos en larvas mutantes <i>panther</i>	43
Figura 8. Reducción del número de macrófagos mediado por la inyección de liposomas de clodronato en larvas de pez cebra.....	45
Figura 9. Cuantificación de macrófagos en la región posterior de larvas inyectadas con Lipo-clodronato 1:50.....	46
Figura 10. Reclutamiento de macrófagos en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50 luego de la amputación de la aleta caudal.	47

Figura 11. Abundancia y reclutamiento de neutrófilos en larvas inyectadas con Lipo-clodronato 1:50.....	48
Figura 12. Método para la cuantificación de la regeneración de la aleta caudal en larvas amputadas a las 72hpf	50
Figura 13. Regeneración de la aleta caudal en larvas mutantes <i>panther</i>	51
Figura 14. Regeneración de la aleta caudal en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50	52
Figura 15. Reducción de poblaciones de macrófagos ante el tratamiento con Lipo-clodronato 1:10.....	53
Figura 16. Regeneración de la aleta caudal en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 a los 3dpa.	54
Figura 17. Dependencia temporal de la depleción de macrófagos con Lipo-clodronato 1:10 sobre la regeneración de la aleta caudal en larvas.....	55
Figura 18. Relación entre poblaciones de macrófagos de larvas de pez cebra y la regeneración de la aleta caudal.....	56
Figura 19. Diferencias en la proliferación y muerte celular entre larvas <i>panther</i> y WT .	58
Figura 20. Acumulación de ROS en el sitio de daño de larvas <i>panther</i> y WT	60
Figura 21. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias luego de la amputación de la aleta caudal en larvas <i>panther</i> y WT.....	62
Figura 22. Modelo propuesto	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados para qRT-PCR.....	34
--	----

TABLA DE ABREVIACIONES

ACFP: *Adult caudal fin primordium* (primordio de la aleta caudal adulta).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

AGM: *aorta gonad mesonephros* (región aorta-gónada-mesonefros)

BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina.

Ccr2: receptor de quimioquina tipo C-C 2.

cDNA: Secuencia híbrida RNA-DNA de doble hebra generada por retrotranscripción del
RNA.

CHT: *Caudal hematopoietic tissue* (tejido caudal hematopoiético).

Csf1r: receptor del factor estimulante de colonias 1.

csf1ra: gen del receptor del factor estimulante de colonias 1a.

Ct: *cycle threshold* (umbral de ciclo).

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína.

dpa: días post-amputación de la aleta caudal.

dpf: días post-fertilización.

H₂DCFDA: diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

hmx1a: gen de la hemo oxigenasa 1a

hpa: horas post-amputación de la aleta caudal.

hpf: horas post-fertilización.

hpi: horas post-inyección.

HSC: *hematopoietic stem cell* (célula madre hematopoiética)

Il-x: Interleuquina “x”.

ilx: gen de la interleuquina “x”.

Lipo-clodronato: liposomas cargados con clodronato.

Lipo-PBS: liposomas cargados con PBS.

MΦ: macrófago.

mpeg1: gen expresado en macrófagos 1.

mpx: gen de la mieloperoxidasa.

NF-κB: Factor nuclear κB.

Panther: peces cebra mutantes homocigotos para el gen *csf1ra*.

pb: pares de bases de nucleótidos.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PFA: paraformaldehído.

PRR: *pattern recognition receptor* (receptor de reconocimiento de patrones).

qRT-PCR: PCR cuantitativo de DNA generado a partir de RNA por retrotranscripción.

RT-PCR: PCR de DNA generado a partir de RNA por retrotranscripción.

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno).

SD: Desviación estándar.

SEM: Error estándar del promedio.

t₀: Tiempo inicial.

Tg(xxx): línea transgénica “xxx”.

Tgf-β: Factor de crecimiento transformante β.

tgfb1a: gen del factor de crecimiento transformante β 1a.

Tnf- α : Factor de necrosis tumoral α .

tfa: gen del factor de necrosis tumoral α

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (marcaje de secuencias de DNA rotas a través de la transferencia de dUTP modificado).

VDA: *ventral wall of dorsal aorta* (pared ventral de la aorta dorsal).

WT: *wild-type* (individuos silvestres sin mutaciones).

1. RESUMEN

El rol de los macrófagos durante la regeneración de tejidos en el pez cebra ha sido ampliamente documentado en los últimos años. Sin embargo, existe evidencia de que los macrófagos del pez cebra son una población heterogénea de células, con funciones diferentes durante respuestas inflamatorias gatilladas por infección o daño tisular. En este trabajo, se realizó una clasificación de los macrófagos presentes en larvas de pez cebra de acuerdo a su ubicación, morfología y migración en condiciones homeostáticas. En primer lugar, fue posible distinguir macrófagos residentes de tejidos periféricos y, un segundo grupo, localizados en tejidos hematopoiéticos, lo que sugiere un estado de diferenciación o activación distinto entre ellos. Segundo, dentro del marco de un daño tisular inducido por la amputación de la aleta caudal en larvas, se estudió el reclutamiento de ambas poblaciones hacia la zona afectada, así como también los efectos de su ausencia, con el fin de caracterizar el funcionamiento específico de cada población en el proceso regenerativo. De esta manera, fue posible determinar que los macrófagos periféricos son necesarios para la correcta regeneración del tejido perdido debido a su temprano reclutamiento y al efecto que tienen sobre la regulación de muerte celular y proliferación en el blastema. Además, se observó que los macrófagos periféricos contribuyen a la regeneración de la aleta caudal a través de la regulación negativa de mediadores pro-inflamatorios en el sitio de daño, tales como interleuquina-1 β (*il1b*) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Este trabajo revela la existencia de una diversidad funcional en la

población de macrófagos presentes en la larva de pez cebra durante una respuesta inflamatoria por daño tisular y en la regeneración de tejidos.

2. ABSTRACT

The role of macrophages during regeneration in zebrafish has been well documented during the last years. Nevertheless, new evidence indicates that zebrafish macrophages are a heterogeneous population of cells, and that they can play different roles during immune responses and in tissue restoration after damage and infection. In this work, we first aimed to classify zebrafish macrophages according to their location in the larva, morphology and migration parameters during homeostasis, distinguishing peripheral and hematopoietic tissue-resident macrophages, and suggesting that these populations have a different activation status. Using the tail fin amputation in zebrafish larvae as a method to analyze the recruitment and the role of both macrophage populations during inflammation and tissue regeneration, we observed that peripheral macrophages were the main contributors of tail fin regeneration, based on their early recruitment to the damage site, and their regulation of cell death and blastema proliferation, and therefore, in the restoration of the lost fin. Further, we assign a specific role for peripheral tissue-resident macrophages, and we propose that these cells contribute to tail fin regeneration through the down-regulation of the interleukin-1 β expression (*illb*) and reactive oxygen species (ROS) accumulation in the damaged site. This work suggests that there is a functional diversity in macrophages recruited after tissue damage in zebrafish larvae during inflammation and tissue regeneration.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Inflamación y sistema inmune

La inflamación es el proceso por el cual el organismo responde ante agentes inflamatorios potencialmente peligrosos, como patógenos o señales de daño celular y tisular, con el fin de eliminar el agente nocivo y restablecer la homeostasis del organismo. El inicio del proceso inflamatorio es caracterizado por la liberación de mediadores en el sitio de daño que, además de generar una respuesta nociva para el agente inflamatorio, permiten el reclutamiento de células del sistema inmune, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos, las cuales poseen diversos mecanismos que permiten la eliminación de patógenos y restos celulares. Esta combinatoria de eventos es conocida como la respuesta inmune, la cual puede ser diferenciada entre innata y adaptativa. La respuesta inmune innata se encuentra presente en gran parte de los metazoos y consiste en la detección de patrones moleculares altamente conservados asociados a patógenos, daño o estrés por receptores específicos, y se plantea que en este tipo de respuesta la principal vía de activación inducida es la del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Janeway, 2005). No sólo células del sistema inmune forman parte de la inmunidad innata, sino que también participan células epiteliales y las mucosas, que contienen una gran cantidad de enzimas con función lítica. La respuesta inmune adaptativa surge evolutivamente con la aparición de los vertebrados cartilagosos, y la componen un grupo de células particulares que complementan las funciones del sistema inmune innato, ampliando el repertorio de

moléculas a reconocer, mejorando la especificidad de la respuesta, la temporalidad, y permitiendo el desarrollo de la memoria inmunológica (Janeway, 2005).

Tan importante como la inducción de la respuesta inflamatoria es la regulación y término de dicha respuesta. La etapa de eliminación de las señales y de las células con actividad pro-inflamatoria del sitio de daño se conoce como la resolución de la inflamación, cuya finalidad es impedir que células o tejidos cercanos al sitio de inflamación se vean afectados por la respuesta inflamatoria (Ayala y cols., 2003). La desregulación de este proceso puede gatillar eventos de inflamación crónica, que tienen por consecuencia la muerte del tejido afectado y circundante, afectando de esta forma su función (Godwin y Brockes, 2006; Julier y cols., 2017).

En eventos de inflamación por daño tisular, donde la integridad de un tejido se ve comprometida, junto con la resolución de la inflamación se inicia el proceso de reparación y/o regeneración del tejido afectado. La reparación consiste en la formación de un tejido distinto al original, denominado cicatriz, que permite mantener la estructura del resto del tejido no afectado, aunque puede impactar negativamente en su función. Por otro lado, la regeneración de tejidos consiste en la restauración completa del tejido afectado, manteniendo las características que presentaba antes de ser dañado. La regeneración es un proceso que ocurre en tejidos y órganos de distintos organismos, incluyendo a humanos (Forbes y Rosenthal, 2014), por lo que el potencial de su aplicación en medicina regenerativa es la razón principal para comprender los mecanismos que operan durante este proceso. En la regeneración de un tejido, son liberados factores que promueven la síntesis y remodelación de la matriz extracelular, factores pro-angiogénicos que permiten la llegada de nutrientes al sitio de inflamación, como también factores tróficos que

permiten la proliferación y diferenciación de células del tejido dañado (Forbes y Rosenthal, 2014; Mantovani y cols., 2013).

Durante la respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular, las distintas células del sistema inmune participan tanto inhibiendo o promoviendo este proceso. Los neutrófilos son reclutados masivamente al sitio de daño y poseen una alta actividad pro-inflamatoria, aunque también contribuyen a la resolución de la inflamación (Julier y cols., 2017; Selders y cols., 2017). El rol de los linfocitos T y B es predominantemente pro-inflamatorio (Julier y cols., 2017), pero existen subpoblaciones de éstos, como los linfocitos T reguladores, que pueden promover una respuesta anti-inflamatoria y la reparación o regeneración de tejidos (Hui y cols., 2017; Zhang y cols., 2017). Por otra parte, los macrófagos cumplen múltiples roles, ya que promueven la respuesta pro-inflamatoria en etapas tempranas, participan activamente en la resolución de la inflamación y contribuyen a la reparación/regeneración del tejido dañado (Chazaud, 2014; Wynn y Vanella, 2016). Estas características han situado a los macrófagos como elementos claves en el estudio de la inflamación y la reparación/regeneración de tejidos en condiciones de daño tisular.

3.2. Macrófagos: orígenes y distribución en el organismo

Los macrófagos son células inmunes comúnmente denominadas como “células fagocíticas profesionales” o también como los “centinelas” del organismo. Fueron descritas inicialmente por Élie Metchnikoff en embriones de estrellas de mar, y luego en vertebrados, a finales del siglo XIX por su rol fagocítico y su capacidad de responder a diferentes estímulos foráneos (Tauber, 2003). Las caracterizaciones posteriores de los macrófagos y sus funciones han sido realizadas principalmente en mamíferos, gracias al

desarrollo de técnicas como la microscopía, cultivo celular, y la detección de moléculas por anticuerpos monoclonales (Gordon, 2007). En la actualidad, se sabe que estas células se encuentran distribuidas en todo el organismo y no sólo son importantes durante la respuesta contra un agente foráneo, sino que también cumplen múltiples roles durante el desarrollo y organogénesis (Mass y cols., 2016), daño tisular (Chazaud, 2014; Wynn y Vanella, 2016) e incluso en condiciones homeostáticas (Ginhoux y Williams, 2016; Wynn y cols., 2013). Estas variedades de funciones han llevado a clasificar a los macrófagos de distintas formas, en base a su origen, localización y función durante una respuesta inflamatoria.

En vertebrados es posible distinguir dos oleadas hematopoiéticas, que dan origen a dos grupos de macrófagos. La primera oleada hematopoiética o hematopoesis primitiva se produce en el saco vitelino y da origen a los macrófagos primitivos, los cuales se distribuyen en distintos tejidos del organismo y dan lugar a los primeros macrófagos residentes de tejidos, como la microglía del sistema nervioso central (Ginhoux y cols., 2010), las células de Kupffer en el hígado y las células de Langerhans en la piel (Schulz y cols., 2012). Por otro lado, la segunda oleada hematopoiética o hematopoesis definitiva ocurre en el endotelio de la región denominada como AGM (abreviación de *aorta gonad mesonephros*) donde progenitores mieloides conocidos como HSCs (abreviación de *hematopoietic stem cells*) migran a un tejido hematopoiético transitorio, para luego volver a migrar al órgano hematopoiético definitivo (Ginhoux y Jung, 2014; McGrath y cols., 2015). Estos progenitores dan origen a células llamadas monocitos, los cuales son capaces de migrar a través del torrente sanguíneo y de diferenciarse a macrófagos al localizarse en un tejido periférico (Ginhoux y Jung, 2014). Si bien se pensaba anteriormente que los

macrófagos residentes de tejidos en la periferia provenían de monocitos, es decir, de la oleada hematopoiética definitiva (van Furth, 1982), se ha propuesto en la última década que existe una contribución particular de cada oleada hematopoiética a la población de macrófagos residentes en diferentes tejidos (Ginhoux y Williams, 2016). Aunque esta idea ha sido ampliamente aceptada, se ha demostrado que los macrófagos de las distintas oleadas hematopoiéticas tienen la potencialidad de colonizar indistintamente tejidos en la periferia y son capaces de adquirir funciones particulares del tejido que colonizan, independiente del origen hematopoiético (van de Laar y cols., 2016). Estos hallazgos resaltan la idea de que la colonización de tejidos periféricos por parte de los macrófagos es un proceso complejo, y que el origen hematopoiético no necesariamente da cuenta de una colonización preferente de los macrófagos durante el desarrollo.

Los macrófagos son células capaces de localizarse en distintos tejidos, participando en funciones básicas y en el desarrollo de éstos, además de contribuir a la homeostasis del tejido cuando éste es dañado (Chazaud, 2014; Gordon y Plüddemann, 2017; Okabe, 2018). Para lo anterior, los macrófagos interactúan con el tejido y su ambiente, adquiriendo una identidad propia del tejido en donde residen, en términos de expresión génica y funcionalidad (Gosselin y cols., 2014; Lavin y cols., 2014). No obstante, esta característica es plástica, y se ha comprobado experimentalmente que puede ser modificada si un macrófago residente de un tejido es reubicado en otro, adquiriendo parcialmente la identidad de un macrófago propio del nuevo tejido residente y perdiendo su perfil anterior (Amit y cols., 2016). Lo anterior da cuenta de que el ambiente propio del tejido en donde un macrófago reside influye sobre su función, pero aun deja en duda si este fenómeno ocurre sólo en condiciones homeostáticas o también durante una respuesta

inflamatoria, donde existe una competencia de señales que pueden afectar la distribución de los macrófagos en el organismo.

3.3. Función de los macrófagos en la respuesta inflamatoria

Durante una respuesta inflamatoria, los macrófagos detectan señales de peligro a través de receptores presentes en su superficie, como los *toll-like receptors* (TLRs), receptores de lectina, manosa y *scavenger*, participando en la remoción de células muertas y elementos no propios del organismo mediante fagocitosis, y también en la potenciación de la respuesta inflamatoria, promoviendo el reclutamiento de otras células inmunes como neutrófilos y monocitos (Davies y cols., 2013). Junto con lo anterior, ha sido descrito que los macrófagos permanecen durante todo el proceso de reparación y/o regeneración en el tejido dañado, y contribuyen al proceso mediante la liberación de factores tróficos y angiogénicos, que permiten la síntesis de matriz extracelular y la activación y proliferación de células multipotentes del tejido asociado (Chazaud, 2014; Wynn y Vanella, 2016). La incorrecta función de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria ha sido observada en patologías como la diabetes, donde los macrófagos de ratones diabéticos mantienen un perfil pro-inflamatorio y son menos eficientes en realizar el proceso de eferocitosis, lo que impide la remoción de neutrófilos y células apoptóticas en un tejido dañado, perpetuando una respuesta inflamatoria en el sitio de daño, y con ello, inhibiendo la reparación del tejido (Khanna y cols., 2010).

Como se mencionó anteriormente, existe una clasificación funcional de los macrófagos durante una respuesta inflamatoria. De esta forma, es posible distinguir a macrófagos con una función pro-inflamatoria, denominados M1, y a aquellos que cumplen

una función anti-inflamatoria, o macrófagos M2. Los nombres de M1 y M2 fueron propuestos por la capacidad de estos macrófagos de secretar citoquinas relacionadas al perfil Th1 y Th2 de linfocitos, respectivamente (Mills y cols., 2000). Con el tiempo, ha sido descrito que estos grupos presentan una expresión diferencial de genes y participan activamente en la respuesta inflamatoria. Los macrófagos del tipo M1 se caracterizan por la expresión de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), proteína involucrada en la síntesis de especies reactivas de oxígeno que promueven la eliminación de patógenos (MacMicking y cols., 1997), y además por la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como interleuquina(IL)-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que promueven el reclutamiento de células inmunes en el sitio de inflamación y agudizan el daño, además de secretar IL-12 e IL-23, que promueven la polarización de linfocitos T a un perfil pro-inflamatorio del tipo Th1/Th17 (Benoit y cols., 2008). Por otro lado, los macrófagos del tipo M2 inducen la polarización de linfocitos T hacia un perfil Th2, y cumplen una función inmunomoduladora y pro-resolutiva (Lucas y cols., 2010), promoviendo la síntesis de matriz extracelular y la disminución de la respuesta inflamatoria a través de la secreción de factores tróficos y mediadores anti-inflamatorios como IL-10 y TGF- β (Laskin y cols., 2011). A diferencia de los macrófagos M1 que expresan iNOS, los macrófagos M2 son caracterizados por la expresión de la enzima arginasa 1 (Arg1), implicada en la producción de poliaminas necesarias para la síntesis de colágeno y la proliferación celular, eventos importantes en el proceso de reparación y remodelación de tejidos (Pesce y cols., 2009). Los macrófagos del tipo M2 también participan en la evasión de la respuesta anti-tumoral del organismo, contribuyendo al proceso angiogénico, la remodelación y a la mantención de un ambiente anti-inflamatorio

en zonas tumorales (Cook y Hagemann, 2013). El origen y/o adquisición de un perfil M1 o M2 por parte de los macrófagos ha sido un tema controversial, ya que se ha visto que en algunos tejidos los macrófagos M1 y M2 provienen de distintas poblaciones, mientras que en otros tejidos son los mismos macrófagos M1 los que son polarizados hacia un perfil M2 (Shechter y cols., 2013; Sica y Mantovani, 2012). Por otra parte, se sabe que los macrófagos residentes de tejidos periféricos poseen propiedades anti-inflamatorias (Murray y Wynn, 2011) y que contribuyen positivamente a la reparación/regeneración de tejidos (Wynn y Vanella, 2016), lo cual ha aumentado el interés en el estudio de esta población de células, ya que es clave para entender la progresión de una respuesta inflamatoria. Sin embargo, la idea de la polarización de M1 a M2 de los macrófagos ha sido frecuentemente refutada en los últimos años, debido a que tales fenotipos fueron descritos *in vitro* y no representan la gran variedad de fenotipos observada en los macrófagos en contextos *in vivo*, la cual depende del tipo de respuesta inflamatoria y de las señales propias del tejido afectado que son cruciales para contextualizar la respuesta inmune (Martínez y Gordon, 2014). De esta forma, se ha propuesto un modelo en que el origen de los macrófagos, los estímulos ambientales y el tiempo pueden simultáneamente afectar el comportamiento de los macrófagos durante una respuesta inflamatoria (Nahrendorf y Swirski, 2016).

En resumen, durante una respuesta inmune los macrófagos pueden cumplir con funciones pro-inflamatorias o anti-inflamatorias, dependiendo de diversas variables, algunas de ellas aún poco comprendidas. Al ser los macrófagos un grupo de células altamente dinámicas, el uso de nuevos modelos animales, donde se pueda identificar y rastrear temporalmente a macrófagos en distintas etapas del desarrollo y durante una

respuesta inmune, podría dar nuevos indicios sobre el comportamiento y función de estas células en un contexto *in vivo*.

3.4. Pez cebra como modelo para el estudio de la respuesta inflamatoria

El pez cebra (*Danio rerio*) surge como una alternativa atractiva para el estudio de la mielopoiesis (Berman y cols., 2005) y de la respuesta inmune innata, ya que en estadíos larvales se encuentran presente principalmente los componentes del sistema inmune innato como neutrófilos (Lieschke y cols., 2001) y macrófagos (Herbomel y cols., 1999). Las células del sistema inmune adaptativo llegan a ser funcionales recién varias semanas después de la fecundación (Lam y cols., 2004). Esta particularidad del desarrollo del pez cebra permite el estudio de la dinámica y la contribución específica de las células del sistema inmune innato a la respuesta inflamatoria (Sullivan y Kim, 2008). Otra ventaja de este modelo animal es la transparencia de sus células y tejidos durante los estados larvales, lo cual permite el rastreo de células *in vivo* y en tiempo real durante dicho período. Lo anterior se complementa con la fácil manipulación genética, permitiendo la obtención de peces mutantes, transgénicos y reporteros codificantes para proteínas fluorescentes conjugados a promotores específicos para un tipo celular. Esto permite el rastreo *in vivo* de una o más células sin interferir el proceso bajo estudio ni el análisis de la morfología celular, e incluso permite la descripción de interacciones entre distintas células en el organismo en tiempo real (Lin y cols., 2016).

El sistema inmune del pez cebra tiene una alta homología respecto al sistema inmune de mamíferos. Se han identificado diferentes genes codificantes para receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por su abreviación en inglés, *pattern recognition*

receptors) y vías de señalización relacionados a la inmunidad innata en el pez cebra, cuyas funciones se encuentran altamente conservadas (Li y cols., 2017). De la misma forma, y además de los neutrófilos y macrófagos, diversas células del sistema inmune presentes en mamíferos han sido descritos en el pez cebra, tales como células dendríticas (Wittamer y cols., 2011), linfocitos B y T (Trede y cols., 2004), entre otros. Como se mencionó anteriormente, la presencia de estas células es dependiente del estadio en el cual se examine el pez cebra, por lo que la respuesta inmune varía con el tiempo. Lo anterior da cuenta de que el pez cebra puede ser utilizado como un modelo simplificado, al estudiar el rol del sistema inmune innato durante fases larvales, pero también como un modelo para el estudio de interacciones complejas entre múltiples y distintos tipos de células inmunes en ejemplares juveniles o adultos.

Los estudios de la respuesta inflamatoria en el pez cebra han sido fundamentales para entender algunos procesos inmunes durante una infección, como por ejemplo el rol de distintas células inmunes en la erradicación de diversos tipos de patógenos (Torraca y Mostow, 2018). Por otro lado, el pez cebra ha sido utilizado ampliamente para el estudio de la respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular, el cual puede ser realizado de forma mecánica (Elks y cols., 2011), eléctrica (Moya-Díaz y cols., 2014) o farmacológica (Curado y cols., 2008). Además de lo anterior, el pez cebra tiene un alto potencial de regeneración de distintos tejidos tanto en fases larvales como en adulto, lo que lo ha convertido en un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de la regeneración de tejidos (Gemberling y cols., 2013). Esto resulta particularmente interesante, ya que permite estudiar la contribución de las células inmunes a la regeneración y/o restauración de la homeostasis del tejido dañado (Keightley y cols., 2014).

Durante una respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular en larvas de pez cebra, se generan moléculas como H₂O₂, que favorecen el reclutamiento de leucocitos al sitio de daño (Niethammer y cols., 2009). Se ha descrito que las primeras células en llegar al sitio de daño son los neutrófilos, que se reconocen por la expresión del gen de la enzima mieloperoxidasa (*mpx/mpo*) (Lieschke y cols., 2001; Renshaw y cols., 2001; Renshaw y cols., 2006). Estas células permanecen en el sitio de daño en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria y luego son removidas a través de apoptosis y posterior eliminación mediada por células fagocíticas (Loynes y cols., 2010), o abandonan el sitio de daño a través de la migración retrógrada, fenómeno que fue descrito por primera vez en el pez cebra (Mathias y cols., 2006). Por otro lado, el reclutamiento de macrófagos al sitio de daño es más lento, respecto a los neutrófilos, pero la persistencia de estas células en el sitio de daño es mayor (Gray y cols., 2011). Además, ambas poblaciones contribuyen diferencialmente a la regeneración del tejido dañado: mientras los macrófagos favorecen la regeneración de tejidos, los neutrófilos la inhiben (Li y cols., 2012). Estas primeras descripciones funcionales han sido fundamentales para estudios posteriores enfocados en entender con detalle el rol de las células inmunes, en especial de los macrófagos, durante la regeneración de tejidos en el pez cebra.

3.5. Caracterización de los macrófagos en el pez cebra

Los primeros trabajos en que se describen los macrófagos del pez cebra se basaron en el uso de criterios morfológicos al observar estas células bajo diferentes técnicas microscópicas. En el trabajo de Herbomel y colaboradores (1999), usando microscopía DIC (*Differential Interference Contrast*) observaron en el vitelo desde las 22 horas post-

fertilización (hpf) células con forma principalmente ameboide, que contienen en su interior vacuolas fagocíticas, y que tienen la capacidad de fagocitar bacterias inyectadas a las 30hpf, erradicándolas del organismo (Herbomel y cols., 1999). En una publicación del mismo grupo, en 2001 (Herbomel y cols., 2001), se muestra que la población de macrófagos antes caracterizada es detectable a través de la tinción vital *Neutral Red* y por la expresión del gen *csf1ra*, codificante para el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (Csf1r). Además, describen que los macrófagos en peces mutantes *panther*, los cuales contienen una mutación que lleva a la pérdida de función del gen *csf1ra* (Parichy y cols., 2000), están presentes en el saco vitelino, pero son incapaces de migrar a los tejidos periféricos del embrión del pez como retina, cerebro y epidermis, por lo que se describió a este mutante como carente de macrófagos residentes de tejido (Herbomel y cols., 2001). En paralelo, las primeras evidencias funcionales de poblaciones granulocíticas y de macrófagos eran reportadas a través de microscopía electrónica (Lieschke y cols., 2001). Desde aquellas descripciones iniciales, se ha acumulado evidencia de las funciones pro-inflamatoria y en la remoción de microorganismos patogénicos de los macrófagos del pez cebra (Torraca y cols., 2014). También se ha dado mucho énfasis a la importancia de estas células durante el desarrollo del pez cebra como, por ejemplo, en la osteogénesis (Meireles y cols., 2014), pigmentación (Eom y Parichy, 2017), angiogénesis (Gerri y cols., 2017) y durante la regeneración de tejidos dañados (Li y cols., 2012; Petrie y cols., 2014).

Los macrófagos del pez cebra, al igual que en mamíferos, son originados en dos oleadas hematopoiéticas. La primera oleada o hematopoesis primitiva se origina en el mesodermo de la placa lateral anterior durante las primeras 24hpf y da origen a los

primeros macrófagos residentes de tejidos periféricos como el cerebro, la retina y la epidermis (Herbomel y cols., 2001). Por otro lado, los progenitores de la hematopoesis definitiva o HSCs se originan desde las 24hpf en la muralla ventral de la aorta dorsal (VDA por su abreviación en inglés, *ventral wall of dorsal aorta*) los cuales pueden dar origen a macrófagos y a células progenitoras eritromieloides (EMP por su abreviación en inglés, *erythromyeloid progenitor*), que luego colonizan un tejido transitorio denominado como tejido caudal hematopoético (CHT por su abreviación en inglés, *caudal hematopoietic tissue*) (Bertrand y cols., 2007; Jin y cols., 2009). En este tejido las células EMP dan origen tanto a células mieloides como neutrófilos y macrófagos como a células de linaje eritroide (Jin y cols., 2009). A los 4 días post-fertilización (dpf), se ha descrito que los progenitores localizados en el CHT comienzan la migración hacia el órgano hematopoético definitivo del pez cebra, que es la médula del riñón (Amatruda y Zon, 1999). Si bien existen diferencias en los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación de estos grupos de progenitores (Yu y cols., 2017), los macrófagos generados por ambas oleadas hematopoiéticas participan activamente en la colonización de tejidos periféricos en larvas de pez cebra (Xu y cols., 2015), y vías de señalización como la de *csf1ra* afectan la colonización de los macrófagos en tejidos periféricos durante estadios tempranos del desarrollo (Herbomel y cols., 2001; Pagán y cols., 2015).

El estudio de los macrófagos del pez cebra ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas que permiten su visualización *in vivo*. La primera de ellas fue el uso del compuesto *Neutral red*, el cual es incorporado por los macrófagos vía endocitosis/fagocitosis, confiriéndoles una tonalidad roja (Herbomel y cols., 2001). El desarrollo de líneas reporteras transgénicas para genes expresados por células inmunes

permitió la identificación de los macrófagos como células que expresan niveles bajos del gen *mpx* (células *mpx^{low}*), pudiendo ser detectadas por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia (Mathias y cols., 2009). Otros genes marcadores mieloides, como *lcp1* y *coro1a*, permitieron la identificación de macrófagos como células *lcp1⁺mpx⁻* o *coro1a⁺mpx⁻* (Li y cols., 2012). Sin embargo, la generación de líneas transgénicas reporteras para genes específicos de macrófagos como *csf1ra* (Gray y cols., 2011), *mfap4* (Walton y cols., 2015) y *mpeg1* (Ellett y cols., 2011) han posibilitado la identificación directa de los macrófagos en el pez cebra. De particular importancia es el reportero del gen *mpeg1* (*macrophage-expressed gene 1*), cuya expresión se restringe exclusivamente a macrófagos en el pez cebra (Zakrzewska y cols., 2010), y que ha sido usado ampliamente para la identificación de estas células. El producto génico de *mpeg1* es una perforina de membrana, y su expresión se encuentra restringida a macrófagos maduros en ratones y humanos (Spilsbury y cols., 1995).

Además de las diferencias en el origen y en la localización de los macrófagos en el pez cebra, también ha sido posible identificar distintas poblaciones de estas células en base a su función durante una respuesta inflamatoria. Las primeras descripciones que señalan lo anterior fueron realizadas en modelos de infección con *Mycobacterium marinum*, donde se encontró una respuesta diferencial, en términos funcionales, de un grupo de macrófagos (células *mpeg1⁺*) reclutado de forma dependiente del gen *ccr2*, que codifica un receptor de quimioquina (Ccr2) involucrado en el reclutamiento de células mieloides ante una respuesta inflamatoria (Cambier y cols., 2014). El mismo grupo demostró posteriormente que los macrófagos que responden a Ccr2 no son residentes del tejido infectado y son reclutados específicamente hacia éste por señales entregadas por los

macrófagos residentes de tejido, que dependen de la señalización de *csf1ra* (Cambier y cols., 2017). En el contexto de inflamación por daño tisular, se ha descrito que existen macrófagos tipo-M1 y tipo-M2 en larvas de pez cebra, las cuales pueden ser identificadas a través de la expresión diferencial de *tnfa* en estas células (Nguyen-Chi y cols., 2015). Este trabajo, además de resaltar la existencia de distintas poblaciones de macrófagos en el pez cebra, generó una herramienta útil para la identificación de macrófagos con distinto perfil en condiciones inflamatorias *in vivo*. Sin embargo, aún existen limitaciones en la identificación detallada de poblaciones de macrófagos en el pez cebra, debido a la carencia de anticuerpos específicos para la especie y que permitan la detección de diferentes marcadores proteicos, tal como se realiza para el análisis de macrófagos murinos y humanos (Gordon y cols., 2014; Lavin y Merad, 2013). Es por ello que el uso de diferentes estrategias, como el análisis de la ubicación de los macrófagos en los tejidos (White y cols., 2017) o su morfología (Nguyen-Chi y cols., 2015; Pagán y cols., 2015) pueden ser útiles para ese fin.

3.6. Función de los macrófagos en la regeneración de tejidos en el pez cebra

El pez cebra ha sido utilizado por muchos años como un modelo animal para el estudio de la regeneración debido a la potente capacidad regenerativa de diferentes tejidos, como la retina, el corazón, los sistemas nerviosos central y periférico, y aletas, entre otros (Gemberling y cols., 2013). En el último tiempo, diversos trabajos remarcan la importancia de los macrófagos en la regeneración de distintos tejidos, como el corazón (Lai y cols., 2017), vasos sanguíneos (Liu y cols., 2016), retina (White y cols., 2017), neuromastos de la línea lateral posterior (Carrillo y cols., 2016) y la aleta caudal (Petrie y

cols., 2014). Esta última es uno de los tejidos más utilizados para estudiar regeneración en el pez cebra, debido a que es un tejido fácilmente accesible/removible y el mecanismo de la regeneración de ésta es conservado y altamente reproducible, condiciones ideales para el estudio de la regeneración epimórfica (Iovine, 2007). Una de las características de la regeneración epimórfica es la aparición de un cúmulo de células con una alta capacidad de proliferación y diferenciación, denominado blastema, y que tiene la capacidad de formar completamente el tejido perdido, como la aleta amputada (Pfefferli y Jaźwińska, 2015). Si bien este modelo fue descrito inicialmente en ejemplares adultos, la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra obedece los mismos mecanismos que en adultos, pero en un tiempo menor (Kawakami y cols., 2004).

La relevancia de los macrófagos durante procesos de remodelación y/o regeneración de la aleta caudal de pez cebra ha sido descrita en los últimos años. En el año 2012, Li y colaboradores fueron los primeros en demostrar que la reducción del número de macrófagos, usando el morfolino contra el gen *irf8*, conlleva a un retardo en la regeneración del tejido de la aleta caudal luego de su amputación en larvas (Li y cols., 2012). Sin embargo, la función descrita para el producto génico de *irf8* es favorecer la diferenciación de progenitores mieloides a macrófagos, y ha sido demostrado que el uso del morfolino contra *irf8* disminuye el número de macrófagos, pero aumenta el número de neutrófilos en larvas de pez cebra (Li y cols., 2011), aumentando consigo el reclutamiento de neutrófilos ante un daño. En el trabajo inicialmente mencionado, los autores también mostraron que el uso del mutante deficiente de neutrófilos *runx1^{w84x}* presenta una velocidad de regeneración de cola mayor a la contraparte silvestre (Li y cols., 2012). Es decir, el trabajo no resolvió si el fenotipo observado en larvas morfantes para

irf8 fue consecuencia de la reducción del número de macrófagos y/o el aumento de neutrófilos en la larva. Unos años más tarde, Petrie y colaboradores resolvieron esta interrogante utilizando el sistema nitroreductasa/metronidazol (White y Mumm, 2013) para la depleción específica de macrófagos (células *mpeg1*⁺) y observaron que la ausencia de macrófagos llevó a una deficiencia en el proceso de regeneración de la aleta caudal en ejemplares adultos y larvas de pez cebra después de su amputación, disminuyendo la proliferación de las células del blastema que dan origen a la nueva aleta (Petrie y cols., 2014). En el mismo trabajo, se mostró que los macrófagos reclutados durante las primeras etapas de la respuesta inflamatoria son los que afectan el crecimiento de la aleta caudal, además de que el reclutamiento de neutrófilos no se vio afectado. De manera importante, se reveló que la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina, necesaria para el proceso de regeneración de la cola, incidió sobre el fenotipo de los macrófagos reclutados al sitio de daño, los cuales presentaron un perfil pro-inflamatorio respecto a peces en que la vía no fue afectada (Petrie y cols., 2014). Esta idea fue reforzada con trabajos realizados por el grupo de Atsushi Kawakami en Japón, el cual encontró que larvas mutantes carentes de células hematopoiéticas, como *cloche* (Stainier y cols., 1995), son incapaces de regenerar la aleta caudal luego de su amputación debido a un aumento en la muerte celular en el sitio de daño y una disminución de la proliferación del blastema (Hasegawa y cols., 2015). Más tarde, el mismo grupo demostró que los macrófagos regulan negativamente la expresión de *il1b* para promover la regeneración de la aleta caudal y que, por lo tanto, la regeneración anormal observada en larvas mutantes *cloche* es consecuencia de la actividad prolongada de $Il-1\beta$ en el sitio de daño (Hasegawa y cols., 2017). La evidencia más reciente sobre el rol de los macrófagos sobre la regeneración de la aleta caudal fue

reportada por Nguyen-Chi y colaboradores, quienes previamente habían identificado diferentes poblaciones de macrófagos reclutados ante un daño tisular a través de la expresión de *tnfa* (Nguyen-Chi y cols., 2015), y que en su último trabajo mostraron que la población de macrófagos *tnfa*⁺ es reclutada en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria, y participa activamente en la regeneración de tejidos a través de la activación de la señalización de Tnf- α con su receptor (Tnfr1) expresado en células estromales del tejido dañado, lo cual promueve la proliferación de estas células (Nguyen-Chi y cols., 2017). Toda esta evidencia indica que existe una heterogeneidad de poblaciones de macrófagos reclutados ante condiciones de inflamación, tales como la amputación de la aleta caudal, y además sugiere que estas poblaciones contribuyen de manera diferencial a la regeneración de la aleta caudal en el pez cebra.

3.7. Planteamiento del problema

Los antecedentes previamente mostrados dan énfasis a la idea de que los macrófagos son una población heterogénea de células y que contribuyen al desarrollo y homeostasis de diversos tejidos, promueven una respuesta pro-inflamatoria ante condiciones de daño tisular o presencia de patógenos en el organismo, y también participan en la atenuación de la respuesta inflamatoria y la reparación/regeneración de tejidos en respuesta al daño tisular. Lo anterior ha llevado a la clasificación de distintas poblaciones de macrófagos bajo criterios ontogénicos, funcionales y relativos al tejido en que éstos residen. Sin embargo, la relación entre estas clasificaciones aun es tema de estudio, y el uso de modelos animales que permiten el rastreo de células *in vivo* y en tiempo real, como el pez cebra, pueden dar más información sobre el tema.

Sobre la evidencia previa, la cual indica que: 1) existe una heterogeneidad de los macrófagos de pez cebra reclutados ante condiciones inflamatorias, y 2) que los macrófagos contribuyen a la regeneración de tejidos en el pez cebra, surge la hipótesis de que **existe una contribución diferencial de poblaciones de macrófagos del pez cebra durante la respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular y la regeneración de tejidos**, y que **una población específica de macrófagos es la que contribuye principalmente a la regeneración de tejidos**. En este trabajo se buscó comprobar estas aseveraciones, a través de la caracterización de las distintas poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra y el rol de estos grupos en el control de la respuesta inflamatoria y en la regeneración de tejidos.

4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

“Una población específica de macrófagos promueve la regeneración de tejidos en el pez cebra, regulando negativamente los niveles de moléculas pro-inflamatorias en el sitio de daño”.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Identificar poblaciones de macrófagos en el pez cebra, definir sus roles durante la respuesta inflamatoria, la regeneración de tejidos, y la relación de éstas con la regulación negativa de moléculas pro-inflamatorias en el sitio de daño.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Objetivo específico 1

Identificar y clasificar las poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra y examinar su comportamiento durante una respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular.

5.2.2. Objetivo específico 2

Evaluar la contribución de las distintas poblaciones de macrófagos del pez cebra a la regeneración de tejidos.

5.2.3. Objetivo específico 3

Establecer la relación de las poblaciones de macrófagos identificadas con la regulación de moléculas pro-inflamatorias durante la regeneración de tejidos en larvas de pez cebra.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

En los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron larvas de pez cebra (*Danio rerio*), de la cepa silvestre TAB-5, las cuales fueron obtenidas a partir de cruces de ejemplares adultos presentes en los bioterios de pez cebra de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En estos recintos, los peces son mantenidos a una temperatura de 28°C con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, en agua de osmosis reversa ajustada con Bicarbonato de Sodio a un pH de 7,0 – 7,5 y con Instant Ocean (Spectrum Brands, Blacksburg, VA, Estados Unidos) a una conductividad de 500 a 800 microsiemens (μS) (Westerfield, 2000). Para la obtención de huevos, los ejemplares fueron divididos en parejas de 1 macho con 1 hembra y dejados en cajas de cruces con separación entre macho y hembra el día anterior a la obtención de los huevos. Al comienzo del horario de luz del día siguiente, la separación entre macho y hembra fue removida, permitiendo el apareamiento de los individuos y la obtención de huevos. Una vez colectados los huevos, éstos fueron incubados a 28°C en medio E3 (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,13mM; MgSO₄ 0,33mM), con cambios de medio diarios.

Las líneas transgénicas utilizadas para la visualización de macrófagos fueron *Tg(mpeg1:GFP)* (Ellett y cols., 2011) y *Tg(mpeg1:Dendra2)* (Harvie y cols., 2013). Para la visualización y cuantificación de neutrófilos *in vivo*, las líneas transgénicas reporteras utilizadas fueron *TgBAC(mpx:GFP)* (Renshaw y cols., 2006) y *Tg(mpx:mCherry)* (Yoo y cols., 2010). También se utilizó la línea mutante *csf1ra^{i4blue}*, cuyos homocigotos adultos

(denominadas *panther*) fueron seleccionados a través del patrón de pigmentación distintivo que poseen (Parichy y cols., 2000). Las larvas mutantes *panther* fueron obtenidas a través del cruce de individuos *panther* adultos.

6.2. Amputación de la aleta caudal en larvas de pez cebra y cuantificación de células inmunes reclutadas en el sitio de daño

Larvas de 3 días post-fertilización (dpf) o 72 horas post-fertilización (72hpf) fueron anestesiadas en MS-222 (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) al 0,04%, y la aleta caudal de cada una de ellas fue seccionada con un bisturí estéril. El tipo de amputación realizada fue de acuerdo al procedimiento descrito por Elks y colaboradores (Elks y cols., 2011), en que la zona posterior de la región ventral sin pigmento en la cola de las larvas, conocida como ACFP (abreviación de *adult caudal fin primordium*) fue usada como punto de referencia para la transección (Figura 1). Inmediatamente después del corte, las larvas fueron lavadas y re-incubadas en medio E3 a 28°C. La cuantificación de neutrófilos y macrófagos reclutados en el sitio de daño (~150µm de tejido ubicados en la proximidad del eje de corte) fue realizada en un estereoscopio de fluorescencia Olympus MVX10 (Olympus, Tokio, Japón) con un lente de aumento 6,3X y equipado con una cámara MicroPublisher 3.3 RTV acoplada al *software* Q-Capture Pro 7.0 (QImaging, Surrey, BC, Canadá), o bien fueron realizados en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 con un lente de aumento 10X, equipado con una cámara Olympus XM10 acoplada al *software* CellSens Dimension. Las imágenes capturadas fueron analizadas en el programa de análisis y procesamiento de imágenes ImageJ (NIH, Bethesda, ML, EUA), utilizando la extensión para cuantificación de eventos “Cell Counter”.

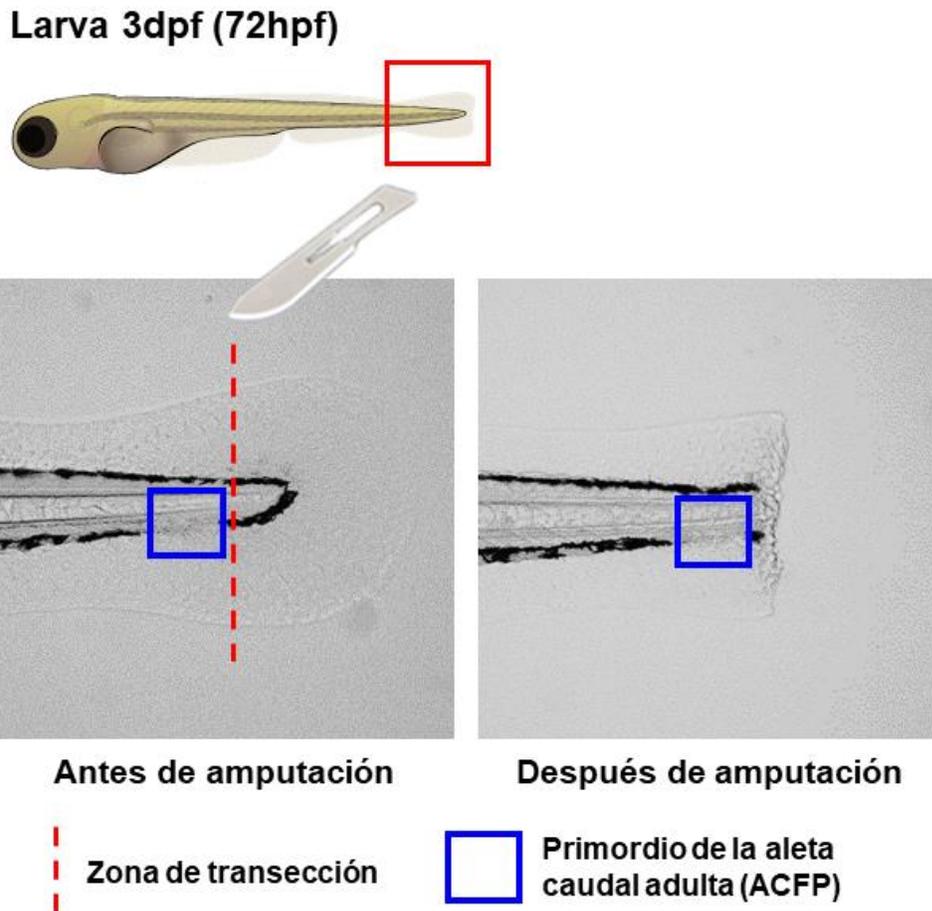


Figura 1. Ilustración de método de daño generado por la amputación de la aleta caudal. Larvas de 72hpf (3dpf) fueron anestesiadas en MS-222 al 0,04%, y la aleta caudal fue amputada con un bisturí. Se muestran imágenes representativas de la cola de una larva antes y después de la amputación. El eje de la transección se muestra como una línea discontinua roja, utilizando como referencia la sección posterior de la región sin pigmento en la cola, correspondiente al primordio de la aleta caudal adulta (ACFP, región de borde azul).

6.3. Seguimiento temporal de macrófagos mediante *time lapse*

Para el seguimiento de macrófagos en condiciones homeostáticas se utilizaron larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)* de 72hpf. Los individuos fueron montados en una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% con MS-222 disuelto al 0,01%. Las imágenes

fueron tomadas utilizando un lente de aumento 10X enfocado en una porción de la cola de larvas en intervalos de 2 minutos, por un período de 3 horas. El análisis de la cinética de los macrófagos fue realizado en el programa de análisis de imágenes ImageJ, utilizando los *plugins* “Manual Tracking” y “Chemotaxis Tool”. Con ellos se obtuvo la velocidad promedio de cada uno de los macrófagos analizados.

Para el rastreo de macrófagos individuales reclutados al sitio de daño, se inyectó ADN del constructo *Tol2-mpeg1:Dendra2* en individuos silvestres en estadio de 1 célula. De esta forma, se obtuvieron individuos con marcaje de macrófagos en mosaico. Del grupo de larvas inyectadas, se seleccionaron aquellos individuos que presentaban entre 2 a 10 macrófagos marcados en la región posterior al ano, y se les realizó la amputación de la aleta caudal. Inmediatamente después de la amputación, las larvas fueron montadas en agarosa de bajo punto de fusión al 0,8% y MS-222 al 0,01%. Utilizando el equipo de epifluorescencia Olympus IX81 con un lente de aumento de 4X, se capturaron imágenes de la cola completa de larvas en mosaico amputadas a partir de los 30 minutos post-amputación (desde aquí “ t_0 ”), en intervalos de 5 minutos por un total de 24 horas. Las distancias de los macrófagos respecto al sitio de daño al inicio del *time-lapse* (t_0), y los tiempos de llegada a éste se obtuvieron utilizando el programa ImageJ. Con dichos valores, se calculó la “velocidad de arribo al sitio de daño” a través de la siguiente fórmula:

$$\text{velocidad de arribo al sitio de daño} = \frac{\text{distancia inicial del sitio de daño}}{\text{tiempo de llegada al sitio de daño}}$$

6.4. Análisis de circularidad de los macrófagos en larvas

Imágenes de una sección de la cola de larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)* fueron tomadas en el equipo Olympus IX81, con un zoom de 10X, y proyecciones del eje Z fueron realizadas en el programa de análisis ImageJ. Para la medición de la circularidad, el área del macrófago analizado fue seleccionada a través de la herramienta “Threshold”, y luego el valor de circularidad fue calculado por el programa a través de la siguiente fórmula:

$$\text{circularidad} = 4\pi \frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2}$$

En la fórmula, un valor de circularidad igual a 1 indica que la figura analizada corresponde a un círculo perfecto, mientras que valores tendientes a cero indican que la figura corresponde a un polígono con forma elongada.

6.5. Inyección de liposomas de clodronato

Para la depleción de macrófagos en larvas de pez cebra, una dilución de liposomas cargados con clodronato (Buiting y van Rooijen, 1994; van Rooijen y Hendrikx, 2010) fue inyectada a las 54hpf directamente al torrente sanguíneo, en la zona llamada *circulation valley*, estructura ubicada bajo el vitelo y que conecta directamente el flujo sanguíneo al corazón, lo cual permitió la dispersión de los liposomas de clodronato en el cuerpo. Como control se inyectaron larvas con una dilución de liposomas cargados con PBS. Las larvas fueron mantenidas a 28°C, y a las 72hpf ó 18 horas post inyección (hpi) se cuantificó el número de macrófagos presentes en la región posterior.

6.6. Cuantificación de la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra

La regeneración de la aleta caudal de larvas fue cuantificada principalmente a los 3 y 5 días post-amputación (dpa), es decir, a los 6dpf y 8dpf respectivamente. Las larvas fueron montadas en agarosa de bajo punto de fusión al 0,8%, y la aleta caudal en regeneración fue fotografiada en campo claro utilizando el microscopio Olympus MVX10 y un lente de aumento de 5X. Las imágenes fueron posteriormente analizadas utilizando el programa ImageJ. Para cuantificar la regeneración de la aleta caudal se calculó la variable “área de la aleta caudal”. Esta variable fue calculada midiendo el área desde el extremo más distal de la aleta caudal en regeneración hasta la zona más proximal del ACFP, en donde también se observa el giro de la arteria caudal que conecta con la vena caudal (Pei y cols., 2016). Los valores de “área de la aleta caudal” fueron calculados en μm^2 .

6.7. Proliferación celular e inmunofluorescencia de larva completa

Para cuantificar la proliferación celular, las larvas amputadas fueron incubadas en 5mM de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, EMD Chemicals, San Diego, CA, Estados Unidos) disuelta en E3 con 1% v/v de DMSO, desde las 6 horas post-amputación (hpa) hasta las 24hpa. Luego de la incubación, las larvas fueron fijadas por 2 horas a temperatura ambiente en una solución de paraformaldehído (PFA) disuelto al 4% p/v en solución tampón de fosfato salina (PBS), y luego guardadas a -20°C en metanol por al menos una noche (16 horas aproximadamente). Para la detección del BrdU incorporado en las larvas, las larvas fueron lavadas varias veces con una solución de PBS con Triton X-100 al 0,3% v/v (PBS-Tx), luego permeabilizados con una solución de Proteinasa K en PBS de

20µg/mL por 30 minutos a temperatura ambiente, re-fijadas en una solución de PFA en PBS al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, y lavadas al menos 3 veces con PBS-Tx. Para aumentar la permeabilidad, las larvas fueron incubadas en acetona fría por 7 minutos a -20°C, y luego lavadas con PBS-Tx a temperatura ambiente. Para exponer el epítipo del BrdU, las muestras fueron tratadas con Ácido Clorhídrico 2N por 20 minutos a temperatura ambiente, y luego lavadas varias veces con PBS-Tx. Luego de los pasos de permeabilización y preparación antes descritos, las larvas fueron incubadas en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino 10mg/mL; suero de cabra al 2%; DMSO al 1%; Tritón X-100 al 0,1%; preparado en PBS) por al menos 45 minutos a temperatura ambiente, y luego incubadas en una dilución 1:500 (en solución de bloqueo) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bromodeoxiuridina Bu20a (M0774, Dako, Glostrup, Dinamarca) por una noche a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario y de lavados sucesivos con PBS-Tx, las larvas fueron incubadas en una solución 1:2000 (en solución de bloqueo) del anticuerpo de cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón (A11029, Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos) por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, y luego lavadas varias veces con PBS-Tx en oscuridad. Las imágenes de las larvas marcadas fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Alemania), con un lente de aumento 20X, y los eventos BrdU⁺ fueron cuantificados utilizando el programa ImageJ con el *plugin* para conteo de eventos Cell Counter. Ya que el área ventral carente de pigmentación en la cola contiene un grupo de células en proliferación, se restringió la cuantificación de eventos BrdU⁺ a la región inmediatamente posterior al eje de corte.

6.8. Análisis de muerte celular

Para la cuantificación de la muerte celular en el sitio de daño, ensayos de TUNEL fueron realizados en larvas a las 24hpa previamente fijadas en PFA al 4% en PBS y deshidratadas en metanol, utilizando el *kit* de detección de apoptosis ApopTag red detection *in situ* (Merck Millipore, Temecula, CA, Estados Unidos). Las imágenes de las larvas fueron adquiridas en el equipo Zeiss LSM 510 Meta, con un lente de aumento 20X, y la cuantificación de eventos TUNEL⁺ en el sitio de daño fue realizado en el programa ImageJ con el *plugin* “Cell Counter”.

6.9. Detección de especies reactivas de oxígeno

La detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en larvas de pez cebra fue realizada utilizando el compuesto diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína (H₂DCF-DA, Sigma), tomando como referencia protocolos previamente establecidos (Mugoni y cols., 2014). En resumen, las larvas vivas fueron lavadas varias veces en medio HBSS (Gibco, Carlsbad, CA, Estados Unidos), y luego fueron incubadas en 50µM de H₂DCFDA, disuelto en HBSS con 0,5% de DMSO, por 15 minutos a 28°C en oscuridad. Posterior a la incubación, las larvas fueron lavadas 3 veces en medio E3, y montadas en agarosa de bajo punto de fusión disuelta en E3 al 0,8%. Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio Olympus MVX10, con un lente de aumento 6,3X, y analizadas en el programa ImageJ. De las imágenes obtenidas se calculó la fluorescencia del sitio de daño, tomando una región de 150µm desde la zona de corte, y de una región de la larva distante en al menos 500µm del área previamente analizada en el mismo individuo. Con estos valores se obtuvo la fluorescencia relativa del sitio de daño, que indica la

acumulación de ROS específica al sitio de daño para cada larva a través de la siguiente ecuación:

$$\text{fluorescencia relativa (sitio de daño)} = \frac{\text{fluorescencia sitio de daño}}{\text{fluorescencia zona distante al daño}}$$

6.10. Expresión génica medida mediante PCR cuantitativo

A las 6hpa y 24hpa, las colas de entre 20 a 25 larvas *panther* y controles no mutantes *wild-type* (WT) respectivamente fueron colectadas y el ARN total de dicho tejido fue obtenido utilizando el *kit* RNAqueous Micro (Ambion, Vilnius, Lituania). Del ARN total purificado para cada condición se generó ADN complementario (ADNc) utilizando el sistema de transcripción reversa ImProm II (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), y con él se realizaron ensayos de qRT-PCR en el equipo Stratagene Mx3000P, utilizando Brilliant II SYBR Green como detector fluorescente de abundancia de ADN (ambos productos de Agilent Technologies, Cedar Creek, TX, Estados Unidos). El valor de Ct promedio para cada condición fue obtenido en el programa MxPro v4.0 (Agilent Technologies), y la expresión relativa para cada gen fue obtenida a través de la siguiente fórmula:

$$\text{expresión relativa} = 2^{-\Delta Ct}$$

En la ecuación anterior, el valor de ΔCt corresponde al valor de Ct promedio para el gen de interés en la condición dada menos el valor de Ct promedio del gen utilizado como control de expresión constitutiva en la misma condición. Los genes analizados y sus respectivos partidores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados para qRT-PCR.

Gen	Partidor 1 (5' – 3')	Partidor 2 (5' – 3')	Tamaño producto	Referencia
<i>efla</i>	AGAAGGAAGCCGCT GAGATG	TGTCCAGGGGCATC AATAAT	157pb	Clatworthy y cols., 2009
<i>il10</i>	ACAGTCCCTATGGA TGTCACGTCA	GCATTTACCCATAT CCCGCTTGAG	161pb	Este trabajo
<i>il1b</i>	TGGA CTTCGCAGCA CAAAATG	CGTTCACTTCACGC TCTTGGATG	151pb	Clatworthy y cols., 2009
<i>tgfb1a</i>	CAACCGCTGGCTCT CATTGA	ACAGTCGCAGTATA ACCTCAGCT	100pb	Nguyen-Chi y cols., 2015
<i>mfa</i>	CAAGGCTGCCATCC ATTTAACAGG	TCAGTTCAGACGTG CAGCTGAT	191pb	Este trabajo

6.11. Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos de tipo *t-test* de Student para la comparación entre dos condiciones, mientras que ANOVAs de 2 vías con post-ensayos de Tukey fueron realizados para analizar datos grupales, con más de una variable a analizar. Las pruebas estadísticas fueron calculadas utilizando el programa Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos).

7. RESULTADOS

7.1. Identificar y clasificar las poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra y examinar su comportamiento durante una respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular

7.1.1. Identificación y clasificación de poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra

Para el estudio de los macrófagos en el pez cebra se utilizan individuos transgénicos reporteros para el gen *mpeg1*, cuya expresión se restringe a macrófagos de acuerdo con la literatura (Ellett y cols., 2011; Zarkzewska y cols., 2010). Los macrófagos en el pez cebra, entendidos de aquí en adelante como las células *mpeg1*⁺, pueden ser subclasificados de diferentes formas. La primera es a través de la expresión diferencial de un gen por un grupo de macrófagos en un momento o ubicación particular. En paralelo al desarrollo del trabajo que aquí se describe, se encontró que el gen *hmox1a* es altamente expresado por macrófagos en larvas de pez cebra. Este marcador es un probable gen candidato para la identificación de macrófagos en condiciones inflamatorias, aunque la evidencia encontrada no es aun concluyente en ese sentido (Datos no mostrados). También se encontró que el gen *ccr2*, receptor de quimioquina expresado por células inmunes, contribuye al reclutamiento diferencial de macrófagos ante condiciones inflamatorias. No obstante, no fue posible identificar a los macrófagos que expresan dicho gen (Datos no mostrados). Una forma alternativa de identificar grupos de macrófagos, a falta de

marcadores específicos, es su sub-clasificación en términos de localización y morfología. Al observar individuos transgénicos *Tg(mpeg1:Dendra2)* a las 72hpf, con particular énfasis en la sección posterior al ano (entendida de aquí en adelante como “región posterior” de la larva), se encontró que los macrófagos (células *mpeg1*⁺) están distribuidos en gran parte del individuo y no únicamente en el tejido caudal hematopoiético (CHT), que es el tejido donde se encuentran los progenitores hematopoiéticos durante este estadio. Dada esta distribución, se optó por clasificar a los macrófagos de acuerdo con su localización en la larva como “periféricos” o “CHT-residentes” (Figura 2.a). Con el fin de analizar posibles diferencias entre los macrófagos periféricos y CHT-residentes, se monitorearon los macrófagos presentes en una sección de la región posterior utilizando la técnica de *time lapse* por un período de 3 horas. De este análisis se obtuvo la velocidad promedio de cada macrófago rastreado, definida como la media de las velocidades de cada macrófago para cada intervalo de tiempo capturado. Al analizar la velocidad promedio de los macrófagos clasificados de acuerdo con su localización, se observó que los macrófagos periféricos presentaron una velocidad media mayor respecto a los macrófagos CHT-residentes (Figura 2.b). Además, se observó que en general los macrófagos CHT-residentes tenían una morfología redonda, comparados a los macrófagos periféricos que mostraban formas más elongadas o “dendríticas” (Figura 2.c). Esto fue confirmado al realizar un análisis de circularidad de los macrófagos, que otorga un valor igual a 1 cuando el área a analizar es un círculo perfecto, y más cercano a 0 cuando presenta una forma lejana a la circular. En este caso, el índice de circularidad fue mayor en los macrófagos CHT-residentes en comparación a los macrófagos periféricos (Figura 2.d). Lo anterior

sugiere que los macrófagos periféricos y CHT-residentes tienen morfologías y comportamientos migratorios diferentes en condiciones basales.

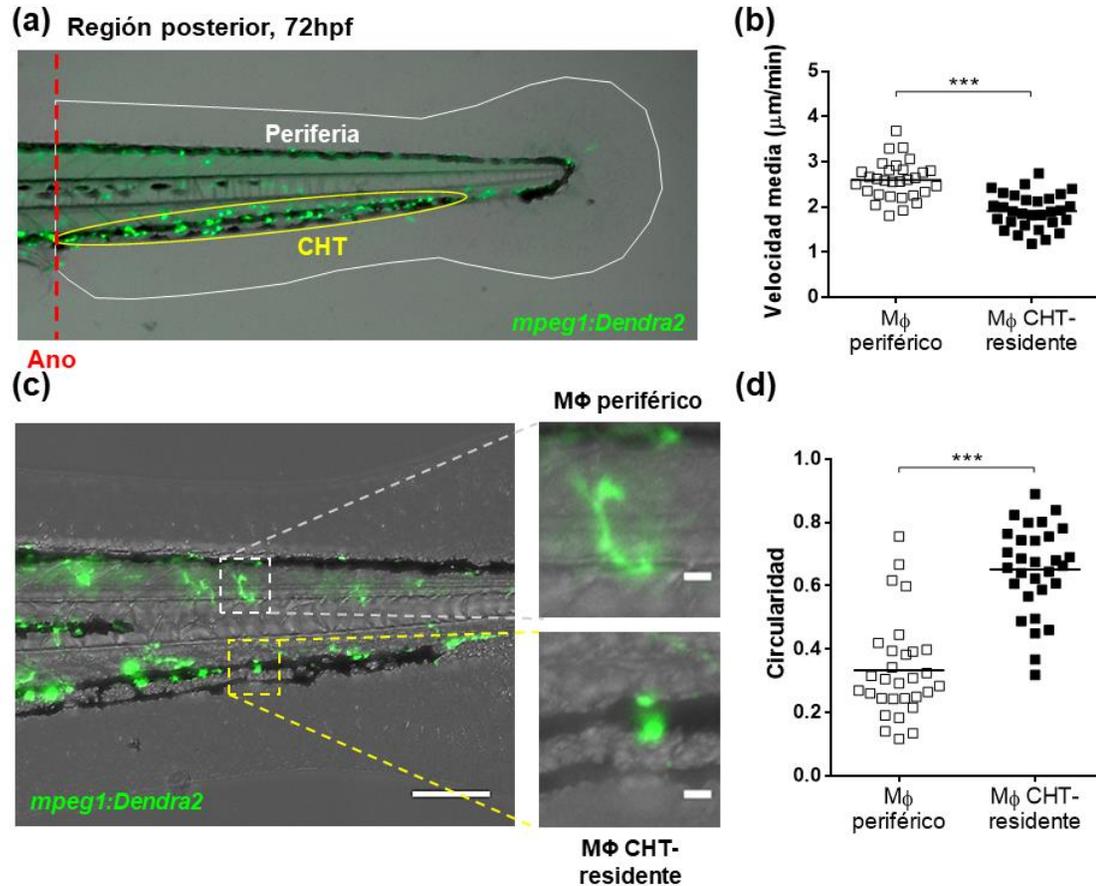


Figura 2. Clasificación de los macrófagos de larvas de pez cebra respecto a su localización en la región posterior. (a) En la región posterior de una larva de 72hpf es posible observar macrófagos ubicados en el tejido caudal hematopoiético (CHT, región amarilla), mientras que otro grupo de macrófagos se encuentra fuera de esta región, localizados en la periferia. (b) Velocidad promedio de los macrófagos periféricos y CHT-residentes en condiciones homeostáticas. Una porción de la región posterior fue utilizada para la captura temporal de imágenes (*time lapse*) cada 2 minutos por 3 horas, y los macrófagos presentes fueron analizados individualmente y clasificados de acuerdo a su ubicación. $n = 30$ macrófagos por grupo. (c) Diferencias morfológicas entre macrófagos periféricos y CHT-residentes. Mientras los macrófagos periféricos presentan una morfología dendrítica y elongada, los macrófagos CHT-residentes se caracterizan por tener una morfología compacta, redonda y menos ramificada. Barra de escala de $100\mu\text{m}$ (izquierda) y de $10\mu\text{m}$ (derecha). (d) Análisis de circularidad de macrófagos periféricos y CHT-residentes. Valores cercanos a 1 indican que las células presentan una forma circular, mientras que valores cercanos a 0 indican que las células tienen una morfología elongada. $n = 30$ macrófagos por grupo. *** $p < 0,001$. $M\Phi$ = macrófago.

7.1.2. Comportamiento de las poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra durante una respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular

Para estudiar posibles diferencias en el comportamiento y en la función de las poblaciones de macrófagos previamente descritas, pero en un contexto inflamatorio, se realizaron amputaciones de la aleta caudal en larvas de 72hpf (Elks y cols., 2011). Este procedimiento permite observar y cuantificar el reclutamiento de células inmunes, como neutrófilos y macrófagos, en el sitio de daño cuando se realiza el daño en larvas transgénicas reporteras para tales células (Figura 3).

Una vez estandarizado el protocolo de daño, se analizó el reclutamiento de los macrófagos periféricos y CHT-residentes ante una respuesta inflamatoria. Para ello, se tomaron imágenes de la región posterior completa de larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)*, de forma similar a la mostrada en la Figura 2.a. Al analizar las imágenes, se observó que la

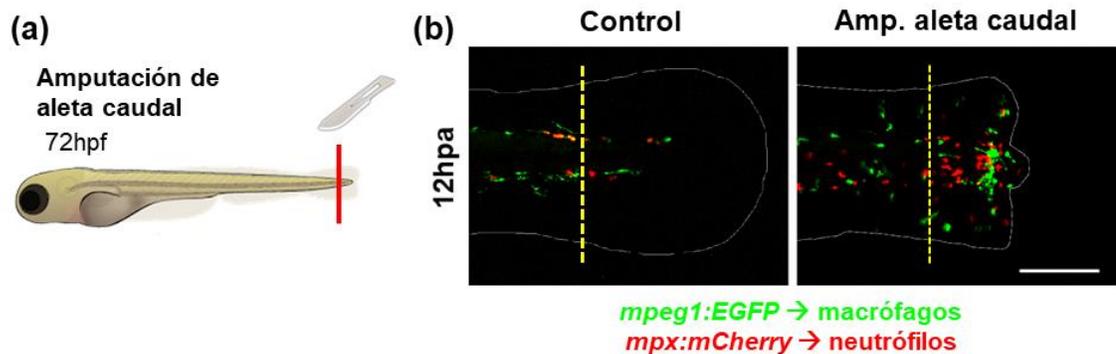


Figura 3. Visualización de las células inmunes reclutadas ante un evento inflamatorio en larvas de pez cebra. (a) Esquema de la amputación de la aleta caudal, la cual gatilla una respuesta inflamatoria y el reclutamiento de células inmunes. En (b) se muestran imágenes representativas de larvas *Tg(mpeg1:EGFP;mpx:mCherry)* a las 12 horas post amputación (hpa, derecha) y un control del mismo estadio sin amputar (izquierda). Se observa un reclutamiento de neutrófilos (rojo) y macrófagos (verde) de forma dependiente de daño. En blanco se observa el borde de la larva, y la zona de inflamación es considerada como el área desde el extremo caudal de la larva hasta la recta segmentada amarilla (ubicada a ~150µm de la zona de amputación). Barra de escala = 200µm.

identificación de macrófagos individuales es compleja dada la baja resolución de la imagen por el bajo aumento. Es por ello que, para poder rastrear de forma sencilla a macrófagos individuales que son reclutados al sitio de daño, se realizaron inyecciones del constructo *Tol2-mpeg1:Dendra2* en cigotos silvestres durante el estadio de 1 célula, generando de esta forma larvas con marca en mosaico de macrófagos. En dichas larvas se realizó el procedimiento de corte de la aleta caudal previamente descrito, y se siguió la respuesta inflamatoria por 24 horas a través de la técnica de *time lapse*, con captura de imágenes cada 5 minutos. Al analizar las imágenes, se clasificaron los macrófagos como “periféricos” o “CHT-residentes” al inicio del *time lapse* (t_0 , 30 minutos posterior a la amputación de la aleta caudal, Figura 4.a), y se calculó la velocidad de arribo al sitio de daño para cada macrófago rastreado (ver Materiales y Métodos). Los resultados mostraron que los macrófagos periféricos fueron más veloces que los macrófagos CHT-residentes en llegar al sitio de daño (Figura 4.b), indicando que ambas poblaciones son reclutadas al sitio de daño, pero lo son de manera diferencial.

7.1.3. Reclutamiento de macrófagos en larvas mutantes para *csf1ra*

Estudios previos han descrito que larvas de pez cebra mutantes homocigotas para el gen *csf1ra* (también llamados *panther*) se caracterizan por tener un menor número de macrófagos, principalmente los residentes de tejidos periféricos, respecto a controles no mutantes, y sin verse afectadas otras poblaciones inmunes como los neutrófilos (Herbomel y cols., 2001; Pagán y cols., 2015). Estos ejemplares, conocidos como *panther* (Parichy y cols., 2000), fueron cruzados con la línea transgénica *Tg(mpeg1:Dendra2)*, para así poder monitorear los macrófagos presentes en los mutantes homocigotos. Al cuantificar el total

(a) *Tg(mpeg1:dendra2)* en mosaico

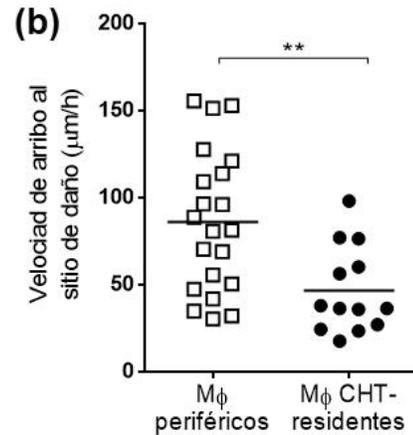
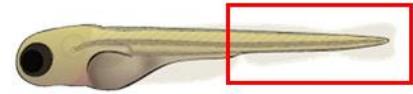
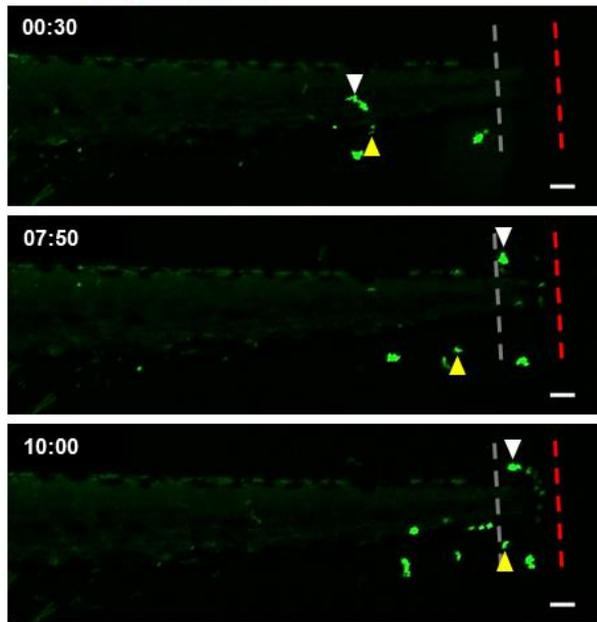


Figura 4. Seguimiento temporal del reclutamiento de macrófagos periféricos y CHT-residentes al sitio del daño generado por la amputación de la aleta caudal en larvas de 72hpf. (a) Imágenes de la región posterior de individuos con marcaje en mosaico para *mpeg1:Dendra2* fueron tomadas por 5 minutos en un intervalo de tiempo de 24 horas. Se señalan en las imágenes a un macrófago periférico (punta de flecha blanca) y a un macrófago CHT-residente (punta de flecha amarilla). Barra de escala = 50 µm. (b) A cada macrófago analizado (21 macrófagos periféricos y 12 macrófagos CHT-residentes) se le calculó la velocidad de arribo al sitio de daño, entendida como el cociente entre la distancia inicial del macrófago desde el sitio de daño por el tiempo de arribo de cada macrófago al sitio de daño. Se observa que los macrófagos periféricos son más veloces en ser reclutados, respecto a los macrófagos CHT-residentes. ** $p < 0,01$. MΦ = macrófago.

de macrófagos presentes en la región posterior al ano (que incluye periféricos y CHT-residentes) de larvas de pez cebra a las 72hpf (Figura 5.a) se observó una disminución cercana un 40% en individuos *panther* respecto a individuos *wild-type* (WT, Figura 5.b). Sin embargo, al cuantificar por separado las poblaciones de macrófagos periféricos y CHT-residentes, se observó una disminución cercana al 60% de los macrófagos periféricos en los mutantes *panther* respecto a los controles WT, mientras que la población CHT-residente disminuyó en un 20% aproximadamente en mutantes *panther* versus WT

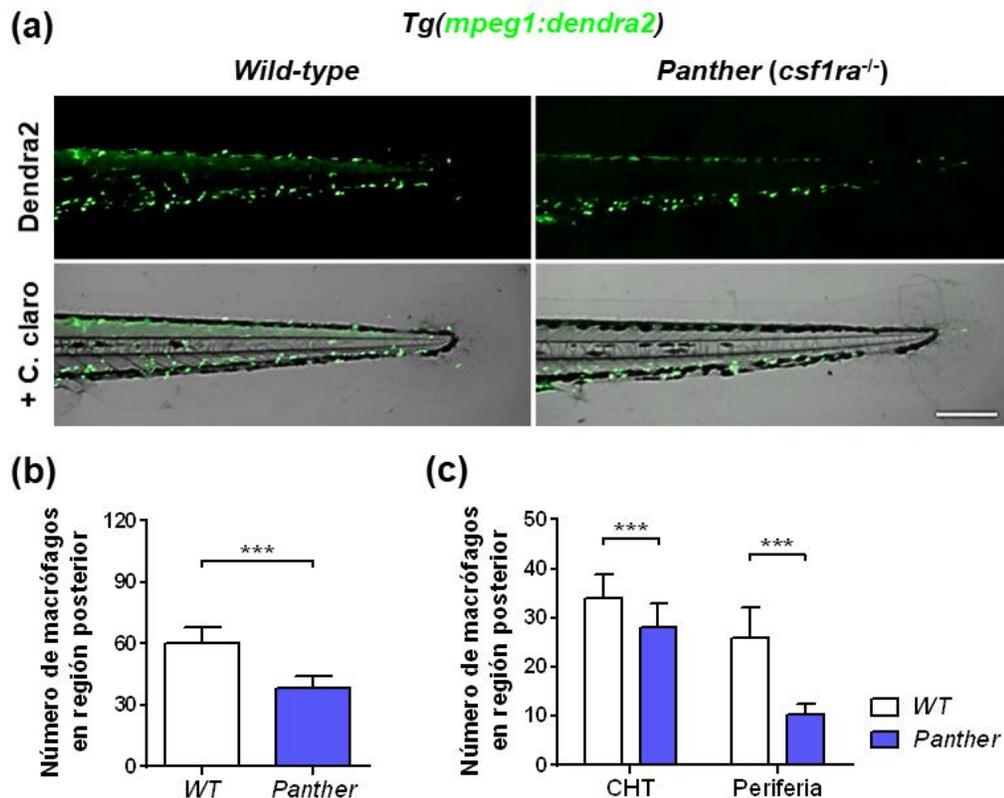


Figura 5. Cuantificación del número de macrófagos en la región posterior de larvas mutantes *panther*. (a) Imágenes representativas en donde se muestra la distribución de los macrófagos (células verde) en la región posterior al ano de un individuo *panther* a las 72hpf, comparado a una larva WT del mismo estadio. Las imágenes de arriba muestran sólo la marca del reportero de macrófagos *Tg(mpeg1:Dendra2)*, mientras que en las imágenes de abajo se aprecia la marca de los macrófagos en el contexto de la larva. Barra de escala = 250µm. (b) Cuantificación del número total de macrófagos en la región posterior de larvas *panther* y WT a las 72hpf. (c) Cuantificación y comparación del número de macrófagos periféricos y CHT-residentes entre individuos *panther* y WT. Las barras de los gráficos indican el promedio \pm SD. n = 20 larvas por experimento. *** p < 0,001.

(Figura 5.c). Si bien la reducción en el total de macrófagos CHT-residentes observada en los mutantes *panther* ha sido reportada previamente (Pagán y cols., 2015), los datos aquí mostrados indican que la población de macrófagos periféricos se encuentra aún más reducida en los mutantes *panther* respecto a la población de macrófagos CHT-residentes.

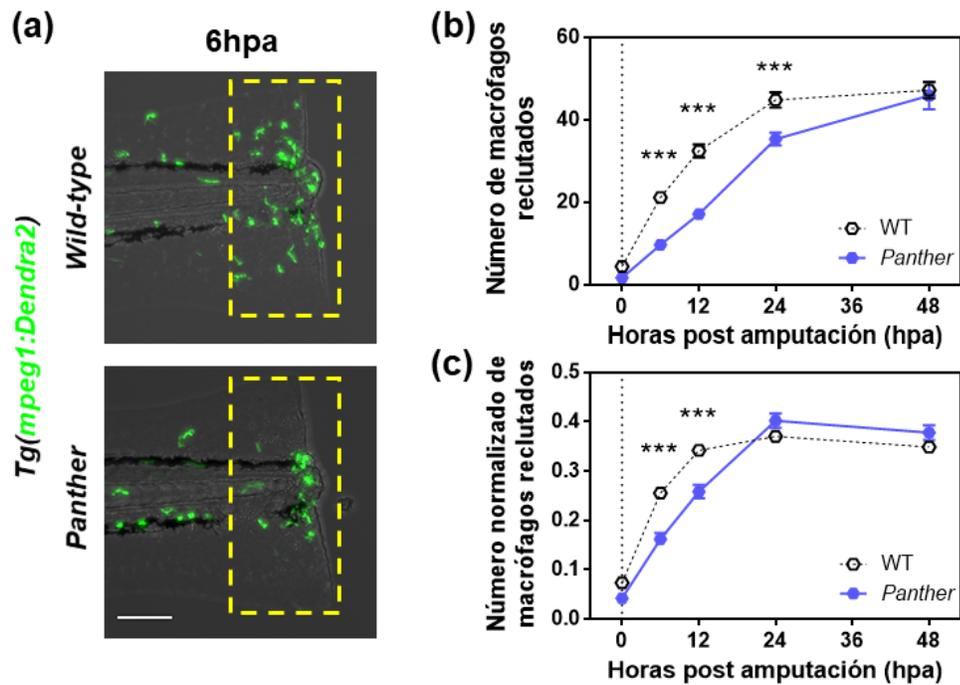


Figura 6. Reclutamiento de macrófagos en larvas *panther* luego de la amputación de la aleta caudal. (a) Imágenes representativas del reclutamiento de macrófagos en larvas *panther* y WT a las 6hpa. Barra de escala = 100µm. (b) Cuantificación del reclutamiento de macrófagos en larvas *panther* y WT desde las 0hpa hasta las 48hpa. (c) Normalización del número de macrófagos reclutados por el total de macrófagos presentes en la región posterior en larvas de pez cebra. Las normalizaciones fueron realizadas para cada larva. n = 20 larvas por experimento. *** p < 0,001.

A continuación, se analizó el reclutamiento de macrófagos en larvas mutantes *panther* luego de la amputación de la aleta caudal. Se observó una reducción en el número de macrófagos reclutados desde las 6hpa hasta las 24hpa (Figura 6.a y 6.b). Dado que la reducción en el reclutamiento de los macrófagos en los mutantes *panther* podría ser explicada por la disminución global del número de macrófagos que ellos poseen, se dividió el número de macrófagos reclutados por el número total de macrófagos en la región posterior de cada larva individualizada, obteniéndose un número normalizado de macrófagos reclutados. Usando esta aproximación, se encontró que el número de macrófagos reclutados en los mutantes *panther* continúa siendo menor respecto a

individuos WT a las 6hpa y 12hpa (Figura 6.c). En paralelo, se analizó la abundancia y el reclutamiento de neutrófilos en larvas *panther* y WT utilizando el reportero *TgBAC(mpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* (Renshaw y cols., 2006), y no se observaron diferencias en la cantidad de neutrófilos en la región posterior (Figura 7.a y 7.b; Pagán y cols., 2015), ni tampoco diferencias en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de daño entre ambas condiciones (Figura 7.c) De esta forma, los resultados indican que la reducción de la población de macrófagos periféricos, como se observa en larvas *panther*, afecta el reclutamiento temprano (antes de las 24hpa) de macrófagos en el pez cebra.

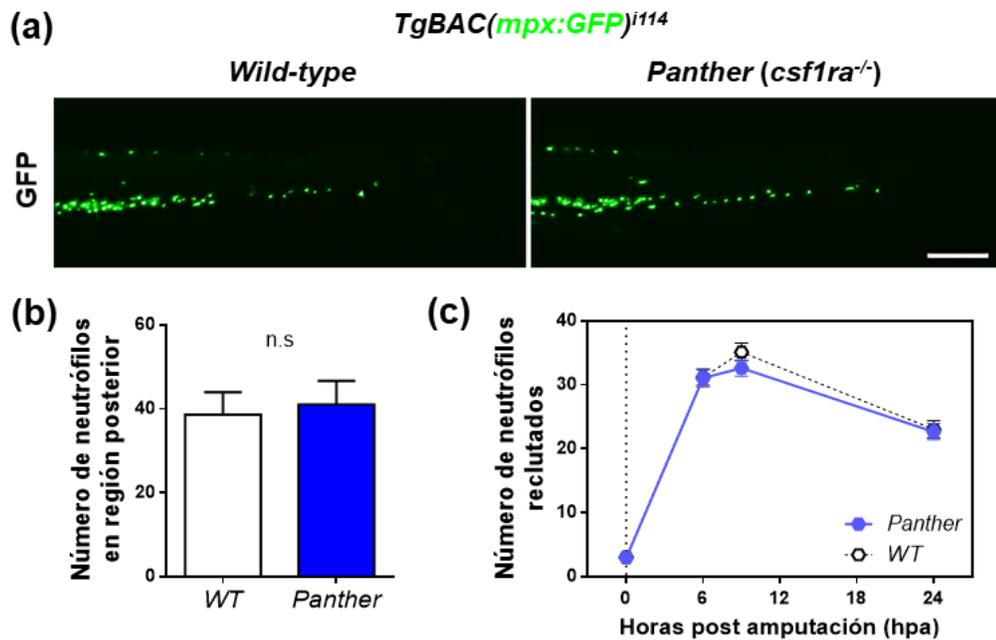


Figura 7. Cantidad y reclutamiento de neutrófilos en larvas mutantes *panther*. (a) Imágenes representativas de la región posterior de larvas WT y *panther* reporteras para neutrófilos *TgBAC(mpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* a las 72hpf. Barra de escala = 250µm. (b) Total ± SD de los neutrófilos en la región posterior n = 6-7 larvas por grupo. (c) Número ± SEM de neutrófilos reclutados en larvas *panther* y WT al sitio de daño durante las 24 horas posteriores a la amputación. n = 24 larvas por condición. n.s diferencia no significativa.

7.1.4. Reducción parcial de macrófagos en larvas de pez cebra

La reducción en el reclutamiento de macrófagos observada en los mutantes *panther* podría ser explicada por el menor número total de macrófagos que presentan estos individuos, y no necesariamente por la reducción de la población de macrófagos periféricos. Para resolver esta interrogante, se utilizaron liposomas de clodronato (abreviado de aquí en adelante como Lipo-clodronato) (Buiting y van Rooijen, 1994; van Rooijen y Hendriks, 2010) para reducir sistémicamente el número total de macrófagos en larvas de pez cebra sin afectar el número de neutrófilos, tal como se ha mostrado previamente (Bernut y cols., 2014; Carrillo y cols., 2016; Nguyen-Chi y cols., 2017; Pagán y cols., 2015). Se inyectó la solución de Lipo-clodronato en larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)* a las 54hpf directamente al torrente sanguíneo, y se cuantificó el número de macrófagos presentes en la región posterior a las 72hpf (18hpi) para evaluar el efecto del clodronato. Se realizaron distintas diluciones de la solución stock de Lipo-clodronato (5mg/mL), con el fin de encontrar una dosis que permita la depleción de macrófagos totales en un 40%, similar a lo observado en los mutantes *panther*. Se encontró que al inyectar 5nL de una solución de Lipo-clodronato diluida 50 veces (1:50, 100µg/mL) se obtiene una reducción del total de macrófagos en la región posterior cercana al 40% respecto a controles inyectados con una solución de liposomas cargados con PBS (Lipo-PBS, Figura 8), similar a lo observado en larvas *panther*. La inyección de una solución de Lipo-clodronato diluida 10 veces (1:10, 500µg/ml) llevó a una reducción mayor del total de macrófagos (60% aproximadamente, Figura 8), demostrando el efecto dosis-dependiente de la inyección de Lipo-clodronato en larvas de pez cebra.

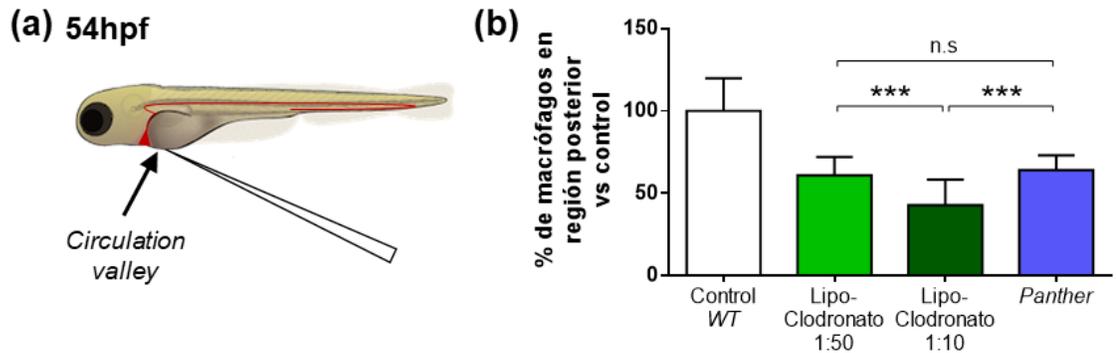


Figura 8. Reducción del número de macrófagos mediado por la inyección de liposomas de clodronato en larvas de pez cebra. (a) A las 54hpf, larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)* fueron inyectadas con 5nl de Lipo-clodronato en la región denominada *circulation valley*, permitiendo su dispersión en el individuo a través del torrente sanguíneo. (b) Cuantificación y comparación del porcentaje (%) de macrófagos presentes en larvas inyectadas con diluciones de Lipo-clodronato 1:50 y 1:10, además de individuos *panther*, a las 72hpf (18 horas post inyección). Los porcentajes fueron calculados con respecto a sus respectivos controles, y normalizados respecto a individuos WT. El gráfico indica el promedio \pm SD para cada condición. $n = 20$ larvas por condición. *** $p < 0,001$.

Al obtener un modelo que replica el número total de macrófagos encontrado en individuos *panther*, el paso siguiente fue determinar si se ven afectadas las poblaciones de macrófagos periféricos y CHT-residentes luego de la inyección de Lipo-clodronato 1:50. El análisis mostró que ambas poblaciones se vieron reducidas en aproximadamente un 40% respecto al control Lipo-PBS 1:50 (Figura 9), indicando que la inyección de Lipo-clodronato en el torrente sanguíneo permite la depleción homogénea de ambas poblaciones de macrófagos en el pez cebra. A continuación, se analizó el reclutamiento de los macrófagos presentes en individuos inyectados con Lipo-clodronato 1:50 luego de la amputación de la aleta caudal. Se observó que el reclutamiento de los macrófagos fue menor en los individuos tratados con Lipo-clodronato 1:50 respecto a los controles tratados con Lipo-PBS 1:50 (Figura 10.a y 10.b). Sin embargo, al normalizar el número

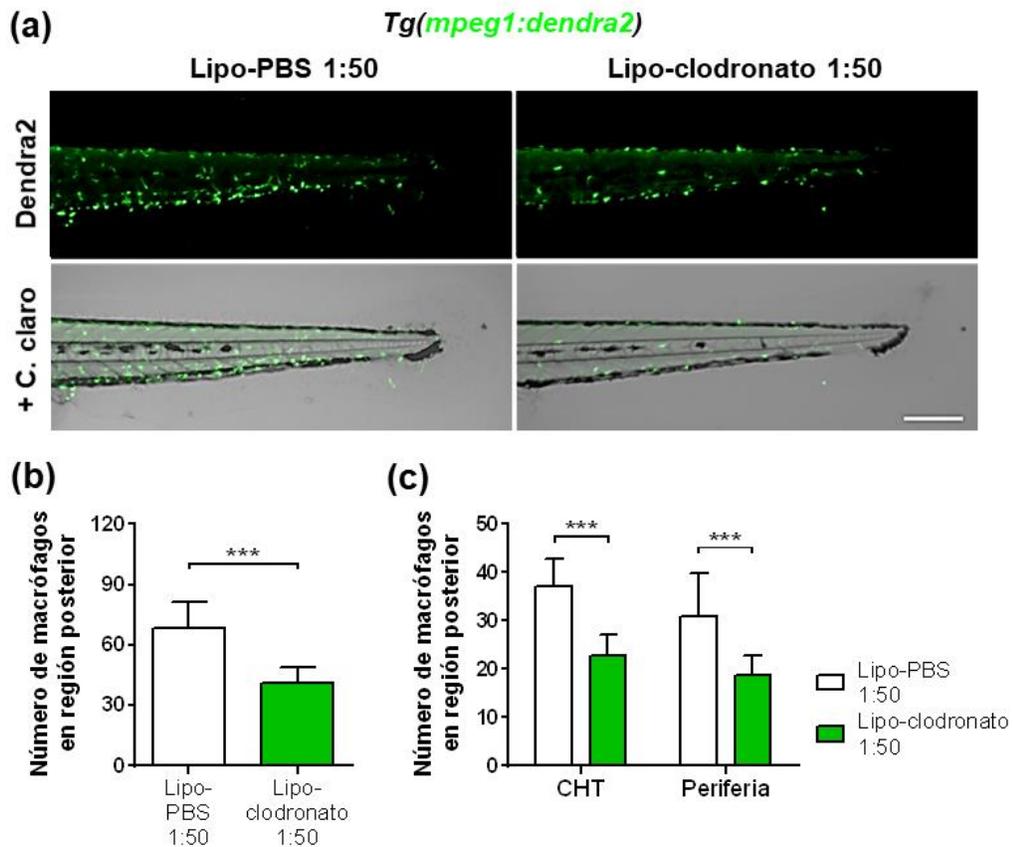


Figura 9. Cuantificación de macrófagos en la región posterior de larvas inyectadas con Lipo-clodronato 1:50. (a) Distribución de los macrófagos en la región posterior al ano de un individuo *Tg(mpeg1:Dendra2)* tratado con Lipo-clodronato 1:50 y con Lipo-PBS 1:50 a las 72hpf, vista a través de imágenes representativas para cada grupo. Barra de escala = 250 μ m. (b) Cuantificación del número total de macrófagos en la región posterior de larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50 y Lipo-PBS 1:50 a las 72hpf. (c) Cuantificación y comparación del número de macrófagos periféricos y CHT-residentes entre los tratamientos Lipo-clodronato y Lipo-PBS. Las barras de los gráficos indican el promedio \pm SD para cada grupo. n = 20 larvas por condición. *** p < 0,001.

de macrófagos reclutados respecto al total de macrófagos presentes en la región posterior no se observaron diferencias entre los tratamientos con Lipo-clodronato 1:50 y Lipo-PBS 1:50 (Figura 10.c). Al comparar este resultado con el obtenido en larvas mutantes *panther* (Figura 6), y dadas las diferencias entre el reclutamiento de macrófagos periféricos y CHT-residentes (Figura 4), se concluye que el menor reclutamiento de macrófagos

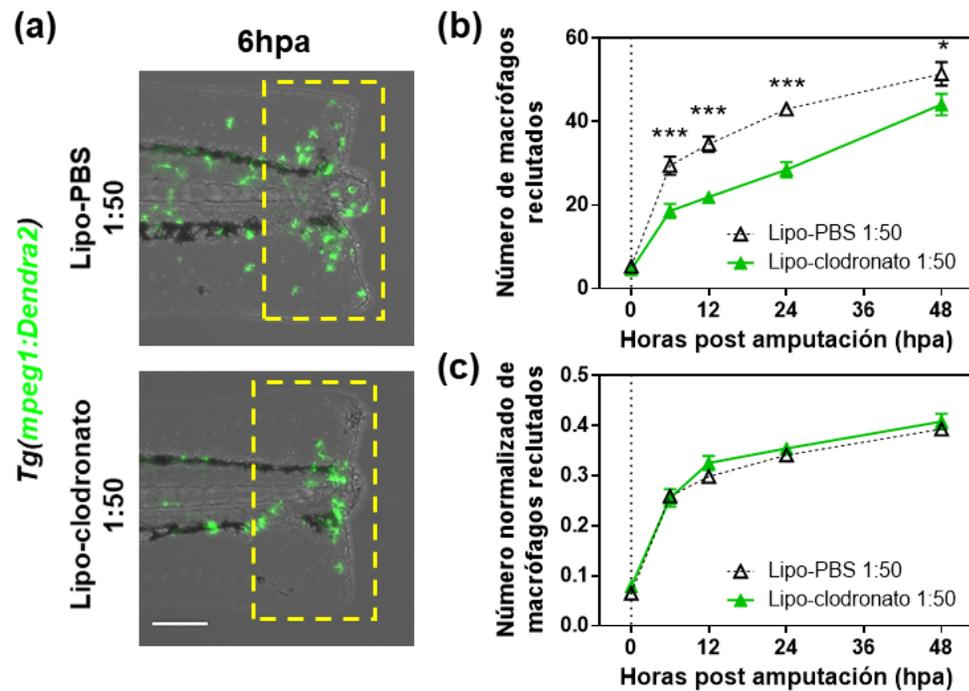


Figura 10. Reclutamiento de macrófagos en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50 luego de la amputación de la aleta caudal. (a) Imágenes representativas que muestran el reclutamiento de macrófagos a las 6hpa en larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)* inyectadas con una dilución 1:50 de Lipo-clodronato y Lipo-PBS a las 54hpf. Barra de escala = 100 μ m. (b) Cuantificación del reclutamiento de macrófagos en larvas Lipo-clodronato 1:50 y Lipo-PBS 1:50 desde las 0hpa hasta las 48hpa. (c) Normalización del número de macrófagos reclutados por el total de macrófagos presentes en la región posterior en larvas de pez cebra. Las normalizaciones fueron realizadas para cada larva. n = 20 larvas por experimento. *** p < 0,001.

observado en mutantes *panther* es consecuencia del menor número de macrófagos periféricos que estos muestran.

Para verificar que el efecto de la inyección de Lipo-clodronato afecta específicamente a los macrófagos, se inyectaron larvas *TgBAC(mpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* con Lipo-clodronato 1:50 y Lipo-PBS 1:50, de la misma forma descrita anteriormente. Tal como ha sido reportado previamente (Bernut y cols., 2014; Nguyen-Chi y cols., 2017; Pagán y cols., 2015), el número de neutrófilos presentes en la región posterior de larvas no se altera

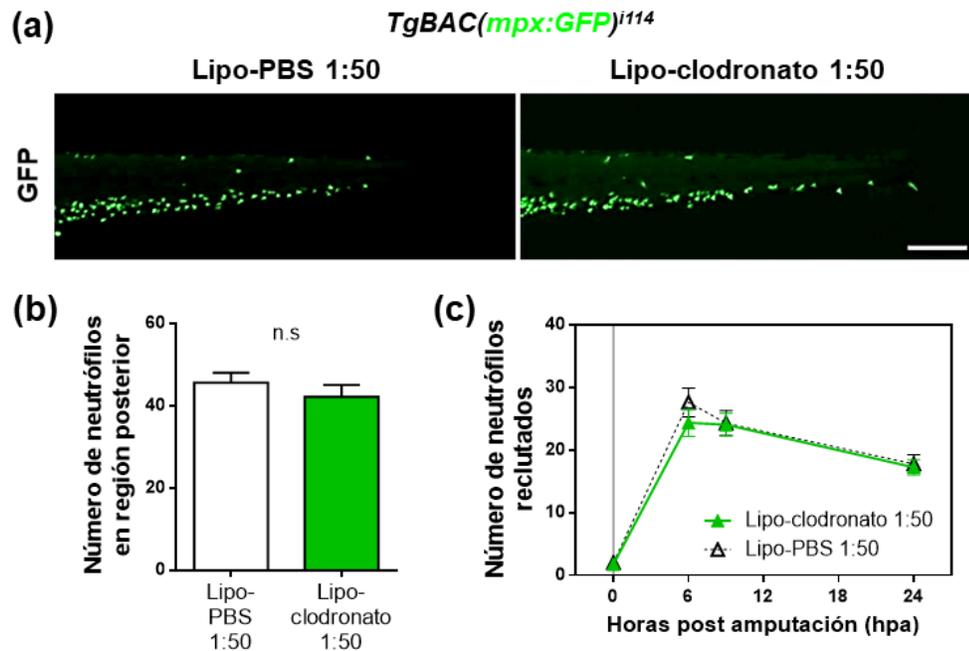


Figura 11. Abundancia y reclutamiento de neutrófilos en larvas inyectadas con Lipo-clodronato 1:50. (a) Imágenes de larvas de 72hpf *TgBAC(mpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* inyectadas con Lipo-PBS 1:50 y Lipo-clodronato 1:50 a las 54hpf. Barra de escala = 250µm. (b) Promedio ± SD del número de neutrófilos en la región posterior. n = 20 larvas por grupo. (c) Número de neutrófilos reclutados ± SEM en larvas *panther* y WT al sitio de daño durante las 24 horas posteriores a la amputación, realizada a las 72hpf. n = 24 larvas por condición. n.s diferencia no significativa.

en las larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50, al compararlas con sus respectivos controles de Lipo-PBS 1:50 (Figura 11.a y 11.b). Tampoco cambia el reclutamiento de los neutrófilos al sitio de daño, ni su salida, bajo este tratamiento (Figura 11.c). Es decir, el tratamiento con Lipo-clodronato induce una muerte selectiva de macrófagos y no afecta ni el número ni la cinética de reclutamiento de los neutrófilos en el sitio de daño ante la amputación de la aleta caudal en el pez cebra.

7.2. Evaluar la contribución de las distintas poblaciones de macrófagos del pez cebra a la regeneración de tejidos

7.2.1. Cuantificación de la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra

La amputación de la aleta caudal en el pez cebra es una aproximación experimental ampliamente utilizada para el estudio de la regeneración de tejidos, principalmente por ser una técnica altamente reproducible y por la detallada información que se posee respecto al mecanismo por el cual la aleta caudal regenera (Pfefferli y Jazwińska, 2015). En este trabajo, se calculó la variable “área de la aleta caudal” para cuantificar la regeneración de ésta, de acuerdo con protocolos previamente establecidos (Pei y cols., 2016). En breve, se midió el área desde el extremo distal de la aleta caudal en regeneración hasta la zona proximal del ACFP, adyacente al giro de la arteria caudal que conecta con la vena caudal (Figura 12.a). La regeneración de la aleta caudal fue cuantificada por varios días en individuos WT, encontrándose que a los 5 días post amputación (dpa) la aleta caudal regenerada presenta características similares a la aleta caudal de individuos sin amputar, además de no mostrar un crecimiento mayor en días posteriores (Figura 12.b). En base a esto, se consideró que a los 5dpa la aleta caudal de larvas WT de pez cebra se encuentra completamente regenerada. Sin embargo, en los análisis mostrados en adelante también se consideró la cuantificación a los 3dpa como un punto intermedio para analizar el proceso de regeneración de la aleta caudal en larvas.

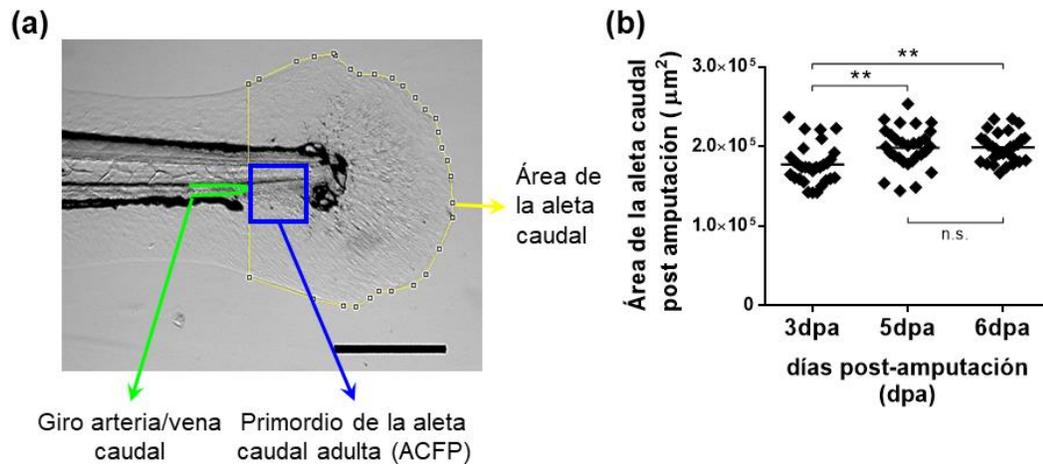


Figura 12. Método para la cuantificación de la regeneración de la aleta caudal en larvas amputadas a las 72hpf. (a) Imagen de una larva amputada luego de 5 días post amputación (dpa), señalando el “área de la aleta caudal” en amarillo, utilizada para cuantificar la regeneración. Además, se muestran regiones características que permiten localizar el inicio de la cola como el primordio de la aleta caudal adulta (ACFP, rojo) y el giro de la arteria/vena caudal (verde). Barra de escala = 200μm. (b) Regeneración de la cola en larvas amputadas a los 3dpa, 5dpa y 6dpa. n = 19-20 larvas por condición. n.s diferencia no significativa; * p < 0,05; ** p < 0,01.

7.2.2. Regeneración de la aleta caudal en larvas mutantes *panther*

La evidencia reciente señala que los macrófagos reclutados en etapas tempranas de la respuesta a la amputación de la aleta caudal (esto es, durante las primeras 24 horas post amputación en larvas) son los más relevantes durante la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra y en adultos (Nguyen-Chi y cols., 2016; Petrie y cols., 2014). Dado que los macrófagos periféricos llegan primero al sitio de daño, respecto a los macrófagos CHT-residentes (Figura 4), y considerando que el reclutamiento de macrófagos es menor en larvas mutantes *panther* a las 6hpa y 12hpa (Figura 6.c), se hipotetizó que la regeneración de la aleta caudal estaría afectada en larvas mutantes *panther*, respecto a individuos WT. Los resultados mostraron que el área de la aleta caudal regenerada fue efectivamente menor en mutantes *panther* respecto a individuos WT a los

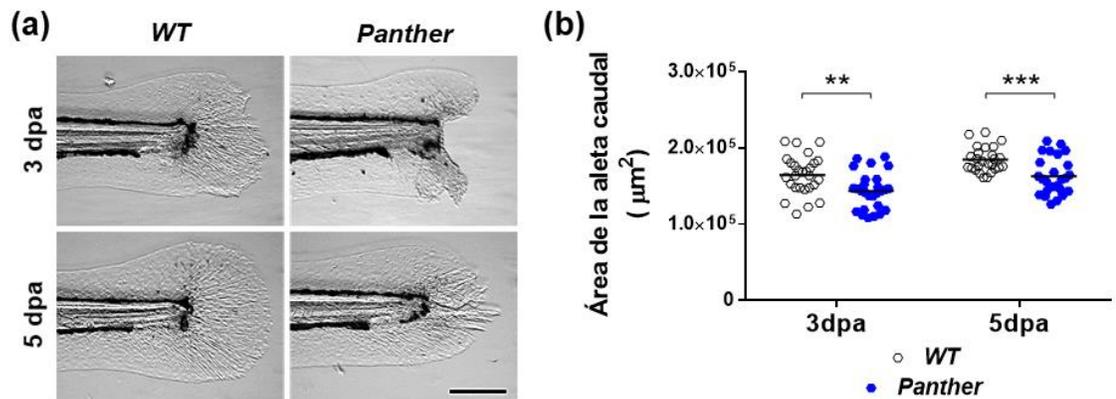


Figura 13. Regeneración de la aleta caudal en larvas mutantes *panther*. La aleta caudal de individuos *panther* y de controles WT fueron amputadas a las 72hpf, para analizar su regeneración (a) Imágenes representativas que muestran la regeneración en mutantes *panther* y controles WT a los 3dpa y 5dpa. Barra de escala = 200 μm . (b) Cuantificación del “área de la aleta caudal” (en μm^2) en mutantes y controles en los tiempos ya mencionados. n = 26-27 larvas por condición. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3dpa y 5dpa (Figura 13), indicando un rol de este gen en regeneración de la aleta caudal, y sugiriendo un posible rol de los macrófagos periféricos en este proceso.

7.2.3. Regeneración de la aleta caudal en larvas tratadas con Lipo-clodronato

Para resolver si la regeneración anómala de la aleta caudal en larvas *panther* es consecuencia de la disminución de la población de macrófagos periféricos, o bien obedece a la reducción global de los macrófagos en el pez cebra sin importar su localización, se cuantificó y analizó la regeneración de la aleta caudal en individuos WT tratados con Lipo-clodronato 1:50 respecto a larvas tratadas con Lipo-PBS 1:50. Los valores del área de la aleta caudal obtenidos en individuos del grupo Lipo-clodronato 1:50 fueron similares a los del grupo de larvas Lipo-PBS 1:50, tanto a los 3dpa como a los 5dpa (Figura 14). Este resultado indica que la reducción global del número de macrófagos en aproximadamente un 40% no afecta la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra. En cambio, la

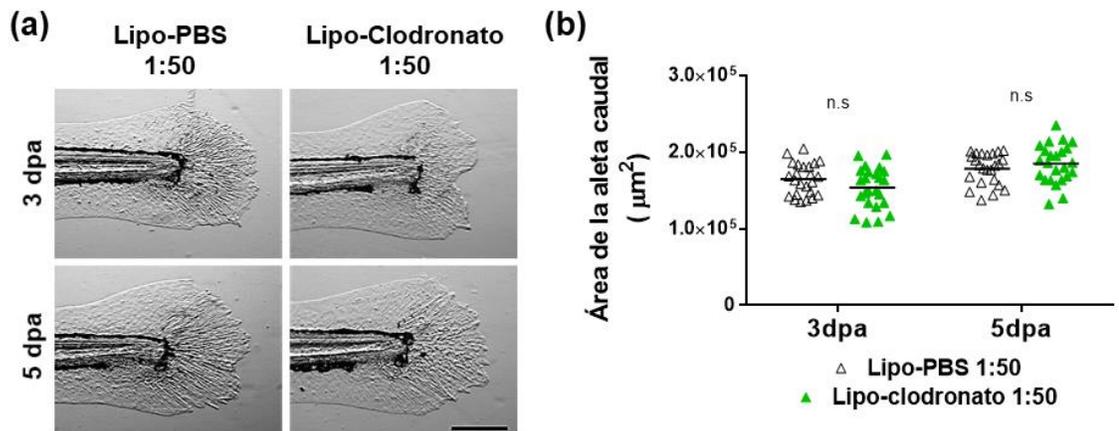


Figura 14. Regeneración de la aleta caudal en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50. A las 72hpf, y luego de 18 horas post inyección de Lipo-clodronato o Lipo-PBS, se amputó la aleta caudal de estos ejemplares y se analizó su regeneración. **(a)** Imágenes representativas que muestran la regeneración en las condiciones Lipo-clodronato 1:50 y Lipo-PBS 1:50 a los 3dpa y 5dpa. Barra de escala = $200\mu\text{m}$. **(b)** Cuantificación del “área de la aleta caudal” en las condiciones estudiadas. $n = 24$ larvas por condición. n.s diferencia no significativa.

reducción selectiva de los macrófagos periféricos de los mutantes *panther* daría cuenta de la regeneración anormal de la aleta caudal.

Dado que la población de macrófagos periféricos en larvas mutantes *panther* se encuentra reducida en un 60% aproximadamente, se analizó la regeneración de la aleta caudal en larvas inyectadas con una solución de Lipo-clodronato diluida 10 veces (1:10, $500\mu\text{g/mL}$), la cuál genera una reducción de un 60% del total de macrófagos respecto al control Lipo-PBS 1:10 (Figuras 8, 15.a y 15.b), afectando por igual a los macrófagos periféricos y CHT-residentes (Figura 15.c). Con este método fue posible obtener larvas cuya cantidad de macrófagos periféricos es comparable a individuos *panther* a las 72hpf. Al analizar la regeneración luego de la amputación de la aleta caudal en estas condiciones, se observó que las larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 presentaron una regeneración deficiente, al compararlos con los controles Lipo-PBS 1:10 (Figura 16). Esto sugiere que

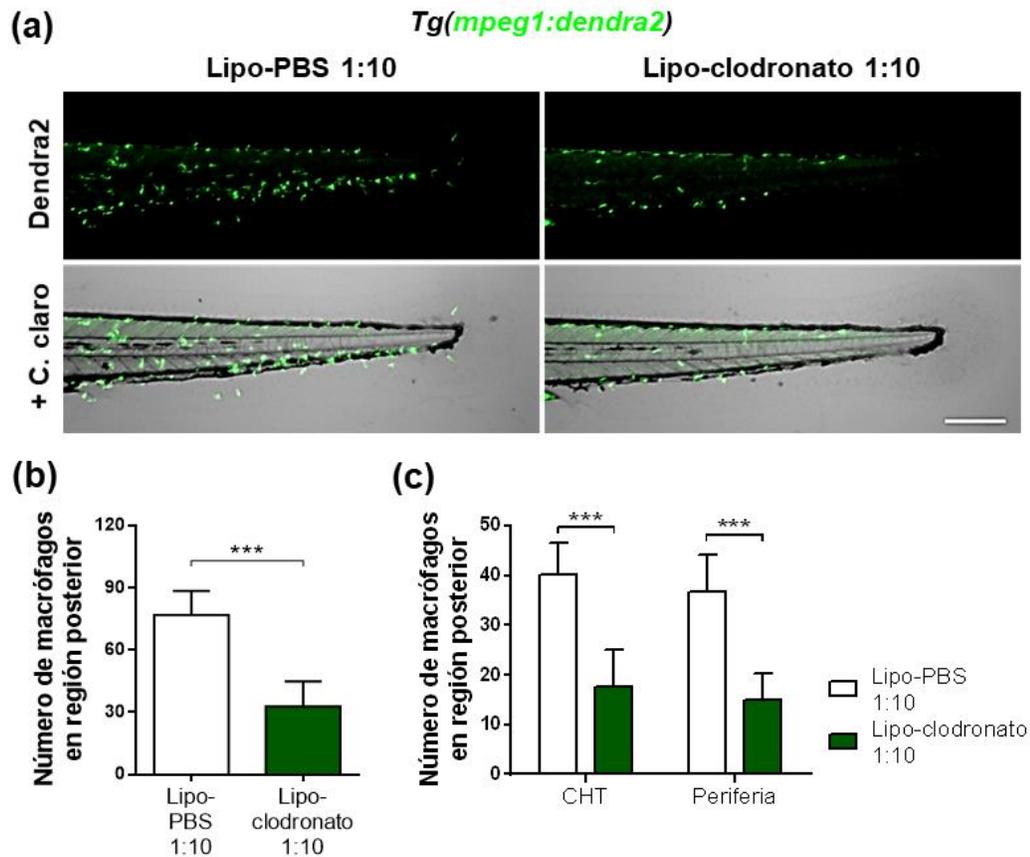


Figura 15. Reducción de poblaciones de macrófagos ante el tratamiento con Lipo-clodronato 1:10. (a) Imágenes representativas de larvas *Tg(mpeg1:Dendra2)* de 72hpf que muestran la distribución de los macrófagos en la región posterior ante la inyección, a las 54hpf, de Lipo-PBS 1:10 y Lipo-clodronato 1:10, respectivamente. (b) Cuantificación del número total de macrófagos en la región posterior de larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 y Lipo-PBS 1:10 a las 72hpf. (c) Comparación del número de macrófagos periféricos y CHT-residentes entre los tratamientos Lipo-clodronato 1:10 y Lipo-PBS 1:10. $n = 20$ larvas por condición. Se graficó el promedio \pm SD para cada grupo. *** $p < 0,001$.

la reducción de la población de macrófagos periféricos en una dosis comparable a aquella observada en larvas *panther* es suficiente para impedir la correcta regeneración de la aleta caudal.

Para confirmar que los macrófagos reclutados en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria gatillada por la amputación de la aleta caudal son claves en la regeneración

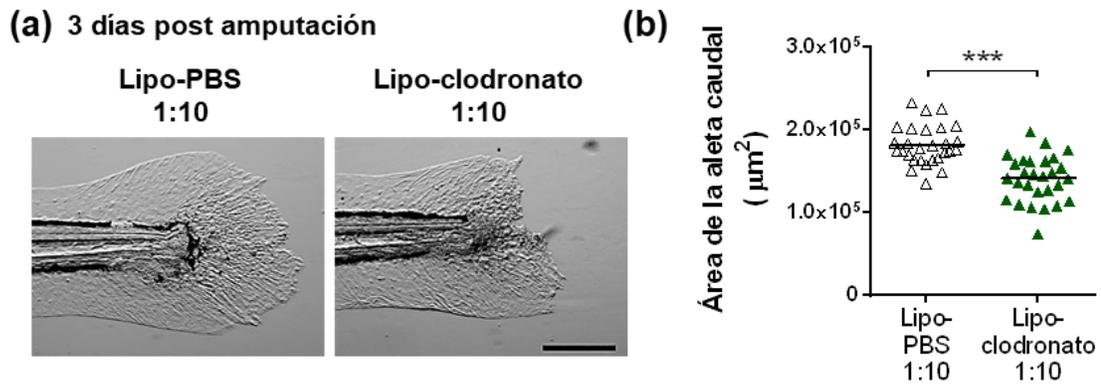


Figura 16. Regeneración de la aleta caudal en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 a los 3dpa. (a) Imágenes representativas de la aleta caudal en regeneración de larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 y con el control Lipo-PBS 1:10. (b) Cuantificación del área de la aleta caudal a los 3dpa. n = 28 larvas por condición. *** p < 0,001.

de ésta, se realizaron ensayos de amputación de la aleta caudal en que un grupo de larvas fue inyectado con Lipo-clodronato 1:10 18 horas antes del daño (54hpf) y un segundo grupo de larvas fue inyectado inmediatamente antes del daño (72hpf) (Figura 17.a). Con esta estrategia se buscó analizar si la depleción tardía de macrófagos afecta la regeneración de la aleta caudal en larvas. En línea con reportes previos (Nguyen-Chi y cols., 2016; Petrie y cols., 2014), se observó que sólo las larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 a las 54hpf mostraban una regeneración anormal de la aleta caudal, mientras que la regeneración en larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10 a las 72hpf fue comparable a su respectivo control (Figura 17.b y 17.c). Estos resultados, combinados con el resultado obtenido en larvas *panther* (Figura 13), indican que los macrófagos periféricos reclutados en fases tempranas de la respuesta inflamatoria son necesarios para la correcta regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra (Figura 18).

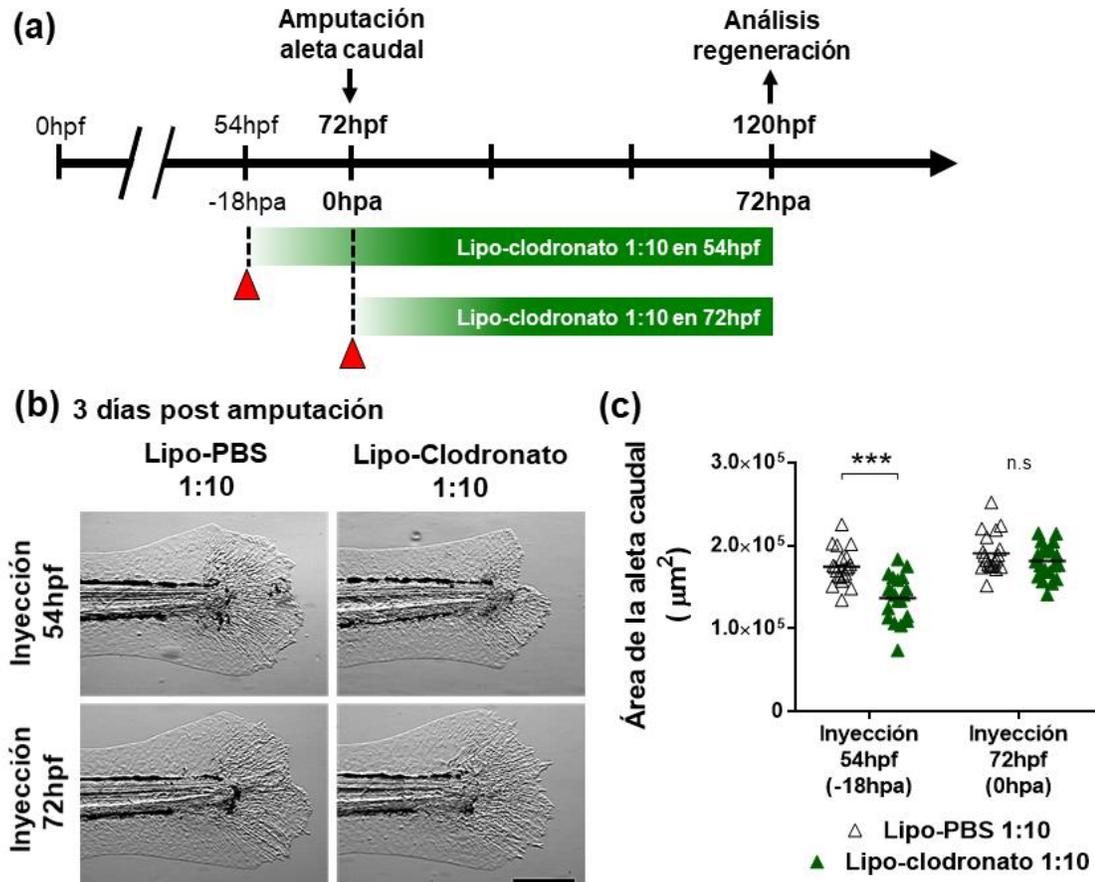


Figura 17. Dependencia temporal de la depleción de macrófagos con Lipo-clodronato 1:10 sobre la regeneración de la aleta caudal en larvas. (a) Esquema de las inyecciones de Lipo-clodronato 1:10 en larvas. Un primer grupo de larvas WT fue inyectado con las diluciones 1:10 de Lipo-clodronato y Lipo-PBS a las 54hpf (18 horas antes de la amputación o -18hpa), mientras que un segundo grupo de larvas fue inyectado a las 72hpf, inmediatamente antes de la amputación (0hpa). (b) La regeneración de la aleta caudal en estos grupos fue analizada a los 3dpa, y se comparó a sus respectivos controles Lipo-PBS 1:10. Imágenes representativas de la regeneración son mostradas. Barra de escala = 200 μm . (c) Cuantificación del área de la aleta caudal a los 3dpa en los tratamientos de Lipo-clodronato 1:10 y sus respectivos controles. n = 20 larvas por cada grupo. n.s diferencia no significativa; *** p < 0.001.

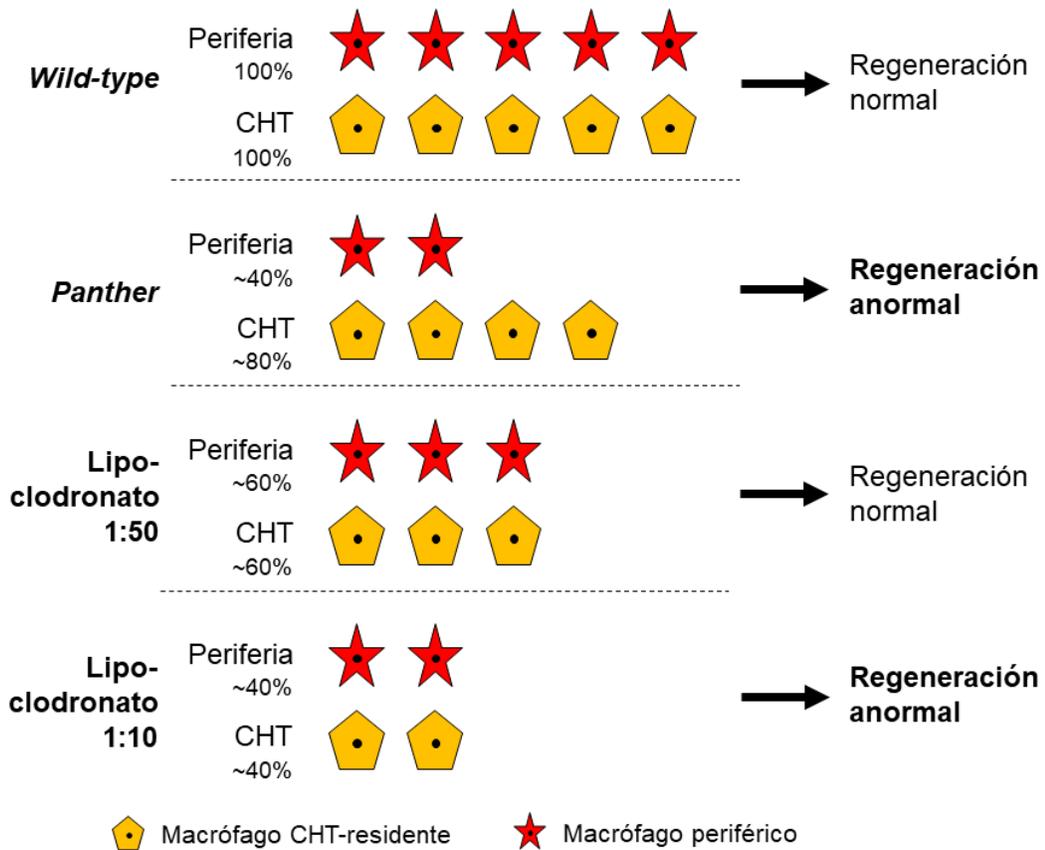


Figura 18. Relación entre poblaciones de macrófagos de larvas de pez cebra y la regeneración de la aleta caudal. Las poblaciones de macrófagos periféricos y CHT-residentes en la región posterior de una larva WT a las 72 hpf son similares en número y se muestran en proporciones de 1/5, para términos explicativos. Además, la regeneración de la aleta caudal de una larva WT se catalogó como “regeneración normal”. Las larvas mutantes *panther* exhiben un número menor de ambas poblaciones de macrófagos respecto a larvas WT, siendo los macrófagos periféricos los más afectados (~40% del total en WT) en comparación a los CHT-residentes (~80% del total en WT), y muestran una regeneración “anormal”. La inyección de Lipo-clodronato 1:50 a las 54hpf en el torrente sanguíneo permite la reducción de las poblaciones de macrófagos periféricos y CHT-residentes de forma homogénea a un ~60% respecto a una larva WT, manteniendo el mismo número de macrófagos que una larva *panther*, aunque la regeneración de la aleta caudal en estos individuos es normal. Por otro lado, la inyección de una solución de Lipo-clodronato 1:10 a las 54hpf, permite la reducción de las poblaciones de macrófagos periféricos y CHT-residentes a un ~40% del total de macrófagos encontrados en larvas WT, y la regeneración de la aleta caudal sí es afectada (anormal). Tanto las larvas *panther* como las larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:10, que presentan una regeneración anormal, tienen cantidades similares de macrófagos periféricos.

7.3. Establecer la relación de las poblaciones de macrófagos identificadas con la regulación de moléculas pro-inflamatorias durante la regeneración de tejidos en larvas de pez cebra

7.3.1. Proliferación y muerte celular ante la amputación de la aleta caudal en larvas

Durante el proceso de regeneración epimórfica se gatilla primero la muerte celular, la que es reemplazada por la proliferación de las células estromales del blastema, las que dan origen al tejido de reemplazo. La desregulación de uno de estos dos procesos, muerte y/o proliferación, puede alterar el proceso regenerativo (Arandjelovic y Ravichandran, 2015; Pfefferli y Jaźwińska, 2015). Para determinar si existen diferencias en estas variables durante la regeneración en los mutantes *panther*, se realizaron ensayos de TUNEL para la detección de muerte celular a las 24hpa, y pulsos de BrdU de 18 horas (desde las 6hpa hasta las 24hpa) para evaluar la proliferación celular en la zona de daño. Se encontró un mayor número de células TUNEL⁺ en larvas mutantes *panther* respecto a controles WT (Figura 19.a y 19.b), mientras que se observó un menor número de células BrdU⁺ luego del pulso de 18 horas (Figura 19.c y 19.d), indicando que los mutantes *panther* presentan mayor muerte celular y menor proliferación celular durante la regeneración. Es decir, el fenotipo mutante se caracteriza por un menor reclutamiento de macrófagos periféricos que redundaría en una perturbación del proceso regenerativo mediado, al menos en parte, por alteraciones en la sobrevivencia y división celular. Los siguientes experimentos apuntaron a establecer un vínculo funcional entre estos fenómenos.

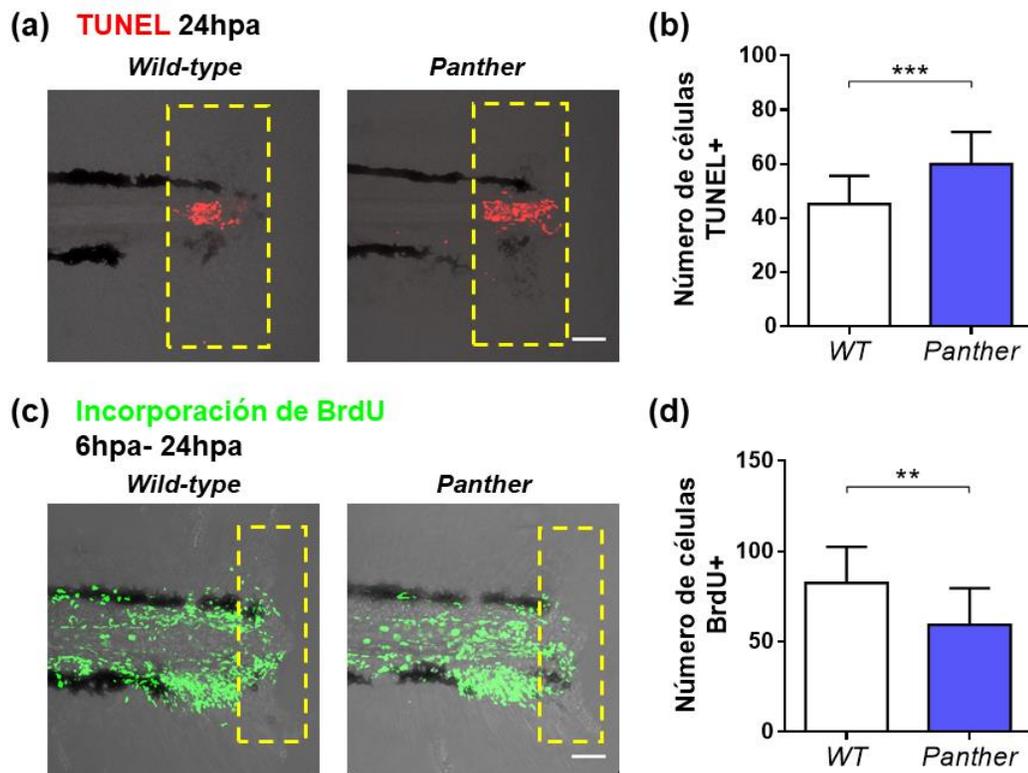


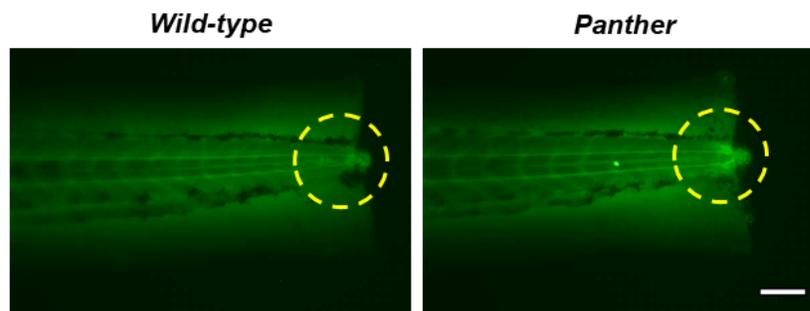
Figura 19. Diferencias en la proliferación y muerte celular entre larvas *panther* y WT. (a) La muerte celular se analizó a través de ensayos de TUNEL a las 24hpa. Imágenes representativas reflejan las diferencias encontradas entre individuos *panther* y WT. Barra de escala = 50 μ m. (b) Cuantificación y comparación del número de células TUNEL⁺ entre los grupos previamente mostrados. n = 20 larvas por condición. *** p < 0,001. (c) Para evaluar la proliferación celular, larvas *panther* y WT fueron sometidas a un pulso de BrdU 5mM entre las 6hpa y las 24hpa. Imágenes representativas muestran las diferencias de la señal de BrdU entre larvas *panther* y WT en la región demarcada con amarillo. (d) Cuantificación y comparación del número de células BrdU⁺ entre ambos grupos. n = 12 larvas por condición. Los gráficos indican el promedio \pm SD para cada condición. ** p < 0,01.

7.3.2. Acumulación de especies reactivas de oxígeno en mutantes *panther*

Clásicamente, se ha considerado que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un tejido puede generar inflamación crónica, además de daño y modificaciones de moléculas importantes para la función de éste (Mittal y cols., 2014; Wittmann y cols., 2012). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la

producción de ROS no sólo promueve el reclutamiento de leucocitos hacia un tejido dañado, sino que también activa vías de señalización importantes en la regeneración de tejidos (Gauron y cols., 2013; Love y cols., 2013). Por este motivo, se comparó la acumulación de ROS entre individuos *panther* y WT durante la respuesta inflamatoria gatillada por daño tisular. Se usó el sensor de ROS H₂DCFDA. Este compuesto penetra en las células y es catabolizado por esterasas no específicas o por reacciones de oxidación, generando el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Este método ha sido utilizado para monitorear la acumulación de ROS en diferentes tejidos del pez cebra ante condiciones de estrés oxidativo (Mugoni y cols., 2014; Olivari y cols., 2008; Walker y cols., 2012). Para este caso, el análisis se restringió al sitio de daño de larvas *panther* y WT antes de la amputación de la aleta caudal y a las 6 horas post amputación, y se utilizó una porción de la cola distante del sitio de daño como referencia para luego obtener un valor normalizado de fluorescencia por larva. El análisis de la fluorescencia generada por el DCF en la región de la transección no mostró diferencias momentos antes de la amputación (Figura 20), mientras que posterior al daño la acumulación de DCF en el sitio de daño de individuos *panther* fue mayor que en larvas WT (6hpa, Figura 20). La mayor acumulación de ROS en el sitio de daño en larvas mutantes *panther* después de la amputación podría explicar el aumento en la muerte celular observada anteriormente en los peces mutantes (Figura 19.a y 19.b).

(a) **Acumulación de DCF, 6hpa**



(b)

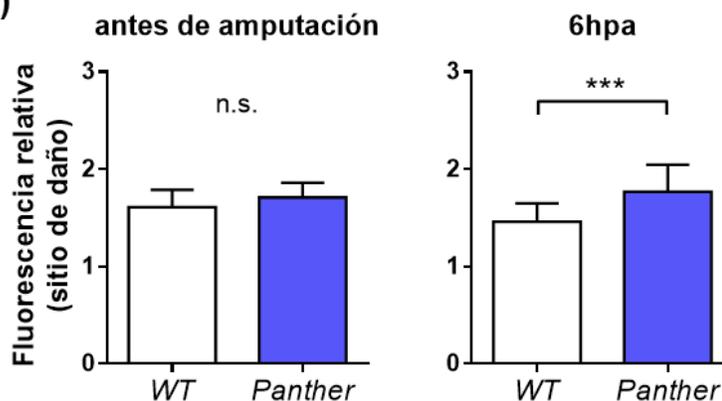


Figura 20. Acumulación de ROS en el sitio de daño de larvas *panther* y WT. (a) Imágenes representativas de la acumulación de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) en el sitio de daño (región amarilla) de larvas *panther* y WT a las 6hpa. Barra de escala = 100 μ m. (b) Cuantificación de la fluorescencia relativa promedio \pm SD generada por la acumulación de DCF en el sitio de daño de larvas *panther* y WT antes del daño y a las 6hpa. n = 20 larvas por condición. n.s diferencia no significativa; *** p < 0,001.

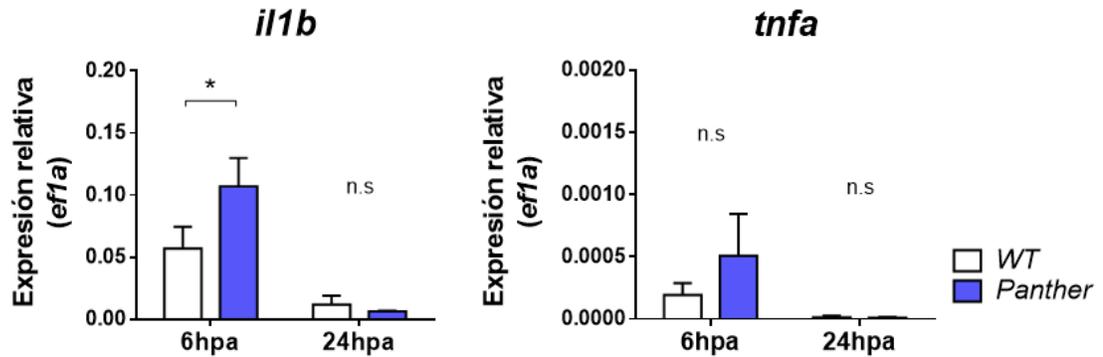
7.3.3. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en mutantes

panther ante la amputación de la aleta caudal

Recientemente, han sido descritos dos posibles mecanismos que explicarían la contribución de los macrófagos durante la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra. En el trabajo de Hasegawa y colaboradores se reportó que la expresión transitoria de *il1b* es requerida para la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra, y que los macrófagos son los encargados de disminuir los niveles de *il1b* en el tejido dañado.

Además, la ausencia de macrófagos conlleva a la expresión prolongada de *illb*, que promueve la muerte celular y la disminución en la proliferación celular (Hasegawa y cols., 2017). Por otro lado, Nguyen-Chi y colaboradores destacaron en un segundo trabajo que la señalización de TNF- α es importante para la proliferación de células mesenquimales, que expresan el receptor de TNF- α . Los autores también demostraron que la síntesis de esta citoquina es llevada a cabo por una subpoblación de macrófagos identificados por la expresión de *tnfa*, y que son reclutados en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria (Nguyen-Chi y cols., 2017). Estos antecedentes nos llevaron a determinar si los mutantes *panther* presentan una desregulación en la expresión de alguno de estos genes, lo que podría explicar los fenotipos observados. Se extrajo ARN de la región posterior de larvas *panther* y WT a las 6hpa y 24hpa, y luego se realizaron ensayos de qRT-PCR. Los resultados indican que la expresión de *illb* es mayor en los mutantes *panther* en comparación a controles WT a las 6hpa (Figura 21.a). Por el contrario, no se observaron diferencias en la expresión de *tnfa* entre individuos *panther* y WT a las 6hpa, ni tampoco se observaron diferencias en la expresión de *illb* ni en *tnfa* entre larvas *panther* y WT a las 24hpa (Figura 21.a). Además, se analizó la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como *il10* y *tgfb1a*, no encontrándose diferencias de expresión entre los mutantes *panther* e individuos WT a las 6hpa, pero sí una mayor expresión de *tgfb1a* en individuos WT a las 24hpa (Figura 21.b). Con estos resultados, sumados a los previamente mostrados (Figuras 19.a, 19.b y 20), se propone que los macrófagos periféricos serían los encargados de regular negativamente la acumulación de ROS y la expresión de *illb* en el tejido dañado, disminuyendo la muerte celular y promoviendo de esta forma la proliferación del blastema y la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra.

(a) Citoquinas pro-inflamatorias



(b) Citoquinas anti-inflamatorias

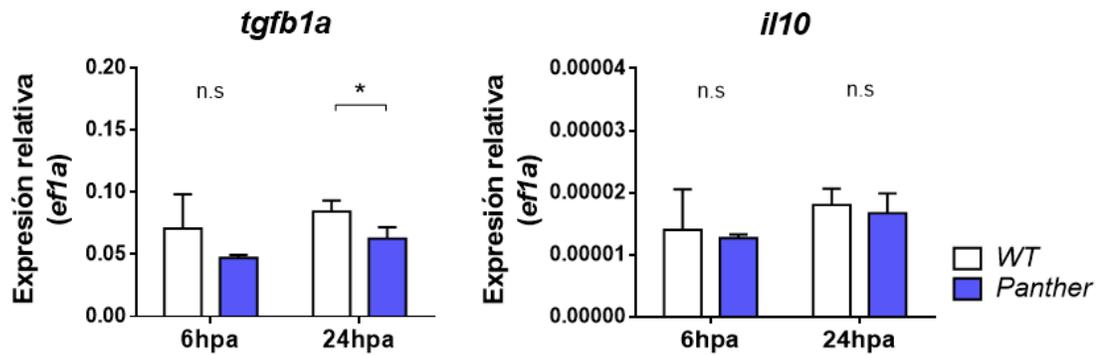


Figura 21. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias luego de la amputación de la aleta caudal en larvas *panther* y WT. Abundancia del RNA en la región posterior de larvas *panther* y WT a las 6hpa y 24hpa de (a) las citoquinas pro-inflamatorias *il1b* y *tnfa* y (b) las citoquinas anti-inflamatorias *tgfb1a* e *il10*. Cada valor de expresión fue normalizado respecto a la abundancia del gen de expresión constitutiva *ef1a*. Cada experimento corresponde a una colección de colas de 20-25 larvas. n = 3 experimentos independientes. n.s diferencia no significativa; * p < 0,05.

8. DISCUSIÓN

8.1. Heterogeneidad de los macrófagos en larvas de pez cebra

En mamíferos, los macrófagos son considerados una población heterogénea de células, con diferentes orígenes y funciones de acuerdo a su localización y también a su estado de activación (Davies y cols., 2013; Perdiguero y Geissmann, 2016). En el pez cebra, la evidencia reciente muestra que también existe una heterogeneidad en los macrófagos durante el desarrollo (Shiau y cols., 2015; Yu y cols., 2017) y en diferentes condiciones inflamatorias, como daño tisular (Nguyen-Chi y cols., 2015) e infección (Cambier y cols., 2015; Cambier y cols., 2017). Sin embargo, la falta de marcadores génicos específicos para macrófagos en este modelo impide la identificación de diferentes poblaciones de macrófagos de la misma forma en que se hace en mamíferos. En este trabajo, utilizando la línea transgénica reportera para el gen *mpeg1*, ampliamente aceptada como marcador específico de macrófagos en el pez cebra (Ellett y cols., 2011; Keightley y cols., 2014; Nguyen-Chi y cols., 2016; Torraca y cols., 2014), fue posible identificar dos poblaciones de macrófagos distinguibles en condiciones de homeostasis tisular en larvas: los macrófagos periféricos y los CHT-residentes. La clasificación de macrófagos en mamíferos por su localización fue usada antes del desarrollo de anticuerpos monoclonales, y ha sido utilizado previamente en el pez cebra para discriminar distintas poblaciones de macrófagos (White y cols., 2017).

Al analizar y comparar a los macrófagos periféricos y CHT-residentes en condiciones homeostáticas, se encontraron diferencias significativas entre ellas en

términos morfológicos y migratorios. Respecto a las diferencias morfológicas, los macrófagos CHT-residentes demostraron ser más circulares respecto a los macrófagos periféricos. Esto podría indicar distintos estados de activación entre éstas, dado que se ha descrito que los macrófagos polarizados hacia un perfil pro-inflamatorio (M1) presentan una morfología más redonda, mientras que formas elongadas son características de macrófagos con un perfil anti-inflamatorio (M2) (McWhorter y cols., 2013). En línea con lo anterior, se ha reportado que los macrófagos con un perfil anti-inflamatorio presentan una movilidad mayor a macrófagos indiferenciados y a aquellos polarizados hacia un perfil pro-inflamatorio (Hind y cols., 2016). Las diferencias encontradas en la velocidad de migración entre los macrófagos periféricos y los CHT-residentes refuerza la idea de que ambas poblaciones presentan distintos estados de activación, de acuerdo a las señales que reciben de su entorno. Una tercera variable a considerar es la capacidad fagocítica de ambas poblaciones estudiadas; sin embargo, trabajos previamente publicados señalan que tanto los macrófagos localizados en la periferia como en el CHT son capaces de fagocitar activamente a patógenos ante una infección bacteriana (Cambier y cols., 2017; Hou y cols., 2016; Pagán y cols., 2015). Además, el hecho de que la inyección de liposomas de clodronato en larvas de pez cebra afecte de forma homogénea a ambas poblaciones de macrófagos (Figuras 9 y 15) indica que éstas conservan la capacidad fagocítica independiente de su localización en la larva. Lo anterior se ratifica a partir de experimentos en que se utiliza la tinción de macrófagos con *Neutral Red*, que es incorporado principalmente a través de fagocitosis (Weeks y cols., 1987) y permite visualizar tanto a macrófagos en tejidos periféricos como en el CHT (Shiau y cols., 2015). Con esto, se plantea que ambas poblaciones de células mantienen la característica propia de un

macrófago, que es su actividad fagocítica, pero que difieren en su estado de activación. Además, se sugiere que las dos poblaciones de macrófagos estudiadas tienen un grado de diferenciación similar, dadas las similitudes fagocíticas que presentan, y por la expresión de *mpeg1*, que es utilizado como marcador de macrófagos maduros en mamíferos (Spilsbury y cols., 1995).

8.2. Reclutamiento y función de los macrófagos periféricos durante una respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria gatillada por la amputación de la aleta caudal en larvas de pez cebra ha sido una aproximación experimental ampliamente utilizada para analizar el reclutamiento y dinámica de las células inmunes durante este proceso (Li y cols., 2012; Loynes y cols., 2010). Utilizando esta aproximación se ha logrado entender diversos fenómenos, como los mecanismos que regulan la migración retrógrada de neutrófilos (Powell y cols., 2014; Tauzin y cols., 2014), así como también la heterogeneidad de los macrófagos reclutados en una respuesta inflamatoria (Nguyen-Chi y cols., 2015). Utilizando este modelo, se encontró que las poblaciones de macrófagos estudiadas en este trabajo difieren en la velocidad de reclutamiento al sitio de daño, siendo los macrófagos periféricos más veloces que los macrófagos CHT-residentes en llegar a dicho lugar. La rápida respuesta de los macrófagos periféricos puede ser consecuencia, por una parte, de una capacidad mayor de este grupo de células para detectar señales de peligro al estar localizados en tejidos periféricos. En mamíferos, es sabido que los macrófagos residentes de tejidos periféricos pueden responder rápidamente a señales inflamatorias como H_2O_2 , calcio, ATP y alarminas (Minutti y cols., 2017). En el pez cebra se ha reportado que el

reclutamiento inicial de leucocitos a un evento inflamatorio es dado por un gradiente de H_2O_2 generado inmediatamente después del daño (Niethammer y cols., 2009), por lo que se sugiere que los macrófagos periféricos son más propensos a responder a estas señales y migrar hacia la fuente de origen de ésta. En línea con esta idea, ha sido recientemente demostrado que los macrófagos residentes del sistema nervioso central en larvas de pez cebra son los primeros en responder ante una infección con *Mycobacterium marinum* en el ventrículo del cerebro posterior (Cambier y cols., 2017), diferenciando así en términos migratorios y funcionales a los macrófagos residentes de tejidos periféricos con los macrófagos provenientes del CHT.

Una función importante de los macrófagos residentes de tejidos periféricos durante una respuesta inflamatoria es promover el reclutamiento de más macrófagos, además de otras células inmunes como los neutrófilos (Davies y cols., 2013). Para analizar la contribución de los macrófagos periféricos durante la respuesta inflamatoria gatillada por la amputación de la aleta caudal en larvas de pez cebra se utilizaron los mutantes *panther*, los cuales fueron inicialmente descritos como animales que presentaban una fuerte reducción en el número de macrófagos residentes de tejidos periféricos (Herbomel y cols., 2001; Pagán y cols., 2015). En el análisis realizado, se encontró que esta línea mutante presenta una disminución de ~20% en la población de macrófagos CHT-residentes, y de un ~60% de macrófagos periféricos, respecto a individuos WT (Figura 5). Es decir, hay un efecto de la mutación sobre el conjunto de los macrófagos, con un 40% de disminución del total de estas células cuando se comparan larvas *panther* con WT. Cuando se evaluó la cantidad de macrófagos reclutados al sitio de daño luego de la amputación de la aleta caudal, se observó una fuerte reducción en los mutantes comparado con los controles,

reducción que se mantuvo aun al normalizar los valores obtenidos de acuerdo al número de macrófagos totales presentes en ambos genotipos previo a la amputación. Se dedujo que la diferencia entre *panther* y WT en términos de los macrófagos que son reclutados a un sitio de daño debe, necesariamente, estar dada por la menor cantidad de macrófagos periféricos que tienen los mutantes. El resultado obtenido requería contar con una segunda aproximación que permitiera reducir la cantidad de macrófagos en distintos grados, para poder confirmar el rol crucial de las células periféricas. En efecto, el uso de liposomas de clodronato en una dilución 1:50 permitió simular la disminución de macrófagos totales observada en los mutantes *panther*, cercana al 40% respecto a su control, pero con una reducción homogénea de las poblaciones de macrófagos periféricos y CHT-residentes (~40% para ambos casos, Figura 9). Aunque los individuos tratados con Lipo-Clodronato 1:50 presentaron una reducción en el número de macrófagos reclutados al sitio de daño, estas diferencias no resultaron ser significativas al comparar los valores normalizados. Este resultado permitió concluir que la población de macrófagos periféricos, las afectadas mayoritariamente por la mutación presente en individuos *panther*, tienen un rol preponderante en la respuesta inflamatoria inducida por daño tisular. Hay que destacar que el reclutamiento de neutrófilos no se vio afectado en ninguna de las dos condiciones mencionadas, excluyendo de esta forma una posible contribución de los macrófagos ausentes en estos casos sobre el reclutamiento de neutrófilos durante una respuesta inflamatoria, en línea con trabajos previamente publicados (Carrillo y cols., 2016; Petrie y cols., 2014).

8.3. Importancia de los macrófagos periféricos en la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra

Ya que en trabajos anteriores se ha demostrado que los macrófagos reclutados tempranamente son importantes para la regeneración de la aleta caudal en larvas y adultos de pez cebra luego de su amputación (Nguyen-Chi y cols., 2017; Petrie y cols., 2014), se decidió analizar la contribución de las distintas poblaciones de macrófagos, descritas en este trabajo, a la regeneración de este tejido. Para esto se evaluó, en primera instancia, la capacidad regenerativa de las larvas *panther*, las cuáles, como se mencionó en la sección anterior, muestran una reducción en el número de macrófagos periféricos (Figura 5), y una reducción en los macrófagos reclutados en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria (Figura 6). Los resultados mostraron que la capacidad de regeneración de la aleta caudal en individuos *panther* es menor en comparación a individuos WT a los 3dpa y 5dpa (Figura 13). Para excluir la posibilidad de que esta observación sea consecuencia del menor número de macrófagos totales presentes en las larvas *panther*, se analizó la capacidad regenerativa de larvas tratadas con Lipo-clodronato 1:50 a las 54hpf, observándose que éstos individuos no presentan diferencias en la regeneración de la aleta caudal respecto a sus respectivos controles Lipo-PBS 1:50 a los 3dpa y 5dpa (Figura 14). Nuevamente, estos resultados son atribuidos a la diferencia en la distribución de los macrófagos entre los individuos *panther* y Lipo-clodronato 1:50. Si bien ambas condiciones presentan una reducción total de macrófagos semejante (~40% menor respecto a un individuo WT), en *panther*, esta reducción ocurre por la pérdida preferente de la población de macrófagos periféricos. Se ideó un experimento para confirmar esta conclusión, consistente en alcanzar una reducción de macrófagos periféricos que

asemejara a la observada en larvas *panther*. Para lo anterior, se aumentó la concentración del tratamiento con Lipo-clodronato a las 54hpf, y se logró una reducción del número de macrófagos periféricos en un 60% (el nivel preciso en que los animales *panther* presentan esta reducción). En estas condiciones, se obtuvo una fenocopia de *panther* (Figura 16), indicando que, efectivamente, los macrófagos periféricos, los cuales son los primeros en ser reclutados a un tejido dañado, tienen un rol preponderante en la respuesta inflamatoria y la posterior regeneración tisular en el pez.

La regeneración de la aleta caudal en larvas, luego de su amputación, se caracteriza por la formación del blastema, un grupo de células altamente proliferativa que permite la formación del tejido de reemplazo (Kawakami y cols., 2004; Mateus y cols., 2012). En los mutantes *panther* se observó una reducción en la proliferación celular en el sitio de daño, en conjunto con un aumento en la muerte celular, al compararlos con individuos WT (Figura 19). Dado que los macrófagos contribuyen a la proliferación del blastema y a la eliminación de células muertas del sitio de daño (Hasegawa y cols., 2017; Nguyen-Chi y cols., 2017; Petrie y cols., 2014), se propone que esta función es llevada a cabo principalmente por los macrófagos reclutados en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria (macrófagos periféricos), en base a las observaciones efectuadas en los mutantes *panther*. Esto sugiere que los macrófagos periféricos cumplen funciones distintas a los macrófagos CHT-residentes durante la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra, por lo que entender los mecanismos por los cuales operan ambas poblaciones de macrófagos durante la regeneración de tejidos daría más información sobre las diferencias que éstas presentan.

8.4. Macrófagos periféricos y el control del ambiente pro-inflamatorio

Los mecanismos posibles por el cual los macrófagos periféricos actúan sobre la regeneración podrían estar relacionados a la regulación de mediadores pro-inflamatorios generados por la amputación de la aleta caudal. Recientemente, se ha demostrado que la inflamación es un paso necesario para iniciar la respuesta regenerativa, pero que a la vez requiere ser finamente controlada para evitar la inflamación crónica (Eming y cols., 2016; Karin y Clevers, 2016). Dentro de los mediadores pro-inflamatorios generados ante un daño tisular se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales se ha demostrado que actúan como moléculas de señalización para la activación de mecanismos que favorecen la regeneración de apéndices en pez cebra y en salamandras (Gauron y cols., 2013; Love y cols., 2013). Sin embargo, también se sabe que su acumulación excesiva promueve la muerte celular y la inflamación crónica, afectando la reparación de un tejido (Mittal y cols., 2014). Con el fin de investigar si, en el modelo experimental utilizado, los macrófagos son capaces de regular la acumulación de ROS en el sitio de daño, se usó el sensor DCF (Gauron y cols., 2013; Mugoni y cols., 2014; Walker y cols., 2012). Si bien existe controversia sobre la selectividad del sensor DCF en la detección de ROS, pudiendo ser más específico en la detección de H_2O_2 por sobre otras especies reactivas de oxígeno (Chen y cols., 2010), es destacable señalar que la producción de H_2O_2 es requerida por leucocitos para su migración direccional al sitio de daño y favorece una respuesta pro-inflamatoria (Yoo y cols., 2011). La acumulación del compuesto fluorescente DCF en larvas *panther* a las 6hpa (Figura 20), sugiere que los macrófagos periféricos regulan negativamente la acumulación de ROS en el sitio de daño, contribuyendo de esta forma a la regeneración de la aleta caudal. En línea con esta idea,

se ha visto que el tratamiento de larvas de pez cebra con H_2O_2 induce la expresión de genes con función antioxidante, dentro de los cuales destaca el gen *hmox1a* (Lisse y cols., 2016). En paralelo al presente trabajo, y a través de la generación de una línea transgénica reportera de la expresión de *hmox1a*, fue posible observar que los macrófagos que migran al sitio de daño expresan *hmox1a*, y que la inhibición farmacológica de la actividad del producto génico de *hmox1a* afecta negativamente la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra (Datos no mostrados). Toda esta evidencia sugiere que los macrófagos del pez cebra contribuyen a la reducción de ROS en el sitio de daño a través de la expresión de genes con funciones antioxidantes, como sería el caso de *hmox1a*. La relación entre los macrófagos periféricos y la expresión de genes antioxidantes sería fundamental para entender el mecanismo por el cual éstos regulan negativamente la acumulación de ROS y el estrés oxidativo en el sitio de daño.

Junto con la producción de ROS, la regulación de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el sitio de daño también influye en la regeneración de tejidos. En el reciente trabajo publicado por Hasegawa y colaboradores, se muestra que la expresión transitoria de *illb*, cuyo producto génico es la citoquina pro-inflamatoria $Il-1\beta$, es requerida para promover la expresión de genes asociados a la regeneración de la aleta caudal en larvas, pero que la expresión prolongada y no controlada de *illb* produce la muerte celular del tejido dañado y a una regeneración anormal del tejido amputado (Hasegawa y cols., 2017). La actividad persistente de $Il-1\beta$ es una condición habitual en diferentes casos de inflamación crónica, en que la reducción de los niveles de esta citoquina lleva a una mejora del tejido afectado (Dinarello, 2011). En el trabajo de Hasegawa y colaboradores, se demuestra que la expresión de *illb* es regulada

negativamente en individuos WT por los macrófagos reclutados durante las primeras horas de la respuesta inflamatoria (Hasegawa y cols., 2017). En este trabajo se observó una mayor expresión de *il1b* en mutantes *panther* respecto a individuos WT a las 6hpa (Figura 21), sugiriendo una respuesta pro-inflamatoria más elevada en los mutantes que en el grupo control. Dado que los macrófagos periféricos son reclutados mayoritariamente durante las primeras horas de la respuesta inflamatoria gatillada por la amputación de la aleta caudal, y que los mutantes *panther* presentan un menor reclutamiento de macrófagos en las primeras 12 horas post-amputación (Figura 6.c), se propone que los macrófagos periféricos tienen la capacidad de regular la expresión de *il1b* en el sitio de daño. Dicha función podría ser llevada a cabo por estas células a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias en el sitio de daño, como Il-10 y Tgf- β , que además participan en la disminución de ROS y en la restauración de la homeostasis del tejido (Ortega-Gómez y cols., 2013). Dado que la expresión de *il1b* y la acumulación de ROS es mayor a las 6hpa en mutantes *panther*, cuya regeneración se ve reducida, se esperaría que la expresión de estos mediadores anti-inflamatorios fuese afectada en esa misma ventana temporal. Sin embargo, sólo se observó una menor expresión de *tgfb1a* en individuos *panther* a las 24hpa y no a las 6hpa, mientras que la expresión de *il10* no se vio afectada en ninguno de los dos tiempos experimentales considerados (Figura 21.b). Existen dos posibles explicaciones para la discrepancia en estos resultados. Primero, el tejido utilizado para la extracción de ARN y el posterior análisis de la abundancia de ARN mensajero por qRT-PCR es una amplia región en la zona caudal del pez, y no sólo el sitio de daño. Experimentos que permitan análisis más particulares en el sitio de daño, como ensayos de hibridación *in situ* contra estos genes, podrían dar mayor información sobre la

temporalidad y abundancia de los ARN mensajeros de estas citoquinas anti-inflamatorias en el sitio de daño. Segundo, el mecanismo de regulación de *illb* por parte de los macrófagos periféricos pudiese estar relacionado a la generación de otras moléculas, tales como mediadores lipídicos como lipoxinas y resolvinas, los cuales inhiben la expresión de mediadores pro-inflamatorios a través de la disminución de la actividad de vías de señalización pro-inflamatorias como NF- κ B (Serhan y cols., 2008). Experimentos en que el análisis se hiciera específicamente en los macrófagos reclutados al sitio de daño, como por ejemplo transcriptómica de célula única, podrían dar indicios sobre los mediadores expresados por los macrófagos periféricos y que regulan la expresión de *illb*.

Otra citoquina pro-inflamatoria cuya expresión ha sido descrita como necesaria en la regeneración de tejidos en pez cebra es *tnfa*. Si bien esta citoquina ha sido definida clásicamente como pro-inflamatoria, y su expresión ha sido ampliamente reportada en condiciones de inflamación crónica (Sedger y McDermott, 2014), Nguyen-Chi y colaboradores mostraron que la proliferación de células estromales requerida para la regeneración de la aleta caudal depende de la señalización del receptor Tnfr1 expresado por estas células, y cuyo ligando (Tnf- α) es liberado por los macrófagos en el sitio de daño. La presencia de macrófagos *tnfa*⁺, clasificados inicialmente como M1 (Nguyen-Chi y cols., 2015), fue observada en fases tempranas de la respuesta inflamatoria y esta población demostró ser importante para la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra (Nguyen-Chi y cols., 2017). Lo anterior vuelve a cuestionar la clasificación de los macrófagos como M1 o M2, e indica que la función de los macrófagos en un contexto inflamatorio es más compleja que una clasificación respecto a su perfil de expresión génica. Al comparar la expresión de *tnfa* luego de la amputación de la aleta caudal, no se

observaron diferencias en la expresión de *tnfa* entre *panther* y WT (Figura 21.a). Lo anterior puede ser debido a los mismos factores técnicos de la extracción de ARN mencionados previamente, los cuales impiden distinguir diferencias en la expresión de *tnfa* exclusivamente en los macrófagos reclutados al sitio de daño. Por otra parte, existe la posibilidad que el mecanismo de acción de los macrófagos periféricos sea independiente de la función de TNF- α , y que el grupo de macrófagos que expresan *tnfa* están presentes en las larvas mutantes *panther*, y por lo tanto corresponderían a una población distinta a los macrófagos periféricos. Esta idea surge a partir del análisis de expresión de *tnfa* en mutantes *panther* a las 6hpa, la cual no presenta diferencias respecto a los controles WT, e incluso tiende a ser mayor (Figura 21.a). Por otro lado, se ha reportado que la expresión de *tnfa* se encuentra restringida a los macrófagos en larvas de pez cebra (Nguyen-Chi y cols., 2015), por lo que se hubiera esperado una reducción en la expresión de *tnfa* si los macrófagos periféricos fueran los responsables de la expresión de esta citoquina. Será necesaria más información para entender la cinética de la expresión de *tnfa* e *illb*, además de las posibles relaciones entre estas citoquinas. Una idea para lo anterior sería la obtención de larvas mutantes *panther* reporteras *Tg(tnfa:GFP)* (Nguyen-Chi y cols., 2015) que permitirían el rastreo y cuantificación de estas células en los mutantes para compararlos con individuos WT.

De las citoquinas anti-inflamatorias estudiadas (*il10* y *tgfb1a*) se encontró que los mutantes *panther* tienen una menor expresión de *tgfb1a* a las 24hpa, respecto a los controles WT. Si bien se ha descrito en mamíferos que la expresión de *tgfb1* está implicada en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria, y que los macrófagos con función anti-inflamatoria expresan *tgfb1* (Chazaud, 2014; Wynn y Vanella, 2016), también se ha

demostrado su efecto en el control de la proliferación y diferenciación celular (Morikawa y cols., 2016). La expresión de componentes de la vía de señalización de TGF- β /Activina, incluyendo a *tgfb1*, se concentra principalmente en las células que forman parte del blastema durante procesos de regeneración en pez cebra y en anfibios (Chablais y Jazwińska, 2012; Ho y Whitman, 2008; Jazwińska y cols., 2007; Lévesque y cols., 2007). Por lo tanto, la expresión reducida de *tgfb1a* observada en larvas *panther* podría bien no tener repercusiones en el control de respuesta inflamatoria, sino que estaría afectando principalmente la función del blastema, lo cual explicaría la baja proliferación celular observada (Figura 19.c y 19.d). Sin embargo, esto no descarta que los macrófagos periféricos expresen *tgfb1a* o su parálogo *tgfb1b*, u otros componentes de la vía TGF- β /Activina, por lo que un análisis más detallado sobre el perfil de expresión génica de los macrófagos periféricos podría dar cuenta de lo anterior.

8.5. Modelo propuesto

Con los resultados obtenidos en el trabajo, se propone el siguiente modelo (Figura 22): la amputación de la aleta caudal gatilla una respuesta inflamatoria, en que el tejido dañado inicia la respuesta inflamatoria liberando factores pro-inflamatorios, como ROS e *illb*, los que favorecen el reclutamiento de células inmunes. Los macrófagos periféricos son reclutados al sitio de daño mayoritariamente durante las primeras horas de la respuesta inflamatoria (6hpa), con mayor rapidez respecto a los macrófagos CHT-residentes, y son los encargados de regular negativamente la expresión de *illb* y la acumulación de ROS, modulando el ambiente pro-inflamatorio, la muerte celular, y favoreciendo de esta forma la proliferación de células en el tejido dañado, dando paso a la regeneración de la aleta

caudal. Por lo tanto, en este trabajo se propone que los macrófagos periféricos son los principales responsables de regular negativamente la presencia de *il1b* y de ROS en el sitio de daño, logrando así que estas señales sean transitorias, para favorecer la regeneración de la aleta caudal en etapas posteriores. Si bien se les otorga un rol primordial a los macrófagos periféricos en el control de la respuesta inflamatoria y en la regeneración de la aleta caudal, no se descarta que los macrófagos CHT-residentes también cumplan una función importante en la regeneración de la aleta caudal, enfatizando la heterogeneidad en las poblaciones de macrófagos existentes en el pez cebra, y sus funciones durante diferentes condiciones inflamatorias.

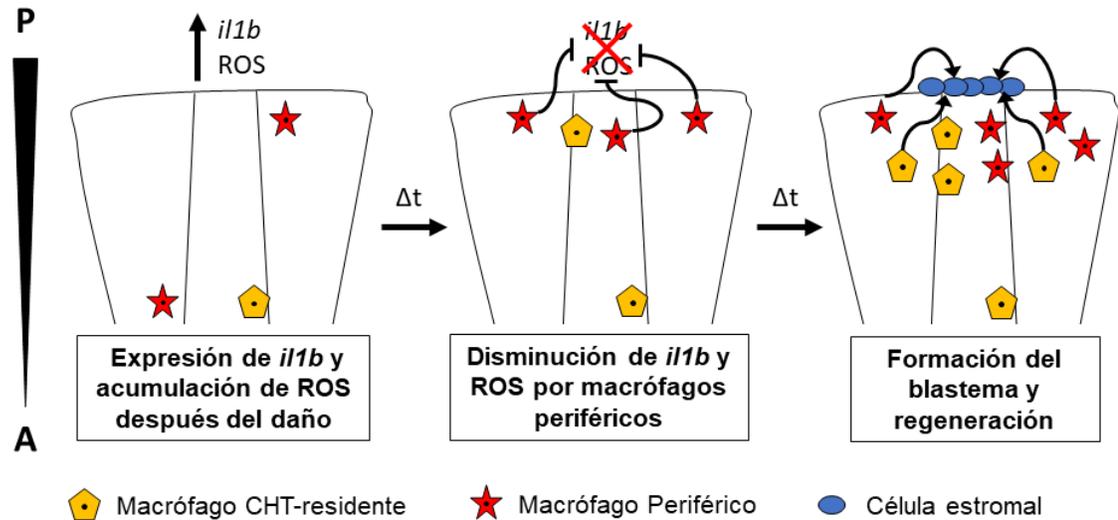


Figura 22. Modelo propuesto. La amputación de la aleta caudal genera señales que inducen la acumulación de ROS y la expresión de *il1b* en el sitio de daño. Los macrófagos periféricos son reclutados rápidamente al sitio de daño y regulan negativamente la acumulación de ROS y la expresión de *il1b*, impidiendo la expresión prolongada de esta citoquina que induce la muerte celular. De esta forma, tanto los macrófagos periféricos como los CHT-residentes, que son reclutados con menor rapidez en el sitio de daño, podrían contribuir a la regeneración del tejido liberando señales que promuevan la proliferación de las células estromales en el sitio de daño y favoreciendo la regeneración de la aleta caudal. A = anterior, P = posterior.

9. CONCLUSIONES

- En este trabajo, fue posible identificar poblaciones de macrófagos en larvas de pez cebra, utilizando criterios morfológicos, migratorios y relativos a su ubicación en el organismo. Bajo estos parámetros, se clasificaron a los macrófagos como “periféricos” o “CHT-residentes”.
- Los macrófagos localizados en la periferia son reclutados más rápido en comparación a los macrófagos residentes del CHT ante la amputación de la aleta caudal en larvas de pez cebra.
- La disminución del número de macrófagos localizados en la periferia afecta negativamente la regeneración de la aleta cauda en larvas de pez cebra.
- Los macrófagos periféricos reclutados contribuyen a disminuir la acumulación de ROS y la expresión de *illb* en el sitio de daño, promoviendo la regeneración de la aleta caudal en larvas de pez cebra.

10. REFERENCIAS

- Amatruda JF, Zon LI. 1999. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol* 216(1):1-15.
- Amit I, Winter DR, Jung S. 2016. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat Immunol* 17(1):18-25.
- Arandjelovic S, Ravichandran KS. 2015. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol* 16(9):907-17.
- Ayala A, Chung CS, Grutkoski PS, Song GY. 2003. Mechanisms of immune resolution. *Crit Care Med* 31:S558-71.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181(6):3733-9.
- Berman JN, Kanki JP, Look AT. 2005. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. *Exp Hematol* 33(9):997-1006.
- Bernut A, Herrmann JL, Kissa K, Dubremetz JF, Gaillard JL, Lutfalla G, Kremer L. 2014. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(10):E943-52.
- Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, Stachura DL, Cisson JL, Traver D. 2007. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development* 134(23):4147-56.
- Buiting AM, van Rooijen N. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: an approach for fundamental studies. *J Drug Target* 2(5):357-62.
- Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan L. 2017. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 47(3):552-65.
- Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, Cosma CL, Ramakrishnan L. 2014. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505(7482):218-22.
- Carrillo SA, Anguita-Salinas C, Peña OA, Morales RA, Muñoz-Sánchez S, Muñoz-Montecinos C, Paredes-Zúñiga S, Tapia K, Allende ML. 2016. Macrophage Recruitment Contributes to Regeneration of Mechanosensory Hair Cells in the Zebrafish Lateral Line. *J Cell Biochem* 117(8):1880-9.
- Chablais F, Jazwinska A. 2012. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGF β signaling. *Development* 139(11):1921-30.
- Chazaud B. 2014. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 219(3):172-8.
- Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res* 44(6): 587-604.

- Clatworthy AE, Lee JS, Leibman M, Kostun Z, Davidson AJ, Hung DT. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect Immunol* 77(4):1293-303.
- Cook J, Hagemann T. 2013. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 13(4):595-601.
- Curado S, Stainier DY, Anderson RM. 2008. Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies. *Nat Protoc* 3(6):948-54.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14(10):986-95.
- Dinarello CA. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14):3720-32.
- Elks PM, Loynes CA, Renshaw SA. 2011. Measuring inflammatory cell migration in the zebrafish. *Methods Mol Biol* 769:261-75.
- Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. 2011. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* 117(4):e49-56.
- Eming SA, Wynn TA, Martin P. 2017. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* 356(6342):1026-30.
- Eom DS, Parichy DM. 2017. A macrophage relay for long-distance signaling during postembryonic tissue remodeling. *Science* 355(6331):1317-20.
- Forbes SJ, Rosenthal N. 2014. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med* 20(8):857-69.
- Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, Ipendey E, Teillon J, Volovitch M, Vriza S. 2013. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep* 3:2084.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. 2013. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet* 29(11):611-20.
- Gerri C, Marín-Juez R, Marass M, Marks A, Maischein HM, Stainier DYR. 2017. Hif-1 α regulates macrophage-endothelial interactions during blood vessel development in zebrafish. *Nat Commun* 8:15492.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330(6005):841-5.
- Ginhoux F, Williams M. 2016. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44(3):439-49.
- Ginhoux F, Jung S. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14(6):392-404.
- Godwin JW, Brockes JP. 2006. Regeneration, tissue injury and the immune response. *J Anat* 209(4):423-32.
- Gordon S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37:S9-17
- Gordon S, Plüddemann A. 2017. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol* 15(1):53.

- Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262(1):36-55.
- Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F, Glass CK. 2014. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159(6):1327-40.
- 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.
- Harvie EA, Green JM, Neely MN, Huttenlocher A. 2013. Innate immune response to *Streptococcus iniae* infection in zebrafish larvae. *Infect Immun* 81(1):110-21.
- Hasegawa T, Hall CJ, Crosier PS, Abe G, Kawakami K, Kudo A, Kawakami A. 2017. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. *Elife* 6. pii:e22716.
- Hasegawa T, Nakajima T, Ishida T, Kudo A, Kawakami A. 2015. A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration. *Dev Biol* 399(1):80-90.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. 1999. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126(17):3735-45.
- 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.
- Hind LE, Lurier EB, Dembo M, Spiller KL, Hammer DA. 2016. Effect of M1-M2 Polarization on the Motility and Traction Stresses of Primary Human Macrophages. *Cell Mol Bioeng* 9(3):455-65.
- Ho DM, Whitman M. 2008. TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Dev Biol* 315(1):203-16.
- Hou Y, Sheng Z, Mao X, Li C, Chen J, Zhang J, Huang H, Ruan H, Luo L, Li L. 2016. Systemic inoculation of *Escherichia coli* causes emergency myelopoiesis in zebrafish larval caudal hematopoietic tissue. *Sci Rep* 6:36853.
- Hui SP, Sheng DZ, Sugimoto K, Gonzalez-Rajal A, Nakagawa S, Hesselson D, Kikuchi K. 2017. Zebrafish Regulatory T Cells Mediate Organ-Specific Regenerative Programs. *Dev Cell* 43(6):659-72.
- Iovine MK. 2007. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins. *Nat Chem Biol* 3(10):613-8.
- Janeway CA. Immunobiology 5: the immune system in health and disease, 5th edition Edn. Garland Pub., New York: 2001.
- Jaźwińska A1, Badakov R, Keating MT. 2007. Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Curr Biol* 17(16):1390-5.
- Jin H, Sood R, Xu J, Zhen F, English MA, Liu PP, Wen Z. 2009. Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. *Development* 136(4):647-54.
- Julier Z, Park AJ, Briques PS, Martino MM. 2017. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater* 53:13-28.

- Karin M, Clevers H. 2016. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* 529(7586):307-15.
- Kawakami A, Fukazawa T, Takeda H. 2004. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Dev Dyn* 231(4):693-9.
- Keightley MC, Wang CH, Pazhakh V, Lieschke GJ. 2014. Delineating the roles of neutrophils and macrophages in zebrafish regeneration models. *Int J Biochem Cell Biol* 56:92-106.
- Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, Bhasker V, Gordillo GM, Sen CK, Roy S. 2010. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One* 5(3):e9539.
- Lai SL, Marín-Juez R, Moura PL, Kuenne C, Lai JKH, Tsedeke AT, Guenther S, Looso M, Stainier DY. 2017. Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. *Elife* 6: pii:e25605.
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM. 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 28(1):9-28.
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. 2011. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51:267-88.
- Lavin Y, Merad M. 2013. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res* 1(4):201-9.
- Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I. 2014. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159(6):1312-26.
- Lévesque M, Gatién S, Finnson K, Desmeules S, Villiard E, Pilote M, Philip A, Roy S. 2007. Transforming growth factor: beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS One* 2(11):e1227.
- Li L, Jin H, Xu J, Shi Y, Wen Z. 2011. Irf8 regulates macrophage versus neutrophil fate during zebrafish primitive myelopoiesis. *Blood* 117(4):1359-69.
- Li L, Yan B, Shi YQ, Zhang WQ, Wen ZL. 2012. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J Biol Chem* 287(30):25353-60.
- Li Y, Li Y, Cao X, Jin X, Jin T. 2017. Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cell Mol Immunol* 14(1):80-89.
- Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98(10):3087-96.
- Lin CY, Chiang CY, Tsai HJ. 2016. Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci* 23:19.
- Lisse TS, King BL, Rieger S. 2016. Comparative transcriptomic profiling of hydrogen peroxide signaling networks in zebrafish and human keratinocytes: Implications toward conservation, migration and wound healing. *Sci Rep* 6:20328.

- Liu C, Wu C, Yang Q, Gao J, Li L, Yang D, Luo L. 2016. Macrophages Mediate the Repair of Brain Vascular Rupture through Direct Physical Adhesion and Mechanical Traction. *Immunity* 44(5):1162-76.
- 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* 87(2):203-12.
- Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, Gallop JL, Dorey K, Amaya E. 2013. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol* 15(2):222-8.
- Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. 2010. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184(7):3964-77.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-50.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229(2):176-85.
- Martinez FO, Gordon S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6:13.
- Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Günther P, Crozet L, Jacome-Galarza CE, Händler K, Klughammer J, Kobayashi Y, Gomez-Perdiguero E, Schultze JL, Beyer M, Bock C, Geissmann F. 2016. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353(6304). pii:aaf4238.
- Mateus R, Pereira T, Sousa S, de Lima JE, Pascoal S, Saúde L, Jacinto A. 2012. In vivo cell and tissue dynamics underlying zebrafish fin fold regeneration. *PLoS One* 7(12):e51766.
- Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, Yoo SK, Ranheim EA, Huttenlocher A. 2009. Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Dev Comp Immunol* 33(11):1212-7.
- 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.
- McGrath KE, Frame JM, Palis J. 2015. Early hematopoiesis and macrophage development. *Semin Immunol* 27(6):379-87.
- McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. 2013. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(43):17253-8.
- Meireles AM, Shiao CE, Guenther CA, Sidik H, Kingsley DM, Talbot WS. 2014. The phosphate exporter *xpr1b* is required for differentiation of tissue-resident macrophages. *Cell Rep* 8(6):1659-67.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164(12):6166-73.
- Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM. 2017. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semi Cell Dev Biol* 61:3-11.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20(7):1126-67.

- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. 2016. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(5). pii:a021873.
- Moya-Díaz J, Peña OA, Sánchez M, Ureta DA, Reynaert NG, Anguita-Salinas C, Marín G, Allende ML. 2014. Electroablation: a method for neurectomy and localized tissue injury. *BMC Dev Biol* 14:7.
- Mugoni V, Camporeale A, Santoro MM. 2014. Analysis of oxidative stress in zebrafish embryos. *J Vis Exp* (89):51328.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11(11):723-37.
- Nahrendorf M, Swirski FK. 2016. Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res* 119(3):414-7.
- Nguyen-Chi M, Laplace-Buihhé B, Jorgensen C, Djouad F. 2016. Deciphering the complexity of macrophage biology and function with the zebrafish model. *Macrophage* 3:e1260.
- Nguyen-Chi M, Laplace-Builhé B, Travnickova J, Luz-Crawford P, Tejedor G, Lutfalla G, Kissa K, Jorgensen C, Djouad F. 2017. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell Death Dis* 8(8):e2979.
- Nguyen-Chi M, Laplace-Builhe B, Travnickova J, Luz-Crawford P, Tejedor G, Phan QT, Duroux-Richard I, Levraud JP, Kissa K, Lutfalla G, Jorgensen C, Djouad F. 2015. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *Elife* 4:e07288.
- 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.
- Okabe Y. 2018. Molecular control of the identity of tissue-resident macrophages. *Int Immunol*. doi:10.1093/intimm/dxy019.
- Olivari FA, Hernández PP, Allende ML. 2008. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 1244:1-12.
- Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 5(5):661-74.
- Pagán AJ, Yang CT, Cameron J, Swaim LE, Ellett F, Lieschke GJ, Ramakrishnan L. 2015. Myeloid Growth Factors Promote Resistance to Mycobacterial Infection by Curtailing Granuloma Necrosis through Macrophage Replenishment. *Cell Host Microbe* 18(1):15-26.
- Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL. 2000. An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 127(14):3031-44.
- Pei W, Tanaka K, Huang SC, Xu L, Liu B, Sinclair J, Idol J, Varshney GK, Huang H, Lin S, Nussenblatt RB, Mori R, Burgess SM. 2016. Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation. *NPJ Regen Med* 1. pii 16013.

- Perdiguero EG, Geissmann F. 2016. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol* 17(1):2-8.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. 2009. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5(4):e1000371.
- Petrie TA, Strand NS, Yang CT, Rabinowitz JS, Moon RT. 2014. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 141(13):2581-91.
- Pfefferli C, Jazwińska A. 2015. The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration (Oxf)* 2(2):72-83.
- Powell D, Tauzin S, Hind LE, Deng Q, Beebe DJ, Huttenlocher A. 2017. Chemokine Signaling and the Regulation of Bidirectional Leukocyte Migration in Interstitial Tissues. *Cell Rep* 19(8):1572-85.
- Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK. 2006. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108(13):3976-8.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336(6077):86-90.
- Sedger LM, McDermott MF. 2014. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 25(4):453-72.
- Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. 2017. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater* 4(1):55-68.
- Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8(5):349-61.
- Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, Kim KW, Klein E, Kalchenko V, Bendel P, Lira SA, Jung S, Schwartz M. 2013. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 38(3):555-69.
- Shiau CE, Kaufman Z, Meireles AM, Talbot WS. 2015. Differential requirement for irf8 in formation of embryonic and adult macrophages in zebrafish. *PLoS One* 10(1):e011
- Sica A, Mantovani A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122(3):787-95.
- Spilsbury K, O'Mara MA, Wu WM, Rowe PB, Symonds G, Takayama Y. 1995. Isolation of a novel macrophage-specific gene by differential cDNA analysis. *Blood* 85(6):1620-9.
- Stainier DY, Weinstein BM, Detrich HW 3rd, Zon LI, Fishman MC. 1995. Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 121(10):3141-50.
- Sullivan C, Kim CH. 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol* 25(4):341-50.

- Tauber AI. 2003. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(11):897-901.
- Tauzin S, Starnes TW, Becker FB, Lam PY, Huttenlocher A. 2014. Redox and Src family kinase signaling control leukocyte wound attraction and neutrophil reverse migration. *J Cell Biol* 207(5):589-98.
- 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* 7(7):785-97.
- Torraca V, Mostowy S. 2018. Zebrafish Infection: From Pathogenesis to Cell Biology. *Trends Cell Biol* 28(2):143-56.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 20(4):367-79.
- van de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, Hoffmann E, Beyaert R, Saeys Y, Lambrecht BN, Guillems M. 2016. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44(4):755-68.
- van Furth R. 1982. Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* 161(3-4):178-85.
- van Rooijen N, Hendrikx E. 2010. Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol Biol* 605:189-203.
- Walker SL, Ariga J, Mathias JR, Coothankandaswamy V, Xie X, Distel M, Köster RW, Parsons MJ, Bhalla KN, Saxena MT, Mumm JS. 2012. Automated reporter quantification in vivo: high-throughput screening method for reporter-based assays in zebrafish. *PLoS One* 7(1):e29916.
- Walton EM, Cronan MR, Beerman RW, Tobin DM. 2015. The Macrophage-Specific Promoter *mfap4* Allows Live, Long-Term Analysis of Macrophage Behavior during Mycobacterial Infection in Zebrafish. *PLoS One* 10(10):e0138949.
- Weeks BA, Keisler AS, Myrvik QN, Warinner JE. Differential uptake of neutral red by macrophages from three species of estuarine fish. *Dev Comp Immunol* 11(1):117-24.
- Westerfield M. The Zebrafish Book: a guide for the laboratory use of Zebrafish, 4th edition. Edn. University of Oregon press, Eugene, USA: 2000.
- White DT, Mumm JS. 2013. The nitroreductase system of inducible targeted ablation facilitates cell-specific regenerative studies in zebrafish. *Methods* 62(3):232-40.
- White DT, Sengupta S, Saxena MT, Xu Q, Hanes J, Ding D, Ji H, Mumm JS. 2017. Immunomodulation-accelerated neuronal regeneration following selective rod photoreceptor cell ablation in the zebrafish retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(18):E3719-28.
- Wittamer V, Bertrand JY, Gutschow PW, Traver D. 2011. Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood* 117(26):7126-35.
- Wittmann C, Chockley P, Singh SK, Pase L, Lieschke GJ, Grabher C. 2012. Hydrogen peroxide in inflammation: messenger, guide, and assassin. *Adv Hematol* 2012:541471.

- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496(7446):445-55.
- Wynn TA, Vanella KM. 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44(3):450-62.
- Xu J, Zhu L, He S, Wu Y, Jin W, Yu T, Qu JY, Wen Z. 2015. Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Dev Cell* 34(6):632-41.
- Yoo SK, Deng Q, Cavnar PJ, Wu YI, Hahn KM, Huttenlocher A. 2010. Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish. *Dev Cell* 18(2):226-36.
- Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. 2011. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* 480(7375):109-12.
- Yu T, Guo W, Tian Y, Xu J, Chen J, Li L, Wen Z. 2017. Distinct regulatory networks control the development of macrophages of different origins in zebrafish. *Blood* 129(4):509-19.
- Zakrzewska A, Cui C, Stockhammer OW, Benard EL, Spaink HP, Meijer AH. 2010. Macrophage-specific gene functions in Spi1-directed innate immunity. *Blood* 116(3):e1-11.
- Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J. 2017. 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. *Cell Physiol Biochem* 43(6):2155-2169.