



Pedro Emanuel Serra Seco

Licenciado em Ciências Biomédicas

Regulação do Desenvolvimento da Microglia pelo Gene *DIA1R*: Uma Pista para a Etiologia do Autismo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Ana Teresa Tavares, Investigadora,
Centro de Estudos de Doenças Crónicas, NOVA Medical
School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA
de Lisboa

Coorientador: Prof. Doutora Ana Catarina Certal, Professora Auxiliar
Convidada, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa/Investigadora-Coordenadora,
Fundação Champalimaud

Júri

Presidente: Prof. Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro
Caldas Braga

Arguente: Doutora Ana Catarina Esteves Ribeiro

Vogal: Doutora Ana Teresa Tavares

Junho, 2021



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Pedro Emanuel Serra Seco

Licenciado em Ciências Biomédicas

Regulação do Desenvolvimento da Microglia pelo Gene *DIA1R*: Uma Pista para a Etiologia do Autismo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Ana Teresa Tavares, Investigadora,
Centro de Estudos de Doenças Crónicas, NOVA Medical
School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA
de Lisboa

Coorientador: Prof. Doutora Ana Catarina Certal, Professora Auxiliar
Convidada, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa/Investigadora-Coordenadora,
Fundação Champalimaud

Junho, 2021

Regulação do Desenvolvimento da Microglia pelo Gene *DIA1R*:

Uma Pista para a Etiologia do Autismo

Copyright © Pedro Emanuel Serra Seco, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Desde o início, muitos acompanharam-me e contribuíram de alguma forma para a realização e concretização deste trabalho. E como não poderia deixar de ser, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

O meu primeiro e maior agradecimento destina-se à minha orientadora, Ana Teresa Tavares, por me ter dado a oportunidade de trabalhar neste projeto, o que me proporcionou uma experiência incrível e me permitiu aprender imenso. Por me ter transmitido a sua perspetiva na investigação e partilhado comigo as suas estratégias de trabalho. Pela grande disponibilidade para me tirar qualquer dúvida, fazer todas correções nas inúmeras versões e explicar-me o mais ínfimo detalhe, com por exemplo a explicação do nome japonês Kaede para a proteína fotoconversora. Com ela aprendi muito, desde abrir uma “janelinha” num ovo de galinha até como se faz uma crítica em ciência de forma construtiva. Pelo extraordinário ensinamento que vou guardar sempre na minha memória “Quando não se critica e nos dizem que está tudo bom, é porque ou estão a ser simpáticos ou não leram o que escrevemos. Pois há sempre alguma coisa que podemos melhorar”. Pela incrível paciência e dedicação que demonstrou nas muitas e longas reuniões/conversas, que foram decisivas para o meu crescimento e para alcançar os objetivos que traçamos. Um agradecimento muito especial por todos os bons momentos, pelas inúmeras gargalhadas e por vibrar comigo quando alcançamos as nossas vitórias. E mesmo nos momentos mais difíceis, por sempre poder contar com o seu apoio e carinho. Por sempre me apoiar e estimular, para que pudesse dar o meu melhor. Por me ter transformado numa pessoa mais atenta ao que a rodeia, detalhada e focada. Para mim é uma extraordinária fonte de inspiração e com quem ainda espero continuar a aprender. Concluindo, nesta etapa tão desafiante e importante na minha vida, muito obrigado pela excelente orientação!

Gostaria também de agradecer à minha co-orientadora, Professora Ana Catarina Certal, pois foi nas suas aulas que descobri o fantástico modelo que é o peixe-zebra, despertando em mim um fascínio imediato. Agradecer também pela atenção e apoio demonstrados logo desde início e por todo o *feedback* valioso que me ofereceu.

Em especial, quero agradecer ao Dr. António Jacinto por me ter acolhido no seu grupo de investigação, pela motivação e boa disposição, com que sempre me presenteou. Por ter sido incansável comigo e pela extraordinária rapidez com que me ajudou no momento em que mais precisava. No “*timing* certo” marcou a minha vida de forma positiva fazendo toda a diferença. Um grande obrigado por tudo!

Quero deixar um agradecimento bastante especial à Carolina Crespo, por todo o apoio e motivação demonstrados desde as minhas primeiras experiências. Pelos deliciosos elogios ao meu trabalho, ao *template* e *slides* das minhas apresentações. Por toda atenção, paciência e dedicação em ensinar-me o procedimento prático da microscopia confocal e em transmitir-me o seu conhecimento, constituindo um suporte fundamental para a obtenção de imagens com esta técnica. Mas quero agradecer igualmente por toda a força, amizade, bons conselhos, simpatia e carinho que me deu, que foram essenciais e indispensáveis para conseguir ultrapassar os momentos mais difíceis e ajudar-me a reencontrar o caminho a seguir. Muito obrigado por tudo!

Um grande agradecimento à Raquel Lourenço, por todos os procedimentos com os *kits*, estratégias, ensinamentos e todas as horas dispensadas para me ensinar as técnicas de Biologia Molecular e hibridação *in situ*. De facto, foi extraordinária, deixando de fazer o seu trabalho para me acompanhar e supervisionar na minha primeira tentativa sozinho. A dedicação disponibilizada foi bastante importante para me ajudar a alcançar sucesso imediato nestas técnicas. Não podia deixar de recordar que saber escolher os embriões de peixe-zebra dos óvulos não fecundados, foi a primeira lição que me deu.

Quero deixar um agradecimento muito especial à Rute Salvador, por me ter recebido de braços abertos e pelo espacinho que me ofereceu na sua secretária para me poder sentar, abrindo assim caminho para grandes conversas, bons momentos, ótimos conselhos. Por todo o apoio, simpatia e amizade que me deu sempre que precisei, que foram muito importantes tanto na bancada como fora dela.

Um enorme agradecimento às maravilhosas pessoas Ana Teresa Matias, Ana Sofia Brandão, Bruna Correia, Diana Saraiva, Jorge Borbinha, Guadalupe Cabral, Lara Carvalho, Nídia Sousa, Nuno Valério, Patrícia Rodrigues, Rita Gorgulho e Susana Ponte, que sempre fizeram do *Tissue Repair and Inflammation Lab* um grupo muito unido, com um grande espírito de entreajuda, boa disposição e muito divertido. O meu mais sincero obrigado por me terem acolhido tão bem desde o primeiro momento e por me fazerem sentir integrado nesta fantástica equipa. Agradeço individualmente e sem exceção a

ajuda fantástica que cada um me deu para alcançar cada um dos passos que conduziram o sucesso deste projeto.

Deixo também um agradecimento à Petra Pintado e ao Fábio Valério pelo acompanhamento extraordinário e conhecimento transmitido durante todas as experiências e cruzamentos com os nossos peixes-zebra. Em especial pelos ensinamentos fundamentais na microinjeção dos morfolinos. Agradecer também à Cláudia Andrade pela disponibilidade e auxílio na citometria de fluxo. Ao Telmo Pereira, quero agradecer pela disponibilidade e suporte fornecidos durante todas as induções, treinos e assistências na microscopia e nos *softwares* de análise de imagens.

Quero deixar também um agradecimento à Illyane Lima pelo material, pela ajuda, simpatia e boa disposição que me forneceu, contribuindo também para o sucesso da citometria de fluxo.

Ao longo deste projeto, figuraram muitos momentos altos e alguns baixos e em todos eles ao meu lado contei com afeto e ternura dos meus amigos e da minha família. Assim, é com especial carinho que passo a agradecer a todos eles.

Começando por agradecer aos dois pilares da minha vida que nunca me deixaram cair ou ficar sozinho. À minha grande amiga Francisca Marques, pela genuína amizade, por todos os fantásticos sítios que visitamos, por me ouvir sempre que precisei e me dar o seu ombro amigo. Por todo o tempo que dispensou para me ajudar e por todo *feedback* bastante positivo. Sempre que precisei com ela pude contar para me acalmar, desanuviar, rir e ver a vida sempre com uma perspetiva positiva. Por sempre me incentivar e me dar força para continuar. Pelas fantásticas férias e tardes bem passadas, mesmo tendo de percorrer centenas de quilómetros para estar comigo um bom bocadinho. Pois como me ensinou “Quando duas pessoas querem estar juntas não há desculpas para não acontecer!”. Por guardar parte da minha memória e nas situações mais complicadas relembrar-me de quem sou. Este projeto fica marcado por um período conturbado na minha vida, que só foi possível ultrapassar com o seu companheirismo e carinho. Do fundo do coração, muito obrigado mesmo! À minha mana do coração Joana Pires, por sempre me acompanhar ao longo desta caminhada e por tudo o que tem feito por mim. Pela célebre mensagem de aniversário em cada ano e pela incansável presença na minha festa. Pelos divertidos momentos que passamos, as tontices nas videochamadas, os cafezinhos e os docinhos que juntos partilhamos. Pela preocupação incondicional com o meu bem-estar, por expor a sua opinião sincera, apoiando-me em todas as situações e dando-me também todos os raspanetes e dizendo-me as verdades, mesmo quando não as quero ouvir. Como diz sempre “Um verdadeiro amigo não é aquele que só te dá palmadinhas nas costas, também é o que diz o que precisas de ouvir”. Por nunca me deixar ir abaixo e em conjunto tentar encontrar uma solução para qualquer problema que surja. Na fase mais difícil, sempre contei com uma chamadinha diária para combater a solidão e uma palavra amiga para afastar a tristeza. Por festejar e saltar comigo nas minhas conquistas e pelos serões bem passados. Nos últimos, mesmo estando nós a uma longa distância e com a pandemia pelo meio, cada vez estávamos mais próximos um do outro do que nunca. Para mim é como uma irmã e sempre será. Muito obrigado pela ajuda nesta etapa alcançada, cada vez estamos mais próximos de chegar onde queremos!

Aos meus amigos Nathalia Kimus e Danilo Mendes, por todos os bons momentos, almoçadas, passeios, doçarias e estadias que me proporcionaram ao longo deste período. Por me ajudarem no momento mais difícil e que com um pequeno (para mim grande) gesto fizeram toda a diferença para a concretização deste projeto.

Quero também agradecer à Dona Lucinda Augusto, uma pessoa muito especial para mim a quem devo muito e que mesmo longe estará sempre no meu coração. Por ter visto as minhas qualidades mesmo antes de eu saber que as tinha. Por me ter transmitido a sua perspetiva de vida e por todos os ensinamentos que ainda hoje me conduzem à felicidade. Muito obrigado por ter pegado em mim e transformar-me na pessoa que sou hoje!

Por fim, mas não menos importante, gostaria também de agradecer à minha família por todo o carinho, dedicação, esforço que têm feito por mim desde sempre e que permitiram chegar aqui.

Resumo

As células da microglia são células imunes residentes do sistema nervoso central que desempenham funções essenciais no desenvolvimento e na homeostasia deste sistema. Nos últimos anos, um número crescente de estudos sugere que a microglia tem um papel fundamental na patogênese de distúrbios do desenvolvimento neurológico, tais como as Perturbações do Espectro do Autismo (PEA), tendo sido proposto que mutações em genes que alterem o número da microglia podem afetar profundamente o neurodesenvolvimento. Neste sentido, a microglia surge como um potencial alvo para o tratamento destes distúrbios. Contudo, os reguladores moleculares subjacentes ao desenvolvimento da microglia e à aquisição de suas propriedades funcionais são ainda pouco conhecidos. No passado, a nossa equipa identificou o gene *DIA1R* (*Deleted in Autism 1 Related*) como um novo gene implicado em PEA que se encontra altamente expresso nos progenitores hematopoiéticos das células da microglia em embriões de vertebrados. Neste projeto fomos investigar o papel do gene *dia1r* no desenvolvimento da microglia do peixe-zebra. Para tal, quantificamos o número de células da microglia presentes no cérebro de larvas de peixe-zebra morfantes e mutantes para *dia1r* utilizando técnicas de citometria de fluxo, coloração com *Neutral Red* e microscopia confocal. Os nossos resultados demonstraram que o número de microglia é significativamente inferior em larvas morfantes e mutantes para *dia1r* em relação aos respetivos controlos, sugerindo que *DIA1R* promove o desenvolvimento da microglia. Estas evidências apresentam o *DIA1R* como um novo regulador da ontogenia da microglia, papel que pode estar subjacente à sua implicação em PEA. Para além disso, esta investigação contribui para esclarecer o papel etiológico da disfunção da microglia nos distúrbios do desenvolvimento neurológico, trazendo novas perspetivas de diagnóstico e potencial tratamento de subtipos de PEA mediados pela microglia.

Palavras-chave: Desenvolvimento Embrionário; Peixe-Zebra; Hematopoiese; Microglia; *DIA1R*; Autismo

Abstract

Microglia are resident immune cells of the central nervous system that play essential roles in the development and homeostasis of this system. In recent years, a growing body of evidence implicates microglia in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders such as Autism Spectrum Disorders (ASD). It has been proposed that gene mutations that alter the number of microglia can profoundly affect neurodevelopment. Therefore, microglia has arisen as a novel potential target for the treatment of these disorders. However, little is known about the molecular regulators underlying the development of microglial cells and their acquisition of functional properties. In the past, our team identified *DIA1R* (*Deleted in Autism 1 Related*) as a novel gene implicated in ASD that is highly expressed in the hematopoietic progenitors of microglial cells in the vertebrate embryo. In this project, we investigated the role of *dia1r* in zebrafish microglia development. For this, we quantified the number of microglial cells present in the brain of *dia1r* morphant and mutant zebrafish larvae using flow cytometry, Neutral Red staining and confocal microscopy. Our results demonstrated that the number of microglia in the brains of *dia1r* morphant and mutant larvae is significantly lower in comparison to their respective controls, suggesting that DIA1R promotes microglia development. These evidences introduce DIA1R as a novel regulator of microglia ontogeny, a role that may underlie its implication in ASD. In addition, this investigation contributes to clarify the etiological role of microglia dysfunction in neurodevelopmental disorders, bringing new perspectives for the diagnosis and potential treatment of microglia-mediated subtypes of ASD.

Keywords: Embryonic Development; Zebrafish; Hematopoiesis; Microglia; DIA1R; Autism

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	viii
Abstract	x
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xvi
Abreviaturas	xviii
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. A microglia no desenvolvimento do SNC	1
1.1.1. Fagocitose neuronal.....	2
1.1.2. Indução da apoptose neuronal	3
1.1.3. Regulação da neurogênese	3
1.1.4. Regulação da mielinização	3
1.1.5. Poda sináptica.....	4
1.1.6. Regulação da atividade neuronal	4
1.2. Contribuição da microglia para os distúrbios do neurodesenvolvimento	4
1.3. Desenvolvimento da microglia: da hematopoiese à formação do cérebro.....	6
1.4. O gene <i>deleted in autismo 1 related (DIA1R)</i>	10
1.5. Hipótese e Objetivos.....	14
Capítulo 2. Materiais e Métodos	15
2.1. Animais: peixes-zebra	15
2.1.1. Peixes-zebra morfantes <i>dia1r</i>	15
2.1.2. Peixes-zebra mutantes <i>dia1r</i>	16
2.1.3. Genotipagem de mutantes <i>dia1r</i> por <i>High-Resolution Melting</i>	17
2.2. Extração de RNA e RT-qPCR	18
2.3. Quantificação da microglia	19
2.3.1. Citometria de fluxo	19
2.3.2. Coloração com <i>Neutral Red</i> e quantificação com SpotNGlia	21
2.3.3. Análise <i>in vivo</i> da microglia por microscopia confocal.....	22
2.4. Desenho experimental e análise estatística	23
Capítulo 3. Resultados	25
3.1. Geração de peixes-zebra <i>knockdown</i> e <i>knockout</i> para o gene <i>dia1r</i>	25
3.2. Função do gene <i>dia1r</i> nos precursores da microglia	28
3.3. Quantificação da microglia em morfantes e mutantes para o gene <i>dia1r</i>	30
3.3.1. Quantificação de macrófagos e microglia em morfantes para <i>dia1r</i> por citometria de fluxo	30
3.3.2. Quantificação da microglia de morfantes e mutantes para <i>dia1r</i> corada com <i>Neutral Red</i>	32
3.3.3. Análise <i>in vivo</i> da microglia de morfantes para <i>dia1r</i> por microscopia confocal	34

Capítulo 4. Discussão	37
4.1. Peixes-zebra <i>knockdown</i> e <i>knockout</i> para o gene <i>dia1r</i> apresentam fenótipos semelhantes.....	37
4.2. O gene <i>dia1r</i> parece restringir o número de progenitores hematopoiéticos e promover a diferenciação da linhagem mieloide	38
4.3. O gene <i>dia1r</i> parece promover o desenvolvimento da microglia	40
4.4. Modelo hipotético do papel do gene <i>dia1r</i> na ontogenia da microglia com possível impacto neuronal e comportamental	42
4.5. Perspetivas futuras e considerações finais	45
Capítulo 5. Conclusão	47
Bibliografia	49
Anexo. Artigo Científico.....	57

Índice de Figuras

Figura 1.1. Funções da microglia durante o neurodesenvolvimento	2
Figura 1.2. Origem embrionária do sistema hematopoiético e ontogenia da microglia no peixe-zebra	7
Figura 1.3. Genética do <i>DIA1R</i> humano associada às PEA e estrutura da proteína DIA1R	11
Figura 1.4. Expressão de DIA1R em embriões de peixe-zebra, galinha e ratinho	13
Figura 2.1. Estratégia de <i>gating</i> utilizada na quantificação de macrófagos e microglia por citometria de fluxo	20
Figura 2.2. O <i>software</i> SpotNGlia identifica e quantifica o número de células da microglia no teto óptico de forma semiautomática	21
Figura 2.3. O <i>software</i> Imaris identifica e quantifica a microglia em imagens de microscopia confocal	22
Figura 3.1. Estratégia de <i>knockdown</i> do gene <i>dia1r</i> em peixe-zebra	26
Figura 3.2. Geração de peixe-zebra mutantes <i>dia1r</i> pelo sistema de edição genética CRISPR-Cas9	27
Figura 3.3. Efeito do <i>knockdown</i> do gene <i>dia1r</i> no desenvolvimento hematopoiético do peixe-zebra	29
Figura 3.4. Quantificação do número de macrófagos e microglia por citometria de fluxo em peixes-zebra morfantes <i>dia1r</i>	31
Figura 3.5. Efeito da perda de função do gene <i>dia1r</i> no número de células da microglia em larvas de peixe-zebra quantificado por coloração <i>Neutral Red</i> e SpotNGlia	33
Figura 3.6. Efeito do <i>knockdown</i> do gene <i>dia1r</i> no número de células da microglia em larvas de peixe-zebra quantificado por análise de imagens de microscopia confocal	35
Figura 4.1. Modelo hipotético do papel de Dia1r na ontogenia da microglia e potencial impacto no desenvolvimento neuronal e no comportamento	44

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Morfolinos utilizados para o <i>knockdown</i> do gene <i>dia1r</i> em peixe-zebra	15
Tabela 2.2. Sequências de todos os <i>primers</i> utilizados.....	17
Tabela 2.3. Condições da técnica de <i>High Resolution Melting</i>	18
Tabela 2.4. Condições do RT-qPCR.....	19

Abreviaturas

AA	Aminoácido(s)
AB	Linha de peixes-zebra AB
AGM	<i>Aorta-Gonad-Mesonephros</i> (aorta-gónada-mesonefros)
ALM	<i>Anterior Lateral Mesoderm</i> (mesoderme lateral anterior)
<i>apoe</i>	<i>Apolipoprotein E</i>
ASD	<i>Autism Spectrum Disorders</i>
AUG	Adenina-Uracilo-Guanina (codão de iniciação)
CD11b	<i>Integrin αM</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (DNA complementar)
<i>cebp1</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein 1</i>
CEDOC	Centro de Estudos de Doenças Crónicas
CHT	<i>Caudal Hematopoietic Tissue</i> (tecido hematopoiético caudal)
CoMO	<i>Control Morpholino</i> (morfolino controlo)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Csf1a	<i>Colony stimulating factor 1a</i>
Csf1b	<i>Colony stimulating factor 1b</i>
<i>csf1ra</i>	<i>colony stimulating factor 1 receptor, a</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i> (limiar de ciclo)
CUX1	<i>Cut Like Homeobox 1</i>
CX3CL1	<i>C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1</i> ou Fractalcina
CX3CR1	<i>C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1</i>
Cxcl8	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>
Cxcr1	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 1</i>
<i>cxc3.2</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 3, tandem duplicate 2</i>
<i>cXorf36</i>	<i>Chromosome X open reading frame 36</i>
DA	<i>Dorsal Aorta</i> (Aorta Dorsal)
del5	deleção de 5 nucleótidos
del13	deleção de 13 nucleótidos
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DIA1	<i>Deleted in Autism-1</i>
DIA1R	<i>Deleted in Autism 1 Related</i>
DILX	Deficiência Intelectual Ligada ao X
DIPK2A	<i>Divergent Protein Kinase Domain 2A</i>
DIPK2B	<i>Divergent Protein Kinase Domain 2B</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dpf	dias após a fertilização
E3	Meio embrionário para peixe-zebra
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético)
EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
<i>eef1a1l1</i>	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EH	Endotélio Hemogénico
EMPs	<i>Erythro-myeloid Progenitors</i> (progenitores eritromieloides)
<i>epor</i>	<i>erythropoietin receptor</i>
F	<i>Forward primer</i>

F0	Fundadores 0
F1	Fundadores 1
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (soro bovino fetal)
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i> (Federação das Associações Europeias de Animais de Laboratório)
<i>fli1</i>	<i>Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter Area</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter Height</i>
FVS450	<i>Fixable Viability Stain 450</i>
GABA	Gamma aminobutyric acid (ácido gama-aminobutírico)
<i>gata1a</i>	<i>GATA binding protein 1a</i>
<i>gata2a</i>	<i>GATA binding protein 2a</i>
GCR	<i>Genetic Compensation Response</i>
gDNA	DNA genómico
gRNA	RNA guia
h	hora(s)
H3	Histona 3
Hb	<i>enhancer</i> de hemangioblastos
<i>hbae1.1</i>	<i>hemoglobin, alpha embryonic 1.1</i>
<i>hbae3</i>	<i>hemoglobin alpha embryonic-3</i>
<i>hbae5</i>	<i>hemoglobin, alpha embryonic 5</i>
<i>hbbe1.1</i>	<i>hemoglobin beta embryonic-1.1</i>
<i>hbbe1.2</i>	<i>hemoglobin beta embryonic-1.2</i>
<i>hbbe1.3</i>	<i>hemoglobin, beta embryonic 1.3</i>
<i>hbbe2</i>	<i>hemoglobin beta embryonic-2</i>
<i>hbbe3</i>	<i>hemoglobin beta embryonic-3</i>
HH	fases do desenvolvimento dos embriões de galinha descritas por Hamburger e Hamilton (1955)
hpf	horas após a fertilização
HRM	<i>High-Resolution Melting</i> (desnaturação de alta resolução)
HSPCs	<i>Hematopoietic Stem/Progenitor Cells</i> (células estaminais/progenitoras hematopoéticas)
ICM	<i>Intermediate Cell Mass</i> (massa celular intermédia)
IDH1-R132H	Gene humano da isocitrato desidrogenase 1
IGF1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)
IL-34	Interleucina 34
IL-6	Interleucina 6
<i>itga2b</i>	<i>integrin alpha 2b</i> (ou <i>cd41</i>)
<i>kdrl</i>	<i>kinase insert domain receptor like</i>
<i>lcp1</i>	<i>lymphocyte cytosolic protein 1</i>
LLC	<i>Limited Liability Company</i>
<i>lmo2</i>	<i>LIM domain only 2</i>
LOXP	<i>Locus of x-over, P1</i>
<i>lyz</i>	<i>lysozyme C</i>
<i>mfap4.1</i>	<i>microfibril associated protein 4, tandem duplicate 1</i>
min	minuto(s)
mM	milimolar
MO	Morfolino experimental
<i>mpeg1.1</i>	<i>Macrophage expressed 1, tandem duplicate 1</i>
<i>mpx</i>	<i>myeloid-specific peroxidase</i>

mRNA	RNA mensageiro
MS-222	Tricaína
<i>myb</i>	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i>
N	Número de replicados biológicos
NA	<i>Numeric aperture</i> (abertura numérica)
ng	nanograma
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (fator de crescimento neural)
nl	nanolitros
NR	Neutral Red
ns	não significativo
nt	nucleótidos
N-terminal	Extremidade amino-terminal
P	<i>p-value</i>
<i>p2ry12</i>	<i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12</i>
pb	pares de bases
PBI	<i>Posterior Blood Island</i> (ilhotas sanguíneas posteriores)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEA	Perturbações do Espectro do Autismo
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (tomografia por emissão de positrões)
PLM	<i>Posterior Lateral Mesoderm</i> (mesoderme lateral posterior)
pmol	picomoles
<i>ptpn6</i>	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6</i>
PTU	1-fenil 2-tioureia
R	<i>Reverse primer</i>
RBI	<i>Rostral Blood Island</i> (ilhotas sanguíneas rostrais)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
rpm	rotações por minuto
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction</i>
<i>runx1</i>	<i>RUNX family transcription factor 1</i>
s	segundo(s)
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i> (erro padrão da média)
SFARI	<i>Simons Foundation Autism Research Initiative</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	<i>Signal peptide</i> (peptídeo sinal)
<i>spi1b</i>	<i>Spi-1 proto-oncogene b</i>
SSC-A	<i>Side Scatter Area</i>
STOP	Codão de terminação
<i>tal1</i>	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TIDE	<i>Tracking of Indels by DEcomposition</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> (fator de necrose tumoral alfa)
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
TU	Linha de peixes-zebra Tuebingen
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling</i>
TYROBP	<i>TYRO protein tyrosine kinase-binding protein</i> (ou DAP12)
VDA	<i>Ventral wall of Dorsal Aorta</i> (parede ventral da aorta dorsal)

WISH	<i>Whole-mount in situ hybridization</i> (hibridação <i>in situ</i> de organismos inteiros)
WT	<i>Wild Type</i> (tipo selvagem)
Xp11.3	Braço curto do cromossoma X, região 1, banda 1 e sub-banda 3
ZFIN	<i>Zebrafish Information Network</i>
ZFN	<i>Zinc Finger Nucleases</i>
µm	micrómetros
µM	micromolar
µl	microlitros
3D	Tridimensional
UTR	<i>untranslated region</i> (região não codificante)
-/-	Genótipo homozigótico para a mutação
+/-	Genótipo heterozigótico para a mutação
+/+	Genótipo <i>wild-type</i> (ou selvagem)

Capítulo 1. Introdução

As células da microglia são células imunes extraordinariamente versáteis presentes no sistema nervoso central (SNC). No cérebro de um adulto, a microglia representa 5 a 15% das células e a sua densidade varia entre as diferentes regiões cerebrais (revisto por Morgane Thion e colaboradores¹). Como sensor ativo e fagócito profissional, a microglia vigia constantemente o ambiente neuronal, estendendo e retraíndo dinamicamente os seus prolongamentos^{2,3}. Neste sentido, estas células são altamente sensíveis a qualquer perturbação do SNC, incluindo a agentes patogénicos, sinais de perigo e até mesmo neurotransmissores (revisto por Uwe-Karsten Hanisch e Helmut Kettenmann⁴). A microglia desempenha um papel importante na interface entre os sistemas nervoso e imunológico, tendo funções características do sistema imune inato no cérebro do organismo adulto (revisto por Geoffrey Norris e Jonathan Kipnis⁵).

As células da microglia desenvolvem-se em estreita proximidade com os neurónios e com as outras células da glia, e têm um papel fundamental no desenvolvimento e homeostasia do SNC (revisto por Qingyun Li e Ben Barres⁶). Nos últimos anos, têm surgido cada vez mais evidências que implicam a microglia na patogénese de distúrbios do neurodesenvolvimento, tais como as Perturbações do Espectro do Autismo (PEA; revisto recentemente⁷⁻⁹). Neste sentido, a microglia surge como um novo alvo bastante promissor para o tratamento destas doenças, sendo que uma melhor compreensão da regulação molecular do desenvolvimento da microglia fornecerá um contributo fundamental para alcançar este objetivo. No entanto, os genes e mecanismos específicos subjacentes ao desenvolvimento da microglia e à aquisição de suas propriedades funcionais são ainda pouco conhecidos.

1.1. A microglia no desenvolvimento do SNC

A colonização do SNC pela microglia é evolutivamente conservada entre os vertebrados e ocorre antes da diferenciação das outras células da glia derivadas da neuroectoderme, os astrócitos e os oligodendrócitos (revisto por TuanTay e colaboradores¹⁰). Nas fases iniciais do neurodesenvolvimento, os progenitores neuronais em elevada proliferação dão origem aos primeiros neurónios, e apenas em fases embrionárias subsequentes vão originar astrócitos e oligodendrócitos. Consequentemente, a microglia constitui a principal população de células da glia durante o início do desenvolvimento do SNC (revisto por Morgane Thion e colaboradores¹).

Ao longo dos últimos anos, a microglia tem despertado o interesse de muitos investigadores pelas suas funções fulcrais no desenvolvimento do SNC. As células da microglia regulam a neurogénese, a apoptose neuronal e a mielinização dos neurónios, realizam a fagocitose de células mortas e executam a poda sináptica e a remodelação de circuitos neuronais (**Figura 1.1**; revisto em vários trabalhos^{6,7,10-12}). No sentido de melhor compreendermos a importância da microglia no neurodesenvolvimento, iremos resumir nos próximos subcapítulos o conhecimento atual sobre as funções mais importantes das células da microglia.

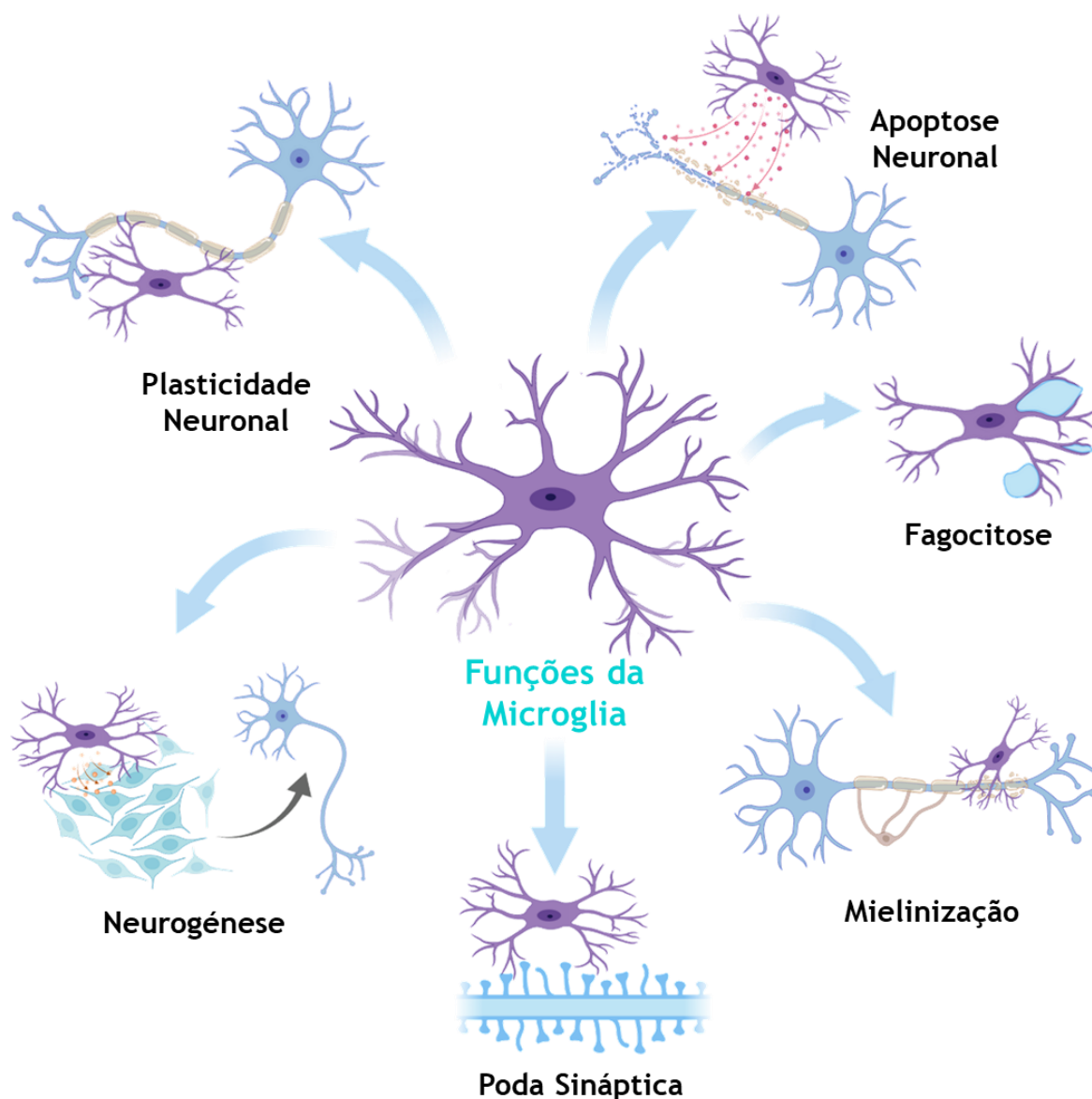


Figura 1.1. Funções da microglia durante o neurodesenvolvimento.

A microglia (roxo) é essencial para o normal desenvolvimento do cérebro. Uma das suas funções é regular a apoptose dos neurónios (azul), realizada através de uma variedade de fatores secretados - por exemplo, fator de crescimento do nervo, espécies reativas de oxigênio (ROS) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) - e de fatores membranares - por exemplo, CD11b e DAP12. Por outro lado, ao realizar a fagocitose, a microglia assume um papel central na remoção de neurónios e células da neuroglia em apoptose. As células da microglia podem também controlar a mielinização, ao removerem as bainhas de mielina em excesso por fagocitose. Na sinaptogênese, os circuitos neuronais passam por um processo de poda sináptica mediado pela microglia, por exemplo pela ativação da via do complemento e da via de sinalização CX3CR1-CX3CL1. Além disso, a microglia pode controlar a proliferação e diferenciação das células progenitoras neuronais, regulando a neurogênese e a plasticidade neuronal. Por último, a microglia interage bi-direcionalmente com os neurónios, mantendo contato próximo com os corpos celulares através dos seus prolongamentos celulares. Adaptado de Michael Salter e Beth Stevens⁷, Elizabeth Wright-Jin e David Gutmann¹¹.

1.1.1. Fagocitose neuronal

O neurodesenvolvimento é caracterizado por uma extensa apoptose neuronal resultante do excesso de neurónios formados. Na verdade, a morte celular programada no SNC é um processo chave no estabelecimento da cito-arquitetura do cérebro¹³⁻¹⁶. As células da microglia assumem um papel central na remoção dos neurónios apoptóticos. As células apoptóticas libertam sinais “come-me” que

permitem à microglia reconhecer e remover seletivamente estas células do tecido por fagocitose¹⁷⁻¹⁹. Observações pioneiras *in vivo* do cérebro embrionário do peixe-zebra demonstraram que a microglia estende os seus prolongamentos em direção aos neurónios apoptóticos e envolve-os antes de os fagocitar^{20,21}. Um aspeto bastante interessante é a capacidade que a microglia apresenta de reconhecer células apoptóticas rodeadas por muitos neurónios viáveis. De facto, os neurónios apoptóticos libertam a quimiocina fractalcina (CX3CL1) para o meio extracelular que atua como um sinal de "encontra-me". Por sua vez, ao expressarem o recetor da fractalcina (CX3CR1 ou *C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1*) as células da microglia são capazes de reconhecer o sinal "encontra-me" e migrar em direção aos neurónios apoptóticos²².

1.1.2. Indução da apoptose neuronal

Para além da remoção dos neurónios apoptóticos, a microglia pode também induzir a apoptose neuronal sem provocar inflamação. Durante o desenvolvimento cerebelar do ratinho, a microglia promove ativamente a morte das células de Purkinje através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS)²³. Estes processos ocorrem também no hipocampo, onde a produção de ROS depende da expressão da integrina CD11b e da proteína de ativação DAP12 (também conhecida como TYROBP)²⁴. Para além disto, foi demonstrado que as células da microglia libertam o fator de crescimento neural (NGF)²³ e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α)²⁵ para induzir apoptose neuronal.

1.1.3. Regulação da neurogénese

Foi proposto que as células da microglia podem detetar sinais do ambiente circundante e ter efeitos regulatórios na neurogénese, de forma temporal e espacialmente restrita (revisto por Kaoru Sato²⁶). A génese e a manutenção das células neurais são promovidas pela microglia através da síntese e libertação do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1)^{27,28} e de uma variedade de citocinas²⁹. A microglia estimula também a formação de espinhas dendríticas e de sinapses^{30,31}. Por outro lado, a microglia pode restringir o número de células progenitoras neuronais através da indução da apoptose destes progenitores seguida por fagocitose (revisto por Dorothy Schafer e Beth Stevens³²). Estas funções aparentemente opostas da microglia (promover a sobrevivência/proliferação ou a morte dos progenitores neuronais) ocorrem em simultâneo durante o desenvolvimento do cérebro. Embora não exista ainda uma explicação para estas observações, pensa-se que diferentes subtipos de células da microglia podem desempenhar essas diferentes funções durante o neurodesenvolvimento (revisto recentemente^{12,32}).

1.1.4. Regulação da mielinização

Durante o desenvolvimento, os oligodendrócitos entram em contato com os axónios neuronais e envolvem-nos com as suas bainhas de mielina. Similarmente aos neurónios e sinapses, o excesso de bainhas de mielina produzido é eliminado seletivamente³³. Em 2020, Alexandria Hughes e Bruce Appel analisaram *in vivo* as interações entre a microglia, a mielina e os neurónios em larvas de peixe-zebra³⁴. Os autores descobriram que a microglia encontra-se intimamente associada aos oligodendrócitos e

fagocita especificamente as bainhas de mielina em excesso, deixando os corpos celulares intactos. Este trabalho revelou ainda que a atividade neuronal tem um papel regulatório sobre a fagocitose da mielina pela microglia. Estas evidências levantam a possibilidade de que as interações entre a microglia, os neurónios e os oligodendrócitos contribuem para o desenvolvimento da função cerebral³⁴.

1.1.5. Poda sináptica

Das diversas funções que a microglia desempenha no neurodesenvolvimento, a mais intrigante é sem dúvida a poda sináptica. Este processo é definido como a eliminação de estruturas sinápticas (axónios e espinhas dendríticas) por fagocitose, para garantir a correta conectividade estrutural do cérebro^{1,35–37}. A análise de imagens *in vivo* e de microscopia eletrónica revelou a presença de estruturas pré- e pós-sinápticas dentro dos lisossomas das células da microglia presentes no sistema visual, no hipocampo e em outras regiões cerebrais do ratinho (revisto por Michael Salter e Beth Stevens¹). Para as células da microglia, as proteínas do complemento são sinais do tipo “coma-me” que se localizam à superfície de células apoptóticas e as sinalizam para serem fagocitadas³⁷. Em 2011, Paolicelli e colaboradores demonstraram que a sinalização neuronal CX3CR1-CX3CL1, também é importante para que a poda sináptica seja desempenhada pela microglia³⁶. Os autores observaram que ratinhos sem este recetor apresentam defeitos na maturação das sinapses do hipocampo. Contudo, estudos recentes afirmam que esta via só é necessária em algumas regiões do cérebro^{38,39}. Isto indica que existe uma heterogeneidade nos perfis da microglia de cada região cerebral e nos respetivos mecanismos de poda sináptica (revisto por Ako Ikegami e colaboradores⁴⁰).

1.1.6. Regulação da atividade neuronal

Notavelmente, a microglia é capaz de detetar a atividade sináptica e modificar os terminais sinápticos para regular a formação dos circuitos neuronais (revisto por Ako Ikegami e colaboradores⁴⁰). Foi descrito que o recetor P2Y12 expresso na microglia é essencial para aumentar a interação entre a microglia e as sinapses no córtex visual⁴¹. As células da microglia são também capazes de detetar a libertação de neurotransmissores, tais como glutamato e GABA (revisto por Huan Liu e colaboradores⁴²). Assim, dependendo do tipo de neurotransmissor, a microglia consegue discriminar a atividade excitatória ou inibitória das sinapses e exercer efeitos específicos sobre cada uma destas⁴³. A análise de imagens *in vivo* da morfologia da microglia e da atividade neuronal no teto óptico da larval peixe-zebra demonstrou que a microglia é atraída por neurónios altamente ativadas⁴⁴. Os autores observaram que a microglia ramificada contacta os neurónios ativados com os seus prolongamentos e induz a redução da atividade neuronal. Estas descobertas demonstram que a microglia e os neurónios comunicam e interagem bidirecionalmente.

1.2. Contribuição da microglia para os distúrbios do neurodesenvolvimento

Neste capítulo iremos apresentar os fenótipos relacionados com a microglia que foram observados no cérebro de animais modelo e pacientes com PEA, e abordar os possíveis papéis destas células na

patogénese do autismo. Conhecidas as funções da microglia, fica claro que estas células imunes contribuem ativamente para a formação e maturação do cérebro em desenvolvimento. Assim, qualquer modificação na formação e atividade da microglia pode trazer consequências a longo prazo na estrutura e na função dos circuitos neuronais. De facto, ao longo dos últimos anos, várias descobertas têm vindo a demonstrar que a disfunção das células da microglia está associada a distúrbios do neurodesenvolvimento como as PEA (revisto por vários trabalhos ^{7,9,45,46}). Esta associação é apoiada por estudos *post-mortem* que descreveram alterações no número de células da microglia, na sua morfologia e na sua interação com neurónios em cérebros de indivíduos com autismo, em particular em regiões como o córtex pré-frontal dorsolateral que controla as funções executivas⁴⁷⁻⁴⁹. Concomitantemente, um estudo de 2013 utilizou a tomografia por emissão de positrões (PET) para obter imagens do cérebro de indivíduos autistas vivos. Esta análise identificou um excesso de ativação da microglia em várias regiões do cérebro de jovens adultos com autismo⁵⁰. Para além disso, a sequenciação de RNA de tecido cerebral identificou alterações na expressão de genes relacionados com a ativação da microglia em alguns indivíduos com autismo^{51,52}.

Foi também demonstrado que crianças com PEA sofrem de um processo neuroinflamatório em diferentes regiões do cérebro mediado pela ativação da microglia^{48,53}. A análise da interação microglia-neurónio no córtex pré-frontal revelou que as células da microglia estão mais próximas dos neurónios em indivíduos com autismo⁵⁴. Em crianças autistas, a ativação da microglia conduz a neuroinflamação caracterizada por níveis elevados de mediadores de stresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL)-6, o TNF α e o interferão gama (IFN γ)⁴⁸. Em particular, no córtex cerebelar de indivíduos com autismo foram detetados níveis elevados de IL-6, uma proteína expressa pela microglia⁵⁵. Esta sobre-expressão pode impedir a migração neuronal e causar um desequilíbrio nos circuitos excitatórios e inibitórios⁵⁵. De facto, defeitos na proporção entre estes circuitos podem estar na base dos distúrbios do neurodesenvolvimento, tais como o autismo (revisto por Morgane Thion e Sonia Garel¹²).

As células da microglia realizam a poda sináptica e são por isso consideradas um elemento chave na remodelação das sinapses neuronais, a qual ocorre constantemente ao longo de toda a vida do indivíduo (revisto por Yuwen Wu⁵⁶). Curiosamente, tanto a poda excessiva como a poda insuficiente foram identificadas em pacientes com PEA (revisto por Ryuta Koyama e Yuji Ikegaya⁵⁷). Em contextos de distúrbios do neurodesenvolvimento, alterações na poda sináptica conduzem a hiper- ou hipo-conectividade dos circuitos cerebrais (revisto por Bernardinelli e colaboradores⁵⁸). Observações em modelos animais com mutações em CX3CR1 revelaram que a redução do número de células da microglia leva a uma diminuição da poda sináptica e da atividade cerebral⁵⁹. Para além disso, ratinhos juvenis e adultos mutantes para CX3CR1 apresentam uma diminuição da conectividade funcional do cérebro e fraca transmissão sináptica, com consequente redução das interações sociais e aumento de comportamentos repetitivos^{36,59}, características associadas às PEA em humanos (revisto por Catherine Lord e colaboradores⁶⁰). Pacientes com autismo apresentam também uma expressão reduzida do recetor TREM2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), o que pode refletir a existência de um menor número de células da microglia com subsequente disfunção na poda sináptica⁶¹. Assim, estes estudos reforçam a ideia de que alterações na poda sináptica resultam numa conectividade

irregular dos circuitos neuronais, a qual pode contribuir para os defeitos comportamentais observados nas PEA.

À semelhança da poda sináptica, defeitos na mielinização que alterem a comunicação entre neurónios podem desempenhar também um papel na patogénese de distúrbios do neurodesenvolvimento (revisto por Ela Bar e Boaz Barak⁴⁶). Em 2020, BaDoi Phan e colaboradores descreveram a ocorrência de defeitos na mielinização em modelos de ratinho de PEA síndrome e em amostras *post-mortem* de cérebros de pacientes com autismo⁶². Estas evidências sugerem que a mielinização pode ser um novo alvo terapêutico para o tratamento do autismo⁶².

Apesar de estas e outras abordagens terem ajudado a elucidar o papel da microglia nos distúrbios do neurodesenvolvimento, a contribuição direta da microglia para a doença ainda não é totalmente compreendida⁴⁶. Assim, compreender quando e onde a microglia se torna disfuncional no autismo será crucial para entender como a microglia influencia os circuitos e regiões cerebrais relevantes⁷, pelo que mais estudos que analisam o desenvolvimento destas células imunes no contexto das PEA ajudarão a esclarecer estas questões e a desenvolver novas terapias.

1.3. Desenvolvimento da microglia: da hematopoiese à formação do cérebro

Estudos anteriores em humanos^{63,64}, ratinho⁶⁵, galinha⁶⁶, e peixe-zebra⁶⁷ descobriram que a origem da microglia é estabelecida no início da embriogénese e que, contrariamente às células da neuroectoderme, as células da microglia são de origem hematopoiética mieloide¹⁰. Semelhante aos mamíferos, o desenvolvimento hematopoiético do peixe-zebra envolve três ondas sequenciais: a hematopoiese primitiva, a onda transitória eritromieloide e a hematopoiese definitiva, que ocorrem em diferentes locais embrionários (**Figura 1.2**; revisto recentemente^{68,69}).

A hematopoiese primitiva é a primeira onda hematopoiética a surgir durante a embriogénese e tem origem nos designados hemangioblastos. Curiosamente, passaram cem anos desde que foi proposta pela primeira vez a designação de hemangioblasto como sendo um precursor comum das linhagens hematopoiética e endotelial⁷⁰. Esta hipótese é apoiada por estudos *in vitro* de culturas celulares de ratinho e células estaminais embrionárias humanas, e *in vivo* por sistemas genéticos em modelos animais, incluindo o ratinho, a galinha e o peixe-zebra (revisto por Jing-Wei Xiong⁷¹). No embrião de peixe-zebra a mesoderme lateral ventral dá origem aos hemangioblastos às 10 horas após a fertilização (hpf; 100% de epibolia). Estas células bipotenciais podem ser identificadas pela expressão dos marcadores hematopoiéticos *tal1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*), *lmo2* (*LIM domain only 2*) e *gata2a* (*GATA binding protein 2a*), e dos marcadores vasculares *kdrl* (*kinase insert domain receptor like*) e *fli1* (*Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor*; revisto por Elizabeth Paik e Leonard Zon⁷²).

Às 11 hpf (3 sómitos), a hematopoiese primitiva é iniciada a partir de hemangioblastos localizados na mesoderme lateral anterior (*anterior lateral mesoderm* ou ALM) e na mesoderme lateral posterior (*posterior lateral mesoderm* ou PLM), e dá origem aos macrófagos primitivos e aos primeiros eritrócitos circulantes (revisto recentemente^{68,69}). Estudos anteriores demonstram que os progenitores mieloides localizam-se na ALM^{67,73}, enquanto que os precursores dos eritrócitos localizam-se na PLM, que mais tarde forma a massa celular intermédia (*intermediate cell mass* ou ICM)⁷⁴.

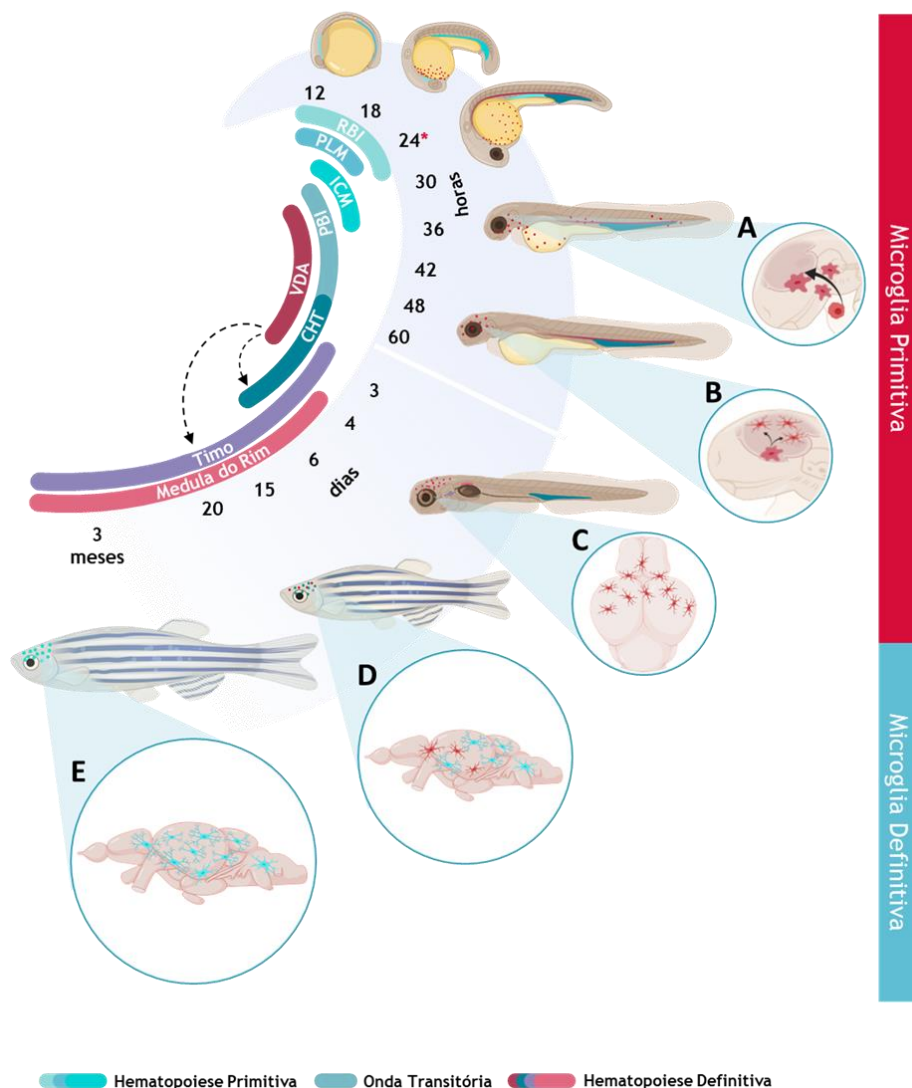


Figura 1.2. Origem embrionária do sistema hematopoiético e ontogenia da microglia no peixe-zebra.

Desenvolvimento hematopoiético no peixe-zebra ao longo do tempo. No embrião de peixe-zebra, a hematopoiese primitiva ocorre nos locais RBI e PLM/ICM, onde têm origem os macrófagos e eritrócitos primitivos, respetivamente. A circulação sanguínea é iniciada às 24 horas após a fertilização (hpf; asterisco vermelho). Pelas 24-30 hpf uma onda hematopoiética transitória e "intermédia" ocorre na PBI com aparecimento dos progenitores eritromielóides, que se diferenciam nas linhagens eritroide e mielóide, mas não linfóide. Por fim entre as 28 e as 30 hpf, surge a hematopoiese definitiva com origem nas HSPCs, inicialmente formadas a partir do endotélio hemogénico na VDA. A partir das 36 hpf, a região da PBI é convencionalmente designada por *caudal hematopoietic tissue* ou CHT. Algumas destas HSPCs migram para o CHT, onde dão origem às linhagens eritroide, mielóide e linfóide, e para o timo, onde ocorre a diferenciação de linfócitos T. Finalmente, as HSPCs semeiam também a medula do rim em desenvolvimento, o local final da hematopoiese definitiva onde ocorre a produção de células eritroides, mielóides e linfócitos B. (A-E) No peixe-zebra a ontogenia da microglia ocorre em duas fases distintas: na primeira fase, surge a microglia primitiva (representada a vermelho) que tem origem em macrófagos primitivos, ao passo que na segunda fase surge a microglia definitiva (representada a azul) que tem origem nas HSPCs⁷⁵⁻⁷⁷. (A) A partir das 35 hpf os macrófagos primitivos migram para o cérebro. (B) Uma vez no cérebro, estes macrófagos desenvolvem-se rapidamente em microglia primitiva, por volta das 60 hpf. (C) Entre os 3 e os 4 dias após a fertilização (dpf) as primeiras células da microglia larval de peixe-zebra tornam-se totalmente funcionais e encontram-se principalmente no teto óptico. (D) Por volta dos 15 dpf, os progenitores mielóides derivados das HSPCs colonizam o cérebro e diferenciam-se em microglia definitiva. (E) Aos 3 meses, a microglia definitiva já substituiu completamente a microglia primitiva. RBI, ilhota de sangue rostral; PLM, mesoderme lateral posterior; ICM, massa celular intermédia; PBI, ilhota sanguínea posterior; CHT, tecido hematopoiético caudal; HSPCs, células estaminais/progenitoras hematopoiéticas; VDA, parede ventral da aorta dorsal. Adaptado de Ramy Elsaïd e colaboradores⁶⁹.

A ICM é conceitualmente considerada análoga às ilhotas sanguíneas do saco vitelino extraembrionário de mamíferos e de aves, e é responsável por dar origem à maioria das células hematopoiéticas primitivas e aos progenitores das duas ondas hematopoiéticas que se seguem (revisto recentemente^{68,69}). A ALM dá origem à chamada ilhota sanguínea rostral (*rostral blood island* ou RBI). Nesta região os hemangioblastos diferenciam-se nos precursores mieloides (positivos para *spi1b* ou *Spi-1 proto-oncogene b*) por volta das 12 hpf (5 sómitos), que migram depois rostralmente e lateralmente sobre o saco vitelino^{73,78}. Entre as 16 hpf e as 18 hpf (17 a 18 sómitos), os precursores mieloides diferenciam-se especificamente em macrófagos primitivos, um processo regulado pelo fator *irf8*⁷⁹ e que é acompanhado pela expressão de *lcp1* (*lymphocyte cytosolic protein 1* ou *l-plastin*)^{67,75}. A partir das 21,5 hpf (25 sómitos), os macrófagos primitivos expressam os genes *csf1ra* (*colony stimulating factor 1 receptor, a*)⁷⁵, *mpeg1.1* (*macrophage expressed 1, tandem duplicate 1*)^{80,81}, *mfap4.1* (*microfibril associated protein 4, tandem duplicate 1*)^{81,82}, *cxcr3.2* (*chemokine (C-X-C motif) receptor 3, tandem duplicate 2*)⁸¹ e *ptpn6* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6*)⁸¹. Por outro lado, os progenitores dos granulócitos expressam *ceb1* (*CCAAT/enhancer binding protein 1*)^{83,84} e às 24 hpf começam a diferenciar-se em neutrófilos, expressando *lyz* (*lysozyme C*)^{85,86} e *mpx* (*myeloid-specific peroxidase*)^{87,88}.

Em paralelo, os precursores na PLM/ICM começam a diferenciar-se às 12 hpf (5 sómitos) em três linhagens celulares distintas que expressam diferentes fatores de transcrição: (i) *gata1a* (*GATA binding protein 1a*), considerado o regulador chave do destino eritroide^{74,89}; (ii) *spi1b*, o regulador mestre da linhagem mielóide^{67,78}; e (iii) *kdrl*, expresso em angioblastos, precursores da linhagem endotelial^{90,91}. Após serem especificados na PLM/ICM, os angioblastos migram para a linha média embrionária onde vão formar os primórdios dos vasos sanguíneos axiais: a veia cardinal posterior e a aorta dorsal⁹². Como descrito mais à frente, a aorta dorsal tem mais tarde um papel essencial na hematopoiese definitiva. A partir das 12 hpf desenvolvem-se os progenitores eritroides *gata1a*+ e a expressão de *epor* (*erythropoietin receptor*) marca o início da sua diferenciação em eritrócitos primitivos. No peixe-zebra, os eritrócitos primitivos expressam os genes da hemoglobina embrionária (*hbae1.1*, *hbae3*, *hbae5*, *hbbe1.1*, *hbbe1.2*, *hbbe1.3*, *hbbe2*, *hbbe3*)⁹³, que os distingue dos eritrócitos que têm origem nas outras ondas hematopoiéticas⁹⁴. Por volta das 24 hpf os eritrócitos primitivos começam a entrar na circulação e persistem na larva até aos 4 dias após a fertilização (dpf)^{91,95}.

Aproximadamente às 24 hpf é iniciada uma onda hematopoiética transitória ou "intermédia" que ocorre na parte mais posterior da ICM, na ilhota sanguínea posterior (*posterior blood island* ou PBI)⁹⁶. Nesta região surgem os progenitores eritromieloides (*erythro-myeloid progenitors* ou EMPs), caracterizados pela co-expressão de *gata1a* e *lmo2*, que se diferenciam em células eritroides *gata1a*+ e mieloides *spi1b*+ (mas não linfóides)^{96,97}. Contudo, são ainda pouco conhecidos os fatores que atuam a montante (*upstream*) de *gata1a* ou *spi1b* e que regulam o equilíbrio entre os destinos eritroide e mielóide dos EMPs⁹⁸.

Por fim, entre as 28 e as 30 hpf surge a última onda de progenitores hematopoiéticos, a hematopoiese definitiva. Embora comece logo na fase embrionária, esta onda é responsável por gerar as células estaminais/progenitoras hematopoiéticas (*hematopoietic stem/progenitor cells* ou HSPCs) que originam as linhagens definitivas de células mieloides, eritroides e linfóides do peixe-zebra adulto.

Tanto nos peixes como nas aves e nos mamíferos, as HSPCs são especificadas na parede ventral da aorta dorsal a partir das células endoteliais hemogénicas. Embora a origem das células do endotélio hemogénico ainda seja controversa, nós demonstramos recentemente que, no embrião de galinha, uma subpopulação destas células aórticas é derivada de hemangioblastos⁹⁹ (ver Anexo). As HSPCs expressam *kdr*¹⁰⁰, *itga2b* (*integrin alpha 2b* ou *cd41*)^{101,102}, *myb* (*v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*)^{100,101} e *runx1* (*RUNX family transcription factor 1*)^{103,104}. A análise de mutantes de peixe-zebra demonstrou que a expressão de *myb* está dependente de *runx1*¹⁰⁵, um dos primeiros marcadores das HSPCs. A partir das 48 hpf, uma população de HSPCs *myb*⁺*runx*⁺ migra da aorta dorsal para a região da PBI, que nesta fase se designa tecido hematopoiético caudal ou CHT (*caudal hematopoietic tissue*)⁹⁶. Este tecido hematopoiético é equivalente ao fígado fetal em mamíferos¹⁰⁶. Tal como nestes, o ambiente no CHT do peixe-zebra promove a expansão e diferenciação das HSPCs. A migração das células hematopoiéticas em direção ao CHT e a sua colonização por estas células dependem da via de sinalização Cxcl8/Cxcr1¹⁰⁷. Às 54 hpf, algumas das HSPCs migram diretamente da aorta dorsal para o timo, diferenciando-se aqui em progenitores linfoides⁸³.

A eritropoiese definitiva começa no CHT aos 3,5 dpf, conforme identificado pela expressão de *gata1a* e *hbbe3*, e produz eritrócitos maduros que gradualmente vão substituir os eritrócitos primitivos em circulação¹⁰⁸. Similarmente, a mielopoiese definitiva começa no CHT por volta dos 3 dpf, e origina macrófagos, neutrófilos e monócitos (revisto por Jason Berman e colaboradores¹⁰⁹). Aos 4 dpf, as HSPCs colonizam também a medula do rim em desenvolvimento, sendo este o local final da hematopoiese definitiva, equivalente à medula óssea dos mamíferos^{101,106}. Estas HSPCs dão origem a todas as linhagens hematopoiéticas, incluindo progenitores linfoides que diferenciam-se em células B no rim e em células T no timo (revisto por Jill Jong e Leonard Zon⁹¹). O timo e o rim continuam a gerar células hematopoiéticas ao longo da vida adulta do peixe-zebra.

Durante a embriogénese dos mamíferos, as primeiras células da microglia diferenciam-se a partir de macrófagos primitivos provenientes do saco vitelino (RBI no peixe-zebra) que colonizam o neuroepitélio em desenvolvimento (**Figura 1.2**)^{65–67}. Estudos de rastreamento de linhagens realizados no modelo de ratinho mostraram que a microglia primitiva é mantida ao longo da vida¹¹⁰, embora ondas hematopoiéticas posteriores possam contribuir parcialmente para a população da microglia adulta¹¹¹. À semelhança dos mamíferos, a microglia primitiva do peixe-zebra desenvolve-se durante a primeira onda hematopoiética^{75–77}. Após as 22 hpf, os macrófagos primitivos migram do saco vitelino e começam a invadir progressivamente os tecidos periféricos^{67,75}. Estas células, com morfologia ameboide, colonizam o tecido neural a partir das 35 hpf, onde proliferam e posteriormente se diferenciam nas células da microglia. Em particular, os macrófagos primitivos colonizam primeiramente as regiões da retina e do teto óptico⁷⁵. Os precursores da microglia expressam um recetor particularmente importante para a sua migração, *csf1ra*, o qual reconhece os ligandos *Csf1a* (*colony stimulating factor 1a*), *Csf1b* (*colony stimulating factor 1b*), e IL-34 (interleucina 34). Recentemente foi demonstrado que a expressão de IL-34 no sistema nervoso atrai primeiramente os macrófagos primitivos para as regiões anteriores da cabeça, e atua através da ativação da via IL-34-Csf1ra^{112,113}. Seguidamente, esta via em conjunto com a apoptose neuronal promovem a colonização das restantes regiões do cérebro pela microglia. Nomeadamente, a via IL-34-Csf1ra promove a colonização da retina e do encéfalo frontal, enquanto

que a apoptose neuronal promove a colonização do teto óptico¹¹². Uma vez no cérebro, estes macrófagos primitivos diferenciam-se em microglia ramificada e funcional por volta das 60 hpf. Este processo é caracterizado pela diminuição da expressão de *lcp1*, aumento da expressão de *apoe* (apolipoprotein E)⁷⁵ e ativação da expressão de genes específicos da microglia, tais como o *p2ry12* (*purinergic receptor P2Y12*)¹¹⁴.

Vários estudos demonstraram que as células da microglia primitiva estão totalmente funcionais nas larvas de peixe-zebra a partir dos 3 dpf. Estas células são capazes de remover neurónios apoptóticos, interagir diretamente com neurónios ativados e responder a lesões neuronais no cérebro larvar^{20,21,44,114}. Curiosamente, as células da microglia primitiva do peixe-zebra são totalmente substituídas por uma população de células da microglia definitiva no final da fase juvenil. Esta microglia definitiva ou adulta tem origem nos progenitores de HSPCs que semeiam o parênquima cerebral a partir dos 15 dpf^{76,77}. Giuliano Ferrero e colaboradores observaram que a sinalização de *csf1ra* é necessária para a formação da microglia primitiva derivada dos macrófagos primitivos^{75,115}, ao passo que o parálogo *csf1rb* é importante para a formação das células mieloides definitivas a partir das HSPCs, reforçando a importância deste gene para a população da microglia adulta¹¹⁶.

Apesar de vários genes já terem sido identificados como intervenientes no desenvolvimento da microglia, pouco se sabe sobre a contribuição de potenciais mutações nestes genes para o aparecimento de distúrbios do desenvolvimento neurológico, tais como as PEA. Como descrito no capítulo seguinte, o nosso trabalho introduz um novo regulador do desenvolvimento da microglia cuja perda de função pode contribuir para a patogénese de doenças do neurodesenvolvimento.

1.4. O gene *deleted in autism 1 related (DIA1R)*

Como descrito previamente, as células da microglia surgem a partir de progenitores hematopoiéticos primordiais localizados no saco vitelino, conhecidos como hemangioblastos¹¹⁷. Anteriormente, ao investigarem a regulação transcricional do gene *Cerberus* no embrião de galinha¹¹⁸, investigadores do nosso laboratório isolaram e caracterizaram um novo *enhancer* (designado Hb) que promove a expressão do gene repórter EGFP especificamente nos hemangioblastos de saco vitelino¹¹⁹. Este trabalho apresentou o repórter específico de hemangioblastos Hb-EGFP como uma poderosa ferramenta para marcar estas células, estudar a dinâmica da morfogénese das ilhotas sanguíneas *in vivo* e analisar o destino celular dos progenitores hematopoiéticos do saco vitelino^{99,119,120}. No passado, este repórter foi também utilizado para isolar a população de hemangioblastos do embrião de galinha, e caracterizar o seu perfil de expressão genética¹¹⁹. Além de validar a especificidade do repórter, esta análise permitiu identificar novos genes expressos nos hemangioblastos do saco vitelino, entre os quais se destacou o ortólogo do gene *DIA1R* humano (*Deleted in Autism-1 Related*; também conhecido como *cXorf36* ou *Divergent Protein Kinase Domain 2B, DIPK2B*) como o segundo gene mais diferencialmente expresso¹²¹.

Em 2011, Azhari Aziz e colaboradores descreveram pela primeira vez o gene *DIA1R* humano como sendo um gene implicado em PEA que se localiza na posição Xp11.3 do cromossoma X^{122,123} (**Figura**

1.3). Pensa-se que o *DIA1R* surgiu a partir da duplicação do gene *DIA1* (*Deleted in Autism-1* ou *Divergent Protein Kinase Domain 2A*, *DIPK2A*). Os genes *DIA1* e *DIA1R* partilham uma região central extremamente similar (identificada através de estudos *in silico*), o que sugere que a sua função biológica também seja parecida^{122–124}. Estes genes têm vários ortólogos, ou seja, estão presentes numa grande variedade de espécies, mas o *DIA1R* aparece exclusivamente nos vertebrados¹²⁴.

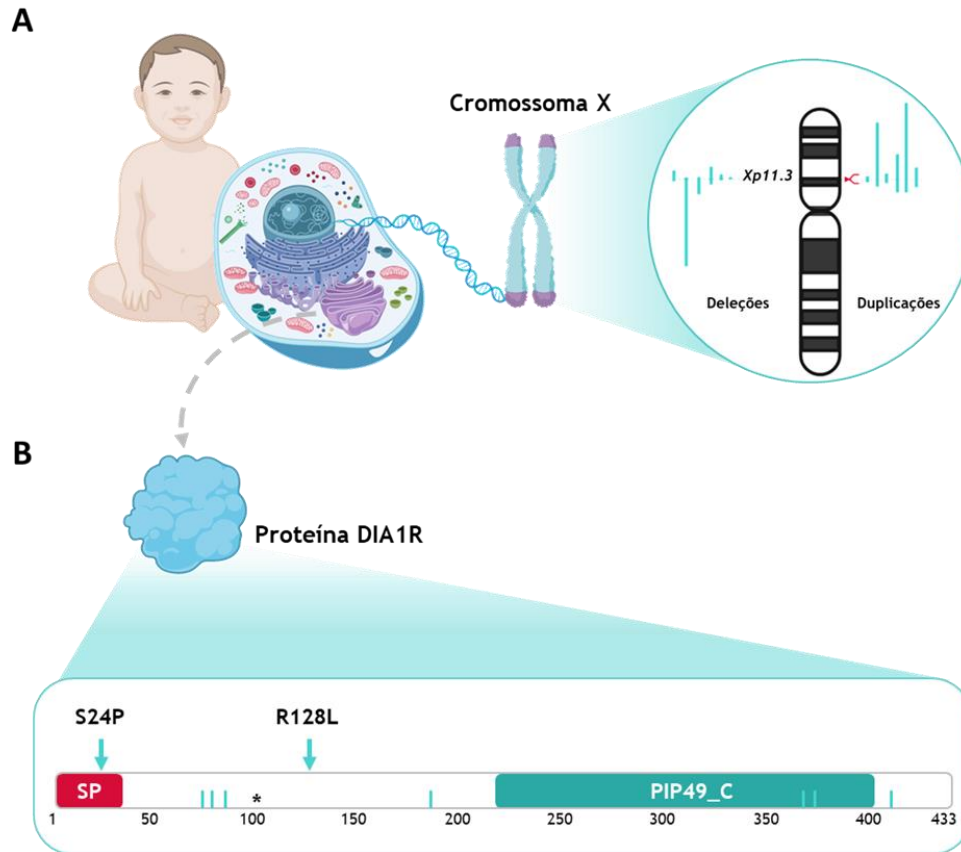


Figura 1.3. Genética do *DIA1R* humano associada às PEA e estrutura da proteína DIA1R.

(A) O gene *DIA1R* localiza-se no cromossoma X na posição Xp11.3 (ponta de seta vermelha e linha cinzenta). Pacientes que apresentam deleções (lado esquerdo) e duplicações (lado direito) apresentam um fenótipo comum de deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento e comportamentos característicos de PEA. Adaptado de Azhari Aziz e colaboradores¹²³. **(B)** Estrutura da proteína DIA1R. A proteína humana é representada e anotada com características conservadas previstas por análise de sequência. A proteína DIA1R possui um péptido sinal (SP) na região N-terminal, seguido de um possível local de clivagem, indicando assim que esta proteína será translocada para o retículo endoplasmático e transportada para o aparelho de Golgi¹²². As proteínas DIA1R também têm um domínio de proteína quinase PIP49_C altamente conservado, característico da família de proteínas quinases FAM69. Contudo, não possui um domínio catalítico conservado, sugerindo que DIA1R pode ser uma quinase atípica ou uma pseudoquinase¹²⁵. DIA1R tem também um local de glicosilação tipo N (asterisco; previsão da uniprot.org) e sete resíduos de cisteína (linhas turquesa) que se encontram conservados nas proteínas DIA1 e DIA1R de todas as espécies. Duas mutações pontuais associadas à DILX (S24P e R128L) encontram-se indicadas por setas. PEA, Perturbações do Espectro do Autismo; DILX, Deficiência Intelectual Ligada ao X.

Notavelmente, o gene *DIA1R* parece ter sido perdido durante a evolução de espécies de vertebrados com um estilo de vida solitário, como a rã *Xenopus tropicalis*, a preguiça e vários peixes acantopterígeos (*Ensembl gain/loss tree*, <http://www.ensembl.org>; Aziz e colaboradores¹²⁴), reforçando o papel potencialmente importante do *DIA1R* na regulação do comportamento social. Mutações pontuais neste gene encontram-se associadas à Deficiência Intelectual Ligada ao X (DILX), enquanto que deleções e duplicações do *DIA1R* estão associadas a síndromes com características semelhantes

a PEA¹²² (**Figura 1.3**). Curiosamente, a análise de pacientes com síndrome de Turner e anomalias do cromossoma X sugere a existência de um gene localizado na região Xp11.3 que escapa à inativação do X¹²⁶. De facto, *DIA1R* pode ser esse gene, uma vez que está localizado nesta região e escapa à inativação do cromossoma X^{122,127,128}.

Passados dez anos desde a primeira descrição dos genes *DIA1R*^{122,124}, a sua função biológica permanece ainda desconhecida. Com base na análise de sequências génicas, a proteína DIA1R parece conter um péptido sinal e um domínio da proteína quinase PIP49_C altamente conservado, característico da família de proteínas quinases FAM69^{122,125} (**Figura 1.3**). No entanto, este domínio PIP49_C não possui uma região catalítica conservada, sugerindo que a proteína DIA1R pode ser uma quinase atípica ou uma pseudoquinase. Estas características sugeriram que a DIA1R pode regular o tráfego intracelular e/ou interferir com a função de fatores secretados¹²³.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é cada vez mais utilizado como organismo modelo para estudar o neurodesenvolvimento e distúrbios neurológicos (revisto por Victoria Rea e Terence Raay¹²⁹). O genoma do peixe-zebra compartilha mais de 70% de homologia com o humano, e os mecanismos do neurodesenvolvimento estão altamente conservados entre peixes e humanos¹³⁰. Recentemente, Daria Meshalkina e colaboradores analisaram 858 genes de risco de PEA e revelaram que aproximadamente 62% dos genes humanos listados na base de dados SFARI (<https://gene.sfari.org>) apresentam ortólogos no peixe-zebra¹³¹. O gene *dia1r* do peixe-zebra (ortólogo do *DIA1R* humano) localiza-se no cromossoma 9 e contém cinco exões, sendo que pode ocorrer *splicing* alternativo no terceiro exão, dando origem a dois transcritos diferentes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/569232>)¹³⁰. A proteína Dia1r do peixe-zebra apresenta 42% de similaridade com a proteína humana (de acordo com a base de dados Genecards; <https://www.genecards.org>). Contrariamente ao gene *dia1* (ortólogo do *DIA1* humano), que apresenta dois parálogos (*dia1a* e *dia1b*), existe apenas uma cópia do gene *dia1r* no peixe-zebra¹²⁴. Relativamente à expressão genética, Cannon e colaboradores revelaram a presença de transcritos de *dia1r* em percursores de células endoteliais e hematopoiéticas de embriões de peixe-zebra (gene designado *cc058*)¹³². De forma consistente com esta observação, a nossa análise da expressão em embriões de peixe-zebra, galinha e ratinho revelou que o *DIA1R* é altamente expresso em hemangioblastos, células endoteliais hemogénicas e progenitores hematopoiéticos, sugerindo que o *DIA1R* pode ter um papel importante no desenvolvimento hematopoiético (**Figura 1.4**)¹²¹. A análise do transcriptoma materno em oócitos de peixe-zebra indicou que não existem RNAs maternos de *dia1r* no zigoto (dados suplementares do artigo)¹³³, o que pode ser revelante para a interpretação dos potenciais fenótipos de mutantes para este gene.

Em embriões de peixe-zebra com 12 hpf e 16 hpf, a expressão de *dia1r* é detetada na ALM e na PLM (**Figura 1.4**; dados não publicados), locais onde os hemangioblastos podem ser encontrados nesta fase (revisto por Aldo Ciau-Uitz e colaboradores¹³⁴). Às 19,5 hpf, a expressão de *dia1r* é detetada na RBI, na aorta dorsal e na ICM, e às 30 hpf mantém-se na aorta e na PBI (**Figura 1.4**), uma região colonizada pelas HSPCs definitivas que migram da aorta dorsal^{68,106}.

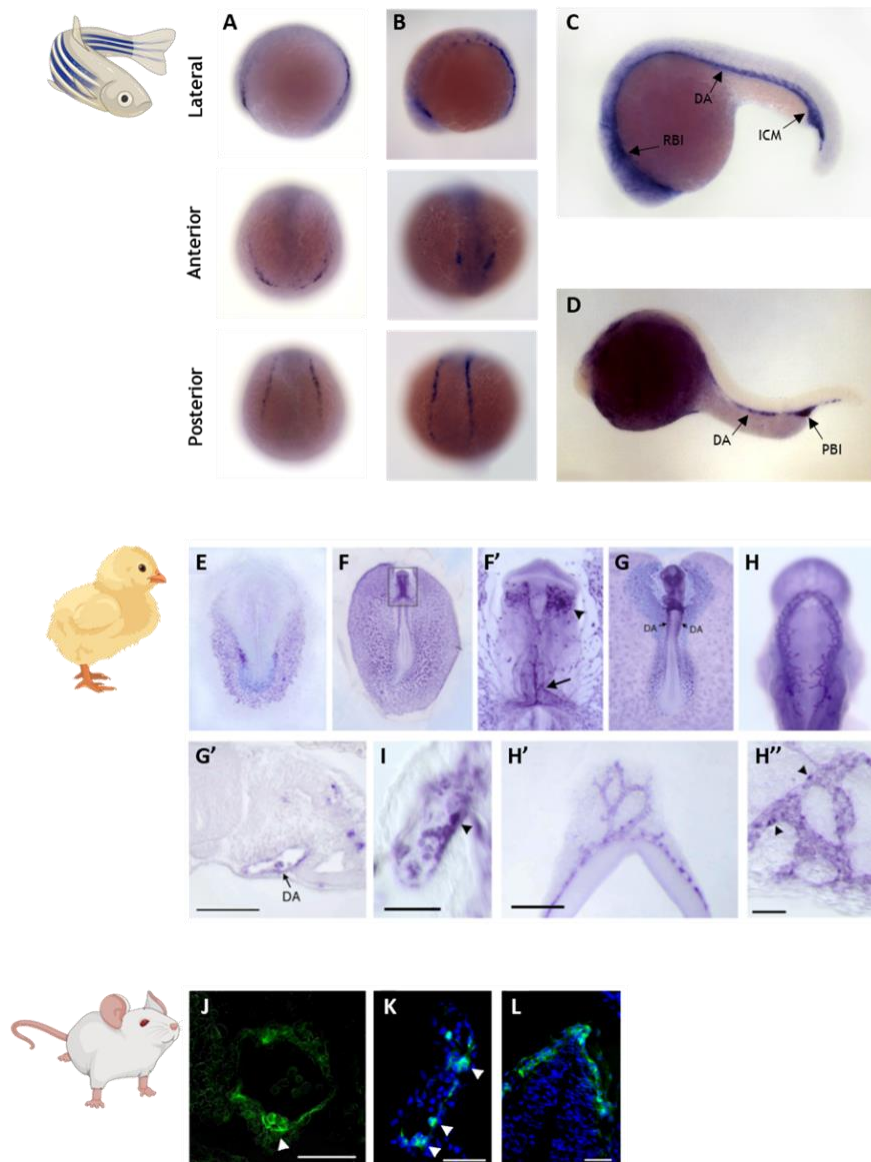


Figura 1.4. Expressão de DIA1R em embriões de peixe-zebra, galinha e ratinho.

A técnica de hibridação *in situ* para detecção de transcritos do gene *dia1r* foi realizada em embriões de peixe-zebra às 12 hpf (A), 16 hpf (B), 19,5 hpf (C) e 30 hpf (D), e em embriões de galinha nas fases HH5 (E), HH11 (F), HH13 (G), HH17 (I) e HH18 (H). (E') Detalhe do embrião em (E). (F', G', G'') Secções dos embriões de galinha correspondentes, em *whole-mount*. A detecção da proteína DIA1R foi realizada por imunofluorescência em crio-seções de embriões de ratinho aos E9.5 (J-L; DAPI em K, L; ab121152 da Abcam). Em embriões de peixe-zebra, os transcritos do gene *dia1r* começam a ser detetados às 12 hpf (A) na mesoderme anterior e posterior da placa lateral (ALM e PLM, respetivamente) - onde se localizam os hemangioblastos - e permanece nestas regiões às 16 hpf (B). Às 19,5 hpf (C), a expressão do *dia1r* é detetada na massa celular intermédia (ICM), que contem progenitores eritromieloides, e na aorta dorsal (DA), que dá origem às HSPCs^{68,134}. O mesmo padrão é detetado às 24 hpf (dados não mostrados). Às 30 hpf (D), a expressão do *dia1r* continua a estar presente na DA e é detetada também na ilhota sanguínea posterior (PBI). Em embriões de galinha, a expressão de *dia1r* começa a ser detetada ao estadio HH5 (E) na mesoderme extraembrionária que formará as ilhotas de sangue do saco vitelino no estadio HH11 (F). Nesta fase, *dia1r* também é expresso na vasculatura da cabeça (pontas de seta em F') e no endocárdio (seta em F') do embrião de galinha, tecidos com capacidade hemogénica¹³⁵. Em estágios posteriores, o gene *dia1r* de galinha e a proteína DIA1R de ratinho são ambos detetados na parede dos vasos sanguíneos (J, K, L) com maior intensidade nas células endoteliais hemogénicas da aorta dorsal (DA; G, G', J; ponta de seta), nas ilhotas sanguíneas (I, K; pontas de seta) e na vasculatura da cabeça (H', H''; pontas de seta). HSPCs, células estaminais/progenitoras hematopoiéticas. hpf, horas pós-fertilização; HH, fases do desenvolvimento dos embriões de galinha descritas por Hamburger e Hamilton¹³⁶. E, dia embrionário do desenvolvimento dos embriões de ratinho. Barras de escala: 100 µm em G', H'', J, H''; 50 µm em I, H'', J-L. (A-D, J-L) Resultados não publicados; (E-I) Imagens de Serrado-Marques e colaboradores¹²¹.

Estas observações estão de acordo com os dados de sequenciação de RNA apresentados por Richard White e colaboradores¹³⁷, que analisaram a expressão de todos os RNAs mensageiros (mRNAs) ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra, desde a fase de uma célula até aos 5 dpf (dados disponíveis no *Expression Atlas*; <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-ERAD-475>). O padrão de expressão que descrevemos (**Figura 1.4**) mostra que o gene *dia1r* é expresso nos locais hematopoiéticos do embrião peixe-zebra. Uma vez que a ALM e a aorta dorsal são locais de origem da microglia no peixe-zebra, podemos afirmar que as células da microglia primitiva e definitiva derivam ambas de progenitores hematopoiéticos que expressam o *dia1r*.

1.5. Hipótese e Objetivos

Tendo em consideração o envolvimento das células da microglia nas PEA e o facto de o gene *DIA1R* ser expresso nos progenitores destas células, decidimos investigar a hipótese de que o *DIA1R* tem um papel importante no desenvolvimento da microglia. Apesar dos avanços na identificação de estratégias para recriar células semelhantes à microglia *in vitro*, ainda é necessário um melhor conhecimento da ontogenia destas células para orientar estes estudos^{138,139}. O peixe-zebra é um excelente modelo animal para o estudo do desenvolvimento da microglia, pois tem um desenvolvimento embrionário externo e as suas larvas são relativamente transparentes. Para além disto, estudos recentes demonstraram que o perfil genético da microglia do peixe-zebra apresenta uma forte semelhança com os perfis apresentados pelas células da microglia do ratinho e do humano^{140,141}. Ao nível do transcriptoma das células da microglia, também foram identificadas semelhanças importantes entre estas espécies¹⁴¹, demonstrando que as principais propriedades da microglia estão conservadas entre os mamíferos e o peixe-zebra. Por outro lado, o peixe-zebra é um excelente modelo genético para estudar o desenvolvimento embrionário, existindo uma vasta gama de ferramentas genéticas ao nosso dispor^{142,143}. Portanto, estas características fazem com que o peixe-zebra seja um sistema modelo poderoso para estudar a função de um gene durante o desenvolvimento da microglia.

Neste projeto fomos investigar o papel do gene *dia1r* no desenvolvimento da microglia do peixe-zebra. Para validar esta hipótese, definimos três principais objetivos: (i) utilizar duas abordagens genéticas distintas que conduzem à perda da função do *dia1r* para gerar peixes-zebra *knockdown* e *knockout* para o gene *dia1r*; (ii) analisar o efeito do *knockdown* do *dia1r* no desenvolvimento hematopoiético; e (iii) avaliar o número de células da microglia no cérebro de larvas de peixe-zebra morfantes e mutantes para *dia1r*.

Capítulo 2. Materiais e Métodos

2.1. Animais: peixes-zebra

Ao longo deste projeto utilizamos linhas de peixes-zebra *wild-type* (WT) AB (ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7) e *Tuebingen* (TU; ZFIN ID: ZDB-GENO-990623-3), uma linha transgênica fluorescente para microglia e uma linha mutante *knockout* para o gene *dia1r*. Adicionalmente, iremos descrever uma segunda linha mutante que ainda está a ser estabelecida.

Todos os animais foram mantidos em sistema de recirculação de água à temperatura de 28°C e com ciclo luminoso de 14 horas (h) de luz e 10 h de escuridão por dia. Os embriões e larvas foram criados em meio embrionário E3 a 28 °C. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as condições laboratoriais estabelecidas pela *Fish Facility* do CEDOC (Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa). Este biotério está licenciado para experimentação animal pela autoridade portuguesa competente para o Bem-Estar Animal (DGAV, Direção Geral de Alimentação e Veterinária), e cumpre as leis nacionais (Decreto-Lei113/2013, de 7 de agosto), as diretivas europeias (Diretiva 2010/63/UE de 22 de setembro de 2010) e as recomendações relativas ao bem-estar de animais de laboratório da Federação das Associações Europeias de Animais de Laboratório (FELASA).

2.1.1. Peixes-zebra morfantes *dia1r*

Para reduzir a expressão do gene *dia1r* de peixe-zebra (*knockdown*), geramos peixes morfantes através da injeção de embriões de uma ou duas células com um morfolino experimental (MO). O MO direcionado para o gene *dia1r* contém 3 nucleótidos (nt) da região 5'UTR, o local de início da tradução (AUG) e 19 nt do primeiro exão, de forma a bloquear a tradução da proteína Dia1r (**Figura 3.1.C**). O morfolino controlo *5bp-mismatch* (CoMO) contém 5 nt mutados que impedem a sua ligação ao mRNA (**Figura 3.1.C**). Ambos os morfolinós foram obtidos a partir da *Gene Tools* (LLC) e as respetivas sequências encontram-se na **Tabela 2.1**. Antes de cada injeção, as soluções de cada morfolino foram previamente aquecidas a 65°C durante 5 minutos (min) seguidos de 10 min a 4°C, de forma a garantir a desnaturação de quaisquer estruturas secundárias dos oligonucleotídeos e a completa solubilização das soluções¹⁴⁴. Embriões AB da mesma postura foram injetados com volumes de 1,4 nanolitros (nl) das soluções de MO ou de CoMO com 1 nanograma (ng) ou 2 ng (diluídos em solução *Danieu*: 58 milimolar (mM) NaCl; 0,7 mM KCl; 0,4 mM MgSO₄·7H₂O; 0,6 mM Ca(NO₃)₂; 5 mM Hepes, pH 7,6) utilizando um micro-injetor PV820 (*Pneumatic PicoPump*) e uma lupa Nikon 80x SMZ745¹⁴⁵.

Tabela 2.1. Morfolinós utilizados para o *knockdown* do gene *dia1r* em peixe-zebra.

Nome	Tipo	Sequência (5' a 3')
<i>dia1r</i> MO	Bloqueio da tradução	CCCCTGACCATATCCCTGCCATCAC
<i>dia1r</i> CoMO	Morfolino controlo 5bp-mismatch	CCCCTCAGCATATCGCTCCGATCAC

2.1.2. Peixes-zebra mutantes *dia1r*

Foram geradas duas linhas de peixe-zebra mutantes (*knockout*) para o gene *dia1r* através do sistema CRISPR-Cas9¹⁴⁶, em colaboração com as investigadoras Joana F. Monteiro e Ana C. Certal da *Fish Platform* da Fundação Champalimaud. O RNA guia (gRNA) foi desenhado previamente pelo investigador José Serrado Marques utilizando o programa CRISPRscan (<http://www.crisprscan.org>)¹⁴⁷. Selecionou-se um gRNA com a sequência 5'- TGGCAGGGATATGGTCAG - 3' direcionado para a região ATG do gene *dia1r* (**Figura 3.2.A**), aumentando assim a probabilidade de criação de mutações que resultem no *knockout* do gene. Na *Fish Platform* foi estabelecida uma primeira linha mutante que apresenta uma deleção de 5 nt (del5), e uma segunda linha mutante que apresenta uma deleção de 13 nt (del13) está atualmente a ser estabelecida. Tendo em conta que o gene humano *DIA1R* está envolvido no autismo, no futuro pretendemos realizar experiências de comportamento com peixes-zebra mutantes *dia1r*. Neste sentido, escolhemos peixes-zebra com *background* TU por serem mais adequados do que os peixes AB para ensaios de comportamento social^{148,149}.

O gRNA e a proteína Cas9 foram injetados em simultâneo em embriões selvagens ou *wild-type* (WT) TU de uma célula (F0). Para se estabelecerem linhas heterozigóticas com uma única mutação, os adultos F0 foram cruzados com peixes WT (*outcross*), e a geração F1 resultante foi recolhida e mantida até à idade adulta. Os peixes mutantes *dia1r* F1 adultos foram genotipados por PCR utilizando como *template* DNA extraído de amostras da cauda. Foi amplificada uma região contendo o local alvo do gRNA, obtendo-se um amplicão de 117 pares de bases (pb; WT), 112 pb (del5) ou 104 pb (del13). Neste processo utilizou-se um par de *primers* de genotipagem (*zdia1r*) cujo as respetivas sequências são apresentadas na **Tabela 2.2**. Os produtos de PCR foram analisados pelo sistema QIAxcel ScreenGel para determinar o seu tamanho e assim reconhecer possíveis mutações nos peixes F1. Após este processo, as mutações foram identificadas por sequenciação de Sanger utilizando o par de *primers seq.dia1r* (**Tabela 2.2**). As sequências de DNA dos mutantes F1 (heterozigóticos) foram analisadas recorrendo ao *software* TIDE (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide>). Esta análise permitiu identificar deleções de 5 pb (del5) e 13 pb (del13) em cada uma das linhas de peixes-zebra mutantes.

Após a seleção dos peixes-zebras del5, novos cruzamentos foram realizados com vista a obter estabelecer uma população homozigótica e outra heterozigótica da linha mutante *dia1r* del5. Alguns embriões destas populações foram importados para a *Fish Facility* do CEDOC (Faculdade de Ciências Médicas), cumprindo os protocolos de biossegurança de ambas as instituições, sendo assim estabelecida a linha mutante *dia1r* del5 no CEDOC. Importa referir que apenas a linha mutante del5 foi utilizada nas experiências laboratoriais descritas de seguida, uma vez que a linha mutante *dia1r* del13 ainda se encontra a ser estabelecida.

Tabela 2.2. Sequências de todos os *primers* utilizados.(1-4) Genotipagem dos mutantes *dia1r* del5; (5-20) RT-qPCR.

Nome do <i>Primer</i>		Sequência (5' a 3')	ID
1	<i>zdia1r</i> (F)	TCACATTGGGAGGGCATTATGG	(originais)
2	<i>zdia1r</i> (R)	GGGTCTGCTGTGCCAAATACTA	
3	seq. <i>dia1r</i> (F)	GTCTAAGTGAGGCGTTTAGTGC	(originais)
4	seq. <i>dia1r</i> (R)	GCAAATGGATGTTCCAATGCAGGC	
5	<i>eef1a1l1</i> (F)	CCTGGGAGTGAAACAGCTG	Brandão, 2019 ¹⁵⁰
6	<i>eef1a1l1</i> (R)	GCCTCCAGCATGTTGTCAC	
7	<i>tal1</i> (F)	GGAGATGCGGAACAGTATGG	Veldman, 2012 ¹⁵¹
8	<i>tal1</i> (R)	GAAGGCACCGTTCACATTCT	
9	<i>lmo2</i> (F)	AAATGAGGAGCCGGTGGAT	Bertrand, 2008 ¹⁰¹
10	<i>lmo2</i> (R)	GCTCGATGGCCTTCAGAAA	
11	<i>gata1a</i> (F)	AAGATGGGACAGGCCACTAC	Ma, 2010 ¹⁵²
12	<i>gata1a</i> (R)	TGCTGACAATCAGCCTCTTTT	
13	<i>myb</i> (F)	TTTCTACCGAATCGAACAGATG	Ma, 2010 ¹⁵²
14	<i>myb</i> (R)	CAATCACCCGTTGGTCTTCT	
15	<i>runx1</i> (F)	CGTCTTCACAAACCCTCCTC	Ma, 2010 ¹⁵²
16	<i>runx1</i> (R)	TACTGCTTCATCCGGCTTCT	
17	<i>spi1b</i> (F)	GGGCAGTTTTTAACCAAAGATCA	Ma, 2010 ¹⁵²
18	<i>spi1b</i> (R)	CCCAAGAGTGATCGTTCTGAC	
19	<i>lcp1</i> (F)	ACTCACACAGGCGGGAAAAGG	Hu, 2014 ¹⁵³
20	<i>lcp1</i> (R)	GCCATCAGACACGCAAACACC	

2.1.3. Genotipagem de mutantes *dia1r* por *High-Resolution Melting*

Para genotiparmos as larvas provenientes de cruzamentos da linha mutante *dia1r* del5 utilizamos a técnica de *High-Resolution Melting* (HRM). O HRM permite identificar larvas homozigóticas, heterozigóticas e WT TU, como descrito por Nikita Zabinyakov e colaboradores¹⁵⁴. O DNA genômico (gDNA) foi isolado a partir de larvas de peixe-zebra aos 4 dpf. Cada larva foi recolhida individualmente em 50 microlitros (µl) de tampão *TE* (10 mM Tris-HCL, pH 8 e 1 mM EDTA, pH 8). As amostras foram aquecidas a 95°C durante 10 min, seguidamente adicionamos 5,0 µl de proteinase K (10 miligramas/mililitro; mg/ml) e incubamos a 55°C durante toda a noite. No dia seguinte, incubamos as amostras novamente a 95°C durante 10 min e conservamo-las a 4°C. Em cada reação para HRM utilizamos 1,0 µl de gDNA, 5,0 µl de SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad, ref. 1725201), 0,5 µl de cada *primer* para *dia1r* (**Tabela 2.2**) a 10 (micromolar) µM e 3,0 µl de água. As soluções foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 2 min a 4°C e analisadas na máquina de PCR em tempo real LightCycler96 (Roche). As condições de PCR para HRM encontram-se descritas na **Tabela 2.3**. Por fim, utilizamos o *software* LightCyler96 para analisar os dados.

Tabela 2.3. Condições da técnica de *High Resolution Melting*.

Passo	Temperatura	Duração	Ciclos
Pré-incubação	95°C	300 s	1
Amplificação	95°C	10 s	45
	65°C	10 s	
	72°C	10 s	
Curva de <i>Melting</i>	95°C	60 s	1
	40°C	60 s	
	65°C	1 s	
	97°C	1 s	

2.2. Extração de RNA e RT-qPCR

Analizamos a expressão relativa de marcadores moleculares de células hematopoiéticas em morfantes na fase do desenvolvimento de 19,5 hpf com recurso à técnica de PCR em tempo real (*real-time quantitative PCR* ou RT-qPCR), tal como descrito por Alvin Ma e colaboradores¹⁵². O RNA total foi extraído de quatro grupos de 50 embriões dos seguintes tipos: WT, WT injetados com MO, WT injetados com CoMO, mutantes heterozigóticos e mutantes homozigóticos. Após a recolha dos embriões, as amostras foram homogenizadas usando o reagente TRIzol (Ambion, ref. 15596026) e o RNA foi isolado utilizando o RNeasy Micro Kit (Qiagen, ref. 74004). A transcrição reversa foi realizada com o Advantage RT-for-PCR Kit (TaKaRa, ref. 639506), de acordo com o protocolo do fabricante. Para obter o DNA complementar (cDNA) foram utilizados os *oligo(dT) primers* (20 picomoles; pmol), os *random hexamer primers* (20 pmol) e 1 micrograma (µg) RNA, em cada reação.

A análise por RT-qPCR foi realizada para quantificar a expressão dos mRNAs característicos de células hematopoiéticas às 19,5 hpf. Para cada reação, utilizamos 2,0 µl de cDNA (10 ng), 3,0 µl de *primers* específicos (**Tabela 2.2**) a uma concentração de 1,0 µM e 10 µl de *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche, ref. 06924204001). A *fold change* de expressão dos genes *tal1* (GenBank: NM_213237.1), *lmo2* (GenBank: NM_131111.1), *myb* (GenBank: NM_001309822.1), *gata1a* (GenBank: NM_131234.2), *runx1* (GenBank: NM_131603.3) e *lcp1* (GenBank: NM_131320.3) foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁵⁵. Os valores de cada gene foram normalizados para a expressão do gene *housekeeping eef1a1l1* (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1*; GenBank: NM_131263.1)^{150,156}. As reações foram processadas num termociclador em tempo real QuantStudio 5 da Applied Biosystems (Thermo Fisher). As condições de RT-qPCR encontram-se descritas na **Tabela 2.4**. Finalmente, os dados foram analisados com o *software* Cloud 4.1 da Applied Biosystems (Thermo Fisher).

Tabela 2.4. Condições do RT-qPCR.

Passo	Temperatura	Duração	Ciclos
Pré-incubação	95°C	600 s	1
Amplificação	95°C	10 s	50
	60°C	13 s	
	72°C	20 s	
Curva de <i>Melting</i>	95°C	10 s	1
	65°C	60 s	
	97°C	1 s	
Arrefecimento	37°C	30 s	



2.3. Quantificação da microglia

2.3.1. Citometria de fluxo

Com a técnica de citometria de fluxo quantificamos o número de macrófagos e microglia fluorescentes presentes em cabeças e larvas inteiras de peixe-zebra aos 4 dpf. Para tal, utilizamos larvas da linha transgênica *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* que expressam DsRedx (fluorescência vermelha) sob a influência do promotor *mpeg1.1*, sendo este específico para macrófagos e microglia⁸⁰. Esta linha apresenta a sequência codificante da proteína DsRedx entre dois locais *LOXP* seguida pela sequência da proteína fluorescente verde EGFP. Somente na presença da enzima Cre recombinase ocorre recombinação genética nos locais *LOXP* e o promotor *mpeg1.1* passa a activar a transcrição de *EGFP*^{80,157}. Esta possibilidade alternativa não foi explorada no nosso projeto, pelo que a microglia e os macrófagos sempre se apresentaram com fluorescência vermelha resultante da expressão de DsRedx.

Para analisar o efeito do *knockdown* de *dia1r* no número de macrófagos e células da microglia, começamos por injetar embriões homozigóticos transgênica *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* com MO e CoMO na concentração de 1 ng, como descrito anteriormente. A partir das 22 hpf incubamos diariamente os embriões com 0,003% de 1-fenil 2-tioureia (PTU; Sigma-Aldrich, ref. P7629) em E3. Aos 4 dpf, procedemos à recolha das cabeças das larvas de acordo com o protocolo descrito por Julie Mazzolini e colaboradores¹⁵⁸. Assim, as larvas foram sacrificadas numa solução contendo 0,6 mM de tricáina (MS-222; Sigma-Aldrich, ref. E10521); 0,003% de PTU e 500 mM de Hepes (VWR, ref. 441485H) em E3, a 4°C. As cabeças foram cortadas pela zona anterior ao saco vitelino utilizando um bisturi, e transferidas para tubos de 2 ml contendo a mesma solução a 4°C. As etapas de homogeneização e preparação das amostras foram previamente otimizadas. Para tal baseamo-nos num protocolo bastante utilizado no nosso grupo de investigação para outros tipos celulares do peixe-zebra. Neste sentido, incubamos as cabeças numa solução de PBS contendo a enzima liberase (5,0 mg/ml; Roche, ref. 05401119001), e procedemos a vários ciclos de agitação e pipetagem manual

durante 20 min a 28°C. Esta temperatura foi escolhida por corresponder à temperatura em que os peixes-zebra e as larvas são mantidos, pois pressupomos que os danos celulares são assim minimizados.

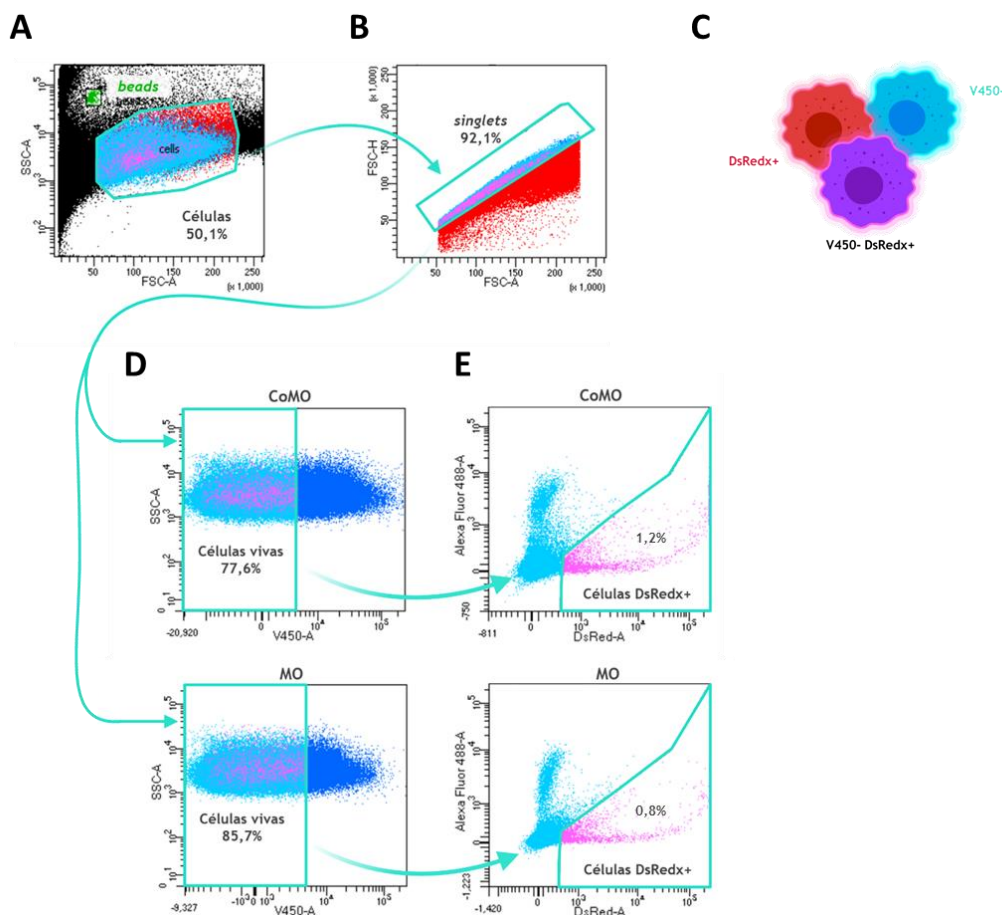


Figura 2.1. Estratégia de *gating* utilizada na quantificação de macrófagos e microglia por citometria de fluxo.

A análise do número de macrófagos e microglia por citometria de fluxo foi realizada em larvas *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* aos 4 dpf injetadas com CoMO ou MO. **(A)** Distinção entre as células e os detritos em função de seu tamanho (FSC-A) e da sua granularidade (SSC-A). Foi desenhado um *gate* para selecionar a população celular e foram identificadas as *beads* de contagem. **(B)** A população de células selecionada anteriormente foi analisada com FSC-H (*forward scatter height*) e SSC-A para selecionar células individuais (*singlets*) e excluir a população de agregados celulares. **(C)** Os macrófagos e a microglia das larvas *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* expressam a proteína DsRedx, ficando marcados com fluorescência vermelha (DsRedx+). Para identificar as células vivas utilizamos a sonda de viabilidade *Fixable Viability Stain 450* (FVS450) que lhes confere fluorescência azul suave (V450-). As células quantificadas foram as que apresentavam simultaneamente as duas fluorescências (V450-DsRedx+). **(D)** A partir da população de células individuais foi selecionado um *gate* que contém a população de células vivas. **(E)** Dentro da população de células vivas foram selecionadas as células que apresentavam fluorescência vermelha. Finalmente obtivemos a população de interesse e a percentagem de células DsRedx+ em cada amostra foi automaticamente determinada pelo *software* FACSDiva do equipamento FACS Aria III, o que nos permite fazer a comparação entre os valores de morfantes MO e CoMO.

Em seguida, passamos as amostras homogeneizadas através de filtros celulares por centrifugação a 300g durante 5 min a 4°C para reduzir o número de agregados celulares. As células foram depois ressuspensas em PBS 1x com 10% FBS (soro fetal bovino) e incubadas com a sonda de viabilidade *Fixable Viability Stain 450* (FVS450; BD Horizon, ref. 562247)^{158,159}. Finalmente, as amostras foram processadas no citômetro de fluxo FACS Aria III da BD Biosciences. A estratégia de *gating* utilizada encontra-se representada na **Figura 2.1**. Este processamento permitiu-nos distinguir as células

individuais dos fragmentos celulares, dupletos e aglomerados celulares em função do seu tamanho (FSC-A) e da sua granularidade (SSC-A). A partir desta população celular, um *gate* foi desenhado para analisar as células vivas (FVS450-; com fluorescência azul suave) separadamente das células mortas (FVS450+; com fluorescência azul mais intensa)¹⁵⁹. Os *gates* correspondentes às populações de macrófagos e microglia foram desenhados de acordo com os parâmetros das células florescentes provenientes de larvas não injetadas. Finalmente, a microglia e os macrófagos (DsRedx+) de larvas injetadas com MO ou CoMO foram quantificados utilizando *beads* de 10 micrómetros (μm ; Sure Count, ref. CC10N-10) como referência (**Figura 2.1**). Para a análise dos dados de citometria de fluxo e cálculo do número de microglia e macrófagos foi utilizado o *software* FACSDiva 8.0.1 (BD Biosciences).

2.3.2. Coloração com *Neutral Red* e quantificação com SpotNGlia

Avaliamos o número de células da microglia no cérebro de larvas de peixe-zebra morfantes e mutantes para *dia1r* recorrendo ao protocolo de coloração com *Neutral Red* (NR; Sigma-Aldrich, ref. N-4638)¹¹³. A quantificação foi realizada em larvas de embriões AB injetados com MO ou CoMO e não injetados (WT), e em larvas resultantes de um cruzamento entre peixes heterozigóticos da linha mutante *del5* (WT, heterozigóticas e homozigóticas). Para impedir a pigmentação, incubamos os embriões às 22 hpf com 0.003% de PTU em E3. Aos 4 dpf as larvas foram incubadas numa solução de NR (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) em E3 durante 5 h.

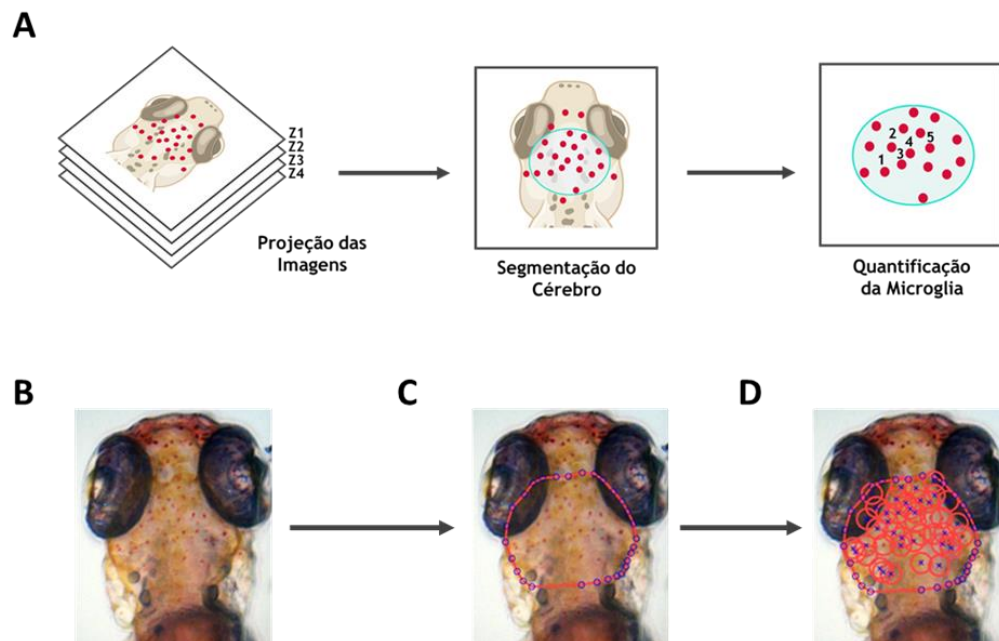


Figura 2.2. O *software* SpotNGlia identifica e quantifica o número de células da microglia no teto óptico de forma semiautomática.

(A) Representação esquemática do processamento e análise do *software* SpotNGlia. (B) Exemplo de uma imagem *z-stack* de uma larva corada com *Neutral Red* (NR). (C) Exemplo da segmentação realizada pelo SpotNGlia da região do cérebro de uma larva que contém o teto óptico. (D) Exemplo da identificação de células individuais e sua quantificação realizada pelo SpotNGlia e pelo operador. Cada célula NR+ é selecionada e apresentada com círculo vermelho pelo programa. Os círculos vermelhos com uma cruz azul representam as células NR+ selecionadas pelo operador. Adaptado de Kuil e colaboradores¹¹³.

Para a aquisição de imagens, as larvas foram anestesiadas com 0,6 mM tricáína em meio E3 e montadas com o lado dorsal voltado para baixo em moldes de agarose a 2,0% com poços em forma de V. Foram adquiridas 10 imagens em sequência no eixo dos Z (z-stacks) com a lupa Zeiss Lumar V12 numa ampliação de 80x. Deste modo, conseguimos analisar as células da microglia presentes numa região do cérebro das larvas de peixe-zebra.

Para a quantificação da microglia utilizamos o *software* SpotNGlia desenvolvido em MATLAB R2017b (MathWorks, Natick), tal como descrito por Laura Kuil e colaboradores¹¹³. A estratégia de processamento do SpotNGlia é apresentada na **Figura 2.2**. O código completo e a descrição técnica de como usar o programa estão disponíveis no GitHub (<https://github.com/samuelgeurts/SpotNGlia>).

2.3.3. Análise *in vivo* da microglia por microscopia confocal

Utilizamos a linha transgênica *Tg(mpeg1.1: LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* para quantificar a microglia presente no teto óptico do cérebro de larvas morfantas aos 4 dpf, de acordo com o procedimento descrito por Jin Xu e colaboradores¹⁶⁰. Para tal, injetamos embriões homozigóticos desta linha com morfollinos a uma concentração de 1 ng, como descrito anteriormente (**Capítulo 2.1**). A partir das 22 hpf, incubamos diariamente os embriões com 0,003% de PTU em E3. Para a aquisição de imagens *in vivo*, as larvas de peixe-zebra com 4 dpf foram anestesiadas com 0,6 mM tricáína e incluídas em 1,0% de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma, ref. A9414) preparada em meio E3.

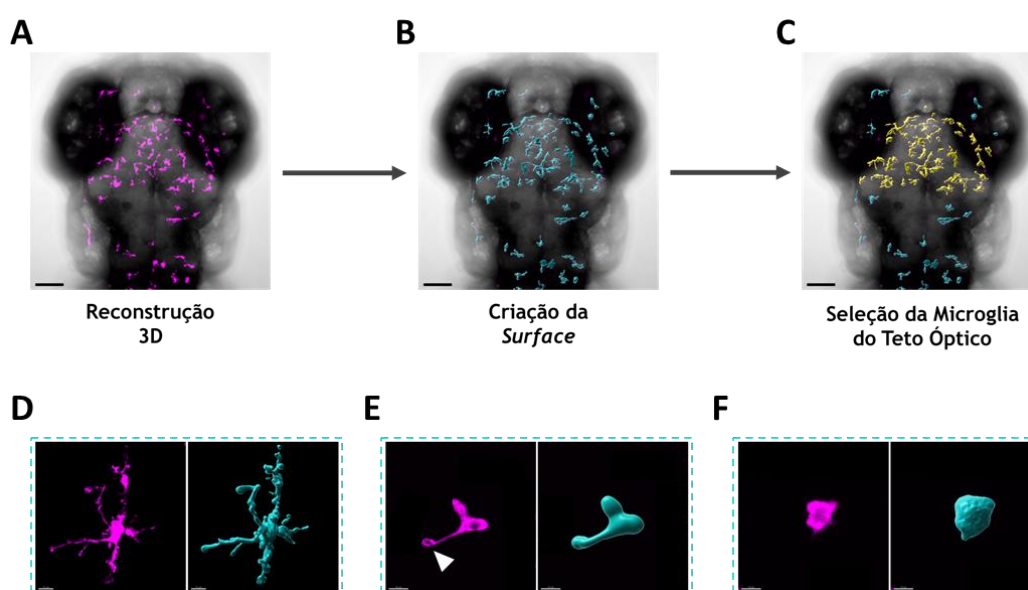


Figura 2.3. O *software* Imaris identifica e quantifica a microglia em imagens de microscopia confocal.

(A) Exemplo da reconstrução 3D da cabeça de uma larva realizada automaticamente pelo *software* Imaris, a partir de imagens *in vivo* de microscopia confocal com a objetiva de 10x/Abertura numérica (NA) 0,30. As células da microglia estão apresentadas a magenta. (B) Exemplo da *surface* criada pelo Imaris para identificar as células da microglia de uma larva (estruturas azuis). (C) Exemplo da seleção da microglia presente no teto óptico de uma larva (estruturas amarelas). As imagens adquiridas com a objetiva de 40x/ NA 1,20 permitiram identificar os três tipos de morfologia que a microglia apresenta durante o desenvolvimento cerebral do peixe-zebra (D-F). (D) Exemplo de uma célula ramificada. (E) Exemplo de uma célula ativada, onde é possível observar uma vesícula fagocítica na extremidade inferior (seta branca). (F) Exemplo de uma célula totalmente ativada (ameboide). Barras de escala: 80 μ m em (A-C); 10 μ m em (D-F).

As imagens de fluorescência da microglia no cérebro das larvas foram adquiridas por microscopia confocal (Zeiss LSM710; objetiva 10×/NA 0,3 e objetiva 40×/NA 1,20; laser de 561 nanômetros). Para a análise de todo o teto óptico do cérebro larvar, capturamos sequências de 30 imagens no eixo dos Z (30 *z-stacks*), com intervalo de 3 μm e com uma profundidade 87-90 μm , com a objetiva de 10x. As imagens de confocal foram processadas no *software* Imaris (<https://imaris.oxinst.com>), com o qual foi criada uma *surface* em 3D que permitiu identificar cada célula da microglia individualmente, tal como em Kelda Chia e colaboradores¹⁶¹. O esquema do processamento das imagens pelo Imaris está representado na **Figura 2.3 A-C**. Foram assim identificadas e quantificadas as células da microglia presentes no teto óptico de 6-7 larvas de cada grupo experimental. As imagens com a objetiva de 40x permitiram a observação da morfologia da microglia (**Figura 2.3 D-F**).

2

2.4. Desenho experimental e análise estatística

Os animais foram repartidos aleatoriamente em grupos experimentais antes do início de cada experiência. A análise de dados para cada grupo experimental foi realizada “às cegas”, no sentido em que só após a obtenção dos resultados estar concluída é que foi realizada a respetiva associação.

Todos os dados apresentados são referentes a pelo menos duas experiências independentes. Todos os dados de cada grupo experimental são apresentados como média $\pm$ s.e.m (*standard error of the mean*). A análise estatística foi realizada usando o programa Prism 8 (GraphPad). Resumidamente, os conjuntos de dados foram avaliados quanto à normalidade e os testes estatísticos apropriados foram realizados conforme indicado nas legendas das figuras. As figuras foram montadas recorrendo aos softwares ImageJ (<https://imagej.net>) e Biorender (<https://biorender.com>).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Geração de peixes-zebra *knockdown* e *knockout* para o gene *dia1r*

Para investigar o possível papel do gene *dia1r* no desenvolvimento da microglia, projetamos duas abordagens genéticas distintas. Na primeira abordagem, o *knockdown* do gene *dia1r* foi realizado através da injeção de embriões de uma ou duas células com um morfolino (MO)¹⁶² que inibe a tradução da proteína Dia1r (**Figura 3.1.A**). O local alvo do MO é o início da tradução (AUG) do mRNA do gene *dia1r*, apresentado no diagrama da **Figura 3.1.B**. De forma a garantir que os fenótipos observados se devem exclusivamente ao efeito do MO experimental, desenhamos um morfolino controlo (CoMO) que, devido às suas cinco mutações pontuais, não é capaz de se ligar ao mRNA do *dia1r*. A interação de cada morfolino com o mRNA está representada na **Figura 3.1.C**.

Começamos por otimizar a concentração de morfolinóis a ser injetada para gerar peixes morfantes para *dia1r*. Em embriões AB da mesma postura injetamos soluções com 1 ng ou 2 ng de MO ou de CoMO. Em seguida, avaliamos a taxa de mortalidade dos embriões injetados com cada uma das concentrações de MO e CoMO e de embriões não injetados (WT). Pela análise da **Figura 3.1.D** podemos observar que, em ambas as concentrações, as percentagens de sobrevivência são menores nos embriões injetados com MO do que nos injetados com CoMO, equivalente a uma maior taxa de mortalidade nos embriões injetados com a maior concentração, o que indica que o morfolino MO pode ter um efeito na sobrevivência. Estas observações levaram-nos a escolher a quantidade de 1 ng nas experiências subsequentes com morfantes, uma vez que os embriões injetados com esta quantidade de MO ou CoMO apresentam uma maior taxa de sobrevivência do que os morfantes injetados com 2 ng. Adicionalmente, não verificamos diferenças no número de microglia (**Capítulo 3.3.2**) entre larvas injetadas com cada uma das duas concentrações (dados não apresentados), sendo a mais baixa suficiente para causar um fenótipo na quantidade de células da microglia.

Na segunda abordagem, geramos duas linhas *knockout* para o gene *dia1r* com o objetivo de inibir a tradução da proteína Dia1r. Para tal recorremos ao sistema de edição do genoma CRISPR-Cas9^{143,146}, em colaboração com a *Fish Platform* da Fundação Champalimaud. O sistema CRISPR é formado por dois componentes, o gRNA e a nuclease Cas9¹⁶³. Desenhamos um gRNA que direciona a Cas9 para uma sequência alvo específica da região ATG do gene *dia1r* (**Figura 3.2.A**). A proteína Cas9 reconhece a pequena sequência PAM, adjacente à sequência alvo, e quebra a dupla cadeia DNA. Esta quebra possibilita o aparecimento de mutações durante os mecanismos de reparação do DNA¹⁶³.

O gRNA e a proteína Cas9 foram injetados em simultâneo em embriões WT TU de uma célula (F0). As larvas F0 foram colocadas a crescer e quando atingiram a idade adulta constituíram os fundadores F0. Estes fundadores foram cruzados com adultos WT TU e a descendência F1 foi criada até à idade adulta (fundadores F1). Os mutantes *dia1r* F1 adultos foram genotipados por PCR e as imagens em gel QIAxcel permitiram identificar os peixes que apresentavam possíveis mutações (**Figura 3.2.B e D**). A sequenciação do DNA de alguns animais confirmou a presença uma deleção de 5 nt (del5) que causa uma alteração *frameshift* no códon seis e o aparecimento prematuro de um códon STOP no códon 30, indicada na **Figura 3.2.C**. Numa segunda linha de peixes-zebra, a sequenciação mostrou uma deleção de 13 nt (del13) e duas mutações pontuais no gene *dia1r* que levam à eliminação do ATG, a uma

alteração *frameshift* e ao aparecimento prematuro de um codão STOP, mutações representadas na **Figura 3.2.E**. Deste modo, foram geradas a primeira linha mutante *dia1r* designada del5, e a segunda linha mutante *dia1r* designada del13.

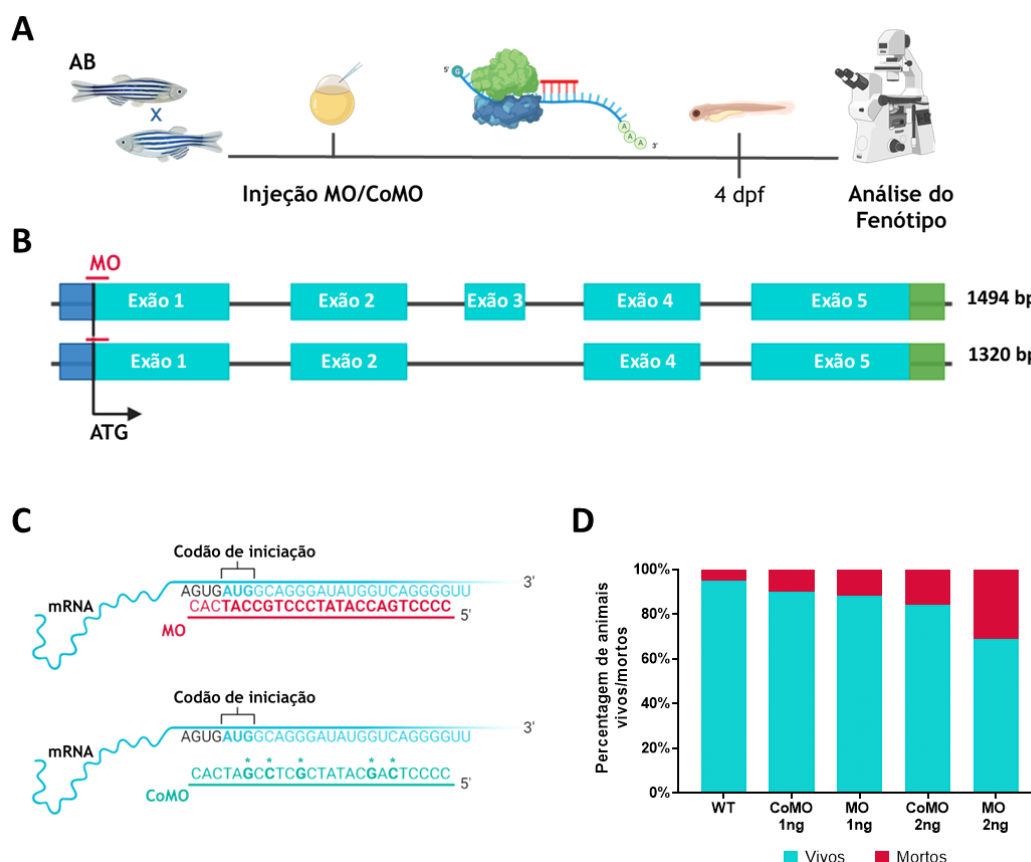


Figura 3.1. Estratégia de *knockdown* do gene *dia1r* em peixe-zebra.

(A) Representação esquemática da criação das larvas de peixe-zebra morfantas pela injeção de morfolidos. Injetamos o morfolino experimental (MO) e o morfolino controle (CoMO) em embriões na fase de desenvolvimento de uma ou duas células e analisamos o fenótipo aos 4 dias após a fertilização (dpf). (B) Esquema da estrutura do gene *dia1r* do peixe-zebra. As caixas azuis escuras e as verdes representam as regiões 5'UTR e 3'UTR não traduzidas respetivamente, enquanto a região traduzida é mostrada com caixas azuis claras. O local de ligação do MO está representado pelo traço vermelho. (C) Estratégia da interação dos morfolidos com o mRNA do *dia1r*. O MO foi desenhado para bloquear a tradução da proteína Dia1r ao nível da região do codão de iniciação (AUG). O CoMO apresenta 5 mutações pontuais para impedir a sua ligação ao mRNA (asteriscos verdes). (D) Análise da taxa de mortalidade dos morfantas para o *dia1r*. Os embriões foram injetados com volumes de 1,4 nl de solução contendo 1 ng ou 2 ng de cada morfolino. A percentagem de mortalidade foi superior nas injeções com maior concentração de morfolidos. ATG, início da região codificante; bp, pares de bases.

Selecionados os peixes-zebras mutantes del5, foram realizados novos cruzamentos para obter um grupo de indivíduos homozigóticos e outro grupo de heterozigóticos. Em seguida, os embriões resultantes foram importados para a *Fish Facility* do CEDOC, onde estabelecemos populações de peixes-zebra del5 homozigóticos e heterozigóticos. A descendência resultante de cruzamentos entre adultos heterozigóticos del5 e entre homozigóticos del5 (*incross*) não apresentou mortalidade significativa nem malformações durante o desenvolvimento, tendo sido possível obter peixes adultos mutantes viáveis e férteis. A linha mutante del13 estará estabelecida em breve.

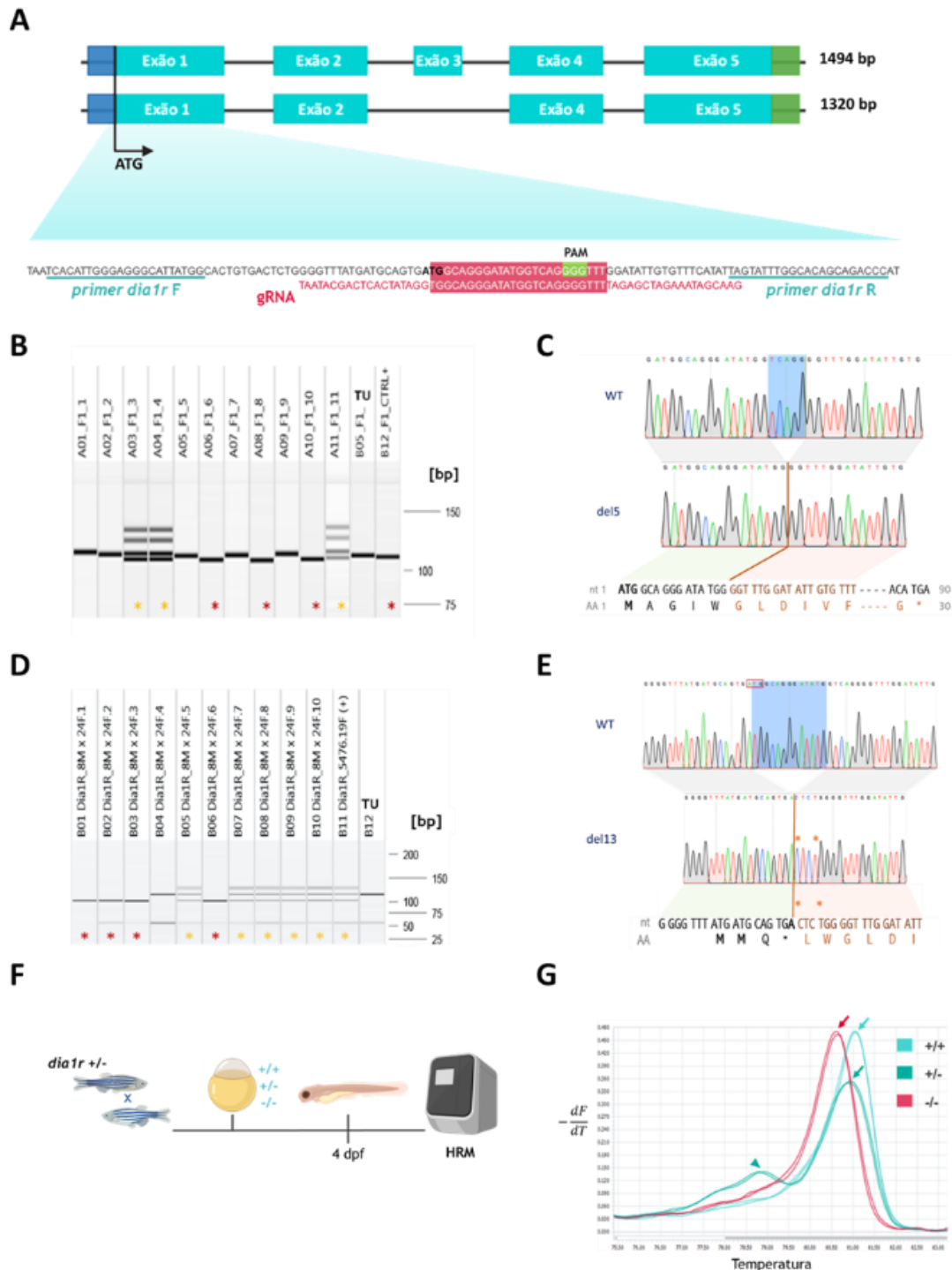


Figura 3.2. Geração de peixe-zebra mutantes *dia1r* pelo sistema de edição genética CRISPR-Cas9.

(A) Representação esquemática da estratégia de reconhecimento genético direcionado. Um gRNA foi desenhado para atingir a região ATG do gene *dia1r* (destacado vermelho) recorrendo ao programa CRISPRscan (<http://www.crisprscan.org>). A sequência de reconhecimento da proteína Cas9 (PAM) encontra-se representada pela caixa verde claro. Os sublinhados a turquesa mostram a posição dos primers de genotipagem. Foram geradas duas linhas mutantes em que uma apresenta uma deleção de 5 bp (del5; B-C) e a outra apresenta uma deleção de 13 bp (del13; D-E). As genotipagens pelo sistema QIAxcel foram realizadas pelos nossos colaboradores da Fundação Champalimaud. (B) Genotipagem de mutantes *dia1r* adultos (F1) del5 por PCR (amostras de DNA da barbatana caudal) e imagem em gel QIAxcel. A amostra de controlo WT (TU) exhibe uma única banda de um fragmento com 117 bp (primers indicados em A), enquanto as amostras de mutantes mostraram uma banda de um fragmento mais pequeno nos homozigóticos (asteriscos vermelhos) e quatro bandas nos heterozigóticos (duas homoduplexes e duas heteroduplexes; asteriscos amarelos). (C) Os gráficos

de sequenciação do DNA de homozigóticos mostram uma deleção de 5 bp no gene *dia1r* de mutantes de peixe-zebra (destaque a azul na sequência WT) que causa uma alteração *frameshift* no codão 6 e o aparecimento prematuro de um codão STOP (TGA) no codão 30 (asterisco). **(D)** Imagem QIAxcel da genotipagem de mutantes *dia1r* adultos (F1) del13 por PCR. As amostras de homozigóticos (asteriscos vermelhos) apresentam uma banda de um fragmento mais pequeno do que a banda controlo. As amostras de heterozigóticos (asteriscos amarelos) apresentam duas bandas de homoduplexes (WT e mutante) e duas bandas próximas mais pesadas correspondentes aos heteroduplexes. **(E)** A sequenciação do DNA dos mutantes homozigóticos del13 mostrou uma deleção de 13 bp e duas mutações pontuais (asteriscos amarelos) no gene *dia1r*, o que leva ao desaparecimento do ATG original, a uma alteração *frameshift* e ao aparecimento prematuro de um codão STOP (asterisco preto). **(F)** Esquema da abordagem de genotipagem de larvas mutantes del5 por HRM. Nas experiências de quantificação da microglia dos mutantes del5 (ver **Capítulo 3.3**), as larvas utilizadas resultaram de cruzamentos entre peixes heterozigóticos, e a sua genotipagem por HRM foi realizada após terem sido recolhidas as imagens da coloração com *Neutral Red*. **(G)** Representação exemplificativa dos gráficos de HRM. A sequência heterozigótica (+/-) é identificada pelo pico duplo (representado pelo triângulo e seta turquesa), a sequência homozigótica (-/-) por um pico de menor temperatura (seta vermelha), e a sequência WT (+/+) por um pico de maior temperatura (seta azul clara). WT, *wild-type*; nt, nucleotídeo; AA, aminoácido.

3

A linha mutante del5 foi utilizada nas experiências de quantificação da microglia descritas no **Capítulo 3.3**. Nestas experiências, foram utilizados embriões provenientes de cruzamentos de mutantes adultos heterozigóticos (**Figura 3.2.F**). A identificação das larvas homozigóticas, heterozigóticas e WT TU foi realizada com recurso à técnica de HRM¹⁶⁴. A **Figura 3.2.E** apresenta um exemplo das curvas de *melting* normalizadas de HRM do DNA de larvas resultantes de um cruzamento de peixes heterozigóticos. As larvas homozigóticas (-/-) são identificadas por um pico de menor temperatura (seta vermelha do gráfico) e as larvas WT (+/+) são identificadas por um pico de maior temperatura (seta azul clara do gráfico). As larvas heterozigóticas (+/-) são identificadas pelo aparecimento de um pico de temperatura intermédia (seta turquesa do gráfico) e outro pico correspondente à temperatura dos heteroduplexes (representado pelo triângulo turquesa). Deste modo, o HRM demonstrou ser um método rápido e eficaz para genotipar os mutantes *dia1r* del5.

3.2. Função do gene *dia1r* nos precursores da microglia

Anteriormente, os nossos ensaios identificaram a presença do gene *dia1r* nos progenitores hematopoiéticos (**Figura 1.4**), sugerindo que este gene pode estar envolvido na ontogenia das células da microglia. Neste sentido, investigamos o efeito da supressão do *dia1r* nos progenitores da microglia do peixe-zebra. Este estudo foi realizado em embriões morfantes, estando atualmente a ser implementado o mesmo procedimento para a análise de embriões mutantes del5 e WT TU.

Para tal, recolhemos embriões morfantes na fase do desenvolvimento de 19,5 hpf (com 21 sómitos) e analisamos a expressão relativa de marcadores moleculares de células hematopoiéticas por RT-qPCR (**Figura 3.3.A**). A **Figura 3.3.B** ilustra a localização das células que expressam os genes *tal1*, *lmo2*, *gata1a*, *myb*, *runx1*, *spi1b* e *lcp1* nesta fase embrionária⁶⁸. Para investigar o impacto do *knockdown* de *dia1r* na hematopoiese primitiva, examinamos a expressão dos marcadores de progenitores hematopoiéticos *tal1* e *lmo2*, que são fatores de transcrição necessários para o desenvolvimento e a diferenciação dos hemangioblastos¹⁶⁵. Para investigar o efeito do *knockdown* de *dia1r* na diferenciação de progenitores das linhagens eritroide e mielóide, analisamos a expressão dos genes *gata1a*⁸⁹ e *spi1b*⁷⁸, respetivamente. O gene *lcp1* foi usado como marcador de macrófagos primitivos^{67,166}, enquanto que os genes *myb*¹⁶⁷ e *runx1*¹⁰⁴ foram usados como marcadores das células precursoras das HSPCs, responsáveis pela geração de células hematopoiéticas definitivas. A

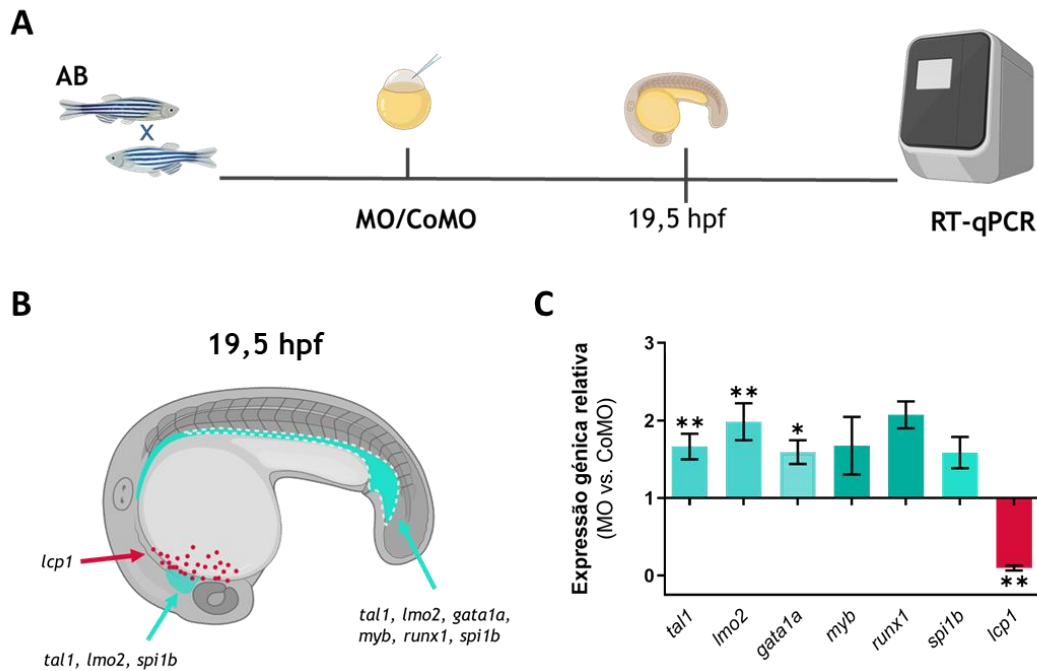


Figura 3.3. Efeito do *knockdown* do gene *dia1r* no desenvolvimento hematopoiético do peixe-zebra.

(A) Representação esquemática da abordagem experimental. Embriões de peixe-zebra com uma a duas células foram injetados com 1 ng de morfolino experimental (MO) ou controle (CoMO) e recolhidos às 19,5 horas após a fertilização (hpf) para análise da expressão genética de marcadores hematopoiéticos por RT-qPCR. (B) Às 19,5 hpf, os primeiros progenitores hematopoiéticos encontram-se na massa celular intermédia (*intermediate cell mass* ou ICM; identificada pelo tracejado branco) e expressam *tal1*, *lmo2*, *gata1a* e *spi1b*, enquanto que os precursores mieloides estão presentes na ilhota de sangue rostral (*rostral blood island* ou RBI) e expressam *tal1*, *lmo2* e *spi1b*. Os marcadores *myb* e *runx1* identificam as células progenitoras das HSPCs. Os macrófagos primitivos em diferenciação expressam *lcp1*. (C) Expressão relativa de marcadores hematopoiéticos (*tal1*, *lmo2*, *gata1a*, *myb*, *runx1*, *spi1b* e *lcp1*) por RT-qPCR em embriões morfantes *dia1r* (4 grupos de 50 embriões cada; *eef1a1l1* foi usado como gene *housekeeping*). Em embriões injetados com MO, os marcadores de hemangioblastos *tal1* e *lmo2*, e o marcador de precursores eritroides *gata1a* têm uma expressão significativamente superior à dos embriões injetados com CoMO. A expressão do marcador *lcp1* de macrófagos primitivos é significativamente mais baixa nos embriões morfantes MO em comparação com os CoMO. Embora não seja estatisticamente significativa, foi observada uma tendência para a expressão mais elevada dos marcadores de progenitores hematopoiéticos *runx1*, *myb* e *spi1b* em embriões morfantes MO. Todos os valores foram normalizados para CoMO e analisados usando o teste estatístico *Student's t-test* (N=4 *p-value <0,05 e **P<0,01. As barras de erro representam s.e.m.). HSPCs, *hematopoietic stem/progenitor cells* ou células estaminais/progenitores hematopoiéticas.

expressão relativa dos genes *tal1*, *lmo2*, *gata1a*, *myb*, *runx1*, *spi1b* e *lcp1* encontra-se representada na **Figura 3.3.C**, e corresponde aos resultados de quatro replicados biológicos.

A *fold change* de expressão dos genes *tal1* e *lmo2* é significativamente mais elevada em embriões injetados com MO relativamente aos injetados com CoMO. Assim, podemos concluir que o bloqueio da tradução do gene *dia1r* parece causar uma acumulação de progenitores hematopoiéticos às 19,5 hpf. A expressão do gene *gata1a* é também significativamente superior nos morfantes MO, sugerindo que estes contêm um maior número de progenitores da linhagem eritroide do que os CoMO. Foi ainda observada uma tendência para uma expressão mais elevada dos marcadores *runx1*, *myb* e *spi1b* em embriões morfantes MO, que não se demonstrou estatisticamente significativa. No entanto, esta tendência sugere que possivelmente o número de células precursoras das HSPCs é superior nos morfantes MO. O mesmo pode ser especulado em relação aos progenitores mieloides que expressam

spi1b. Contrariamente, a expressão de *lcp1* às 19,5 hpf é significativamente mais baixa em embriões morfantes MO, sugerindo que estes contêm menos macrófagos primitivos do que os morfantes CoMO.

Em resumo, os resultados de RT-qPCR para os marcadores analisados parecem indicar que o gene *dia1r* regula a dimensão das populações de progenitores hematopoiéticos das linhagens primitiva e definitiva. Por outro lado, a análise da expressão do gene *lcp1* permite levantar a hipótese de que o gene *dia1r* promove a diferenciação de macrófagos primitivos, parte dos quais vão dar origem à microglia. Estas observações levaram-nos assim a investigar o possível efeito da perda de função do gene *dia1r* no número de células da microglia em larvas de peixe-zebra.

3

3.3. Quantificação da microglia em morfantes e mutantes para o gene *dia1r*

Estabelecidas as duas abordagens de perda de função do gene *dia1r* (descritas no **Capítulo 3.1**), e com a evidência de que este gene parece atuar ao nível dos precursores da microglia, procedemos à avaliação do número de células da microglia no cérebro de larvas de peixe-zebra morfantes e mutantes para *dia1r* aos 4 dpf. Nesta fase do desenvolvimento, a microglia encontra-se em proliferação e completamente funcional no cérebro da larva^{76,168}, contribuindo já para o seu desenvolvimento. Dado que o papel fisiológico do *dia1r* é ainda desconhecido, optamos por fazer uma análise quantitativa detalhada utilizando o máximo de técnicas ao nosso dispor. Assim, o número de células da microglia foi quantificado recorrendo a técnicas de citometria de fluxo e análise de imagens de cérebros de larvas com microglia corada com *Neutral Red* (microscopia de luz convencional) ou com uma proteína fluorescente (microscopia confocal).

3.3.1. Quantificação de macrófagos e microglia em morfantes para *dia1r* por citometria de fluxo

O gene *mpeg1.1* é expresso especificamente em macrófagos e microglia durante do desenvolvimento do peixe-zebra^{80,81}. Diversos estudos apresentaram linhas transgênicas de peixe-zebra baseadas no promotor *mpeg1.1*, demonstrando que este é capaz de direcionar a expressão do transgene especificamente para macrófagos primitivos e microglia, permitindo a sua visualização *in vivo*^{80,160}. Para este estudo, estabelecemos uma população de peixes homozigóticos da linha transgênica *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* na qual macrófagos e microglia expressam DsRedx (DsRedx+)¹⁶⁰. Para a análise do número de macrófagos e microglia por citometria de fluxo¹⁵⁸, injetamos embriões desta linha com 1 ng de MO ou CoMO para *dia1r*, e recolhemos larvas morfantes aos 4 dpf. Após o processamento das amostras, avaliamos o número de macrófagos e microglia presente em 10 larvas inteiras e em 50 cabeças de larvas MO e CoMO (**Figura 3.4.A**).

Para identificar a população de células vivas e eliminar as células mortas utilizamos a sonda de viabilidade FVS450¹⁵⁹. Nas experiências com amostras de larvas inteiras e com cabeças seguimos um protocolo experimental que preserva a integridade da membrana plasmática e obtivemos um valor médio de taxa de morte celular de 24,9%. Curiosamente, este valor é inferior ao obtido recentemente por Julie Mazzolini e colaboradores (26,7%)¹⁵⁸ utilizando um protocolo que permite isolar neurónios, macrófagos e microglia de cérebros de larvas de peixe-zebra. Do mesmo modo, o nosso método de

processamento das amostras pode vir a ser útil para isolar macrófagos e microglia e analisar o seu perfil de expressão gênica.

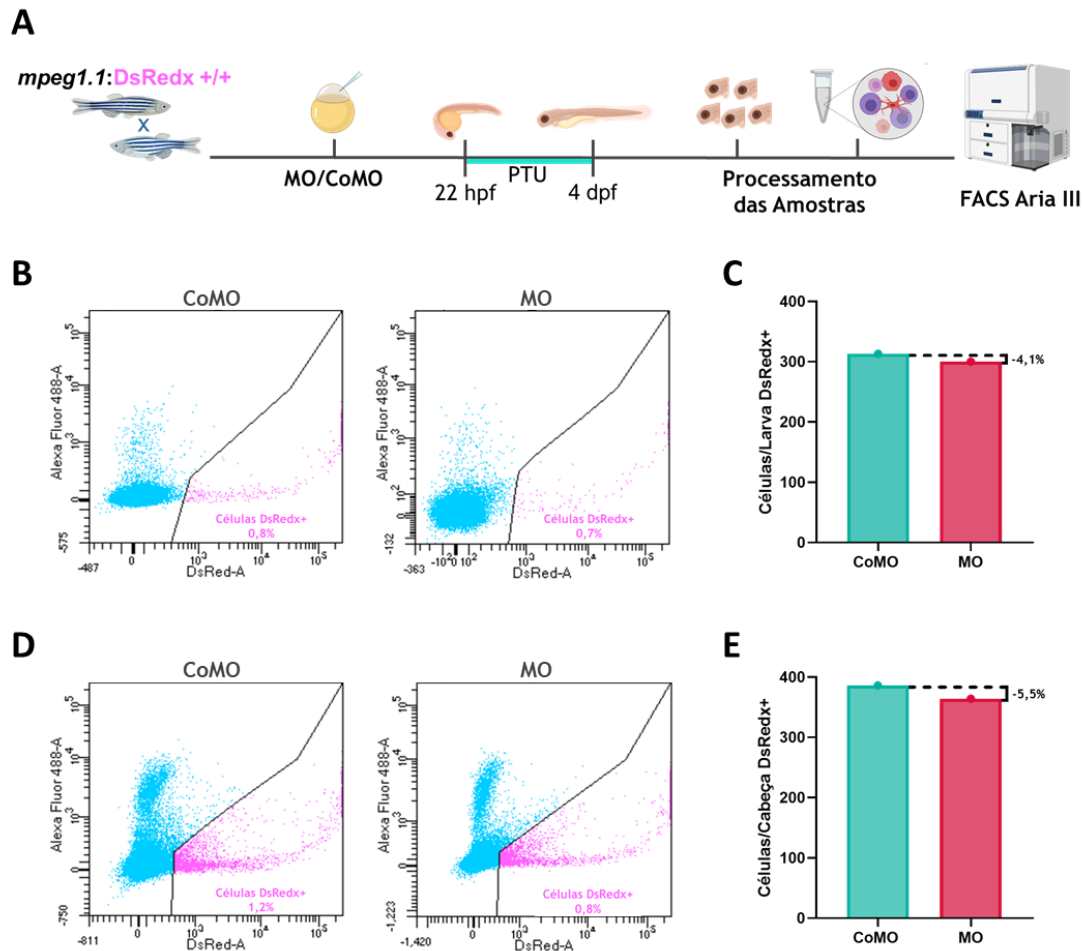


Figura 3.4. Quantificação do número de macrófagos e microglia por citometria de fluxo em peixes-zebra morfantes *dia1r*.

(A) Representação esquemática da abordagem experimental. Embriões da linha transgênica *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* foram injetados com 1 ng de morfolino *dia1r* experimental (MO) ou controle (CoMO). A partir das 22 hpf e até aos 4 dpf, os morfantes foram incubados diariamente com PTU para impedir a formação de pigmento. Foi realizada apenas uma experiência (N=1) de quantificação por citometria de fluxo para grupos de 10 larvas inteiras (B-C) e outra experiência (N=1) para grupos de 50 cabeças de larvas (D-E) aos 4 dpf. (B) Gráficos de citometria de fluxo para larvas inteiras morfantes. Foi escolhido um *gate* para selecionar a população de células DsRedx+ dentro do grupo de células vivas e que apresentam autofluorescência verde (detetada pelo detetor do corante fluorescente Alexa Fluor 488). Verificamos existir uma diferença de 0,1% na percentagem de macrófagos e microglia nas larvas morfantes *dia1r* MO em comparação com larvas CoMO. (C) Quantificação por citometria de fluxo do número médio de células DsRedx+ presentes em cada larva. Observamos uma tendência para um menor número de macrófagos e microglia nas larvas morfantes, evidente por uma redução em percentagem de 4,1% face ao número médio de células das larvas CoMO. (D) Gráficos de citometria de fluxo para cabeças de larvas morfantes. Observamos uma redução de 0,4% na percentagem de macrófagos e microglia nas cabeças de larvas morfantes *dia1r* MO em comparação com larvas CoMO. (E) Quantificação por citometria de fluxo do número médio de células DsRedx+ presentes em cada cabeça de larva. Observamos uma tendência para um menor número médio de macrófagos e microglia nas cabeças de larvas MO relativamente às CoMO, traduzido numa redução de 5,5%.

Com a técnica de citometria de fluxo foi possível identificar e determinar a percentagem de células fluorescentes DsRedx+ dentro da população de células vivas (FVS450-) presentes nas amostras (Figura 3.4.B e D). As percentagens foram adquiridas automaticamente pelo *software* FACSDiva do equipamento. Para obtermos uma quantificação absoluta utilizamos *beads* que permitem calcular o

número total de células DsRedx+ presentes na amostra. Com estes cálculos conseguimos determinar o número médio de células DsRedx+ presentes em cada larva ou em cada cabeça (**Figura 3.4.C e E**, respetivamente). Em seguida com os valores médios, determinamos a diferença na percentagem de células da microglia nas larvas morfantes MO relativamente às CoMO (para tal assumimos o número de células DsRedx+ das CoMO como 100%). Numa experiência inicial, quantificamos o número de macrófagos e microglia de larvas inteiras como forma de otimizar o procedimento experimental e investigar se o bloqueio da expressão do *dia1r* tem efeito na quantidade de células mieloides (**Figura 3.4.B e C**). A análise dos resultados representados na **Figura 3.4.B** mostra uma ligeira diferença na percentagem de células DsRedx+ entre os morfantes MO e os CoMO, sendo o número total de células DsRedx+ 4,1% menor nas larvas MO (**Figura 3.4.C**). No entanto, constatamos que as amostras controlo apresentavam um número de células muito inferior ao esperado (dados não apresentados), sugerindo que ocorreram perdas significativas de células viáveis durante o processamento das amostras.

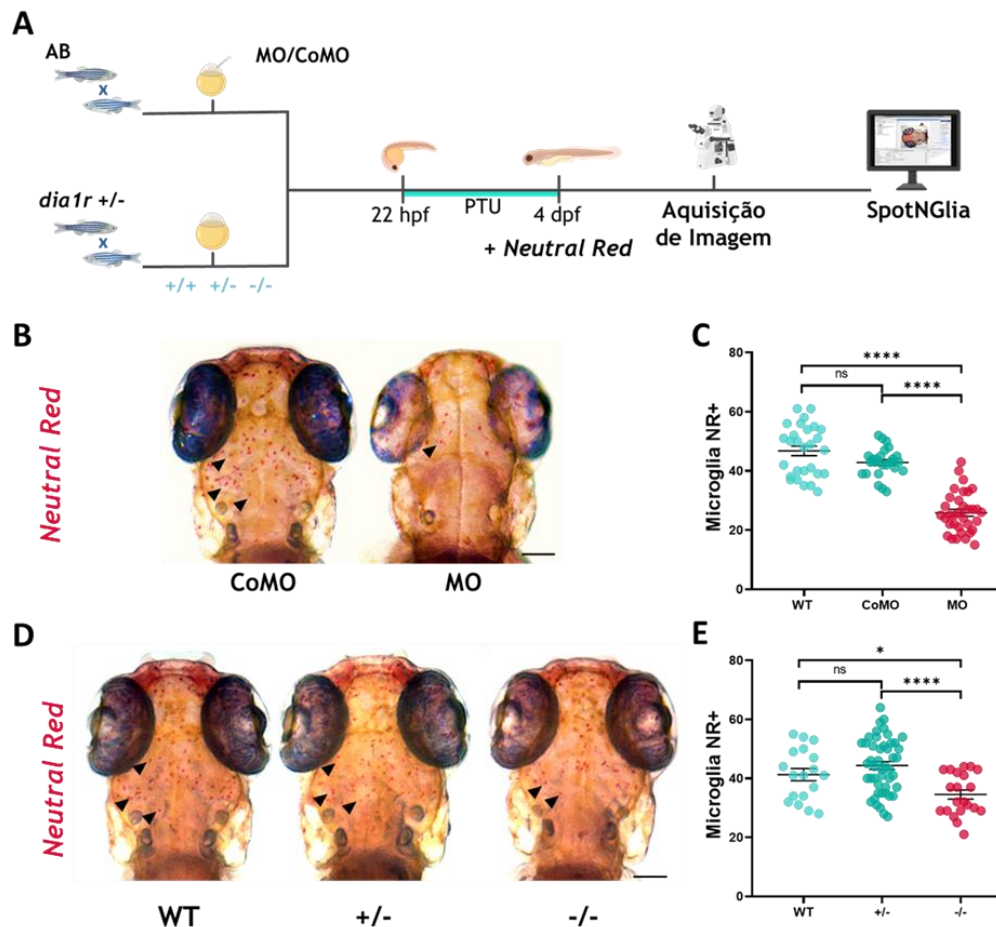
Seguidamente, quantificamos o número de células DsRedx+ presentes apenas nas cabeças de larvas morfantes (**Figura 3.4.D e E**). Pela observação da **Figura 3.4.D** constatamos que a percentagem de células DsRedx+ nas cabeças de larvas CoMO tem o valor de 1,2%. Este valor encontra-se próximo do descrito para a população de macrófagos e microglia presentes na cabeça de larvas com 8 dpf (1,56%), apresentado por um estudo recente realizado também numa linha transgénica *mpeg1.1*¹⁵⁸. Deste modo, podemos concluir que a população de macrófagos e microglia analisada corresponde à população real presente na cabeça das larvas, e que as perdas celulares foram mínimas. Na **Figura 3.4.D** podemos ainda observar que a percentagem de células DsRedx+ nas cabeças das larvas MO é inferior ao valor das larvas CoMO. Na quantificação em que utilizamos o mesmo número de *beads* como referência, observamos que as cabeças de larvas MO apresentam em média menos 21 células DsRedx+, correspondente a uma diferença de menos 5,5% em relação ao valor do CoMO (**Figura 3.4.E**). Assim, esta evidência aponta para um possível papel do gene *dia1r* no desenvolvimento dos macrófagos e da microglia. No entanto, teremos de analisar outros replicados biológicos para confirmar que as diferenças entre as larvas morfantes MO e CoMO são estatisticamente significativas.

3.3.2. Quantificação da microglia de morfantes e mutantes para *dia1r* corada com *Neutral Red*

As larvas de peixe-zebra são relativamente pequenas, particularmente fáceis de manipular e transparentes, sendo extremamente adequadas para estudos genéticos e de análise de imagens *in vivo*¹⁶⁹. Uma forma eficaz de identificar a microglia presente no cérebro das larvas de peixe-zebra é utilizar a coloração *Neutral Red* (NR). Este corante vital é absorvido por endocitose e acumula-se nos lisossomas de células altamente endocíticas, marcando intensamente macrófagos e microglia⁷⁵. Para além disto, foi descrito que este corante confere às células da microglia uma coloração vermelha mais forte do que a de outros macrófagos^{75,113}. Assim, avaliamos o número de células da microglia no cérebro de larvas de peixe-zebra morfantes e mutantes para *dia1r* recorrendo ao protocolo de coloração com NR e ao *software* SpotNGlia. A quantificação foi realizada em larvas morfantes MO, CoMO e WT AB, e em larvas resultantes de um cruzamento entre peixes heterozigóticos da linha mutante del5 (WT TU,

heterozigóticas e homozigóticas). As larvas foram coradas com NR aos 4 dpf e visualizadas numa lupa estereoscópica para a aquisição de imagens das suas cabeças. Em seguida, as imagens foram processadas no *software* SpotNGlia com o qual se realizaram as quantificações da microglia (**Figura 3.5.A**). As larvas provenientes de cruzamentos entre peixes mutantes heterozigóticos *del5* foram genotipadas por HRM (como descrito no **Capítulo 3.1**), após a aquisição de imagens e quantificação da microglia.

Pela observação da **Figura 3.5.B** verificamos que as larvas morfantes MO apresentam menos células da microglia no cérebro do que as larvas injetadas com CoMO. A análise do gráfico da **Figura 3.5.C** mostra um número de células da microglia significativamente inferior nas larvas morfantes MO



em comparação com os respetivos controlos. Não observamos diferença significativa no número de microglia entre as larvas injetadas com CoMO e as larvas WT não injetadas, sugerindo que a redução verificada com MO deve-se ao bloqueio da tradução da proteína Dia1r. As imagens da coloração com NR e as quantificações da microglia nos mutantes *dia1r* e irmãos WT encontram-se representadas na **Figura 3.5.D e E**. As larvas homozigóticas (-/-) apresentam uma redução bastante significativa em relação as suas irmãs heterozigóticas (+/-). No entanto, quando comparadas com as suas irmãs WT (+/+) a redução continua a ser significativa, mas num grau de significância menor. Tal pode dever-se ao facto de o número de larvas WT analisadas ser inferior ao das larvas +/- e -/-. Comparando as larvas +/- com as suas irmãs +/+ não observamos diferenças significativas no número de microglia.

Em resumo, observamos uma redução altamente significativa no número de microglia nos cérebros de larvas morfantes MO e mutantes homozigóticas para *dia1r* quando comparado com os respetivos controlos. Deste modo, demonstramos que tanto o *knockdown* como *knockout* para o gene *dia1r* conduzem ao aparecimento de um fenótipo semelhante no número de células da microglia de larvas aos 4 dpf. Assim, podemos concluir que o gene *dia1r* parece promover a formação da microglia durante o desenvolvimento do peixe-zebra.

3.3.3. Análise *in vivo* da microglia de morfantes para *dia1r* por microscopia confocal

Por fim, fomos avaliar o possível efeito do gene *dia1r* no número de células da microglia presente no teto óptico do cérebro das larvas morfantes através da análise de imagens de microscopia confocal. Para tal, utilizamos larvas morfantes da linha transgénica *Tg(mpeg1.1: LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* na qual as células da microglia (e macrófagos) expressam a proteína fluorescente DsRedx+ sob o controlo do promotor *mpeg1.1*¹⁶⁰. As larvas foram recolhidas aos 4 dpf, montadas em placas com agarose de baixo ponto de fusão e visualizadas no microscópio confocal para a análise da microglia *in vivo* (**Figura 3.6.A**).

Para a quantificação do número de células da microglia, fotografamos a região do teto óptico de larvas injetadas com MO, CoMO e não injetadas (WT), e analisamos as imagens utilizando o *software* Imaris, de acordo com Kelda Chia e colaboradores¹⁶¹. Na **Figura 3.6.B** encontram-se imagens representativas das cabeças de larvas morfantes MO e CoMO com células da microglia identificadas pela fluorescência da proteína DsRedx+. Como se pode ver na **Figura 3.6.C**, observamos uma redução muito significativa no número de microglia DsRedx+ nas larvas morfantes MO em comparação com as larvas CoMO. Quando comparamos as larvas MO com as WT, a redução é igualmente significativa mas num grau de significância menor. O número de células da microglia DsRedx+ não apresenta diferenças significativas entre larvas CoMO e WT. Importa referir que o número larvas por condição é reduzido, pelo que teremos de quantificar a microglia de mais larvas para podermos fazer uma análise estatística mais precisa. Ainda assim, a redução muito significativa no número de células da microglia DsRedx+ observada nas larvas MO reforça a hipótese de que o gene *dia1r* promove o desenvolvimento da microglia. No futuro, pretendemos realizar a mesma análise em larvas de mutantes para *dia1r*.

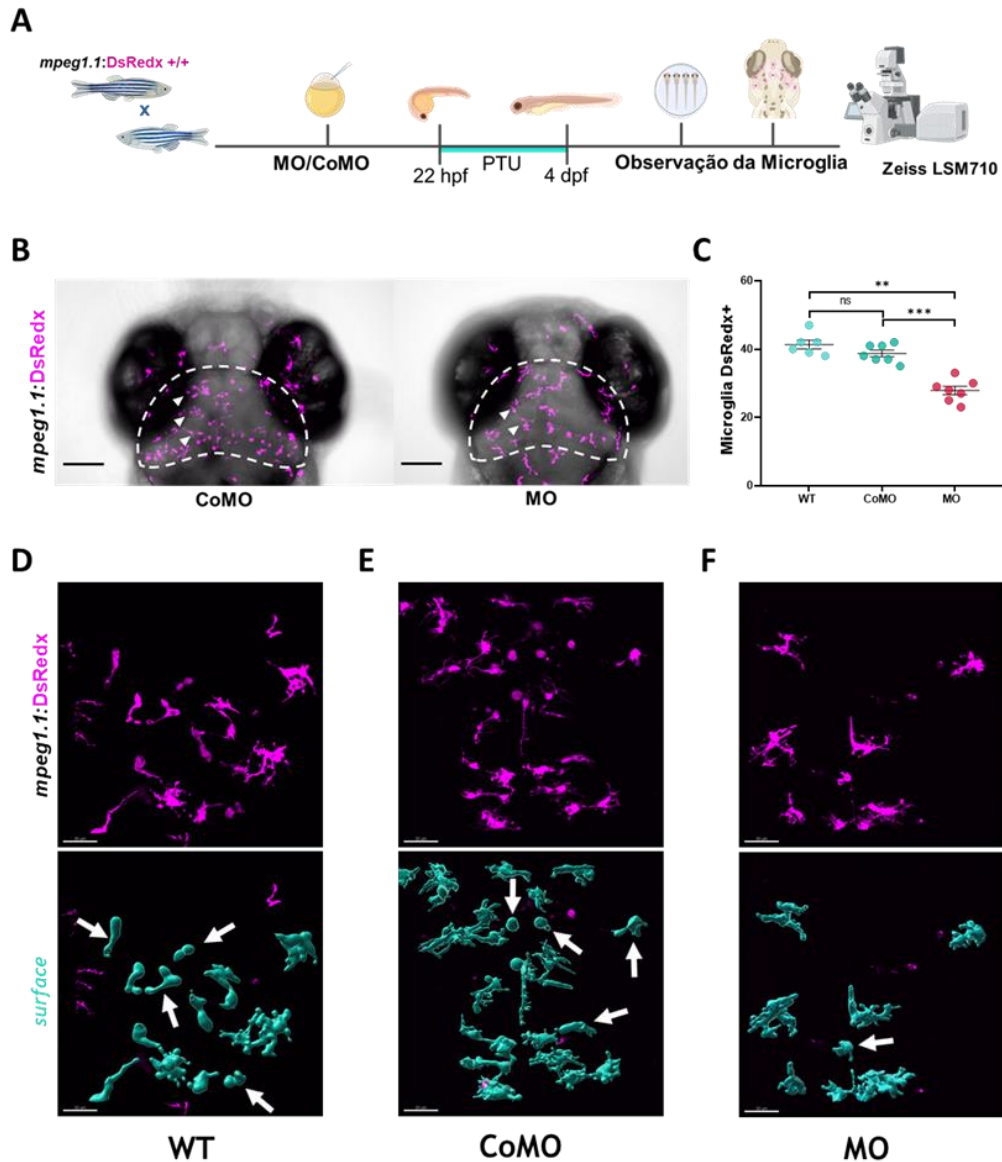


Figura 3.6. Efeito do knockdown do gene *dia1r* no número de células da microglia em larvas de peixe-zebra quantificado por análise de imagens de microscopia confocal.

(A) Representação esquemática da abordagem experimental. Embriões da linha transgênica *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)* foram injetados na fase de uma a duas células com 1 ng de morfolino *dia1r* experimental (MO) ou controle (CoMO). A partir das 22 hpf e até aos 4 dpf, os morfantes foram incubados diariamente com PTU para impedir o aparecimento de pigmento. A microglia das larvas foi observada num microscópio confocal Zeiss LSM710. (B) Imagens adquiridas com a objetiva de 10x/ NA 0,30 onde se podem observar as células da microglia DsRedx+ *in vivo* no cérebro de larvas morfantes e larvas não injetadas (WT). As setas brancas indicam algumas das células da microglia presentes no teto óptico (linhas tracejadas). (C) Quantificação da microglia presente no teto óptico de larvas morfantes e larvas não injetadas (WT). Cada ponto colorido representa o número de células da microglia de uma larva. As larvas MO mostram uma redução bastante significativa no número de microglia DsRedx+ em comparação com larvas CoMO. *Student's t-test*; ns, não significativo; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Barras de erro, s.e.m. (D-F) As imagens adquiridas com a objetiva de 40x/ NA 1,20 permitiram observar a morfologia da microglia presente numa região do teto óptico de larvas morfantes e larvas não injetadas (WT). A *surface* criada pelo software Imaris está representada a azul nos painéis inferiores. (D) Imagens da microglia DsRedx+ de uma larva WT. (E) Imagens da microglia DsRedx+ *in vivo* de uma larva injetada com CoMO. Numa análise preliminar, a microglia das larvas CoMO parece não apresentar diferenças morfológicas quando comparada com microglia de larvas WT. (F) Imagens da microglia DsRedx+ de uma larva MO. As larvas MO aparentam ter um menor número de células da microglia ativadas (setas brancas) em comparação com os respetivos controlos. Barras de escala: 100 μ m em (B); 10 μ m em (D-F).

De acordo com o que se encontra descrito, a morfologia da microglia é bastante dinâmica durante o desenvolvimento, passando de uma conformação ameboide (1 dpf; e.g., **Figura 2.3.F**) para uma altamente ramificada (aos 7 dpf), e apresentando características intermédias de ramificação aos 4 dpf

(e.g., **Figura 2.3.D**)^{140,168}. Para examinarmos a morfologia das células da microglia DsRedx+²⁰, adquirimos imagens do teto óptico das larvas morfantes e WT com uma maior ampliação (**Figura 3.5.D-F**). Nas imagens dos morfantes MO encontramos células da microglia que apresentam uma morfologia ramificada. Estas observações sugerem que a supressão do gene *dia1r* parece não condicionar a maturação da microglia no teto óptico.

A microglia ameboide foi anteriormente associada a maior mobilidade e capacidade fagocítica, em contraste com a microglia ramificada que se fixa numa região por longos períodos de tempo, desenvolvendo prolongamentos dinâmicos que inspecionam o ambiente envolvente¹⁶⁸. Observamos preliminarmente que as larvas MO apresentam aparentemente um menor número de células da microglia ameboides em comparação com as larvas CoMO e WT. Embora a nossa observação possa sugerir que as larvas MO apresentam menos células da microglia ativas, para averiguar se a redução é significativa e consistente teremos de adquirir imagens de mais larvas e analisar todo o teto óptico. Assim, planeamos quantificar as frações de microglia ameboide e ramificada no teto óptico de larvas morfantes e mutantes para verificar se existe ou não uma alteração nos estados morfológicos da microglia.

Capítulo 4. Discussão

4.1. Peixes-zebra *knockdown* e *knockout* para o gene *dia1r* apresentam fenótipos semelhantes

Neste projeto fomos investigar o papel do gene *dia1r* no desenvolvimento da microglia do peixe-zebra recorrendo a duas abordagens genéticas distintas. Na primeira abordagem utilizamos morfolinós para estudar a função do *dia1r* (**Figura 3.1**), por esta ser uma estratégia de *knockdown* relativamente barata e mais rápida do que as estratégias de *knockout*¹⁷⁰. Os nossos dados demonstraram que os morfantes MO apresentam um fenótipo claro ao nível do número de células da microglia e dos seus progenitores, em contraste com os morfantes CoMO que não apresentam diferenças em relação aos WT (**Figura 3.5.C**). Assim, podemos concluir que o fenótipo de *knockdown* do gene *dia1r* parece ser específico. Foi proposto por Didier Stainier e colaboradores¹⁷¹ que, no estudo da função de um gene, os morfantes devem ser utilizados juntamente com mutantes, fornecendo assim uma abordagem adicional e útil para a compreensão da função do gene. Os autores apresentaram ainda um conjunto atualizado de diretrizes para o uso de morfolinós em peixes-zebra baseadas nas apresentadas anteriormente por Judith Eisen e James Smith¹⁷². Neste sentido, os nossos estudos com morfantes estão de acordo com estas diretrizes, e foram complementados com o estudo de mutantes para o mesmo gene.

A utilização do sistema de edição do genoma CRISPR-Cas9 para gerar linhas mutantes em peixe-zebra é uma estratégia recente e cada vez mais utilizada¹⁴³. Com esta abordagem os mutantes genéticos podem ser gerados com uma taxa de sucesso de 99% e com uma taxa média de transmissão na linha germinativa de aproximadamente 28%¹⁷³. Por esta razão, este sistema é seis vezes mais eficiente a gerar mutações em peixes-zebra quando comparado com sistemas que utilizam as nucleases ZFN ou TALEN¹⁷³. Assim, utilizamos o sistema CRISPR-Cas9 para fazer *knockout* do gene *dia1r* e geramos com sucesso duas linhas de peixes-zebra mutantes (**Figura 3.2**).

Recentemente, vários estudos constataram que estratégias de *knockdown* e de *knockout* para o mesmo gene podem gerar organismos com fenótipos diferentes^{170,174,175}. Adicionalmente, foi observado que algumas linhas de peixe-zebra mutantes podem não exibir o fenótipo esperado^{175,176}. Tendo em consideração estas evidências, analisamos cuidadosamente os dados de sequenciação para selecionar os mutantes que pareceriam mais capazes de conduzir à perda de função do gene *dia1r* e consequentemente exibir um fenótipo. Uma vez que a perda do local de iniciação da tradução de um gene pode ser compensada pela ativação de outros codões AUG vizinhos que asseguram a tradução do mRNA desse gene^{174,177}, várias linhas de peixes mutantes para *dia1r* que satisfaziam esta situação foram excluídas. Selecionamos então duas linhas com mutações distintas que impedem a tradução normal do gene *dia1r* e estabelecemos com sucesso as linhas mutantes del5 e del13 (**Figura 3.2**). A utilização de uma segunda linha mutante permitirá validar o fenótipo observado na primeira linha mutante e nos morfantes, garantantindo assim a sua especificidade.

No decorrer deste estudo verificamos que tanto os mutantes heterozigóticos como os homozigóticos da linha del5 são viáveis, desenvolvem-se até à idade adulta e produzem descendência

fértil. Quando comparamos as observações feitas em larvas morfantes e mutantes, verificamos que a redução do número de microglia detetada nos morfantes é recapitulada nos mutantes *del5* (Figura 3.5), o que confirma a especificidade deste fenótipo. Deste modo, podemos validar as duas abordagens genéticas selecionadas para estudar a função do gene *dia1r*.

4.2. O gene *dia1r* parece restringir o número de progenitores hematopoiéticos e promover a diferenciação da linhagem mieloide

Começamos por investigar a função do gene *dia1r* nos progenitores da microglia em embriões morfantes de peixe-zebra com 19,5 hpf (21 sómitos). Os nossos resultados de RT-qPCR demonstram que a expressão dos marcadores de progenitores hematopoiéticos *tal1* e *lmo2*¹⁶⁵ é significativamente mais elevada em embriões injetados com MO (**Figura 3.3.C**). Assim, podemos concluir que o gene *dia1r* parece restringir o tamanho da população de progenitores hematopoiéticos primitivos, uma vez que, em embriões de peixe-zebra, *lmo2* atua em conjunto com *tal1* para regular a hematopoiese primitiva¹⁶⁵. Nesta fase do desenvolvimento, a expressão do fator de transcrição *gata1a* marca as populações de progenitores eritromieloides (EMPs) localizados na ICM e os progenitores hematopoiéticos definitivos (precursores das HSPCs) localizados na aorta dorsal^{89,95}. Os nossos dados demonstraram que a expressão de *gata1a* também se encontra elevada quando o *dia1r* é suprimido. Este resultado sugere que o *dia1r* pode também restringir o número de EMPs e de progenitores hematopoiéticos definitivos.

Às 24 hpf, a expressão de *lmo2*, *gata1a* e *spi1b* na PBI identifica as células e os progenitores da onda hematopoiética transitória que vão dar origem aos EMPs⁹⁶. A expressão do gene *dia1r* na PBI às 24 hpf (**Figura 1.4.A**) e a expressão elevada de *lmo2*, *gata1a* e *spi1b* nos embriões morfantes MO (**Figura 3.3.C**) sugerem que o gene *dia1r* pode regular esta onda hematopoiética transitória. Da mesma forma, a tendência de expressão mais elevada de *runx1*, *myb* e *gata1a* nos embriões morfantes MO sugere a existência de um maior número de progenitores hematopoiéticos definitivos localizados na aorta dorsal. Esta observação juntamente com o facto de *dia1r* ser expresso na aorta dorsal às 30 hpf (**Figura 1.4.A**) indicam que o gene *dia1r* pode também ser importante para a hematopoiese definitiva.

As células progenitoras mieloides que dão origem a macrófagos e neutrófilos podem ser identificadas pela expressão do gene *spi1b*⁷⁸. A tendência de expressão mais elevada de *spi1b* nos morfantes MO (**Figura 3.3.C**) sugere que estes podem ter um número ligeiramente superior de células progenitoras mieloides. Contudo, observamos que a expressão do marcador de macrófagos diferenciados *lcp1* é significativamente mais baixa nos embriões morfantes MO (**Figura 3.3.C**), sugerindo que existem menos macrófagos primitivos nestes embriões. Estas observações indicam que a supressão do gene *dia1r* pode bloquear a diferenciação dos progenitores mieloides. Este resultado é semelhante ao descrito por Xiangguo Shi e colaboradores num estudo em que analisaram a função do gene humano da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1-R132H) e do seu ortólogo em peixe-zebra¹⁷⁸. Os autores demonstraram que embriões morfantes e mutantes para *idh1* nas fases de 18 e 24 hpf apresentam um bloqueio na diferenciação mieloide, evidente pela expressão elevada do *spi1b* e baixa expressão dos marcadores *lcp1* e *mpeg1.1*.

No futuro, para esclarecermos o efeito do *dia1r* na diferenciação mieloide, iremos utilizar as técnicas de RT-qPCR e hibridação *in situ* de organismos inteiros (*whole-mount in situ hybridization* ou WISH)¹⁷⁹ para avaliar a expressão de genes expressos em macrófagos primitivos, tais como *mpeg1.1*⁸¹ e *csf1ra*⁷⁵, em embriões morfantes e mutantes em fases mais avançadas do desenvolvimento. Iremos analisar também a expressão dos marcadores de neutrófilos *mpx*⁸⁷ e *lyz*⁸⁶ a partir das 24 hpf, altura em que os progenitores de granulócitos se começam a diferenciar⁷³. Para investigarmos o papel do *dia1r* na diferenciação dos eritrócitos, pretendemos analisar a expressão de marcadores de células eritroides, tais como os genes da hemoglobina embrionária *hbae3* e *hbbe1.1*^{93,180}. Esta análise será feita em embriões com 48 hpf, pois nesta fase existe já uma grande população de eritrócitos maduros no sangue⁹⁵.

A perda de função de *gata1a* ou a diminuição da sua capacidade de ligação ao DNA conduzem a um aumento do número de células mieloides positivas para *lcp1*^{89,181}. Estes estudos propuseram que, para além de ser um regulador essencial do destino das células eritroides, *gata1a* inibe a diferenciação da linhagem mieloide. Neste sentido, a expressão elevada do gene *gata1a* (**Figura 3.3.C**) poderá estar a reprimir a diferenciação dos progenitores mieloides quando a tradução do mRNA de *dia1r* é bloqueada, conduzindo a uma diminuição no número de células mieloides. Assim, podemos levantar a hipótese de que o gene *dia1r* pode promover a diferenciação mieloide pela via do *gata1a*, durante do desenvolvimento hematopoiético do peixe-zebra. Contudo, teremos de verificar esta evidência em embriões morfantes e mutantes *dia1r* em fases mais avançadas do desenvolvimento.

De um modo geral, estes resultados indicam que o gene *dia1r* tem um papel na hematopoiese primitiva e sugerem também um possível papel na onda transitória e na hematopoiese definitiva do peixe-zebra, restringindo o número de precursores hematopoiéticos. Duas hipóteses podem ser propostas para explicar esta função: (i) *dia1r* pode condicionar a proliferação dos progenitores hematopoiéticos, e/ou (ii) *dia1r* pode promover a diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas. Para testar a primeira hipótese, iremos futuramente utilizar a coloração 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU)¹⁸² para avaliar o efeito do *knockdown* do gene *dia1r* na proliferação dos progenitores hematopoiéticos. Para avaliar a segunda hipótese, iremos identificar e quantificar as populações de progenitores hematopoiéticos utilizando linhas transgênicas específicas¹⁸³ ou recorrendo à técnica WISH¹⁷⁹. A WISH permitirá analisar os padrões de expressão de marcadores específicos para células hematopoiéticas em embriões morfantes e mutantes de diferentes estados do desenvolvimento¹⁸⁴. Importa referir, que os nossos resultados de RT-qPCR traduzem a expressão de cada um dos marcadores utilizados em todo o embrião, pelo que a utilização de sondas WISH para estes marcadores fornecerá a sua localização e quantificação em determinados tecidos, permitindo assim confirmar as hipóteses levantadas anteriormente. Por outro lado, os nossos resultados indicam que a perda da função do gene *dia1r* parece afetar o número dos progenitores das três ondas hematopoiéticas do peixe-zebra. Assim, é possível que, para além dos macrófagos primitivos, outras populações de células hematopoiéticas diferenciadas (como eritrócitos e neutrófilos) possam também estar alteradas.

Notavelmente, os dados obtidos permitem-nos inferir que o gene *dia1r* parece restringir o número de progenitores hematopoiéticos e promover a sua diferenciação em células da linhagem mieloide.

Recentemente, Giuliano Ferrero e colaboradores⁷⁷ mostraram que os macrófagos primitivos dão origem à microglia primitiva. Visto que os dados de RT-qPCR indicam que *dia1r* promove a diferenciação de células da linhagem mieloide primitiva, levantamos a hipótese de que o gene *dia1r* poderá ter um papel importante na ontogenia da microglia primitiva durante o desenvolvimento do peixe-zebra.

4.3. O gene *dia1r* parece promover o desenvolvimento da microglia

Para testar a hipótese de que *dia1r* promove a diferenciação da microglia, procedemos à quantificação do número de células da microglia no cérebro de larvas de peixe-zebra morfantes e mutantes para *dia1r* aos 4 dpf. Para tal recorremos às técnicas de citometria de fluxo e de análise de imagens de cérebros de larvas com microglia corada com *Neutral Red* ou com uma proteína fluorescente.

A técnica de citometria de fluxo permitiu-nos analisar com sucesso a população de macrófagos e microglia presentes nas cabeças de larvas morfantes. Os nossos resultados mostraram que o grupo de 50 cabeças de larvas morfantes MO apresenta uma redução na população de células DsRedx+ em relação ao grupo controlo (**Figura 3.4.E**). Embora os resultados apresentados correspondam a uma experiência única, podemos inferir que *knockdown* do gene *dia1r* conduz a uma redução no número de macrófagos e microglia. Assim, podemos concluir que o gene *dia1r* parece promover o desenvolvimento de macrófagos e microglia. Apesar de nos termos focado no desenvolvimento da microglia, não excluimos um possível papel do *dia1r* no desenvolvimento dos macrófagos em geral. Efetivamente, os nossos dados de citometria abrem caminho para uma possível investigação futura ao nível do desenvolvimento dos macrófagos de outros tecidos.

Seguidamente, adotamos duas estratégias diferentes de marcação e análise do número de microglia presente no teto óptico de larvas aos 4 dpf. Pela análise das imagens da coloração com NR observamos uma redução altamente significativa no número de microglia nos cérebros de larvas morfantes e mutantes homozigóticas para *dia1r*, quando comparados aos respetivos controlos (**Figura 3.5**). Convém notar que a maioria das larvas injetadas com MO apresenta um menor número de células da microglia do que a média relativa às larvas homozigóticas. Foi observado que os fenótipos induzidos por morfolinóis são frequentemente mais acentuados do que os dos mutantes correspondentes, tendo sido propostas várias explicações para estas observações¹⁷¹. Após análise detalhada de cada uma destas explicações, concluímos que a resposta de compensação genética (*genetic compensation response* ou GCR) que ocorre em animais mutantes mas não em morfantes¹⁷⁵ parece ser a explicação que melhor se aplica ao nosso caso. A GCR é um novo mecanismo de robustez genética que traduz a capacidade que o genótipo de um organismo apresenta para minimizar os efeitos de uma mutação ao nível fenotípico (revisto recentemente por Zhipeng Ma e Jun Chen¹⁸⁵). Em abril de 2019, dois estudos publicados na mesma edição da revista *Nature* desvendaram o mecanismo molecular subjacente ao GCR^{186,187}. Os autores demonstraram que a existência de genes compensatórios (com sequências homólogas ao gene mutado) e mutações que levem ao aparecimento de um codão STOP prematuro são necessárias para induzir a compensação genética¹⁸⁵. De facto, a mutação apresentada pelos peixes-zebra *knockout* para o gene *dia1r* produz um mRNA com um codão STOP (**Figura 3.2.C**), e

pode eventualmente existir um gene compensatório que contenha uma sequência homóloga ao *dia1r* capaz de desencadear a GCR. Adicionalmente, a existência de características genéticas específicas em peixes-zebra de diferentes *backgrounds* genéticos¹⁸⁸ pode também contribuir para as diferenças observadas, dado que os morfollinos são injetados em embriões com *background* AB e os mutantes têm *background* TU. Para avaliar esta possibilidade, poderemos injetar embriões WT TU com morfollino, realizar a quantificação da microglia e verificar se o número destas células se aproxima dos valores dos mutantes.

Os resultados anteriores foram reforçados pela análise das imagens de microscopia confocal, que demonstrou existir um número significativamente inferior de microglia no teto óptico das larvas MO em relação às larvas CoMO (**Figura 3.6**). No futuro, pretendemos realizar a mesma análise em mutantes *dia1r*. Para tal, já realizamos cruzamentos entre peixes homozigóticos da linha transgênica *Tg(mpeg1.1:LOXP-DsRedx-LOXP-EGFP)*⁸⁰ e peixes mutantes del5 *dia1r* *-/-* para estabelecermos uma linha transgênica heterozigótica para *dia1r*. Com o *incross* desta linha iremos obter larvas WT, mutantes homozigóticas e heterozigóticas para *dia1r* que apresentarão as células da microglia (e macrófagos) com fluorescência vermelha (75% da descendência).

Em resumo, todos os resultados de quantificação da microglia indicam que a perda da função do gene *dia1r* tem como consequência um menor número de células da microglia. Três hipóteses podem ser propostas para explicar este fenómeno: (i) a supressão do *dia1r* pode afetar a migração dos macrófagos primitivos para cérebro; e/ou (ii) a microglia pode ter dificuldade em proliferar normalmente; e/ou (iii) o número reduzido de microglia pode ser atribuído a uma menor diferenciação de células da microglia a partir dos seus progenitores hematopoiéticos.

A colonização do cérebro pelos precursores da microglia é um processo dinâmico promovido pela apoptose neuronal (que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento do CNS)^{160,189} e pela via de sinalização IL-34-Csf1ra¹¹². Na primeira hipótese, o gene *dia1r* poderá modelar esta sinalização, promovendo a migração e entrada dos macrófagos primitivos no cérebro. Para avaliar esta suposição, poderemos registar imagens *in vivo* ao longo do tempo (vídeos) de embriões transgênicos morfantes, mutantes e WT entre as fases de 24 hpf e 32 hpf¹¹². Este método permitirá seguir e analisar o trajeto dos macrófagos primitivos *mpeg1.1-DsRedx+* desde a RBI até à cabeça do embrião.

Na segunda hipótese, propomos que *dia1r* pode promover a proliferação da microglia no cérebro larvar. Foi descrito que o número de microglia aumenta a partir dos 3 dpf⁷⁵. Assim, uma estratégia que poderemos utilizar é quantificar a microglia NR+ no teto óptico das larvas morfantes, mutantes e WT com 5 dpf e determinar se o número de microglia permanece baixo à semelhança dos valores já obtidos aos 4 dpf. Simultaneamente, realizaremos a marcação com EdU e com anticorpo anti-Lcp1 em larvas mutantes e WT aos 4 dpf (tal como descrito por Laura Kuil e colaboradores¹¹³). Em seguida, determinaremos a fração de microglia EdU+ e verificaremos se a perda do *dia1r* altera a fração proliferativa da microglia.

Finalmente, a terceira hipótese parece-nos ser a explicação mais provável, dado que é apoiada pelos nossos dados de RT-qPCR que sugerem existir um menor número de células mieloides precursoras da microglia em embriões morfantes com 19,5 hpf. Deste modo, *dia1r* poderá promover a diferenciação dos progenitores da linhagem mielóide em macrófagos primitivos durante a

hematopoiese primitiva, assegurando assim a colonização do cérebro larvar do peixe-zebra pelo número correto de células da microglia. Para testar esta hipótese poderemos quantificar o número de macrófagos primitivos observados em imagens de microscopia confocal do saco vitelino e da região da cabeça de embriões morfantes, mutantes e WT com *background mpeg1.1-DsRedx*¹¹² nas fases de 24 hpf, 30 hpf e 2 dpf (tal como descrito anteriormente^{112,113}) e analisar todos os macrófagos por citometria de fluxo (como descrito por Julie Mazzolini e colaboradores¹⁵⁸). Este estudo será complementado com os futuros dados da análise por RT-qPCR e WISH da expressão de marcadores específicos de macrófago primitivos, referida anteriormente (**Capítulo 4.2**).

Neste projeto, avaliamos o efeito da perda de função do gene *dia1r* no desenvolvimento da microglia primitiva do peixe-zebra. As primeiras células da microglia embrionária e larvar têm origem em macrófagos primitivos e formam-se a partir dos 3 dpf, enquanto que a microglia definitiva começa a surgir por volta dos 15 dpf⁷⁷. Esta microglia definitiva tem origem em HSPCs e é regulada pelos fatores *runx1* e *myb*^{76,77}. Os nossos resultados de RT-qPCR demonstram que a expressão destes genes está alterada nos embriões morfantes MO com 19,5 hpf (**Figura 3.3.C**), sugerindo que o gene *dia1r* poderá ter também um efeito sobre a população de HSPCs. Neste sentido, podemos levantar a hipótese de que, da mesma forma que promove o desenvolvimento da microglia primitiva, o gene *dia1r* pode ter também um papel na formação da microglia definitiva do peixe adulto. Para estudar esta possibilidade poderemos quantificar e determinar a densidade da microglia definitiva presente no cérebro de mutantes para *dia1r* e WT aos 21, 28, 40 e 50 dpf, tal como descrito em estudos recentes^{116,190}.

4.4. Modelo hipotético do papel do gene *dia1r* na ontogenia da microglia com possível impacto neuronal e comportamental

A microglia desempenha funções essenciais no desenvolvimento e homeostasia do SNC, interagindo permanentemente com os outros tipos de células para fornecer suporte e regular a formação dos circuitos neuronais (revisto recentemente^{6,46}). Alterações no número da microglia durante o desenvolvimento podem conduzir a alterações nestas funções (revisto por Rosa Paolicelli e Maria Ferretti¹⁹¹). Com este estudo descobrimos que a perda de função do gene *dia1r* leva à formação de um menor número de células da microglia. Assim, de forma intrigante surge a seguinte questão: que efeitos pode esta redução de microglia causar no desenvolvimento do cérebro da larva do peixe-zebra? Vários estudos demonstraram que a depleção genética ou farmacológica da microglia durante o desenvolvimento conduz a mudanças consideráveis na função sináptica e na formação dos circuitos cerebrais (revisto por Rosa Paolicelli e Maria Ferretti¹⁹¹). Uma abordagem farmacológica bastante comum para reduzir a microglia no cérebro é o tratamento com lipossomas de clodronato, o qual é absorvido especificamente pelos macrófagos e pela microglia por fagocitose e causa a sua morte^{192,193}. Foi descrito que eliminação da microglia do córtex cerebral fetal com este tratamento aumenta significativamente o número de células precursoras neuronais, demonstrando assim um papel importante da microglia na neurogénese¹⁹⁴. Este número elevado de precursores pode traduzir-se na formação de mais neurónios. De facto, observou-se um excesso de neurónios no córtex pré-frontal de

crianças com autismo, o qual está associado a um crescimento excessivo do cérebro nestes pacientes^{195,196}. O excesso de neurónios pode dever-se também a uma redução da apoptose neuronal e da fagocitose de neurónios apoptóticos pela microglia (revisto por Morgane Thion e Sonia Garel¹²). De facto, foi observado que a depleção da microglia pode traduzir-se numa redução da apoptose neuronal durante o desenvolvimento^{197,198}. Neste sentido, podemos pressupor que uma redução no número de células da microglia pode conduzir a um excesso de neurónios como consequência de um aumento da neurogénese e/ou uma redução da apoptose neuronal.

Para além dos modelos farmacológicos de depleção da microglia, os efeitos desta depleção podem ser também estudados em modelos animais com mutações genéticas. Por exemplo, os ratinhos mutantes para o gene *Cx3cr1* apresentam uma redução na microglia e consequentemente um défice na poda sináptica³⁶. Foi também demonstrado que esta disfunção na poda sináptica está associada a défices na interação social e ao aumento de comportamentos repetitivos, previamente associados a PEA⁵⁹. Para além disso, foi observado que pacientes com autismo apresentam uma redução da proteína TREM2 expressada pela microglia, o que pode refletir a existência de um menor número destas células⁶¹. Em concordância, os ratinhos mutantes para o gene *Trem2* apresentam uma redução no número de microglia no hipocampo, acompanhada por defeitos na eliminação de sinapses pela microglia e exibição de comportamentos repetitivos e sociabilidade alterada⁶¹. Notavelmente, Alexandria Hughes e Bruce Appel observaram que a depleção da microglia no cérebro de larvas de peixe-zebra com 4 dpf conduz a um excesso de bainhas de mielina (normalmente fagocitadas pela microglia)³⁴, um fenómeno recentemente descrito como envolvimento ectópico dos corpos celulares neuronais¹⁹⁹. Curiosamente, a hipermielinização foi também recentemente identificada em pacientes com autismo⁶².

Recentemente, foi descrito que um paciente de 10 meses de idade com uma mutação letal no gene *CSF1R*, um recetor necessário para a sobrevivência da microglia, apresentava uma ausência quase completa de microglia no cérebro e exibia várias anomalias cerebrais estruturais, incluindo agénese do corpo caloso²⁰⁰. Os autores analisaram um modelo de peixe-zebra com perda da função do gene *csf1r* e descobriram que os cérebros de larvas e adultos também não tinham microglia e apresentavam níveis reduzidos de *CUX1*, um fator de transcrição neuronal. Consistentemente, os neurónios *CUX1+*, que projetam os seus axónios no corpo caloso, foram também detetados em menor número em secções do cérebro humano de pacientes com mutações em homozigotia no gene *CSF1R*. Com estes dados, os autores propuseram que a deficiência na microglia pode contribuir para a agénese do corpo caloso por meio da redução do número de neurónios *CUX1+*²⁰⁰.

Em resumo, estes estudos em peixe-zebra, ratinho e humano revelaram que a manutenção do número da microglia é importante para o normal desenvolvimento do cérebro e que a redução destas células pode provocar alterações neuronais não só no embrião, mas também ao longo da vida do indivíduo adulto. Assim, podemos levantar a hipótese de que a redução do número das células da microglia resultante da perda da função do gene *dia1r* pode conduzir a algumas das alterações neuronais anteriormente referidas.

Dado o papel da microglia no desenvolvimento neuronal e a sua implicação em PEA, levanta-se também a seguinte questão: será que a perda da função do gene *dia1r* pode conduzir a alterações no

4.4 | Modelo hipotético do papel do gene *dia1r* na ontogenia da microglia com possível impacto neuronal e comportamental

comportamento social do peixe-zebra? Na verdade, o gene *DIA1R* humano foi recentemente implicado em PEA e DILX¹²². Este gene encontra-se apenas em animais vertebrados e, curiosamente, está ausente em peixes com estilo de vida solitário, mas está presente em peixes que vivem em cardumes, o que reforça a sua relevância para a etiologia das PEA¹²⁴. Para além disso, foi proposto que qualquer gene que altere o número e/ou a ativação da microglia *in útero* pode afetar profundamente o neurodesenvolvimento e conduzir a alterações no comportamento¹⁹⁴. Portanto, a ausência do gene *dia1r*, caso provoque alterações neuronais, pode conduzir a alterações no comportamento social de peixes-zebras mutantes.

Considerando os nossos resultados e as evidências recentemente apresentadas sobre as funções da microglia durante o neurodesenvolvimento, propomos um modelo hipotético para o papel da proteína Dia1r no peixe-zebra, representado na **Figura 4.1**. Como observamos anteriormente, o gene *dia1r* é expresso nos progenitores hematopoieticos da microglia (**Figura 1.4**). Assim, podemos formular a hipótese de que Dia1r promove a diferenciação da linhagem mieloide durante o desenvolvimento do peixe-zebra, potenciando assim a ontogenia da microglia primitiva. Neste sentido, tendo em conta as funções da microglia no desenvolvimento do cérebro, ao regular o número de células da microglia, Dia1r pode ter um papel no neurodesenvolvimento e, consequentemente, no comportamento social do indivíduo. Assim, mutações que afetem a função do gene *dia1r* podem conduzir à redução do número de células da microglia que resultam na ocorrência de alterações neuronais, tais como o aumento de progenitores neuronais, a diminuição da poda sináptica e o excesso de bainhas de mielina. Por sua vez, estas alterações podem ser suficientes para provocar alterações no comportamento social do indivíduo.

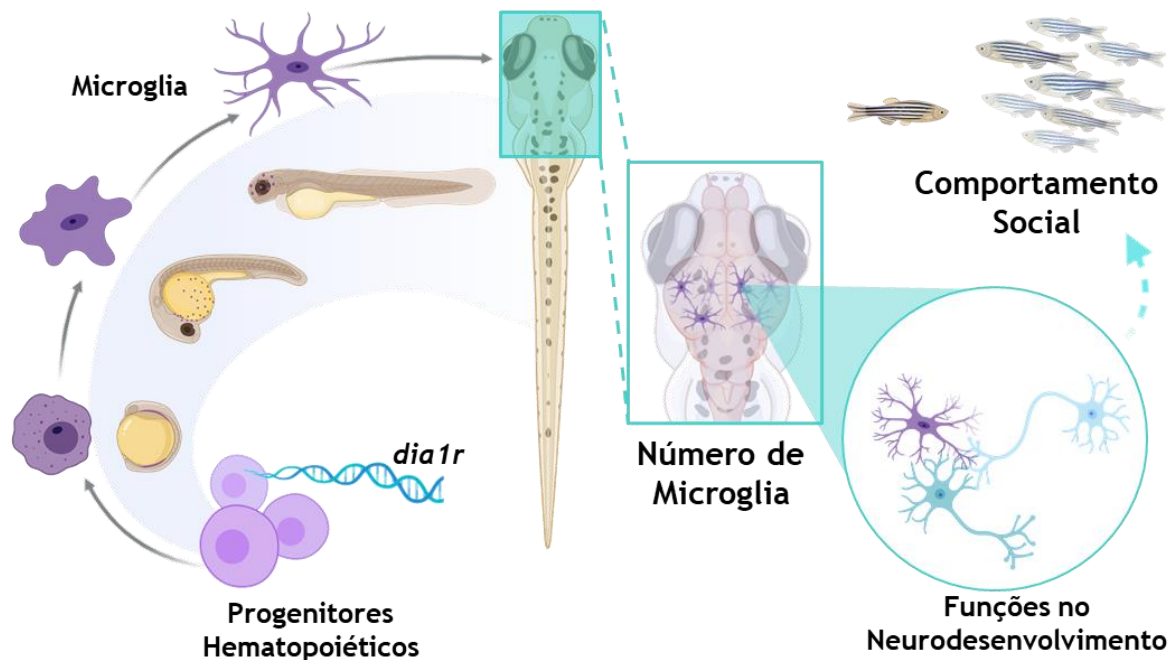


Figura 4.1. Modelo hipotético do papel de Dia1r na ontogenia da microglia e potencial impacto no desenvolvimento neuronal e no comportamento.

Os resultados da nossa investigação demonstraram que o gene *dia1r* é expresso nos progenitores hematopoieticos e parece regular a diferenciação destes progenitores em células da microglia durante o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. O nosso modelo sugere que, ao controlar o número de células da microglia, Dia1r pode promover o normal desenvolvimento e funcionamento do cérebro, com consequente impacto no comportamento social do indivíduo.

4.5. Perspetivas futuras e considerações finais

Futuramente, planeamos realizar vários ensaios para validar o nosso modelo e aumentar o conhecimento sobre a função do gene *dia1r*. Como primeira prioridade, iremos avaliar se a diferença observada no número de células da microglia entre as larvas *knockdown* e *knockout* para o *dia1r* e os respetivos controlos é mantida ou alterada em fases posteriores do desenvolvimento do peixe-zebra. Por exemplo, é possível que exista uma compensação após os 4 dpf devido a um aumento da proliferação da microglia existente ou colonização do cérebro por novos progenitores, tal como observado em larvas mutantes para o gene *IL-34*¹¹³. A segunda prioridade será avaliar o papel do gene *dia1r* na formação da microglia definitiva, dado que o gene *dia1r* é expresso nas HSPCs, as células progenitoras da microglia adulta no peixe-zebra⁷⁷. Para tal, iremos quantificar as células da microglia em cérebros de peixes-zebra juvenis mutantes e WT.

Seguidamente, pretendemos avaliar o papel da proteína Dia1r no neurodesenvolvimento e no comportamento das larvas de peixe-zebra. Para tal, iremos analisar possíveis fenótipos neuroanatómicos de mutantes para o *dia1r* que podem resultar da redução no número de células da microglia. Simultaneamente, iremos utilizar outros modelos de depleção da microglia em peixe-zebra, tais como larvas tratadas com clodronato (descrito por Rodrigo Morales e Miguel Allende²⁰¹) e o larvas mutantes para o gene *csf1ra*⁷⁵, um regulador da colonização da microglia no cérebro¹¹². Dos estudos que estamos a planear realizar, destacam-se a quantificação da apoptose e da proliferação neuronal por serem dois eventos regulados pela microglia durante o neurodesenvolvimento (**Figura 1.1**). Estas quantificações serão realizadas a partir da análise de imagens de microscopia confocal de cérebros de larvas com coloração de TUNEL e imunofluorescência para a fosfo-histona H3, respetivamente (como descrito recentemente por Noémie Hamilton e colaboradores²⁰²). Para além disso, em modelos de depleção da microglia em peixe-zebra foram descritos defeitos nas populações de neurónios excitatórios (glutamatérgicos) e inibitórios (GABAérgicos)^{44,203}. Assim, iremos analisar a neuroanatomia do cérebro de larvas transgênicas de peixe-zebra nas quais cada uma destas populações de neurónios se encontra marcadas com fluorescência, e que serão tratadas com clodronato ou combinadas com os mutantes para *dia1r* e *csfr1a*. Os resultados destas experiências contribuirão para a interpretação de possíveis fenótipos comportamentais observados em futuros estudos de comportamento. Nomeadamente, pretendemos avaliar se a proteína Dia1r é importante para o desenvolvimento de comportamentos sociais no peixe-zebra, uma característica que se apresenta diminuída nas PEA⁶⁰ e em modelos de autismo em peixe-zebra^{129,204}. Tendo em consideração que o gene *DIA1R* foi associado a PEA e DILX em humanos^{122,123}, esperamos observar fenótipos comportamentais em larvas mutantes *dia1r* semelhantes aos encontrados nestes distúrbios, tais como uma redução na interação social. Alguns dos possíveis ensaios são a análise do comportamento de cardume e testes de preferência social, tal como foram sugeridos anteriormente para o estudo de comportamentos associados às PEA no modelo de peixe-zebra (revisto por Victoria Rea e Terence Raay¹²⁹). Iremos também investigar a reprodução destes fenótipos em larvas tratadas com clodronato e mutantes para *csfr1a*, enfatizando assim a importância da microglia no desenvolvimento e função do cérebro (revisto por Rosa Paolicelli e Maria Ferretti¹⁹¹).

Neste projeto, descobrimos que uma das funções do gene *dia1r* do peixe-zebra é regular o desenvolvimento da microglia. Dada a elevada similaridade com o gene *DIA1R* humano (55,85% dados da base de dados *Genecards*; <https://www.genecards.org>) e a forte semelhança entre as células da microglia das duas espécies¹⁴⁰, é possível que o *DIA1R* humano promova também a formação da microglia durante o desenvolvimento. Tendo em conta a potencial implicação da microglia na etiologia do autismo⁹, levantamos a hipótese de que o papel do *DIA1R* na ontogenia da microglia pode estar na base da sua associação a PEA e DILX.

Estudos recentes sugerem que a maior prevalência das PEA nos homens pode ser explicada por diferenças entre os sexos na formação da microglia (revisto por Margaret McCarthy e Christopher Wright²⁰⁵). Foi também demonstrado que o número e a função da microglia diferem entre machos e fêmeas (revisto recentemente por Evan Bordt e colaboradores²⁰⁶). Uma vez que o gene *DIA1R* humano se localiza no cromossoma X e escapa à inativação^{122,128}, podemos pressupor que diferentes níveis de expressão do *DIA1R* entre mulheres e homens podem contribuir para o aparecimento de diferenças entre os sexos no desenvolvimento da microglia. Esta hipótese será investigada utilizando linhas de células estaminais pluripotentes induzidas (hiPSCs) humanas de dadores saudáveis do sexo feminino e masculino que serão diferenciadas em microglia. Para tal, iremos estabelecer clones mutantes para o gene *DIA1R* gerados com sistema de edição do genoma CRISPR-Cas9, e comparar o potencial de diferenciação em microglia e o transcriptoma de clones de células femininas e masculinas²⁰⁷. Esta investigação permitirá revelar grupos específicos de genes que podem regular a ontogenia da microglia a jusante de *DIA1R*.

De um modo geral, as evidências que aqui descrevemos contribuem para aumentar o conhecimento existente sobre o gene *DIA1R*, apresentando este gene como um novo regulador do desenvolvimento da microglia. Para além disso, esta investigação pode ajudar a esclarecer o papel etiológico da microglia nas PEA. Nos últimos anos, a microglia tem sido considerada como um novo alvo bastante promissor para o tratamento das PEA. Estudos recentes demonstraram que potenciais terapias baseadas na administração de imunomoduladores podem modificar as funções da microglia e melhorar os fenótipos comportamentais associados às PEA (tais como hiperatividade, comportamentos repetitivos e defeitos na comunicação social)^{9,208}. Embora muitas dessas novas opções de tratamento pareçam ser promissoras e esperançosas, os seus mecanismos de ação não são ainda totalmente conhecidos. Semelhantemente, o papel da proteína *DIA1R* na ontogenia da microglia e a sua possível contribuição para o processo do neurodesenvolvimento são potenciais alvos para futuras terapias aplicadas ao tratamento das PEA e DILX. Por outro lado, caso apresentem comportamentos semelhantes aos de pacientes com autismo, os nossos peixes-zebra mutantes para *dia1r* poderão vir a ser utilizados como modelo para a descoberta de novos fármacos com potencial terapêutico para o tratamento das PEA.

Capítulo 5. Conclusão

Neste projeto, investigamos o papel do gene *dia1r* no desenvolvimento da microglia do peixe-zebra. Para tal, desenvolvemos com sucesso peixes-zebra morfantes e mutantes para o gene *dia1r*. A análise da expressão de marcadores hematopoiéticos em peixes morfantes sugere que o gene *dia1r* desempenha um papel importante no desenvolvimento hematopoiético do embrião de peixe-zebra. Em particular, *dia1r* parece restringir o número de progenitores hematopoiéticos e promover a diferenciação da linhagem mieloide que dá origem à microglia primitiva. Esta hipótese foi confirmada pelos nossos resultados de quantificação da microglia que demonstram que a perda de função do gene *dia1r* tem como consequência um menor número de células da microglia no cérebro das larvas de peixe-zebra. Esta observação sugere que o *DIA1R* promove o desenvolvimento da microglia, papel que pode estar subjacente à sua implicação nas PEA e DILX. No futuro, este conhecimento poderá ajudar a esclarecer o papel etiológico da disfunção da microglia nos distúrbios do neurodesenvolvimento e tornar-se instrumental para o tratamento de subtipos de PEA mediados pela microglia.

Bibliografia

1. Thion, M. S., Ginhoux, F. & Garel, S. Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science*. **362**, 185–189 (2018).
2. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *e-Neuroforum* **11**, 95–96 (2005).
3. Davalos, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**, 752–758 (2005).
4. Hanisch, U.-K. & Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* **10**, 1387–1394 (2007).
5. Norris, G. T. & Kipnis, J. Immune cells and CNS physiology: Microglia and beyond. *J. Exp. Med.* **216**, 60–70 (2019).
6. Li, Q. & Barres, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 225–242 (2018).
7. Salter, M. W. & Stevens, B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* **23**, 1018–1027 (2017).
8. Lenz, K. M. & Nelson, L. H. Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
9. Kim, J. W., Hong, J. Y. & Bae, S. M. Microglia and Autism Spectrum Disorder: Overview of Current Evidence and Novel Immunomodulatory Treatment Options. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **16**, 246–252 (2018).
10. Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K. & Tremblay, M.-È. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J. Physiol.* **595**, 1929–1945 (2017).
11. Wright-Jin, E. C. & Gutmann, D. H. Microglia as Dynamic Cellular Mediators of Brain Function. *Trends Mol. Med.* **25**, 967–979 (2019).
12. Thion, M. S. & Garel, S. Microglial ontogeny, diversity and neurodevelopmental functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **65**, 186–194 (2020).
13. Oppenheim, R. Cell Death During Development Of The Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 453–501 (1991).
14. Kuida, K. et al. Reduced Apoptosis and Cytochrome c–Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9. *Cell* **94**, 325–337 (1998).
15. de la Rosa, E. J. & de Pablo, F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* **23**, 454–458 (2000).
16. Cole, L. K. & Ross, L. S. Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. *Dev. Biol.* **240**, 123–142 (2001).
17. Hanayama, R. et al. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182–187 (2002).
18. Fuller, A. D. & Van Eldik, L. J. MFG-E8 Regulates Microglial Phagocytosis of Apoptotic Neurons. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **3**, 246–256 (2008).
19. Liu, Y. et al. Essential Role of MFG-E8 for Phagocytic Properties of Microglial Cells. *PLoS One* **8**, e55754 (2013).
20. Peri, F. & Nüsslein-Volhard, C. Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase a1 in Phagosomal Fusion In Vivo. *Cell* **133**, 916–927 (2008).
21. Mazaheri, F. et al. Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia. *Nat. Commun.* **5**, 4046 (2014).
22. Sokolowski, J. D., Chabanon-Hicks, C. N., Han, C. Z., Heffron, D. S. & Mandell, J. W. Fractalkine is a “find-me” signal released by neurons undergoing ethanol-induced apoptosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–10 (2014).
23. Frade, J. M. & Barde, Y.-A. Microglia-Derived Nerve Growth Factor Causes Cell Death in the Developing Retina. *Neuron* **20**, 35–41 (1998).
24. Wakselman, S. et al. Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor. *J. Neurosci.* **28**, 8138–8143 (2008).
25. Sedel, F. Macrophage-Derived Tumor Necrosis Factor α , an Early Developmental Signal for Motoneuron Death. *J. Neurosci.* **24**, 2236–2246 (2004).
26. Sato, K. Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia* **63**, 1394–1405 (2015).
27. Włodarczyk, A. et al. A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *EMBO J.* **36**, 3292–3308 (2017).

28. Hagemeyer, N. *et al.* Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol.* **134**, 441–458 (2017).
29. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y. & Sato, K. Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *J. Neurosci.* **34**, 2231–2243 (2014).
30. Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* **155**, 1596–1609 (2013).
31. Lim, S.-H. *et al.* Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS One* **8**, e81218 (2013).
32. Schafer, D. P. & Stevens, B. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020545 (2015).
33. Liu, P., Du, J. & He, C. Developmental pruning of early-stage myelin segments during CNS myelination in vivo. *Cell Res.* **23**, 962–964 (2013).
34. Hughes, A. N. & Appel, B. Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination. *Nat. Neurosci.* **23**, 1055–1066 (2020).
35. Tremblay, M.-È., Lowery, R. L. & Majewska, A. K. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol.* **8**, e1000527 (2010).
36. Paolicelli, R. C. *et al.* Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science.* **333**, 1456–1458 (2011).
37. Schafer, D. P. *et al.* Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* **74**, 691–705 (2012).
38. Schechter, R. W. *et al.* Experience-Dependent Synaptic Plasticity in V1 Occurs without Microglial CX3CR1. *J. Neurosci.* **37**, 10541–10553 (2017).
39. Lowery, R. L., Tremblay, M.-E., Hopkins, B. E. & Majewska, A. K. The microglial fractalkine receptor is not required for activity-dependent plasticity in the mouse visual system. *Glia* **65**, 1744–1761 (2017).
40. Ikegami, A., Haruwaka, K. & Wake, H. Microglia: Lifelong modulator of neural circuits. *Neuropathology* **39**, 173–180 (2019).
41. Sipe, G. O. *et al.* Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat. Commun.* **7**, 10905 (2016).
42. Liu, H., Leak, R. K. & Hu, X. Neurotransmitter receptors on microglia. *BMJ* **1**, 52–58 (2016).
43. Fontainhas, A. M. *et al.* Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLoS One* **6**, e15973 (2011).
44. Li, Y., Du, X., Liu, C., Wen, Z. & Du, J. Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* **23**, 1189–1202 (2012).
45. Edmonson, C. A., Ziats, M. N. & Rennert, O. M. A Non-inflammatory Role for Microglia in Autism Spectrum Disorders. *Front. Neurol.* **7**, 1–6 (2016).
46. Bar, E. & Barak, B. Microglia roles in synaptic plasticity and myelination in homeostatic conditions and neurodevelopmental disorders. *Glia* **67**, 2125–2141 (2019).
47. Morgan, J. T. *et al.* Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biol. Psychiatry* **68**, 368–376 (2010).
48. Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W. & Pardo, C. A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* **57**, 67–81 (2005).
49. Tetreault, N. A. *et al.* Microglia in the Cerebral Cortex in Autism. *J. Autism Dev. Disord.* **42**, 2569–2584 (2012).
50. Suzuki, K. *et al.* Microglial Activation in Young Adults With Autism Spectrum Disorder. *JAMA Psychiatry* **70**, 49 (2013).
51. Voineagu, I. *et al.* Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* **474**, 380–384 (2011).
52. Gupta, S. *et al.* Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat. Commun.* **5**, 5748 (2014).
53. Chez, M. G., Dowling, T., Patel, P. B., Khanna, P. & Kominsky, M. Elevation of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Cerebrospinal Fluid of Autistic Children. *Pediatr. Neurol.* **36**, 361–365 (2007).
54. Morgan, J. T. *et al.* Abnormal microglial–neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Res.* **1456**, 72–81 (2012).
55. Wei, H. *et al.* IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *J. Neuroinflammation* **8**, 52 (2011).
56. Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A. & Stevens, B. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* **36**, 605–613 (2015).

57. Koyama, R. & Ikegaya, Y. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Neurosci. Res.* **100**, 1–5 (2015).
58. Bernardinelli, Y., Nikonenko, I. & Muller, D. Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Front. Neuroanat.* **8**, 1–9 (2014).
59. Zhan, Y. *et al.* Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* **17**, 400–406 (2014).
60. Lord, C. *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6**, 5 (2020).
61. Filipello, F. *et al.* The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity* **48**, 979–991.e8 (2018).
62. Phan, B. N. *et al.* A myelin-related transcriptomic profile is shared by Pitt–Hopkins syndrome models and human autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* **23**, 375–385 (2020).
63. Bian, Z. *et al.* Deciphering human macrophage development at single-cell resolution. *Nature* **582**, 571–576 (2020).
64. Boche, D., Perry, V. H. & Nicoll, J. A. R. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 3–18 (2013).
65. Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* **117**, 145–152 (1999).
66. Cuadros, M. A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A. & Navascués, J. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **330**, 113–129 (1993).
67. Herbomel, P., Thisse, B. & Thisse, C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* **126**, 3735–3745 (1999).
68. Gore, A. V., Pillay, L. M., Venero Galanternik, M. & Weinstein, B. M. The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **7**, e312 (2018).
69. Elsaid, R. *et al.* Hematopoiesis: A Layered Organization Across Chordate Species. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
70. Sabin, F. Studies on the origins of blood-vessels and of red blood- corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of development. *Contrib. Embryol.* **36**, 213–262 (1920).
71. Xiong, J.-W. Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Dev. Dyn.* **237**, 1218–1231 (2008).
72. Paik, E. J. & Zon, L. I. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 1127–1137 (2010).
73. Bennett, C. M. *et al.* Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* **98**, 643–651 (2001).
74. Detrich, H. W. *et al.* Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10713–10717 (1995).
75. Herbomel, P., Thisse, B. & Thisse, C. Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process. *Dev. Biol.* **238**, 274–288 (2001).
76. Xu, J. *et al.* Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Dev. Cell* **34**, 632–641 (2015).
77. Ferrero, G. *et al.* Embryonic Microglia Derive from Primitive Macrophages and Are Replaced by cmyb-Dependent Definitive Microglia in Zebrafish. *Cell Rep.* **24**, 130–141 (2018).
78. Lieschke, G. J. *et al.* Zebrafish SPI-1 (PU.1) Marks a Site of Myeloid Development Independent of Primitive Erythropoiesis: Implications for Axial Patterning. *Dev. Biol.* **246**, 274–295 (2002).
79. Li, L., Jin, H., Xu, J., Shi, Y. & Wen, Z. Irf8 regulates macrophage versus neutrophil fate during zebrafish primitive myelopoiesis. *Blood* **117**, 1359–1369 (2011).
80. Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A. & Lieschke, G. J. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* **117**, e49–e56 (2011).
81. Zakrzewska, A. *et al.* Macrophage-specific gene functions in Spi1-directed innate immunity. *Blood* **116**, e1–e11 (2010).
82. Walton, E. M., Cronan, M. R., Beerman, R. W. & Tobin, D. M. The Macrophage-Specific Promoter mfap4 Allows Live, Long-Term Analysis of Macrophage Behavior during Mycobacterial Infection in Zebrafish. *PLoS One* **10**, e0138949 (2015).
83. Le Guyader, D. *et al.* Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood* **111**, 132–141 (2008).
84. Jin, H. *et al.* c-Myb acts in parallel and cooperatively with Cebp1 to regulate neutrophil maturation in zebrafish. *Blood* **128**, 415–426 (2016).
85. Liu, F. & Wen, Z. Cloning and expression pattern of the lysozyme C gene in zebrafish. *Mech.*

- Dev.* **113**, 69–72 (2002).
86. Meijer, A. H. *et al.* Identification and real-time imaging of a myc-expressing neutrophil population involved in inflammation and mycobacterial granuloma formation in zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 36–49 (2008).
 87. Lieschke, G. J., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C. & Layton, J. E. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* **98**, 3087–3096 (2001).
 88. Jin, H. *et al.* Runx1 regulates embryonic myeloid fate choice in zebrafish through a negative feedback loop inhibiting Pu.1 expression. *Blood* **119**, 5239–5249 (2012).
 89. Galloway, J. L., Wingert, R. A., Thisse, C., Thisse, B. & Zon, L. I. Loss of Gata1 but Not Gata2 Converts Erythropoiesis to Myelopoiesis in Zebrafish Embryos. *Dev. Cell* **8**, 109–116 (2005).
 90. Liao, W. *et al.* The zebrafish gene *cloche* acts upstream of a *flk-1* homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development* **124**, 381–389 (1997).
 91. de Jong, J. L. O. & Zon, L. I. Use of the Zebrafish System to Study Primitive and Definitive Hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 481–501 (2005).
 92. Jin, S.-W. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* **132**, 5199–5209 (2005).
 93. Brownlie, A. *et al.* Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish. *Dev. Biol.* **255**, 48–61 (2003).
 94. Ganis, J. J. *et al.* Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR. *Dev. Biol.* **366**, 185–194 (2012).
 95. Long, Q. *et al.* GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development* **124**, 4105–4111 (1997).
 96. Bertrand, J. Y. *et al.* Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development* **134**, 4147–4156 (2007).
 97. Bertrand, J. Y. *et al.* Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* **464**, 108–111 (2010).
 98. Li, X. *et al.* *Elavl1a* regulates zebrafish erythropoiesis via posttranscriptional control of *gata1*. *Blood* **123**, 1384–1392 (2014).
 99. Seco, P., Martins, G. G., Jacinto, A. & Tavares, A. T. A Bird's Eye View on the Origin of Aortic Hemogenic Endothelial Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–8 (2020).
 100. Thompson, M. A. *et al.* The *cloche* and *spade* tail Genes Differentially Affect Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Dev. Biol.* **197**, 248–269 (1998).
 101. Bertrand, J. Y., Kim, A. D., Teng, S. & Traver, D. CD41+ *cmyb*+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Development* **135**, 1853–1862 (2008).
 102. Lin, H.-F. *et al.* Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* **106**, 3803–3810 (2005).
 103. Kalev-Zylinska, M. L. *et al.* Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX-1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development* **129**, 2015–2030 (2002).
 104. Burns, C. E. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev.* **19**, 2331–2342 (2005).
 105. Sood, R. *et al.* Development of multilineage adult hematopoiesis in the zebrafish with a *runx1* truncation mutation. *Blood* **115**, 2806–2809 (2010).
 106. Murayama, E. *et al.* Tracing Hematopoietic Precursor Migration to Successive Hematopoietic Organs during Zebrafish Development. *Immunity* **25**, 963–975 (2006).
 107. Blaser, B. W. *et al.* CXCR1 remodels the vascular niche to promote hematopoietic stem and progenitor cell engraftment. *J. Exp. Med.* **214**, 1011–1027 (2017).
 108. Jin, H. *et al.* Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. *Development* **136**, 647–654 (2009).
 109. Berman, J. N., Kanki, J. P. & Look, A. T. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. *Exp. Hematol.* **33**, 997–1006 (2005).
 110. Ginhoux, F. *et al.* Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*. **330**, 841–845 (2010).
 111. De, S. *et al.* Two distinct ontogenies confer heterogeneity to mouse brain microglia. *Development* **145**, dev152306 (2018).
 112. Wu, S. *et al.* Il34-Csf1r Pathway Regulates the Migration and Colonization of Microglial Precursors. *Dev. Cell* **46**, 552–563.e4 (2018).
 113. Kuil, L. E. *et al.* Reverse genetic screen reveals that Il34 facilitates yolk sac macrophage

- distribution and seeding of the brain. *Dis. Model. Mech.* **12**, dmm037762 (2019).
114. Sieger, D., Moritz, C., Ziegenhals, T., Prykhodzhiy, S. & Peri, F. Long-Range Ca²⁺ Waves Transmit Brain-Damage Signals to Microglia. *Dev. Cell* **22**, 1138–1148 (2012).
 115. Oosterhof, N. *et al.* Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R) Regulates Microglia Density and Distribution, but Not Microglia Differentiation In Vivo. *Cell Rep.* **24**, 1203–1217.e6 (2018).
 116. Ferrero, G., Miserocchi, M., Di Ruggiero, E. & Wittamer, V. A c sf1rb mutation uncouples two waves of microglia development in zebrafish. *Development* **148**, dev194241 (2021).
 117. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D. & Huber, T. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–14 (2013).
 118. Tavares, A. T., Andrade, S., Silva, A. C. & Belo, J. A. Cerberus is a feedback inhibitor of Nodal asymmetric signaling in the chick embryo. *Development* **134**, 2051–2060 (2007).
 119. Teixeira, V., Arede, N., Gardner, R., Rodríguez-León, J. & Tavares, A. T. Targeting the hemangioblast with a novel cell type-specific enhancer. *BMC Dev. Biol.* **11**, 76 (2011).
 120. Gordon-Keylock, S. & Medvinsky, A. Endothelio-hematopoietic relationship: getting closer to the beginnings. *BMC Biol.* **9**, 88 (2011).
 121. Serrado Marques, J., Teixeira, V., Jacinto, A. & Tavares, A. Identification of Novel Hemangioblast Genes in the Early Chick Embryo. *Cells* **7**, 9 (2018).
 122. Aziz, A., Harrop, S. P. & Bishop, N. E. DIA1R Is an X-Linked Gene Related to Deleted In Autism-1. *PLoS One* **6**, e14534 (2011).
 123. Aziz, A., Karmi, T. & Bishop, N. Autism and Dia1 Family: Cellular Secretory Pathway. in *Comprehensive Guide to Autism* (eds. Patel, V. B., Preedy, V. R. & Martin, C. R.) 1433–1456 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-4788-7_80.
 124. Aziz, A., Harrop, S. P. & Bishop, N. E. Characterization of the Deleted in Autism 1 Protein Family: Implications for Studying Cognitive Disorders. *PLoS One* **6**, e14547 (2011).
 125. Dudkiewicz, M., Lenart, A. & Pawłowski, K. A Novel Predicted Calcium-Regulated Kinase Family Implicated in Neurological Disorders. *PLoS One* **8**, e66427 (2013).
 126. Good, C. D. *et al.* Dosage-sensitive X-linked locus influences the development of amygdala and orbitofrontal cortex, and fear recognition in humans. *Brain* **126**, 2431–2446 (2003).
 127. Yang, F., Babak, T., Shendure, J. & Distech, C. M. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res.* **20**, 614–622 (2010).
 128. Tukiainen, T. *et al.* Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* **550**, 244–248 (2017).
 129. Rea, V. & Van Raay, T. J. Using Zebrafish to Model Autism Spectrum Disorder: A Comparison of ASD Risk Genes Between Zebrafish and Their Mammalian Counterparts. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 1–19 (2020).
 130. Howe, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498–503 (2013).
 131. Meshalkina, D. A. *et al.* Zebrafish models of autism spectrum disorder. *Exp. Neurol.* **299**, 207–216 (2018).
 132. Cannon, J. E. *et al.* Global analysis of the haematopoietic and endothelial transcriptome during zebrafish development. *Mech. Dev.* **130**, 122–131 (2013).
 133. Rauwerda, H. *et al.* Mother-Specific Signature in the Maternal Transcriptome Composition of Mature, Unfertilized Zebrafish Eggs. *PLoS One* **11**, e0147151 (2016).
 134. Ciau-Uitz, A., Monteiro, R., Kirmizitas, A. & Patient, R. Developmental hematopoiesis: Ontogeny, genetic programming and conservation. *Exp. Hematol.* **42**, 669–683 (2014).
 135. Swiers, G., Rode, C., Azzoni, E. & de Bruijn, M. F. T. R. A short history of hemogenic endothelium. *Blood Cells, Mol. Dis.* **51**, 206–212 (2013).
 136. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49–92 (1951).
 137. White, R. J. *et al.* A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife* **6**, e30860 (2017).
 138. Lee, C. Z. W., Kozaki, T. & Ginhoux, F. Studying tissue macrophages in vitro: are iPSC-derived cells the answer? *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 716–725 (2018).
 139. Muffat, J. *et al.* Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **22**, 1358–1367 (2016).
 140. Mazzolini, J. *et al.* Gene expression profiling reveals a conserved microglia signature in larval zebrafish. *Glia* **68**, 298–315 (2020).
 141. Oosterhof, N. *et al.* Identification of a conserved and acute neurodegeneration-specific microglial transcriptome in the zebrafish. *Glia* **65**, 138–149 (2017).
 142. Holtzman, N. G., Iovine, M. K., Liang, J. O. & Morris, J. Learning to Fish with Genetics: A Primer

- on the Vertebrate Model *Danio rerio*. *Genetics* **203**, 1069–1089 (2016).
143. Liu, K., Petree, C., Requena, T., Varshney, P. & Varshney, G. K. Expanding the CRISPR Toolbox in Zebrafish for Studying Development and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–15 (2019).
 144. Yuan, S. & Sun, Z. Microinjection of mRNA and Morpholino Antisense Oligonucleotides in Zebrafish Embryos. *J. Vis. Exp.* 27–29 (2009) doi:10.3791/1113.
 145. Rosen, J. N., Sweeney, M. F. & Mably, J. D. Microinjection of Zebrafish Embryos to Analyze Gene Function. *J. Vis. Exp.* 1–5 (2009) doi:10.3791/1115.
 146. Vejnar, C. E., Moreno-Mateos, M. A., Cifuentes, D., Bazzini, A. A. & Giraldez, A. J. Optimized CRISPR–Cas9 System for Genome Editing in Zebrafish. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, pdb.prot086850 (2016).
 147. Moreno-Mateos, M. A. *et al.* CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR–Cas9 targeting in vivo. *Nat. Methods* **12**, 982–988 (2015).
 148. Mahabir, S., Chatterjee, D., Buske, C. & Gerlai, R. Maturation of shoaling in two zebrafish strains: A behavioral and neurochemical analysis. *Behav. Brain Res.* **247**, 1–8 (2013).
 149. Vignet, C. *et al.* Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains. *Zebrafish* **10**, 365–375 (2013).
 150. Brandão, A. S. *et al.* Yap induces osteoblast differentiation by modulating Bmp signalling during zebrafish caudal fin regeneration. *J. Cell Sci.* **132**, jcs231993 (2019).
 151. Veldman, M. B. & Lin, S. Etsrp/Etv2 Is Directly Regulated by Foxc1a/b in the Zebrafish Angioblast. *Circ. Res.* **110**, 220–229 (2012).
 152. Ma, A. C. H., Chung, M. I. S., Liang, R. & Leung, A. Y. H. A DEAB-sensitive aldehyde dehydrogenase regulates hematopoietic stem and progenitor cells development during primitive hematopoiesis in zebrafish embryos. *Leukemia* **24**, 2090–2099 (2010).
 153. Hu, B. *et al.* Zebrafish eaf1 suppresses foxo3b expression to modulate transcriptional activity of gata1 and spi1 in primitive hematopoiesis. *Dev. Biol.* **388**, 81–93 (2014).
 154. Zabinyakov, N. *et al.* Characterization of the first knock-out aldh7a1 zebrafish model for pyridoxine-dependent epilepsy using CRISPR–Cas9 technology. *PLoS One* **12**, e0186645 (2017).
 155. Ponchel, F. *et al.* Real-time PCR based on SYBR–Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* **3**, 1–13 (2003).
 156. TANG, R., DODD, A., LAI, D., MCNABB, W. C. & LOVE, D. R. Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT–PCR Normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **39**, 384–390 (2007).
 157. He, S. *et al.* Adult zebrafish Langerhans cells arise from hematopoietic stem/progenitor cells. *Elife* **7**, (2018).
 158. Mazzolini, J., Chia, K. & Sieger, D. Isolation and RNA Extraction of Neurons, Macrophages and Microglia from Larval Zebrafish Brains. *J. Vis. Exp.* **2018**, 1–8 (2018).
 159. Perfetto, S. P. *et al.* Amine reactive dyes: An effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **313**, 199–208 (2006).
 160. Xu, J., Wang, T., Wu, Y., Jin, W. & Wen, Z. Microglia Colonization of Developing Zebrafish Midbrain Is Promoted by Apoptotic Neuron and Lysophosphatidylcholine. *Dev. Cell* **38**, 214–222 (2016).
 161. Chia, K., Mazzolini, J., Mione, M. & Sieger, D. Tumor initiating cells induce Cxcr4-mediated infiltration of pro-tumoral macrophages into the brain. *Elife* **7**, 1–28 (2018).
 162. Nasevicius, A. & Ekker, S. C. Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat. Genet.* **26**, 216–220 (2000).
 163. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529 (2017).
 164. Parant, J. M., George, S. A., Pryor, R., Wittwer, C. T. & Yost, H. J. A rapid and efficient method of genotyping zebrafish mutants. *Dev. Dyn.* **238**, 3168–3174 (2009).
 165. Patterson, L. J. *et al.* The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood* **109**, 2389–2398 (2007).
 166. Jones, S. L., Wang, J., Turck, C. W. & Brown, E. J. A role for the actin-bundling protein I-plastin in the regulation of leukocyte integrin function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9331–9336 (1998).
 167. Soza-Ried, C., Hess, I., Netuschil, N., Schorpp, M. & Boehm, T. Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17304–17308 (2010).
 168. Svahn, A. J. *et al.* Development of ramified microglia from early macrophages in the zebrafish optic tectum. *Dev. Neurobiol.* **73**, 60–71 (2013).

169. Oosterhof, N., Boddeke, E. & van Ham, T. J. Immune cell dynamics in the CNS: Learning from the zebrafish. *Glia* **63**, 719–735 (2015).
170. Kok, F. O. *et al.* Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. *Dev. Cell* **32**, 97–108 (2015).
171. Stainier, D. Y. R. *et al.* Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLOS Genet.* **13**, e1007000 (2017).
172. Eisen, J. S. & Smith, J. C. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735–1743 (2008).
173. Varshney, G. K. *et al.* High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Res.* **25**, 1030–1042 (2015).
174. Stainier, D. Y. R., Kontarakis, Z. & Rossi, A. Making Sense of Anti-Sense Data. *Dev. Cell* **32**, 7–8 (2015).
175. Rossi, A. *et al.* Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* **524**, 230–233 (2015).
176. San, B. *et al.* The *ezh2(sa1199)* mutant zebrafish display no distinct phenotype. *PLoS One* **14**, e0210217 (2019).
177. Kochetov, A. V. Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *BioEssays* **30**, 683–691 (2008).
178. Shi, X. *et al.* Functions of *idh1* and its mutation in the regulation of developmental hematopoiesis in zebrafish. *Blood* **125**, 2974–2984 (2015).
179. Thisse, C. & Thisse, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59–69 (2008).
180. Palasin, K. *et al.* Abnormal development of zebrafish after knockout and knockdown of ribosomal protein L10a. *Sci. Rep.* **9**, 18130 (2019).
181. Belele, C. L. *et al.* Differential requirement for Gata1 DNA binding and transactivation between primitive and definitive stages of hematopoiesis in zebrafish. *Blood* **114**, 5162–5172 (2009).
182. Salic, A. & Mitchison, T. J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2415–2420 (2008).
183. Zhang, P. & Liu, F. In vivo imaging of hematopoietic stem cell development in the zebrafish. *Front. Med.* **5**, 239–247 (2011).
184. Dobrzycki, T., Krecsmarik, M. & Monteiro, R. Genotyping and Quantification of In Situ Hybridization Staining in Zebrafish. *J. Vis. Exp.* **2020**, 1–7 (2020).
185. Ma, Z. & Chen, J. Premature Termination Codon-Bearing mRNA Mediates Genetic Compensation Response. *Zebrafish* **17**, 157–162 (2020).
186. El-Brolosy, M. A. *et al.* Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* **568**, 193–197 (2019).
187. Ma, Z. *et al.* PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature* **568**, 259–263 (2019).
188. Holden, L. A. & Brown, K. H. Baseline mRNA expression differs widely between common laboratory strains of zebrafish. *Sci. Rep.* **8**, 4780 (2018).
189. Casano, A. M., Albert, M. & Peri, F. Developmental Apoptosis Mediates Entry and Positioning of Microglia in the Zebrafish Brain. *Cell Rep.* **16**, 897–906 (2016).
190. Wu, S. *et al.* Two phenotypically and functionally distinct microglial populations in adult zebrafish. *Sci. Adv.* **6**, eabd1160 (2020).
191. Paolicelli, R. C. & Ferretti, M. T. Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Front. Synaptic Neurosci.* **9**, 1–17 (2017).
192. Rooijen, N. Van & Sanders, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* **174**, 83–93 (1994).
193. Kumamaru, H. *et al.* Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. *J. Neuroinflammation* **9**, 647 (2012).
194. Cunningham, C. L., Martinez-Cerdeno, V. & Noctor, S. C. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **33**, 4216–4233 (2013).
195. Courchesne, E. *et al.* Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism. *JAMA* **306**, 2001 (2011).
196. Courchesne, E. *et al.* An Overabundance of Prefrontal Cortex Neurons Underlies Early Brain Overgrowth in Autism. in *Neurosterology* 73–83 (John Wiley & Sons, Inc., 2013). doi:10.1002/9781118444177.ch6.
197. Marín-Teva, J. L. *et al.* Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron* **41**, 535–547 (2004).
198. Jacobs, A. J., Castillo-Ruiz, A., Cisternas, C. D. & Forger, N. G. Microglial Depletion Causes

- Region-Specific Changes to Developmental Neuronal Cell Death in the Mouse Brain. *Dev. Neurobiol.* **79**, 769–779 (2019).
199. Almeida, R. G. *et al.* Myelination of Neuronal Cell Bodies when Myelin Supply Exceeds Axonal Demand. *Curr. Biol.* **28**, 1296–1305.e5 (2018).
 200. Oosterhof, N. *et al.* Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia. *Am. J. Hum. Genet.* **104**, 936–947 (2019).
 201. Morales, R. A. & Allende, M. L. Peripheral Macrophages Promote Tissue Regeneration in Zebrafish by Fine-Tuning the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* **10**, 1–14 (2019).
 202. Hamilton, N. *et al.* The failure of microglia to digest developmental apoptotic cells contributes to the pathology of RNASET2-deficient leukoencephalopathy. *Glia* **68**, 1531–1545 (2020).
 203. Jin, W. *et al.* Dysregulation of Microglial Function Contributes to Neuronal Impairment in Mcoln1a-Deficient Zebrafish. *iScience* **13**, 391–401 (2019).
 204. Zimmermann, F. F., Gaspary, K. V., Leite, C. E., De Paula Cognato, G. & Bonan, C. D. Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis. *Neurotoxicol. Teratol.* **52**, 36–41 (2015).
 205. McCarthy, M. M. & Wright, C. L. Convergence of Sex Differences and the Neuroimmune System in Autism Spectrum Disorder. *Biol. Psychiatry* **81**, 402–410 (2017).
 206. Bordt, E. A., Ceasrine, A. M. & Bilbo, S. D. Microglia and sexual differentiation of the developing brain: A focus on ontogeny and intrinsic factors. *Glia* **68**, 1085–1099 (2020).
 207. Hendriks, W. T., Warren, C. R. & Cowan, C. A. Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell* **18**, 53–65 (2016).
 208. Andoh, M., Ikegaya, Y. & Koyama, R. Microglia as possible therapeutic targets for autism spectrum disorders. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 167 223–245 (Elsevier Inc., 2019).

Anexo. Artigo Científico

Contribuição para o artigo científico “*A Bird’s Eye View on the Origin of Aortic Hemogenic Endothelial Cells*”

No início deste projeto de tese, surgiu a oportunidade de contribuir para a finalização de um projeto adicional em embriões de galinha, centrado na origem embrionária das células endoteliais hemogénicas da aorta dorsal. Durante o desenvolvimento hematopoiético, o endotélio hemogénico da aorta dorsal é considerado o principal local de produção das HSPCs definitivas. Contudo apesar de mais de 40 anos de investigação, ainda existe um debate científico intenso sobre a origem intraembrionária vs. extraembrionária das células endoteliais hemogénicas e das HSPCs. O conhecimento do processo de desenvolvimento destas células é particularmente relevante para a otimização de protocolos de produção de células estaminais hematopoiéticas em cultura para terapia celular. A nossa investigação demonstrou que uma subpopulação destas células endoteliais hemogénicas é derivada de hemangioblastos, os precursores das ilhotas sanguíneas extraembrionárias, conduzindo assim a uma nova perspetiva sobre a origem embrionária do sangue.

A minha principal contribuição para elaboração deste artigo científico centrou-se na escrita e revisão do manuscrito. Assim, foi com enorme alegria que no passado dia 17 de novembro de 2020 vimos ser publicado o nosso artigo de perspetiva na revista “*Frontiers in Cell and Developmental Biology*”. Este trabalho foi destacado nas redes sociais da NMS, do CEDOC e da COLife e divulgado na secção “*Article at a Glance*” da página oficial do CEDOC, com o título “*Research coming out of the shell: What is the embryonic origin of blood stem cells?*” (<http://cedoc.unl.pt/solutions-view/a-jacinto-lab-research-coming-out-of-the-shell-what-is-the-embryonic-origin-of-blood-stem-cells/>).

Uma vez que a minha contribuição para este artigo não envolveu a realização das experiências laboratoriais que o acompanham, decidimos não incluir estes dados no **Capítulo 3. Resultados** da presente dissertação de mestrado. Contudo, referenciamos este nosso artigo como referência bibliográfica número 99 nos **Capítulos 1.3 e 1.4**, e consideramos ser oportuno apresentar este texto explicativo da minha contribuição e anexar o artigo científico à dissertação. Em seguida são apresentados a respetiva referência bibliográfica e o artigo científico.

Seco, P., Martins, G. G., Jacinto, A. & Tavares, A. T. A Bird’s Eye View on the Origin of Aortic Hemogenic Endothelial Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–8 (2020).

An



A Bird's Eye View on the Origin of Aortic Hemogenic Endothelial Cells

Pedro Seco¹, Gabriel G. Martins^{2,3}, António Jacinto¹ and Ana Teresa Tavares^{1*}

¹ iNOVA4Health, CEDOC, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal, ² Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal, ³ Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

OPEN ACCESS

Edited by:

Susana Solá,
University of Lisbon, Portugal

Reviewed by:

Valerie Kouskoff,
The University of Manchester,
United Kingdom
Eirini Trompouki,
Max Planck Institute
for Immunobiology and Epigenetics,
Germany

Thierry Jaffredo,

Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

*Correspondence:

Ana Teresa Tavares
anateresa.tavares@nms.unl.pt

Specialty section:

This article was submitted to
Stem Cell Research,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 11 September 2020

Accepted: 28 October 2020

Published: 17 November 2020

Citation:

Seco P, Martins GG, Jacinto A
and Tavares AT (2020) A Bird's Eye
View on the Origin of Aortic
Hemogenic Endothelial Cells.
Front. Cell Dev. Biol. 8:605274.
doi: 10.3389/fcell.2020.605274

During early embryogenesis, the hemogenic endothelium of the developing dorsal aorta is the main source of definitive hematopoietic stem cells (HSCs), which will generate all blood cell lineages of the adult organism. The hemogenic endothelial cells (HECs) of the dorsal aorta are known to arise from the splanchnic lateral plate mesoderm. However, the specific cell lineages and developmental paths that give rise to aortic HECs are still unclear. Over the past half a century, the scientific debate on the origin of aortic HECs and HSCs has largely focused on two potential and apparently alternative birthplaces, the extraembryonic yolk sac blood islands and the intraembryonic splanchnic mesoderm. However, as we argue, both yolk sac blood islands and aortic HECs may have a common hemangioblastic origin. Further insight into aortic HEC development is being gained from fate-mapping studies that address the identity of progenitor cell lineages, rather than their physical location within the developing embryo. In this perspective article, we discuss the current knowledge on the origin of aortic HECs with a particular focus on the evidence provided by studies in the avian embryo, a model that pioneered the field of developmental hematopoiesis.

Keywords: hemogenic endothelium, hemangioblast, dorsal aorta, yolk sac, avian embryo, lineage-tracing

INTRODUCTION

Hemogenic endothelial cells (HECs) are specialized vascular endothelial cells with the potential to give rise to hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) during vertebrate embryogenesis (Jaffredo et al., 1998; Zovein et al., 2008; Gritz and Hirschi, 2016). During this differentiation process, known as endothelial-to-hematopoietic transition (EHT), HECs gradually round up, separate from their neighboring cells and bud off from the endothelium (Eilken et al., 2009; Lancrin et al., 2009; Bertrand et al., 2010; Boisset et al., 2010; Kissa and Herbomel, 2010; Lam et al., 2010; Ottersbach, 2019; **Figure 1A**). Depending on developmental stage and location, HECs differentiate into HSPC populations with different hematopoietic potential. In mammalian and avian embryos, the first HECs are observed in the yolk sac blood islands and give rise to erythro-myeloid progenitors (EMPs) (Li et al., 2005; McGrath et al., 2015; Frame et al., 2016) and lymphoid progenitors (Yoshimoto et al., 2011, 2012). In addition, HECs located in the endocardium only generate EMPs (Nakano et al., 2013), whereas those in the head arteries and vitelline/umbilical arteries generate both EMPs and definitive hematopoietic stem cells (HSCs), the founders of adult hematopoietic cells (De Bruijn et al., 2000; Zovein et al., 2010; Li et al., 2012). Yet, HSC-producing HECs reside

mainly in the ventral wall of the dorsal aorta in all vertebrate embryos studied to date (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Jaffredo et al., 1998; Ciau-Uitz et al., 2000; Oberlin et al., 2002; Zovein et al., 2008; Bertrand et al., 2010). Recent studies suggest that aortic HECs retain a dual potential for differentiation into endothelial or hematopoietic cells (Hou et al., 2020), which may be driven toward a hemogenic fate by local cues that promote their detachment from the endothelium and cell cycle re-entry (Yue et al., 2012; Zhang et al., 2014; Canu et al., 2020).

In contrast to their clear developmental fate, the origin of aortic HECs and HSCs remains a matter of active debate. The enduring question is whether aortic HECs arise from extraembryonic yolk sac-derived progenitors that migrate into the developing aorta or from local intraembryonic progenitors, with experimental evidence supporting both possibilities (reviewed in Medvinsky et al., 2011; Wittamer and Bertrand, 2020). The seemingly contradictory results may be explained by the use of different models, time frames and methods. Namely, the evaluation of HSC differentiation potential in *in vitro* culture and transplantation assays was used to verify the presence of HSC precursor cells in different embryonic tissues. Data from these studies mostly support an intraembryonic origin for aortic HECs (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Cumano et al., 2001; Yvernogeu and Robin, 2017). However, differentiation potentials may not reflect the original developmental fate of the explanted cell populations, which is largely influenced by their natural microenvironment and commitment status. Alternatively, the origin of aortic HECs has been more accurately investigated using fate-mapping and live imaging methods. In particular, lineage-tracing experiments using tamoxifen-inducible mouse models have indicated that yolk sac-derived cells migrate into the embryo and give rise to aortic HECs (Samokhvalov et al., 2007; Tanaka et al., 2014). However, conclusions from these studies may be compromised by the persistence of tamoxifen in the system and consequent labeling of intraembryonic cells (Senserrich et al., 2018). In addition to mouse models, fate-mapping studies in avian embryos have also greatly contributed to the discussion. For more than a century, observations in avian embryo models have led to major fundamental discoveries in the field of hematopoietic development (Le Douarin and Dieterlen-Lièvre, 2013; Jaffredo and Yvernogeu, 2014). After a brief description of yolk sac and dorsal aorta development, this perspective article will review and discuss the experimental evidence in chick and quail embryos that provided key insight into the origin of aortic HECs and vastly enriched our understanding of hematopoietic development.

YOLK SAC AND DORSAL AORTA DEVELOPMENT IN THE AVIAN EMBRYO

To better interpret the evidence supporting each of the two proposed sites of origin of aortic HECs, the yolk sac blood islands (extraembryonic) and the prospective ventral dorsal aorta (intraembryonic), it is important to understand when and how these tissues develop. Both the yolk sac blood islands

and the ventral endothelium of the dorsal aorta derive from the splanchnic lateral plate mesoderm, which, together with the endoderm, forms the splanchnopleure (Prummel et al., 2020). During gastrulation, these mesodermal cells arise from median-posterior sections of the primitive streak, with the posterior region giving rise to more lateral (extraembryonic) tissues (Psychoyos and Stern, 1996). In addition to their common mesodermal origin, the developmental paths of the yolk sac and dorsal aorta are closely coordinated in time and space, thus ensuring the proper establishment of embryonic blood circulation.

The yolk sac blood islands give rise to the extraembryonic vascular network and to the first hematopoietic cells of the developing embryo (Sabin, 1920). These structures are formed by a subpopulation of mesodermal-derived cells known as hemangioblasts, the precursors of both endothelial and hematopoietic cell lineages (Sabin, 1920; Murray, 1932). In the chick embryo, hemangioblasts arise in the yolk sac at Hamburger and Hamilton (HH) stage 5–6 (Hamburger and Hamilton, 1992), where they aggregate into blood islands at stage HH7–8 and start to differentiate into endothelial and hematopoietic cells at stage HH9–10 (Nagai et al., 2018). It is currently thought that these hematopoietic cells originate from two types of hemangioblast-derived progenitors: primitive hematopoietic cells derive from hemogenic angioblasts, whereas EMPs derive from hemogenic endothelial cells (Lacaud and Kouskoff, 2017). Proximal blood islands differentiate only into endothelial cells that will form a connecting network between the extraembryonic vasculature and the intraembryonic vascular plexus (Coffin and Poole, 1988; Nagai et al., 2018). At stages HH9 to HH11, this vascular plexus is contiguous with the developing endocardium (anterior region) and dorsal aorta (posterior region) and will later give rise to the vitelline veins and arteries (le Noble et al., 2004).

The dorsal aorta is not only the first and largest intraembryonic blood vessel, but also an important site of secondary hematopoiesis (reviewed in Medvinsky et al., 2011). In avian embryos, paired dorsal aortae arise at stage HH8 as bilateral longitudinal cords of endothelial precursor cells (or angioblasts), which are derived from the splanchnic mesoderm (Poole and Coffin, 1989; Pardanaud et al., 1996). At stage HH9, angioblasts start to coalesce and remodel into two endothelial vessels. A few hours later (stage HH10), the two vessels move toward the ventral midline, where they will fuse into a single tube (stage HH13) (Pardanaud et al., 1987; Coffin and Poole, 1988). During these stages, somite-derived endothelial cells are integrated into the dorsal region (roof) of the dorsal aorta and gradually displace the splanchnic mesoderm-derived endothelial cells to the ventral region (floor), which is where HECs arise (Pardanaud et al., 1996; Jaffredo et al., 2013). In the caudal region of the embryo, the dorsal aorta elongates posteriorly and becomes attached to the intraembryonic vascular plexus, thus forming a connection with the extraembryonic vascular network (Pardanaud et al., 1987; Coffin and Poole, 1988). Circulating blood cells can be seen in the dorsal aorta by stage HH12 (early day 2 of development), shortly after heartbeat onset at stage HH10–11 (Hogers et al., 1995). From then on, blood circulation between the yolk sac and the embryo body is established, which

An

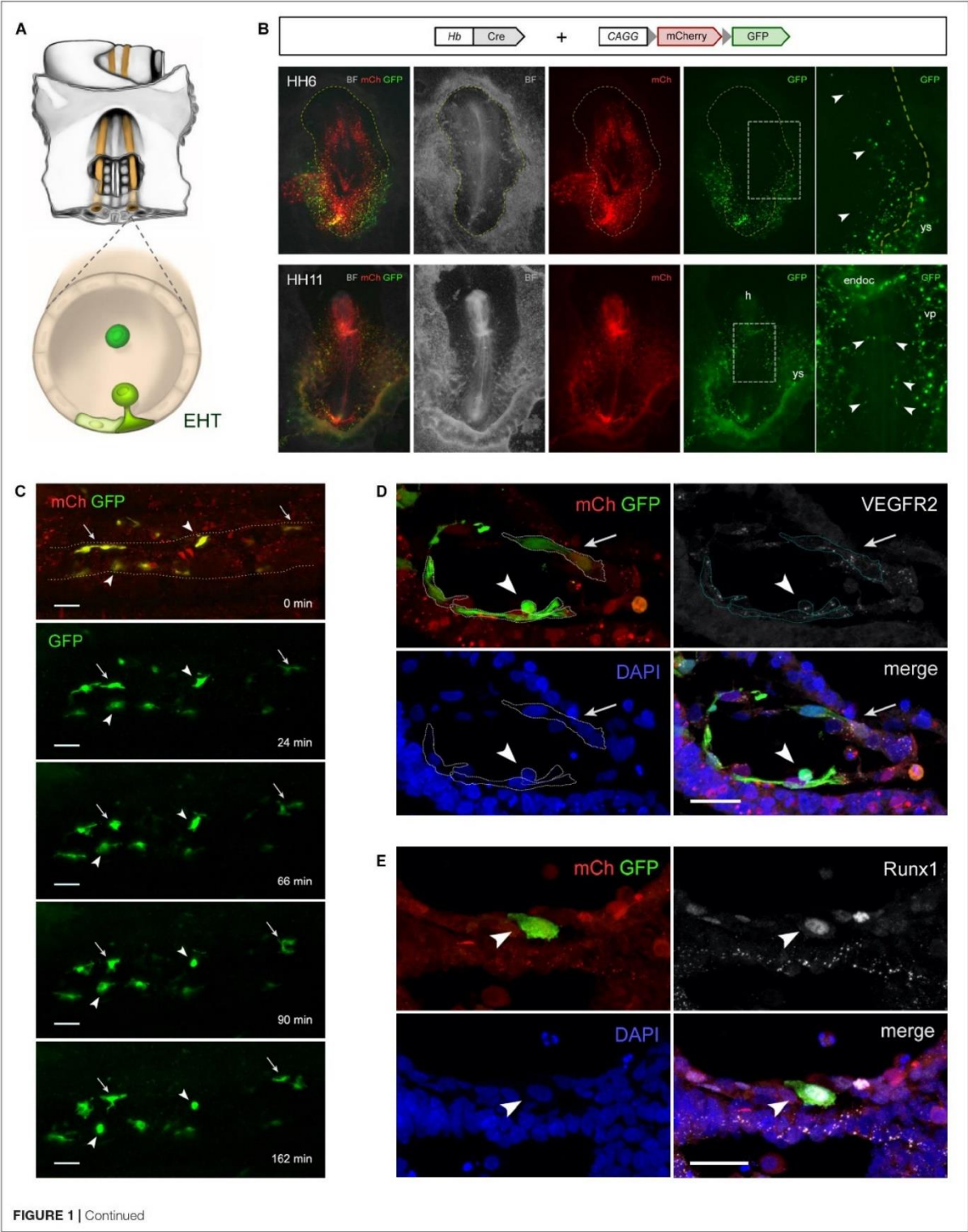


FIGURE 1 | Hemangioblasts give rise to aortic hemogenic endothelial cells in the chick embryo. **(A)** Illustration of the central region of a stage HH11 chick embryo (ventral side up) highlighting the paired dorsal aortae (orange) and the hemogenic endothelial cells (HECs; green) localized in the aortic floor that differentiate into hematopoietic stem/progenitor cells via an endothelial-to-hematopoietic transition (EHT). **(B–E)** Hb-Cre and pCAGG-LoxP-mCherry-LoxP-GFP plasmids were used to analyze the progeny of chick hemangioblasts. Chick embryos were electroporated *ex ovo* at stage HH3 using an Intracel TSS20 electroporator, incubated until stage HH13 in New culture (New, 1955) or until stage HH16 in MC culture (Nagai et al., 2011), and imaged either as whole mounts using a Zeiss SteREO Lumar stereomicroscope **(B)** and a Prairie Multiphoton system **(C)**, or in immunolabeled cryosections using a Zeiss LSM710 confocal microscope **(D,E)**. **(B)** While mCherry (mCh) is ubiquitously expressed in all electroporated cells, GFP expression is specifically detected in hemangioblasts and their progeny. mCh expression in GFP+ cells may result from the presence of unrecombined copies of the reporter construct and/or persistent mCh transcripts and protein. At stage HH6 ($n = 36$; top), GFP+ hemangioblasts are found in both the yolk sac (ys) and the intraembryonic region (arrowhead; dashed yellow line outlines the embryo). At stage HH11 ($n = 52$; bottom), GFP+ hemangioblast-derived cells are found in the yolk sac (ys), head region (h), endocardium (endoc), intraembryonic vascular plexus (vp) and dorsal aorta (arrowheads). **(C)** Time-lapse images of electroporated HH11–12 chick embryo showing the dynamics of GFP+ hemangioblast-derived cells in the dorsal aorta endothelium ($n = 3$; see Video S1 and legend). During the imaging period (168 min), two GFP+ HECs undergo EHT (arrowheads), whereas other GFP+ cells remain as endothelial cells (arrows). **(D,E)** Transverse sections through the dorsal aortae of electroporated chick embryos immunolabeled with primary antibodies against GFP (Roche, 11814460001; Invitrogen, A11122; green), VEGFR2 (gift from Anne Eichmann; Eichmann et al., 1997; $n = 5$; **D**; HH13; white) or Runx1 (Abcam, ab92336; $n = 6$; **E**; HH16; white), and secondary antibodies with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11001 and A11008) or Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, 715-605-151 and 711-605-152). Cell nuclei were labeled with DAPI (Sigma-Aldrich; blue). Electroporated cells are identified by mCh fluorescence (red). **(D)** GFP+ cells co-express VEGFR2, a marker of endothelial cells, and exhibit either a HEC morphology (arrowhead) or a typical endothelial cell shape (arrow). **(E)** Prior to emergence from the aortic floor, a GFP+ cell can be identified as a HEC by Runx1 expression (arrowhead), a marker of endothelial cells with hemogenic potential. BF, brightfield; n , number of embryos.

makes it impossible to determine if aortic HECs that may arise hereafter have an extra- or intraembryonic origin.

TRACING THE ORIGIN OF AVIAN AORTIC HECs

Since aortic HECs arise prior to the establishment of circulation, their progenitor cells are thought to either migrate into the presumptive ventral aorta region from the adjacent yolk sac (extraembryonic origin) or develop *in situ* within the presumptive dorsal aorta region (intraembryonic origin) (Medvinsky et al., 2011; Wittamer and Bertrand, 2020). Both hypotheses have gathered support over the years from fate-mapping studies using classical grafting techniques as well as more recent genetic and time-lapse imaging methods in electroporated or transgenic avian embryos.

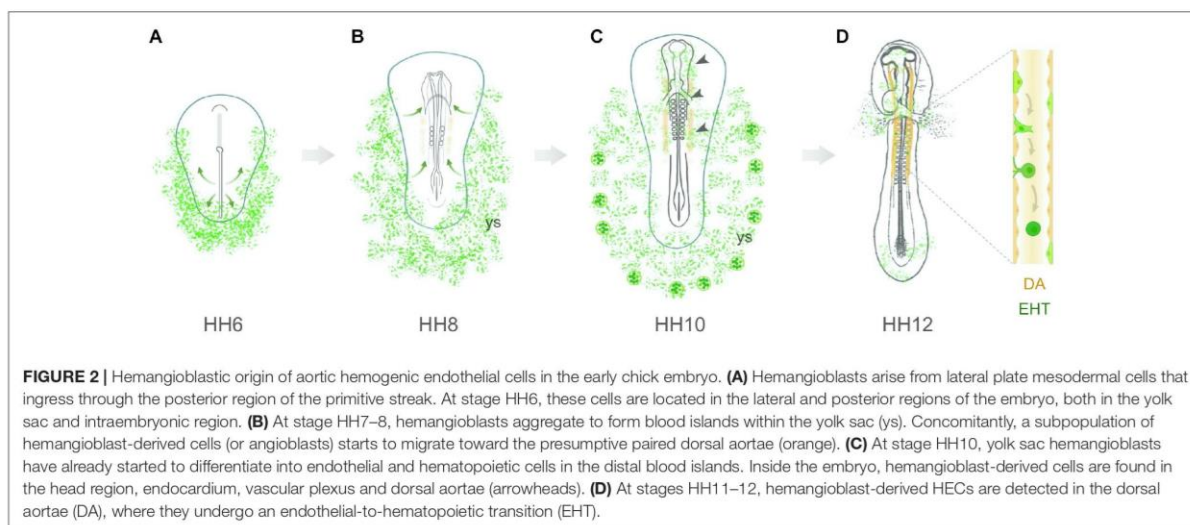
Early experimental studies addressed the origin of definitive HSCs before the identification of aortic HECs as their progenitor cells (Cormier and Dieterlen-Lièvre, 1988; Jaffredo et al., 1998). The colonization of developing hematopoietic organs by yolk sac-derived HSCs was initially suggested by studies using parabiotic chick embryos (Moore and Owen, 1965). Yet, these experiments evaluated only the contribution of circulating cells (at 6–8 days of development), suggesting that embryo-derived HSCs might be already present in the yolk sac. The intraembryonic origin of HSCs was originally proposed in a series of classical grafting studies using avian yolk sac chimeras (reviewed in Jaffredo and Yvernogeau, 2014). The first experimental evidence came from analyzing chimeras of quail embryo bodies grafted onto chick yolk sacs before circulation is established. In most chimeras, the dorsal aorta (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981), spleen and thymus (Dieterlen-Lièvre, 1975) contained exclusively quail cells, thus indicating that the adult hematopoietic system was derived from the embryo proper and not from the yolk sac. The same conclusion was reached in studies of homospecific yolk sac chimeras from different-sex or allogeneic chick embryos (Lassila et al., 1978, 1982; Martin et al., 1978; Beaupain et al., 1979). Nonetheless, since the earliest stage of grafting was HH9

(Dieterlen-Lièvre, 1975; Lassila et al., 1978; Beaupain et al., 1979; Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981), the possibility exists that yolk sac-derived angioblasts (or hemangioblasts) have colonized the presumptive dorsal aorta region before this stage.

The hypothesis that hemangioblasts give rise to aortic endothelial cells is supported by evidence showing that dorsal aorta-forming angioblasts express the hemangioblast and endothelial/blood marker *Tal1/Scf* (Drake et al., 1997) and that extraembryonic cells migrate to and contribute to the dorsal aorta endothelium (Sato et al., 2010; Tanaka et al., 2014; Eliades et al., 2016). However, as mentioned earlier, developmental cell fate is best addressed with *in vivo* lineage-tracing and time-lapse imaging methods, which first require the identification of a lineage-specific marker capable of labeling a particular cell population and its progeny (Stern and Fraser, 2001). Indeed, we have identified a hemangioblast enhancer (Hb) that is able to specifically activate the expression of a reporter gene (eGFP) in chick embryo hemangioblasts as they ingress through the posterior primitive streak at stages HH3 to HH6 (Teixeira et al., 2011). The Hb-eGFP reporter was used to study the dynamics of blood island morphogenesis in live imaging assays (Teixeira et al., 2011), and to isolate and characterize the gene expression profile of chick embryo hemangioblasts (Serrado Marques et al., 2018). Moreover, Zamir et al. (2017) used this reporter to show that a subpopulation of Hb-eGFP+ hemangioblasts gives rise to hemogenic angioblasts that can be found in both the extraembryonic yolk sac and intraembryonic lateral plate mesoderm at stage HH7, and that contribute to the hemogenic endothelium of the dorsal aorta. However, although eGFP RNA and protein stability may enable the detection of Hb-eGFP+ hemangioblast-derived cells, lineage-tracing analysis is required to accurately identify the progeny of hemangioblasts.

In order to label and trace the hemangioblast lineage, we took advantage of a Cre-Lox system in which a plasmid containing the hemangioblast enhancer driving Cre recombinase expression (Hb-Cre) and the conditional reporter plasmid pCAGG-LoxP-mCherry-LoxP-GFP are co-electroporated into chick embryos (stage HH3), as previously reported for neuronal lineages (Avraham et al., 2009). In this system, cells that express Cre

An



under the control of the Hb enhancer will recombine out the floxed mCherry sequence and activate GFP expression, enabling the identification of hemangioblasts as well as their progeny. We observed that GFP⁺ cells are present in both the yolk sac and intraembryonic lateral plate mesoderm at early stages (Figure 1B, top), which supports the existence of a subpopulation of intraembryonic hemangioblasts. At later stages, GFP⁺ hemangioblast-derived cells are detected in the yolk sac blood islands, head region, endocardium, intraembryonic vascular plexus and dorsal aorta (Figure 1B, bottom). Using time-lapse multiphoton microscopy imaging of electroporated chick embryos, we observed that some GFP⁺ cells in the dorsal aorta undergo EHT at stages HH11–12 (Supplementary Video S1 and Figure 1C). GFP⁺ cells in the aortic endothelium display either a flat endothelial morphology or HEC features, as seen also in cross-sections of the dorsal aorta labeled for VEGFR2, a marker of endothelial cells (Eichmann et al., 1993; Figure 1D), and for Runx1, a marker of HECs (Jaffredo et al., 2005; Figure 1E). Of note, Runx1 expression is also detected in some mCherry⁺GFP⁺ cells, suggesting that hemangioblasts are not the exclusive source of aortic hemogenic endothelium. Taken together, these observations indicate that hemangioblast-derived hemogenic angioblasts give rise to a subpopulation of aortic HECs in the chick embryo. However, further experiments are required to reveal the hematopoietic potential of hemangioblast-derived aortic HECs. Our findings are consistent with lineage-tracing experiments in the mouse embryo showing that extraembryonic Runx1⁺ hemogenic angioblasts migrate into the intraembryonic region prior to circulation and contribute to the dorsal aorta hemogenic endothelium (Tanaka et al., 2014). It is therefore, conceivable that both yolk sac blood islands and aortic HECs originate from hemangioblasts.

In summary, recent evidence suggests that hemangioblasts colonize the presumptive dorsal aorta region (stages HH7–8), contribute to the developing aortic endothelium (stages HH9–10) and give rise to aortic HECs (stage HH11 onwards; Figure 2).

Yet, it remains to be determined if these hemangioblasts are originally located in the intraembryonic splanchnic mesoderm (as shown in Figure 1B, top; Zamir et al., 2017) or if they migrate medially from the yolk sac at stages HH7–8. In any case, this early population of aortic HECs progenitors would be reasonably considered to have an intraembryonic origin in grafting studies of yolk sac chimeras established at stage HH9 and later. In conclusion, aortic HECs are likely to originate from multiple sources that combine hemangioblasts and other splanchnic mesoderm-derived hemogenic progenitors.

Further evidence supporting a hemangioblastic origin for aortic HECs was provided by studies in *Xenopus* embryos. Lineage tracing and co-expression analysis of endothelial and blood markers demonstrated that HSC-producing aortic HECs arise from hematovascular progenitors known as adult or definitive hemangioblasts (Walmsley et al., 2002; Ciau-Uitz et al., 2013). Definitive hemangioblasts arise from lateral plate mesodermal cells that express Tal1/Scf and lie close to the somites. These features are also typical of aortic HEC precursors in zebrafish, chick and mouse, suggesting that definitive hemangioblasts may indeed exist in all vertebrates (reviewed in Ciau-Uitz and Patient, 2016). Furthermore, converging evidence has come from *in vitro* differentiation studies of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, which show that definitive HSCs-producing HECs can be derived from hemangioblastic progenitors (reviewed in Chen et al., 2015). Ultimately, this information can be used to develop hemangioblast-based differentiation protocols for the *in vitro* generation of transplantable HSCs.

CONCLUDING REMARKS

The hemogenic endothelium of the developing dorsal aorta is considered to be the major site of HSC production in the early

embryo. As such, aortic HECs have been the subject of extensive research on many of their biological aspects, such as molecular signature, differentiation potential and developmental origin. For over 40 years, the extra- vs. intraembryonic origin of HSCs and aortic HECs has been the focus of numerous studies, for which the avian embryo was a pioneer model. However, classical grafting experiments in avian embryos need to be reinterpreted in light of recent lineage-tracing evidence demonstrating that hemangioblasts give rise to aortic HECs at early developmental stages. This finding is particularly relevant in the context of *in vitro* differentiation of pluripotent stem cells into HSCs for clinical applications.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because all experimental procedures were performed in chicken embryos with less than 3 days of development, which are not considered experimental animal subjects according to the Portuguese Law (Decree-Law 113/2013) and European Guidelines (Directive 2010/63/EU).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PS performed the experiments and contributed to the manuscript writing. GM helped with the research design, image acquisition, and data analysis. AJ contributed to the data interpretation and scientific discussion. AT designed and performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript revision and approved the final version.

REFERENCES

- Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., et al. (2009). Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1. *Neural Dev.* 4:21. doi: 10.1186/1749-8104-4-21
- Beaupain, D., Martin, C., and Dieterlen-Lièvre, F. (1979). Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood* 53, 212–225. doi: 10.1182/blood.V53.2.212.212
- Bertrand, J. Y., Chi, N. C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D. Y. R., and Traver, D. (2010). Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* 464, 108–111. doi: 10.1038/nature08738
- Boisset, J. C., Van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., and Robin, C. (2010). In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464, 116–120. doi: 10.1038/nature08764

FUNDING

This work was supported by the FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (PTDC/BTM-SAL/29377/2017) and iNOVA4Health (UID/Multi/04462/2019). The Advanced Imaging Facility of the Instituto Gulbenkian de Ciência was supported by national Portuguese funding co-financed by the Lisboa Regional Operational Programme (Lisboa 2020), under the Portugal 2020 Partnership Agreement, through the European Regional Development Fund (FEDER) and FCT (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122). AT was funded by the FCT in the context of a program contract under “Norma Transitória” (DL57/2016 of 29 August, as amended by DL57/2017 of 19 July).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Natacha Arede, Vera Teixeira, Ana Farinho, and Telmo Pereira for technical assistance, Ofélia Carvalho for critically revising the manuscript, Anne Eichmann for kindly providing the avian VEGFR2 antibody and Avihu Klar for kindly providing plasmid constructs.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.605274/full#supplementary-material>

Supplementary Video 1 | Hemangioblast-derived hemogenic endothelial cells are detected in the chick embryo dorsal aorta. Time-lapse movie of a stage HH11–12 live chick embryo in New culture electroporated at stage HH3 with Hb-Cre and pCAGG-LoxP-mCherry-LoxP-GFP reporter constructs showing a portion of the dorsal aorta (still frames in **Figure 1C**). The anterior side is to the left. Brightfield images were acquired on a Zeiss SteREO Lumar stereomicroscope (initial frames). Time-lapse 4D stacks were acquired on a Prairie Multiphoton system equipped with GaAsP detectors mounted on an Olympus BX61 microscope equipped with a 10× 0.3NA objective, and the datasets were processed and 3D reconstructed using Fiji (ImageJ) and Imaris software (Bitplane). Red represents mCherry, and green, GFP expression. Arrowheads point at two GFP+ hemogenic endothelial cells that round up and emerge from the aortic wall. Arrows point at GFP+ cells that maintain an endothelial morphology. Time is indicated in minutes in the lower right corner.

An

- Ciau-Uitz, A., Walmsley, M., and Patient, R. (2000). Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*. *Cell* 102, 787–796. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00067-2
- Coffin, J. D., and Poole, T. J. (1988). Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* 102, 735–748.
- Cormier, F., and Dieterlen-Lièvre, F. (1988). The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development* 102, 279–285.
- Cumano, A., Ferraz, J. C., Klaine, M., Di Santo, J. P., and Godin, I. (2001). Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477–485. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00190-X
- De Bruijn, M. F. T. R., Speck, N. A., Peeters, M. C. E., and Dzierzak, E. (2000). Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J.* 19, 2465–2474. doi: 10.1093/emboj/19.11.2465
- Dieterlen-Lièvre, F. (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33, 607–619.
- Dieterlen-Lièvre, F., and Martin, C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.* 88, 180–191. doi: 10.1016/0012-1606(81)90228-1
- Drake, C. J., Brandt, S. J., Trusk, T. C., and Little, C. D. (1997). TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev. Biol.* 192, 17–30. doi: 10.1006/dbio.1997.8751
- Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Bréant, C., and Le Douarin, N. M. (1997). Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5141–5146. doi: 10.1073/pnas.94.10.5141
- Eichmann, A., Marcelle, C., Bréant, C., and Le Douarin, N. M. (1993). Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech. Dev.* 42, 33–48. doi: 10.1016/0925-4773(93)90096-G
- Eilken, H. M., Nishikawa, S. I., and Schroeder, T. (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 457, 896–900. doi: 10.1038/nature07760
- Eliades, A., Wareing, S., Marinopoulou, E., Fadlullah, M. Z. H., Patel, R., Grabarek, J. B., et al. (2016). The hemogenic competence of endothelial progenitors is restricted by Runx1 silencing during embryonic development. *Cell Rep.* 15, 2185–2199. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.001
- Frame, J. M., Fegan, K. H., Conway, S. J., McGrath, K. E., and Palis, J. (2016). Definitive hematopoiesis in the yolk sac emerges from Wnt-responsive hemogenic endothelium independently of circulation and arterial identity. *Stem Cells* 34, 431–444. doi: 10.1002/stem.2213
- Gritz, E., and Hirschi, K. K. (2016). Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1547–1567. doi: 10.1007/s00018-016-2134-0
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* 195, 231–272. doi: 10.1002/aja.1001950404
- Hogers, B., DeRuiter, M. C., Baasten, A. M. J., Gittenberger-de Groot, A. C., and Poelmann, R. E. (1995). Intracardiac blood flow patterns related to the yolk sac circulation of the chick embryo. *Circ. Res.* 76, 871–877. doi: 10.1161/01.RES.76.5.871
- Hou, S., Li, Z., Zheng, X., Gao, Y., Dong, J., Ni, Y., et al. (2020). Embryonic endothelial evolution towards first hematopoietic stem cells revealed by single-cell transcriptomic and functional analyses. *Cell Res.* 30, 376–392. doi: 10.1038/s41422-020-0300-2
- Jaffredo, T., Bollerot, K., Sugiyama, D., Gautier, R., and Drevon, C. (2005). Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 269–277. doi: 10.1387/ijdb.041948tj
- Jaffredo, T., Lempereur, A., Richard, C., Bollerot, K., Gautier, R., Canto, P. Y., et al. (2013). Dorsal-ventral contributions in the formation of the embryonic aorta and the control of aortic hematopoiesis. *Blood Cells, Mol. Dis.* 51, 232–238. doi: 10.1016/j.bcmd.2013.07.004
- Jaffredo, T., Rodolphe, G., Eichmann, A., and Dieterlen-Lièvre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Trends Cardiovasc. Med.* 125, 4575–4583.
- Jaffredo, T., and Yvernogeu, L. (2014). How the avian model has pioneered the field of hematopoietic development. *Exp. Hematol.* 42, 661–668. doi: 10.1016/j.exphem.2014.05.009
- Kissa, K., and Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 464, 112–115. doi: 10.1038/nature08761
- Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2017). Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 49, 19–24. doi: 10.1016/j.exphem.2016.12.009
- Lam, E. Y. N., Hall, C. J., Crosier, P. S., Crosier, K. E., and Flores, M. V. (2010). Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of blood progenitors from endothelial cells. *Blood* 116, 909–914. doi: 10.1182/blood-2010-01-264382
- Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457, 892–895. doi: 10.1038/nature07679
- Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., Martin, C., and Dieterlen-Lièvre, F. (1978). The origin of lymphoid stem cells studied in chick yolk sac-embryo chimaeras. *Nature* 272, 353–354. doi: 10.1038/272353a0
- Lassila, O., Martin, C., Toivanen, P., and Dieterlen-Lièvre, F. (1982). Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells. *Blood* 59, 377–381. doi: 10.1182/blood.V59.2.377.377
- Le Douarin, N. M., and Dieterlen-Lièvre, F. (2013). How studies on the avian embryo have opened new avenues in the understanding of development: a view about the neural and hematopoietic systems. *Dev. Growth Differ.* 55, 1–14. doi: 10.1111/dgd.12015
- le Noble, F., Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Djonov, V., Matthijsen, R., et al. (2004). Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 131, 361–375. doi: 10.1242/dev.00929
- Li, W., Ferkowicz, M. J., Johnson, S. A., Shelley, W. C., and Yoder, M. C. (2005). Endothelial cells in the early murine yolk sac give rise to CD41-expressing hematopoietic cells. *Stem Cells Dev.* 14, 44–54. doi: 10.1089/scd.2005.14.44
- Li, Z., Lan, Y., He, W., Chen, D., Wang, J., Zhou, F., et al. (2012). Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell* 11, 663–675. doi: 10.1016/j.stem.2012.07.004
- Martin, C., Beaupain, D., and Dieterlen-Lièvre, F. (1978). Developmental relationships between vitelline and intra-embryonic hemopoiesis studied in avian 'yolk sac chimaeras'. *Cell Differ.* 7, 115–130. doi: 10.1016/0045-6039(78)90012-X
- McGrath, K. E., Frame, J. M., Fegan, K. H., Bowen, J. R., Conway, S. J., Catherman, S. C., et al. (2015). Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *Cell Rep.* 11, 1892–1904. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.036
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897–906. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80165-8
- Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 138, 1017–1031. doi: 10.1242/dev.040998
- Moore, M., and Owen, J. (1965). Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo. *Nature* 208:956. doi: 10.1038/208956a0
- Murray, P. D. F. (1932). The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol.* 111, 497–521. doi: 10.1098/rspb.1932.0070
- Nagai, H., Lin, M. C., and Sheng, G. (2011). A modified cornish pasty method for ex ovo culture of the chick embryo. *Genesis* 49, 46–52. doi: 10.1002/dvg.20690
- Nagai, H., Shin, M., Weng, W., Nakazawa, F., Jakt, L. M., Alev, C., et al. (2018). Early hematopoietic and vascular development in the chick. *Int. J. Dev. Biol.* 62, 137–144. doi: 10.1387/ijdb.170291gs
- Nakano, H., Liu, X., Arshi, A., Nakashima, Y., van Handel, B., Sasidharan, R., et al. (2013). Haemogenic endocardium contributes to transient definitive hematopoiesis. *Nat. Commun.* 4:1564. doi: 10.1038/ncomms2569

- New, D. A. T. (1955). A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Development* 3, 326–331.
- Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, L., and Péault, B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 129, 4147–4157.
- Ottersbach, K. (2019). Endothelial-to-hematopoietic transition: an update on the process of making blood. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 591–601. doi: 10.1042/BST20180320
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lièvre, F., and Buck, C. A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100, 339–349.
- Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L. M., Catala, M., and Dieterlen-Lièvre, F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 122, 1363–1371.
- Poole, T. J., and Coffin, J. D. (1989). Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J. Exp. Zool.* 251, 224–231. doi: 10.1002/jez.1402510210
- Prummel, K. D., Nieuwenhuize, S., and Mosimann, C. (2020). The lateral plate mesoderm. *Development* 147:dev175059. doi: 10.1242/dev.175059
- Psychoyos, D., and Stern, C. D. (1996). Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* 122, 1523–1534.
- Sabin, F. (1920). Studies on the origins of blood-vessels and of red blood-corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of development. *Contrib. Embryol.* 36, 213–262.
- Samokhvalov, I. M., Samokhvalova, N. I., and Nishikawa, S. I. (2007). Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 446, 1056–1061. doi: 10.1038/nature05725
- Sato, Y., Poynter, G., Huss, D., Filla, M. B., Czirik, A., Rongish, B. J., et al. (2010). Dynamic analysis of vascular morphogenesis using transgenic quail embryos. *PLoS One* 5:e12674. doi: 10.1371/journal.pone.0012674
- Senserrich, J., Batsivari, A., Rybtsov, S., Gordon-Keylock, S., Souilhol, C., Buchholz, F., et al. (2018). Analysis of Runx1 using induced gene ablation reveals its essential role in pre-liver HSC development and limitations of an in vivo approach. *Stem Cell Rep.* 11, 784–794. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.08.004
- Serrado Marques, J., Teixeira, V., Jacinto, A., and Tavares, A. (2018). Identification of novel hemangioblast genes in the early chick embryo. *Cells* 7:9. doi: 10.3390/cells7020009
- Stern, C. D., and Fraser, S. E. (2001). Tracing the lineage of tracing cell lineages. *Nat. Cell Biol.* 3, E216–E218. doi: 10.1038/ncb0901-e216
- Tanaka, Y., Sanchez, V., Takata, N., Yokomizo, T., Yamanaka, Y., Kataoka, H., et al. (2014). Circulation-independent differentiation pathway from extraembryonic mesoderm toward hematopoietic stem cells via hemogenic angioblasts. *Cell Rep.* 8, 31–39. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.055
- Teixeira, V., Arede, N., Gardner, R., Rodríguez-Leán, J., and Tavares, A. T. (2011). Targeting the hemangioblast with a novel cell type-specific enhancer. *BMC Dev. Biol.* 11:76. doi: 10.1186/1471-213X-11-76
- Walmsley, M., Ciau-Uitz, A., and Patient, R. (2002). Adult and embryonic blood and endothelium derive from distinct precursor populations which are differentially programmed by BMP in *Xenopus*. *Development* 129, 5683–5695. doi: 10.1242/dev.00169
- Wittamer, V., and Bertrand, J. Y. (2020). Yolk sac hematopoiesis: does it contribute to the adult hematopoietic system? *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 4081–4091. doi: 10.1007/s00018-020-03527-6
- Yoshimoto, M., Montecino-Rodriguez, E., Ferkowicz, M. J., Porayette, P., Shelley, W. C., Conway, S. J., et al. (2011). Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1468–1473. doi: 10.1073/pnas.1015841108
- Yoshimoto, M., Porayette, P., Glosson, N. L., Conway, S. J., Carlesso, N., Cardoso, A. A., et al. (2012). Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence. *Blood* 119, 5706–5714. doi: 10.1182/blood-2011-12-397489
- Yue, R., Li, H., Liu, H., Li, Y., Wei, B., Gao, G., et al. (2012). Thrombin receptor regulates hematopoiesis and endothelial-to-hematopoietic transition. *Dev. Cell* 22, 1092–1100. doi: 10.1016/j.devcel.2012.01.025
- Yvergneau, L., and Robin, C. (2017). Restricted intra-embryonic origin of bona fide hematopoietic stem cells in the chicken. *Development* 144, 2352–2363. doi: 10.1242/dev.151613
- Zamir, L., Singh, R., Nathan, E., Patrick, R., Yifa, O., Yahalom-Ronen, Y., et al. (2017). Nkx2.5 marks angioblasts that contribute to hemogenic endothelium of the endocardium and dorsal aorta. *eLife* 6:e20994. doi: 10.7554/eLife.20994
- Zhang, C., Lv, J., He, Q., Wang, S., Gao, Y., Meng, A., et al. (2014). Inhibition of endothelial ERK signalling by Smad1/5 is essential for haematopoietic stem cell emergence. *Nat. Commun.* 5:3431. doi: 10.1038/ncomms4431
- Zovein, A. C., Hofmann, J. J., Lynch, M., French, W. J., Turlo, K. A., Yang, Y., et al. (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 625–636. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.018
- Zovein, A. C., Turlo, K. A., Poncet, R. M., Lynch, M. R., Chen, K. C., Hofmann, J. J., et al. (2010). Vascular remodeling of the vitelline artery initiates extravascular emergence of hematopoietic clusters. *Blood* 116, 3435–3444. doi: 10.1182/blood-2010-04-279497

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Seco, Martins, Jacinto and Tavares. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.