

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Brenda Naemi Lanza Nakagaki

**ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E METABÓLICAS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO NEONATAL REPROGRAMAM A IDENTIDADE E
FUNÇÃO DO FÍGADO**

Belo Horizonte

2022

Brenda Naemi Lanza Nakagaki

**ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E METABÓLICAS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO NEONATAL REPROGRAMAM A IDENTIDADE E
FUNÇÃO DO FÍGADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Belo Horizonte

2022

043

Nakagaki, Brenda Naemi Lanza.

Alterações imunológicas e metabólicas durante o desenvolvimento neonatal reprogramam a identidade e função do fígado [manuscrito] / Brenda Naemi Lanza Nakagaki. – 2022.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Fígado. 3. Animais Recém-Nascidos. 4. Desmame. 5. Microbioma Gastrointestinal. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE BRENDA NAEMI LANZA NAKAGAKI

249/2022 _ ENTRADA - 1º/2018 _ 2018697514

Às **nove horas** do dia **30 de junho de 2022**, reuniu-se, por meio de Plataforma On-Line, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E METABÓLICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO NEONATAL REPROGRAMAM A IDENTIDADE E FUNÇÃO DO FÍGADO**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	Aprovada
Dra. Ana Maria Caetano de Faria	UFMG	Aprovada
Dra. Liliane Martins	UFMG	Aprovada
Dra. Patrícia Gama	USP	Aprovada
Dr. Heitor Paula Neto	UFRJ	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de junho de 2022.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador)

Dr^a. Ana Maria Caetano de Faria

Dr^a Liliane Martins

Dr^a. Patrícia Gama

Dr. Heitor Paula Neto

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Heitor Affonso de Paula Neto, Usuário Externo**, em 01/07/2022, às 14:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 01/07/2022, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Gama, Usuária Externa**, em 01/07/2022, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 03/07/2022, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria Caetano de Faria, Professora do Magistério Superior**, em 04/07/2022, às 13:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Liliane Martins dos Santos, Usuário Externo**, em 07/07/2022, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1565449** e o código CRC **951B6EE1**.

*À minha mãe, que tinha o sonho de ser cientista,
e que a vida, tão cedo, levou de mim.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Ana Paula e Gilson, pelo amor incondicional, carinho, apoio e presença, mesmo na ausência imposta pela distância.

Aos meus avós, por todo apoio e por sempre torcerem por mim.

Ao Gustavo, por todas as oportunidades, confiança, aprendizado e acolhimento.

Ao Mateus, pelo companheirismo, amor e incentivo.

Aos amigos do CGB, pela convivência diária, momentos de descontração, por toda ajuda, aprendizado e amizade. Especialmente à Kassiana e à Érika, que conduziram o projeto junto a mim.

Aos meus companheiros de Cabral, pelos melhores momentos que o doutorado me proporcionou.

Ao Gabriel Campolina, German, Gabriel Fernandes, Julliane, Leda e Suellen, pela ajuda e colaboração no trabalho.

Ao Rafael e todos do laboratório em Boston, por terem me acolhido tão bem e me ensinado tanto.

Aos melhores amigos que a Biologia podia ter me dado, por todos os momentos inesquecíveis da graduação.

Às agências de fomento, pelos recursos que financiaram o trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e a todos os professores que o integram, por tornarem o trabalho possível.

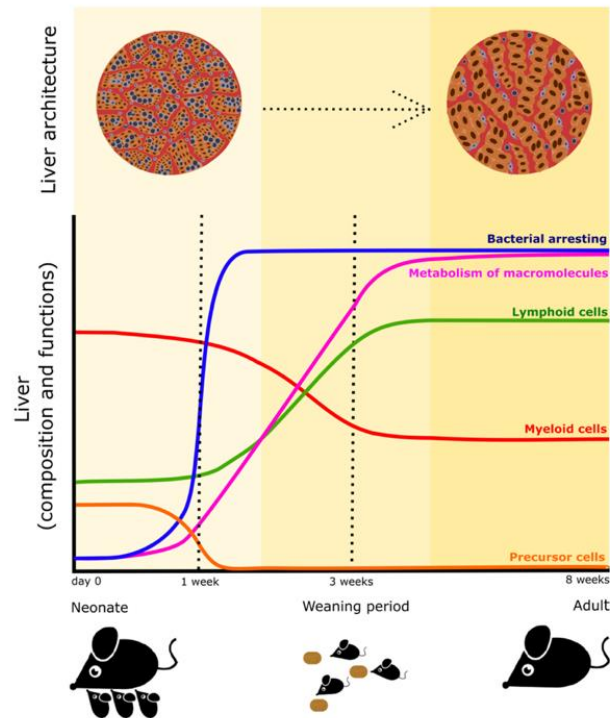
Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa etapa, deixo o meu agradecimento.

Resumo

O fígado é o principal sítio hematopoiético do embrião, tornando-se um órgão metabólico e imunológico importante em adultos. Apesar de muito se saber sobre o desenvolvimento embrionário hepático, as particularidades do desenvolvimento pós-natal do órgão são, por vezes, negligenciadas. É ainda elusivo como o fígado adapta tanto o sistema imune quanto o metabolismo para reagir aos inúmeros desafios que neonatos enfrentam ao nascimento, como mudanças na microbiota e dieta. Assim, a transição da vida intra- para extrauterina exige adaptações rápidas, complexas e bem orquestradas para garantir a sobrevivência neonatal. Visto a importância desse período pós-nascimento, conhecido como janela de oportunidade neonatal, na maturação adequada dos órgãos, nosso objetivo neste trabalho foi caracterizar o desenvolvimento neonatal hepático e identificar possíveis fatores envolvidos no processo. Encontramos que a organização microscópica do fígado em neonatos é muito diferente da encontrada em adultos, constituindo um agregado homogêneo sem uma clara compartimentalização e com presença de ilhas de células imunes, o que foi confirmado em amostras humanas. Uma análise mais profunda das populações celulares revelou que células mielóides, precursoras e imaturas primariamente compõem o sistema imune hepático, enquanto o fígado em adultos é composto por células linfóides. Apesar de neonatos serem mais susceptíveis a infecções por *E. coli*, com expressão reduzida de genes pertencentes a vias relacionadas ao processo de captura, internalização e eliminação de microrganismos pelas células de Kupffer, uma rápida evolução para uma resposta imune eficiente foi observada. Concomitantemente, neonatos apresentaram redução na expressão de genes metabólicos, sendo que níveis semelhantes ao adulto foram atingidos por volta do período de desmame. De forma interessante, o desmame prematuro, além de alterar a composição da microbiota intestinal, alterou o programa de desenvolvimento hepático, com uma elevação na expressão gênica metabólica, que persistiu até a fase adulta, e uma reduzida capacidade de lidar com infecções. Por fim, a microbiota se mostrou importante em modular a captura de bactérias pelas células de Kupffer e a tolerância hepática. Em conclusão, nossos dados fornecem um novo panorama do desenvolvimento imunológico e metabólico hepático. O fígado em neonatos pode ser considerado um órgão completamente diferente do encontrado em adultos, exercendo, inclusive, algumas funções distintas, o que pode ser explicado por

diferenças na composição e fenótipo das células hepáticas. Ainda, a dieta e componentes da microbiota podem ser cruciais para guiar o desenvolvimento adequado do fígado durante o período pós-natal.

Palavras chave: desenvolvimento hepático pós-natal, neonatos, desmame prematuro, imunologia hepática, microbiota intestinal pós-natal.



Abstract

Liver is the main hematopoietic site in embryos, becoming a crucial organ in both immunity and metabolism in adults. Although much is known about hepatic embryonic development and the chronology of hematopoiesis during the gestational phase, it is still largely elusive how the liver adapts both the immune system and enzymatic profile to react to a plethora of challenges that a newborn faces in the initial periods after birth. In fact, abrupt changes in both microbiota and diet are expected during this phase; thus, the transition from intra- to extra-uterine life may demand rapid, complex and well-orchestrated steps to ensure neonatal survival and adaptation. Given the importance of the postnatal period, known as neonatal window of opportunity, we aimed to characterize neonatal liver development and identify possible factors underlying this adaptation. We found that human and mouse newborns have a sharp different hepatic cellular composition and arrangement compared to adults. We also found that myeloid cells and B cells primarily compose the neonatal hepatic immune system. Although neonatal mice were more susceptible to infections, with reduced expression of genes related to bacterial recognition, phagocytosis and killing by Kupffer cells, a rapid evolution to an efficient immune response was observed. Concomitantly, newborns displayed a reduction of several macronutrient metabolic functions and normal expression level of enzymes belonging to lipid and carbohydrate metabolism was reached around the weaning period. Interestingly, in addition to altering the composition of the intestinal microbiota, early weaning profoundly disturbed the expression of several hepatic metabolic pathways, which persisted into adulthood, and caused a reduced ability to deal with infections. Lastly, we found that the gut microbiota is an important factor modulating bacterial catching by Kupffer cells and hepatic tolerance. In conclusion, our data provide a novel landscape of hepatic immune and metabolic development. The liver in neonates can be considered as a completely different organ from that in adults, which can be explained by the differences in the liver cell repertoire and phenotype. Also, dietary and antigen cues may be crucial to guide liver development during postnatal phase.

Lista de ilustrações e figuras

Ilustração 1. Desenvolvimento hepático ao longo da vida.....	18
Ilustração 2. Localização das populações celulares no lóbulo hepático.....	21
Ilustração 3. Procedimento cirúrgico para desafio bacteriano <i>in vivo</i> em neonatos....	31
Figura 1. A arquitetura e celularidade hepáticas em neonatos diferem drasticamente das encontradas em adultos.....	40
Figura 2. Alterações vasculares acompanham as mudanças no parênquima hepático no desenvolvimento pós-natal.	41
Figura 3. O fígado passa de um órgão mieloide em neonatos para um órgão linfóide em adultos.	44
Figura 4. Grandes mudanças na frequência e compartimentalização das células mielóides hepáticas são observadas durante o desenvolvimento.....	47
Figura 5. Aplasia temporária na medula óssea e baço de neonatos.....	49
Figura 6. Neonatos apresentam um atraso na resposta à infecção por <i>E. coli</i>	52
Figura 7. Diferenças entre KCs de neonatos e adultos.....	55
Figura 8. Diferenças na expressão entre KCs de neonatos e adultos de vias relacionadas ao processo de captura, internalização e eliminação de microrganismos.....	56
Figura 9. Metabolismo hepático quiescente em neonatos.....	59
Figura 10. O desmame prematuro perturba a maturação hepática.....	61
Figura 11. Principais grupos de bactérias encontradas nos animais no período pré-desmame.....	64
Figura 12. Principais grupos de bactérias que sofreram alterações com o desmame prematuro.	65
Figura 13. Desbalanço de citocinas pró- e anti-inflamatórias nos animais <i>germ free</i> na primeira semana de vida.	68
Figura 14. KCs de animais isentos de germes capturam <i>E.coli</i> mais rapidamente com uma semana de vida.....	69

Lista de tabelas

Tabela de anticorpos.....	98
Tabela de <i>primers</i>	99

Lista de abreviaturas

ALT – Alanina aminotransferase

APC – Célula apresentadora de antígeno

AST – Aspartato transaminase

ASV – *Amplicon sequence variant*

CFU – Unidade formadora de colônia

CR3 – Receptor de complemento 3

CR1g – Receptor do complemento da superfamília das imunoglobulinas

CX3CR1 – Receptor 1 de quimiocina CX3C

Cyp8b1 – Citocromo P450 8b1

CyTOF – *Time-of-flight mass cytometry*

DC – Célula dendrítica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Elovl3 – Ácido graxo elongase 3

Fasn – Ácido graxo sintase

FcγR – Receptor Fcγ

GFP – Proteína verde fluorescente

HSC – Célula tronco hematopoiética

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso

ICG – Verde de indocianina

IFNγ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL-10 – Interleucina 10

KC – Célula de Kupffer

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LAMP – Proteína 2 de membrana associada ao lisossomo

LPS – Lipopolissacarídeo

LSEC – Células endoteliais sinusoidais hepáticas

MARCO – Receptor de macrófago com estrutura de colágeno

MIV – Microscopia intravital confocal

MR – Receptor de manose tipo lectina-C

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NK – Células natural killer

NKT – Células T natural killer

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PCA – Análise de componentes principais

PCoA – Análise de coordenadas principais

PECAM-1 - platelet/endothelial cell adhesion molecule 1

qPCR – PCR em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

SCFAs - Ácidos graxos de cadeia curta

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta

TLR4 – Receptor tipo-toll 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VAMP3 – Proteína 3 de membrana associada à vesícula

vATPse – ATPase vacuolar

Sumário

1. Introdução	16
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Metodologia	27
3.1. Animais experimentais.....	27
3.2. Imunofluorescência.....	27
3.3. Avaliação histológica do fígado	28
3.4. Imunofenotipagem das populações imunes hepáticas por CyTOF	29
3.5. Microscopia confocal <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	29
3.6. Cultivos e ensaios com <i>Escherichia coli</i>	30
3.7. Citometria de fluxo de medula óssea e baço	31
3.8. Análise dos dados de <i>microarray</i>	32
3.9. Extração de RNA e PCR em tempo real.....	33
3.10. Ensaio enzimáticos de ALT e AST	33
3.11. Ensaio de depuração do verde indocianina	34
3.12. Extração de DNA das amostras de fezes	34
3.13. Construção da biblioteca e sequenciamento	35
3.14. Processamento dos dados, classificação taxonômica e estatística	36
3.15. Análise de dados e estatística.....	37
4. Resultados	38
4.1. A organização morfológica hepática muda drasticamente durante o desenvolvimento hepático pós-natal	38
4.2. A composição celular imune muda de mieloide em neonatos para linfóide em adultos	42
4.3. A composição e compartimentalização das células imunes mielóides se altera durante o processo de desenvolvimento.....	45
4.4. O fígado é o principal detentor de precursores hematopoiéticos nos estágios iniciais do desenvolvimento, enquanto a medula óssea e o baço são aplásicos..	48
4.5. Os fagócitos hepáticos rapidamente se tornam funcionais para capturar e eliminar bactérias circulantes	50

4.6. Genes relacionados ao processo de fagocitose e eliminação de patógenos estão reduzidos nas KCs de neonatos.....	53
4.7. A capacidade metabólica hepática total é adquirida durante o período de desmame.....	57
4.8. O período de transição alimentar é chave para o desenvolvimento hepático	60
4.9. O desmame prematuro altera a composição da microbiota intestinal	62
4.10. O processo de colonização e estabelecimento da microbiota intestinal interfere com a tolerância hepática	66
5. Discussão.....	70
6. Conclusões	83
Referências bibliográficas	84
Apêndice A: anticorpos utilizados no CyTOF	98
Apêndice B: <i>primers</i> utilizados no trabalho	99
Apêndice C: produção científica	101

1. Introdução

O fígado é um órgão vital para o funcionamento do organismo e realiza inúmeras funções essenciais – estima-se que um fígado completamente maduro é capaz de desempenhar até 500 funções diferentes (Almeida et al., 2022). É o segundo maior órgão do corpo, localizado na cavidade abdominal logo abaixo do diafragma, ligado diretamente ao trato digestivo via sistema porta-hepático (Vollmar and Menger, 2009). Seu aporte sanguíneo é único, recebendo cerca de 20% de sangue arterial – proveniente da artéria hepática e rico em oxigênio – e 80% de sangue venoso – proveniente da veia porta, pouco oxigenado e rico em nutrientes, toxinas ambientais e produtos bacterianos absorvidos no intestino. O fluxo sanguíneo hepático é impressionante: em um corpo humano, o volume corpóreo total de sangue circula pelo fígado aproximadamente 360 vezes em um dia (Sheth and Bankey, 2001).

Essa alta vascularização e dupla irrigação conferem ao órgão grande multiplicidade funcional (Jenne and Kubes, 2013). Do ponto de vista metabólico, o fígado é o principal órgão envolvido na regulação do metabolismo energético corporal, recebendo nutrientes diretamente da circulação portal e sendo responsável pelo processamento, armazenamento e distribuição pelo organismo (Rui, 2014). Assim, controla o estoque de glicogênio, a homeostase de glicose e a síntese e transporte de colesterol – convertido em ácidos biliares. Como a maior glândula do corpo, o fígado exhibe propriedades exócrinas – produção de bile – e endócrinas – produção de proteínas carreadoras, fatores de coagulação e de crescimento, trombopoietina e angiotensina. Ainda, tem papel essencial na detoxificação de compostos endógenos e exógenos, como amônia, proteínas séricas, hormônios esteroides, medicamentos, contaminantes ambientais, álcool e drogas (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019; Chiang, 2014). Do ponto de vista imunológico, o fígado desempenha funções importantes, como a produção de proteínas de fase aguda, componentes do complemento, citocinas e quimiocinas, além de ser um componente crítico na defesa contra infecção por via sanguínea (Jenne and Kubes, 2013). Contendo a maior coleção de células fagocíticas do corpo, o órgão é uma das primeiras linhas de defesa entre o organismo e o ambiente externo, com papel na detecção e eliminação de patógenos que atingem a circulação (Kubes and Jenne, 2018).

Para cumprir esse amplo espectro de funções críticas, além de uma localização estratégica no organismo, o fígado conta com uma arquitetura única do parênquima. O órgão é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, conhecida como cápsula de Glisson (Kiernan, 1834). Septos de tecido conjuntivo oriundos dessa cápsula dividem o parênquima em lóbulos hepáticos, de formato hexagonal, que constituem a unidade funcional hepática. Na periferia dos lóbulos, se encontram os espaços porta, contendo as tríades portais, que incluem um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ducto biliar – além de vasos linfáticos e nervos, mais difíceis de visualizar (Ilustração 1A). Ao chegar no fígado pelos espaços porta, sangue venoso e arterial desembocam em uma rede de vasos capilares de fino calibre, os sinusoides, pelos quais fluem até alcançar a veia central (ou centrolubular), deixando o órgão pela veia cava inferior. Essa estrutura vascular, responsável pelo fluxo unidirecional do sangue, permite que a mistura sanguínea circule lentamente pelo fígado, em baixa pressão e tensão de oxigênio, o que maximiza o contato do conteúdo da circulação com as células hepáticas. A velocidade do fluxo nos sinusoides é aproximadamente metade da encontrada em outros leitos capilares, maximizando a probabilidade de que uma determinada molécula ou patógeno sejam notados pelas células imunes (Oda et al., 2006).

Os hepatócitos, principais células do parênquima hepático, correspondem a cerca de 80% da massa do fígado e realizam a maioria das funções metabólicas e secretoras descritas, o que requer, em termos energéticos, que sejam células muito ativas, com citoplasma amplo e eosinofílico – devido ao grande número de mitocôndrias –, abundante retículo endoplasmático e um ou mais núcleos (Duncan, 2013). Essas células se organizam em cordões que se estendem entre as fileiras de sinusoides e estão em íntimo contato com a circulação – separadas por uma única camada de células endoteliais sinusoidais (LSECs) (Ilustração 1A). Os hepatócitos constituem uma população heterogênea graças a um fenômeno denominado zoneamento metabólico, em que as células possuem funções específicas de acordo com sua localização no lóbulo (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019). Os mais próximos do espaço porta estão mais expostos ao sangue com maior conteúdo de oxigênio e concentração de nutrientes e, portando, são responsáveis por processos energeticamente exigentes, como síntese de proteínas, gliconeogênese e metabolismo de lipídeos. Os mais próximos da veia centrolubular são especializados

nas reações de biotransformação, glicólise e biossíntese de ácidos biliares, processos que demandam menos energia. Os intermediários se especializaram na secreção do hormônio regulador do ferro, hepcidina, entre outras tarefas dependentes da sua proximidade relativa com as outras zonas (Halpern et al., 2017).

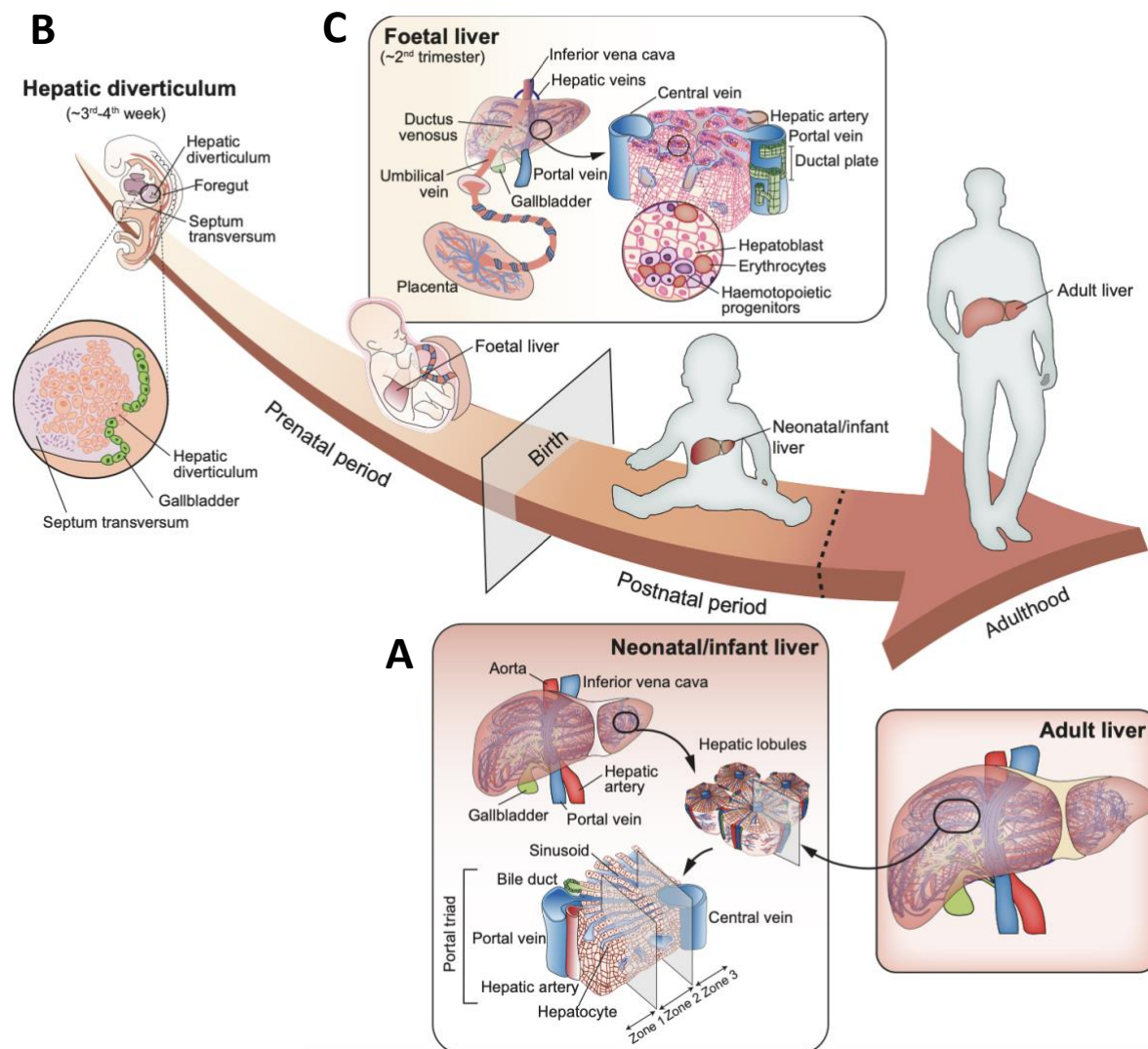


Ilustração 1. Desenvolvimento hepático ao longo da vida. (A) Arquitetura do fígado adulto, evidenciando os elementos vasculares que irrigam o órgão e a estrutura dos lóbulos hepáticos: nos vértices, são encontradas as tríades portais, contendo um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ducto biliar; no centro, é encontrada a veia central. Fileiras de hepatócitos se organizam de maneira radial, delimitados por capilares sinusoides. (B) Formação do primórdio do fígado: a porção ventral do endoderma se torna mais espessa para formar o divertículo hepático, que invade o septo transversum circundante, originando o primórdio do fígado. (C) Arquitetura do fígado fetal, evidenciando os elementos vasculares que irrigam o órgão e a estrutura do parênquima (presença de progenitores hematopoiéticos). Retirado de: Almeida J. I, *Journal of Hepatology*, 2021.

Apesar do papel primário dos hepatócitos constituir o metabolismo, produção de proteínas e neutralização de toxinas, essas células estão também envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), induzindo tanto respostas inatas quanto adaptativas (Warren et al., 2006). Além dos hepatócitos, os colangiócitos também participam da composição do parênquima hepático, constituindo as células epiteliais que delimitam o ducto biliar. Embora os hepatócitos adicionem os elementos principais da bile, são os colangiócitos os responsáveis por modificá-la, através de uma sequência de processos secretores e absorptivos, ajustando seu conteúdo e sua alcalinidade para que ela desempenhe seu papel no organismo (Strazzabosco and Fabris, 2008).

O segundo tipo celular mais abundante no fígado corresponde às LSECs, que compreendem aproximadamente 50% das células não parenquimais hepáticas (Racanelli and Rehermann, 2006). As LSECs são células endoteliais altamente especializadas, delgadas e desprovidas de lâmina basal, o que leva à formação de um espaço, denominado espaço de Disse, entre o parênquima hepático e o lúmen sinuoidal (Ilustração 2). Ao contrário das células endoteliais vasculares típicas, as LSECs apresentam poros, formando um endotélio fenestrado e permitindo a transferência eficiente de lipoproteínas, pequenos remanescentes de quilomícrons e outras macromoléculas do sangue para o espaço de Disse, onde são capturadas pelos hepatócitos (Maslak et al., 2015). Essas células expressam moléculas que promovem a internalização de antígenos, debris celulares e imunocomplexos, incluindo receptores de manose e receptores *scavenger*, bem como moléculas que promovem a apresentação de antígenos, sendo, portanto, críticas na detecção e captura de patógenos (Poisson et al., 2017).

Outras células essenciais para a função de vigilância imunológica do fígado são as células de Kupffer (KCs), os macrófagos residentes hepáticos, que representam até 35% das células não parenquimais do órgão e a maior população de macrófagos teciduais do corpo (Bilzer et al., 2006). Localizadas estrategicamente no interior dos sinusoides, aderidas às LSECs (Ilustração 2), as KCs estão diretamente expostas ao fluxo sanguíneo, o que permite a fagocitose de conteúdo direto da microcirculação hepática, sob condições de fluxo – diferentemente dos outros macrófagos teciduais, que fagocitam em condições estáticas. Assim, as KCs têm um

papel fundamental de “filtro”, impedindo que grandes quantidades de lipopolissacarídeos (LPS), restos celulares e microrganismos da microbiota atinjam a circulação sistêmica e prevenindo a disseminação de patógenos em condições homeostáticas e de doença (Balmer et al., 2014). Essas células se originam de precursores do saco vitelínico e se mantêm no órgão por toda a vida, graças a sua capacidade de autorrenovação (Gomez Perdiguero et al., 2015). Apesar de sua origem monocítica, as KCs são negativas para CX3CR1, mas são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície F4/80 e CLEC4F. Elas ainda expressam múltiplos receptores do tipo Toll, receptores *scavenger*, receptores Fc e receptores de complemento, que permitem o reconhecimento e internalização de patógenos e moléculas associadas (Krenkel and Tacke, 2017). Além disso, esses receptores, em parte, guiam a ativação das KCs, levando à produção de uma variedade de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos e fatores do complemento.

KCs, LSEC e hepatócitos não são as únicas células apresentadoras de antígenos (APCs) encontradas no fígado. O órgão conta ainda com inúmeras populações de macrófagos e células dendríticas (DCs). Essas últimas estão tipicamente localizadas ao redor das veias centrais e tratos portais (Ilustração 2) (Prickett et al., 1988). Ainda, parecem entrar no tecido imaturas predominantemente via suprimento sanguíneo portal, amadurecendo à medida que transitam em direção à veia central (Sato et al., 1998) – ou podem também atravessar as LSECs, entrando no espaço de Disse e deixando o fígado via linfático (Kudo et al., 1997). Outra grande população de células residentes ocupa o espaço subcapsular, sendo que ainda há divergência se essas células compreenderiam uma população de DCs (David et al., 2016; Freitas-Lopes et al., 2017) ou de macrófagos fenotipicamente e espacialmente divergente das KCs (Sierro et al., 2017). Foi demonstrado que tais células previnem a disseminação de bactérias da cavidade peritoneal para o fígado através do recrutamento de outro grupo de células fagocíticas, os neutrófilos. Em condições fisiológicas, poucos neutrófilos são encontrados no fígado. Entretanto, são prontamente recrutados em resposta a um estímulo patogênico (Gregory et al., 1996) ou estéril (Marques et al., 2012; McDonald and Kubes, 2016).

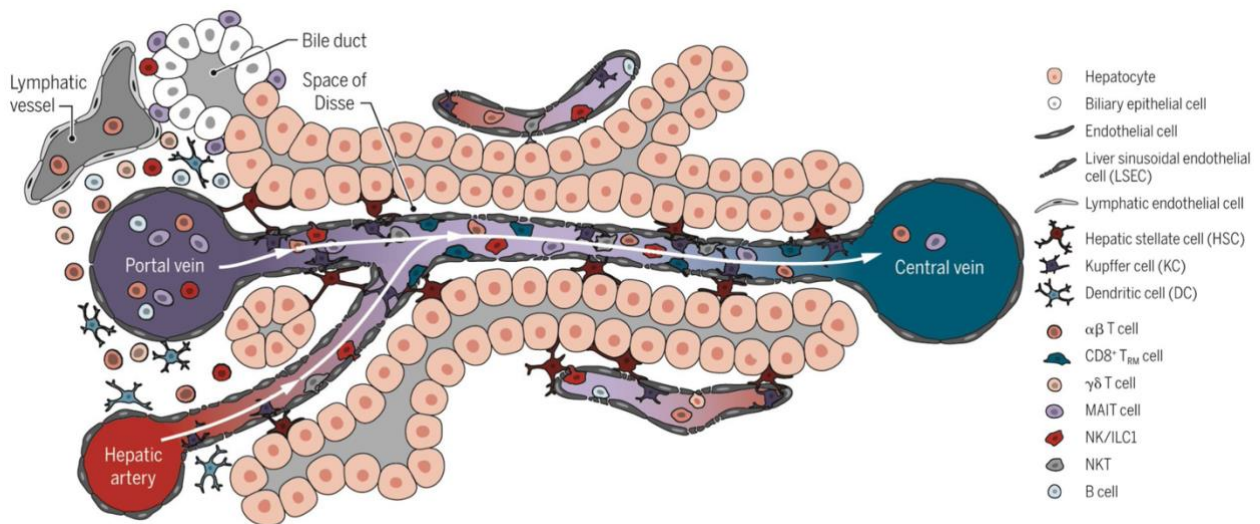


Ilustração 2. Localização das populações celulares no lóbulo hepático. Cordões de hepatócitos estão delimitados por uma camada de LSEC, que compõe os capilares sinusoides. No lúmen sinusoidal se encontram as KCs, em íntimo contato com a circulação, bem como diferentes populações de linfócitos. Células dendríticas estão tipicamente localizadas ao redor das veias centrais e tratos portaais. Retirado de: Ficht and Iannacone, *Sci. Immunol.*, 2020.

Apesar de não ser considerado um órgão linfóide secundário clássico, o fígado constitui um ambiente único para o desenvolvimento e função da resposta imune adaptativa (Crispe, 2009). Inúmeras populações de linfócitos adaptativos, incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como células B, habitam o órgão, localizadas intravascularmente, nos septos de tecido conjuntivo ou intercalados entre as células do parênquima hepático (Ilustração 2), orquestrando respostas potentes e altamente específicas contra patógenos invasores (Heymann and Tacke, 2016). A composição hepática de linfócitos difere da encontrada em outros tecidos e, além dessas células, o fígado é enriquecido em linfócitos envolvidos na resposta imune inata, como células *natural killer* (NK), *T natural killer* (NKT) e T $\gamma\delta$, que respondem rapidamente a ligantes conservados expressos por patógenos microbianos (Wong et al., 2016). Entre essas populações, as células NKT tem papel importante como sentinela imune, patrulhando ativamente a vasculatura hepática em busca de patógenos (Geissmann et al., 2005).

Toda essa vigilância imunológica é essencial em um órgão que está constantemente exposto a antígenos bacterianos e até mesmo microrganismos comensais viáveis que escapam do intestino. A arquitetura distinta dos sinusoides e a presença de inúmeras populações de APCs tornam o fígado ideal para ativação local de células T e geração de respostas imunes (Crispe, 2009). É importante

ressaltar que nem todas as moléculas estranhas são nocivas e o fígado deve evitar respostas inflamatórias indesejadas direcionadas a antígenos alimentares inofensivos ou produtos da microbiota comensal – quando em níveis normais. Assim, o status imunológico padrão do órgão é imunotolerante, apresentando um microambiente anti-inflamatório, rico especialmente nas citocinas IL-10 e TGF- β – sintetizadas por hepatócitos, LSEC, KCs, DCs e células T (Lau et al., 2003). Em situações de homeostase, a exposição contínua a LPS e outros produtos microbianos resulta na produção dessas citocinas pelas KCs, o que regula negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs, limitando as respostas imunes no órgão (Knolle et al., 1995; Knolle et al., 1998). Esse ambiente tolerogênico promove e sustenta um fenótipo imaturo das DCs, que são menos potentes em apresentar antígenos e produzem mais IL-10 comparadas a DCs de outros órgãos (Bamboot et al., 2009; Pillarisetty et al., 2004). Entretanto, sob certas condições apropriadas (presença de citocinas ou PAMPs), o órgão é capaz de mudar rapidamente da hiporresponsividade para montar uma resposta imune robusta e rápida. Esse balanço entre imunidade e tolerância é essencial para a saúde geral e ressalta a importância do fígado como um órgão imunológico fundamental (Kubes and Jenne, 2018).

Outra função do fígado menos conhecida, porém, não menos importante, ocorre no período gestacional, quando o órgão exibe função hematopoiética. O desenvolvimento hepático é um processo notavelmente conservado entre as espécies de vertebrados e, em camundongos, se inicia por volta do dia embrionário 8.5 – 9.0 (3ª para 4ª semana de gestação em humanos), quando o domínio ventral do intestino adjacente ao mesoderma cardíaco e septo transversal se torna mais espesso para formar o divertículo hepático (Ilustração 1B) (McLin and Zorn, 2006). As células endodérmicas que formam esse divertículo rapidamente se proliferam e invadem o septo transversal circundante, originando o primórdio do fígado – nesse momento, passam a ser denominadas hepatoblastos, células bipotenciais marcadas pela expressão de alfafetoproteína, que darão origem tanto aos hepatócitos quanto aos colangiócitos (Yang et al., 2017). Células endoteliais são fundamentais nesse processo, formando um colar ao redor do divertículo hepático, delimitando o crescimento do primórdio do fígado e estabelecendo, posteriormente, os capilares sinusoides (Matsumoto et al., 2001).

Logo que se inicia o desenvolvimento hepático, o fígado passa a ser o destino de inúmeros progenitores provenientes do saco vitelínico e de outros sítios hemogênicos do embrião, se tornando o principal sítio de hematopoiese fetal (Gordillo et al., 2015; Si-Tayeb et al., 2010). Ali, tais células sofrem expansão e diferenciação, antes de colonizarem outros tecidos (Ilustração 1C). Diferentes ondas de hematopoiese hepática intra-embriônica ocorrem, incluindo uma transitória, em que progenitores eritro-mieloides (EMPs) são recrutados e dão origem às populações de macrófagos residentes no adulto – incluindo as KCs –, e uma definitiva, em que há recrutamento de células tronco hematopoiéticas (HSCs), que colonizam o fígado, estabelecendo a hematopoiese definitiva até os tempos tardios da gestação (Ginhoux and Guilliams, 2016; Hoeffel and Ginhoux, 2015). Do fígado, essas células colonizam a medula óssea, levando à geração das HSCs encontradas na medula óssea dos adultos. A dinâmica pela qual as HSCs povoam o fígado tornou-se um campo crescente de interesse e entender como o processo de maturação dos macrófagos teciduais ocorre nos órgãos e como eles são mantidos ao longo da vida pode ter um impacto significativo em investigações básicas e clínicas.

Durante esse período gestacional, o fígado se torna um órgão central envolvido no metabolismo fetal-placentário. Ainda, o órgão é frequentemente descrito como um “tecido cardio-vascular”, uma vez que recebe sangue rico em oxigênio da veia umbilical e o conduz, via ducto venoso, para a veia cava inferior, que desemboca diretamente no coração (Ilustração 1C) (Giancotti et al., 2019). Entretanto, nessa fase, a maioria das funções hepáticas desempenhadas por um fígado maduro se encontram ainda ausentes, sendo o metabolismo hepático fetal incapaz de alcançar os níveis encontrados no adulto (Li et al., 2009). Essa relativa imaturidade pode estar relacionada com uma possível dependência da mãe pelo feto para suportar funções básicas como nutrição e filtração ou simplesmente porque a aquisição das funções hepáticas requer mais tempo e estímulos, que não estão presentes na vida uterina (Almeida et al., 2022). De fato, durante a gestação, o feto recebe um suprimento contínuo de nutrientes da circulação materna, com a qual mantém um equilíbrio de glicose, que é a principal fonte de energia em condições fisiológicas. Apenas após o nascimento, com a cessação da nutrição placentária, ele precisa assumir o controle do seu metabolismo hepático, para mobilizar os estoques de glicogênio e lidar com a alimentação enteral (Grijalva and Vakili, 2013).

Outro estímulo importante ocorre apenas após o nascimento: o estabelecimento de uma entidade complexa no trato gastrointestinal, o microbioma – apesar da colonização bacteriana ter sido proposta de começar *in utero*, é amplamente aceito que a colonização significativa do intestino e as alterações progressivas para o estabelecimento de um microbioma estável ocorrem durante a vida extrauterina (Blaser et al., 2021). O microbioma intestinal compreende os trilhões de microrganismos (microbiota) e seus metabólitos, que influenciam a homeostase do hospedeiro de inúmeras maneiras (Barko et al., 2018). Uma vez que o fígado está localizado na interface entre o sistema gastrointestinal e a circulação sistêmica, é de se esperar que esse microbioma intestinal influencie no desenvolvimento do órgão. Muitos trabalhos com foco nesse eixo intestino-fígado se concentram em situações de doença (Giuffre et al., 2020), entretanto, é importante considerar essa comunicação como determinante para a aquisição, maturação e manutenção das funções hepáticas ao longo da vida.

O termo eixo intestino-fígado faz referência à comunicação bidirecional entre o intestino (e sua microbiota) e o fígado. Essa interação recíproca é estabelecida pela veia porta, que permite o transporte de produtos provenientes do trato gastrointestinal diretamente para o fígado, e pela via de retroalimentação hepática de secreção de bile e anticorpos para o intestino (Albillos et al., 2020). Inúmeras moléculas derivadas dos microrganismos intestinais participam do *crosstalk* entre os dois órgãos, comprovadamente desempenhando efeito na função hepática – incluindo componentes bacterianos diretos (componentes da parede, ácidos nucleicos) ou produtos resultantes do metabolismo (Almeida et al., 2022). Entre os últimos se destacam os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), um subconjunto de ácidos graxos com 6 ou menos átomos de carbono em sua estrutura, obtidos através da fermentação de carboidratos, especialmente fibras solúveis da dieta, pelos microrganismos. Esses SCFAs podem, por exemplo, regular o metabolismo hepático interagindo com receptores (Brown et al., 2003) ou servir como substratos intermediários para reações de síntese no fígado (den Besten et al., 2013; Perry et al., 2016). Dessa forma, é de se esperar que a colonização do trato gastrointestinal no período pós-nascimento, que ocorre paralelamente ao desenvolvimento hepático, contribua para a maturação adequada do fígado, em um período especialmente crítico conhecido como “janela de oportunidade neonatal” (Torow and Hornef, 2017).

Apesar de muito se saber sobre o desenvolvimento hepático durante a fase gestacional – incluindo a cronologia da hematopoiese (Zhao and Duncan, 2005) –, bem como das funções metabólicas e imunológicas do fígado na fase adulta, poucos estudos elucidam como o órgão adapta, tanto o sistema imune quanto o perfil enzimático, para reagir aos desafios enfrentados nos períodos iniciais pós-nascimento. De fato, mudanças abruptas na microbiota e na dieta são esperadas nessa fase; assim, a transição da vida intra- para extrauterina exige adaptações rápidas, complexas e bem orquestradas para garantir a sobrevivência neonatal (Mafra et al., 2019; Morton and Brodsky, 2016). Entender o desenvolvimento de um órgão vital tão importante nesse período é, portanto, essencial. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica de maturação hepática pós-natal.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Descrever o desenvolvimento hepático pós-natal em camundongos, tanto imunologicamente quanto metabolicamente, bem como identificar possíveis fatores que governam a maturação do órgão.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterização da arquitetura hepática ao longo do desenvolvimento pós-natal;
2. Determinação da composição celular imune do fígado nas diferentes fases do desenvolvimento;
3. Visualização da distribuição de diferentes populações mieloides ao longo do fígado;
4. Análise de precursores em outros órgãos hematopoiéticos;
5. Avaliação da susceptibilidade à infecção por *Escherichia coli* e caracterização da captura desse patógeno pelas células de Kupffer;
6. Comparação do perfil de expressão de genes relacionados ao processo de fagocitose e eliminação de patógenos entre as células de Kupffer de neonatos e adultos;
7. Avaliação da função do fígado de depuração de substâncias e da dinâmica de expressão de diferentes genes envolvidos no metabolismo hepático;
8. Determinação de parâmetros que influenciam na maturação hepática, como desmame e presença da microbiota;
9. Caracterização da composição da microbiota durante o desenvolvimento pós-natal, incluindo na situação de desmame prematuro;
10. Análise de captura de *Escherichia coli* pelas células de Kupffer de animais isentos de germes;
11. Avaliação do perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias durante o desenvolvimento, em animais convencionais e isentos de germes.

3. Metodologia

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J selvagens (WT), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG); C57BL/6 CX3CR1^{gpf/wt} (B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J) e LysM-EGFP (Lyz2tm1.1Graf), provenientes do Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Também foram utilizados camundongos Swiss/NIH isentos de germes obtidos originalmente da empresa Taconic (Madison, WI, EUA) e camundongos Swiss/NIH convencionais, mantidos no biotério do laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG e cedidos pela Professora Leda Vieira. Animais de diferentes idades (0 e 4 dias, 2, 3, 4 e 8 semanas) foram gerados de matrizes acondicionadas em grupos de 2 fêmeas para cada macho em ambiente com temperatura controlada (24°C), períodos alternados de 12h claro/escuro, com disponibilidade de ração (Nuvilab) e água *ad libitum*. Os camundongos isentos de germes foram procriados em isoladores flexíveis (Standard Safety Company, Palatine IL e Class Biological Clean Ltda), utilizando-se de técnicas de gnotobiologia. O desmame dos camundongos em situações normais foi feito na 3ª semana de vida, exceto para os experimentos de desmame prematuro, em que os animais foram separados de suas mães com 2 semanas e uma dieta customizada (mesma ração, porém umedecida) foi oferecida no fundo das gaiolas. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA 34/2017, 315/2017, 384/2016).

3.2. Imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal (i.p.) de (ketamina 80 mg/kg e xilazina 15mg /kg; Syntec) e perfundidos via transcardíaca com 20mL de solução salina (Ringer's solution) e em seguida, com 40 mL de formalina neutra tamponada (NBF) a 10%. O fígado foi então removido e fragmentos foram fixados em NBF 10% por 3 horas e em seguida, imersos

em solução de sacarose a 15% (por 1 hora) e 30% (por 3 horas ou *overnight*). Após, os tecidos foram montados em OCT, congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e então seccionados a 12 µm (-22°C) em criostato (Leica CM3050 S). Lâminas contendo as secções de tecido foram imersas em PBS por 15 minutos e submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato 0,06% e aquecimento em microondas por 10 minutos. Após permeabilização por 15 minutos em solução PBS contendo 0,5% de triton X-100, os cortes foram submetidos ao bloqueio de ligações inespecíficas pela incubação por 1 hora com soro normal de cabra (NGS) a 3% e em seguida, incubados *overnight* (4°C) com os anticorpos primários. Para hepatócitos, foi utilizado o anticorpo primário anti-albumina (clone 188835, R&D Systems) na concentração de 1:100; para células imunes, um mix de anticorpos (todos 1:50) foi utilizado: anti-GR1 (clone RB6-8C5, eBioscience), anti-F4/80 (clone BM8, eBioscience), anti-CD19 (clone 6D5, BioLegend), anti-CD172a (clone P82, BioLegend), anti-CD117 (clone 2B8, BD Biosciences) e anti-CD3 (clone 145-2C11, BD Biosciences). Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-mouse IgG Cy3 (Merck) e anti-rat IgG Alexa 633 (BioLegend), ambos diluídos 1:100. A marcação nuclear foi realizada com uso de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies). As lâminas obtidas foram montadas em glicerol contendo Tris-HCl 0,1M na proporção (9:1) e seladas. As lâminas foram analisadas utilizando microscópio Confocal Nikon Ti A1R (Nikon, Japão).

3.3. Avaliação histológica do fígado

Fragmentos de fígado de camundongos nas diferentes idades foram coletados e fixados em formol 4% tamponado. Posteriormente, foram desidratados em soluções de álcool etílico, banhados em xilol e incluídos em blocos de parafina histológica. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo e corados com coloração padrão de hematoxilina & eosina (H&E). A visualização dos cortes foi feita em microscópio Nikon Eclipse E600 e as imagens foram obtidas utilizando o sistema de imagem Axiocam (Zeiss). Os mesmos procedimentos foram realizados para amostras de fígados humanos recebidas da Faculdade de Medicina da UFMG, que estão de acordo com as normas da COEP (CAAE – 00907612.0.0000.5149).

3.4. Imunofenotipagem das populações imunes hepáticas por CyTOF

Para o isolamento de células não parenquimais, os camundongos foram anestesiados via i.p., o sangue foi coletado e os fígados foram removidos, macerados e digeridos em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) suplementado com colagenase tipo VIII (1mg/mL; Sigma-Aldrich) sob agitação constante, a 37°C, por 1 hora. Após incubação, essa solução foi filtrada em *cell strainer* 70µm para a remoção de tecido não digerido. O filtrado foi então submetido à uma série de centrifugações diferenciais: i) 400g por 10 minutos a 4°C (*pellet* coletado); ii) 60g por 3 minutos a 4°C (sobrenadante coletado) e iii) 400g por 10 minutos a 4°C (*pellet* coletado). As células foram submetidas à lise por ACK (Sigma), centrifugadas novamente a 400g por 10 minutos e o *pellet* final, correspondendo agora às células não parenquimais hepáticas, foi utilizado para posterior análise. Para citometria de massa (*time-of-flight mass cytometry* – CyTOF), 1×10^6 células foram marcadas com anticorpos conjugados a radioisótopos na diluição de 1:100, como descrito previamente (Becher et al. 2014; David et al. 2017). A lista completa dos 30 anticorpos utilizados se encontra no Apêndice I. As amostras foram adquiridas no citômetro Helios Mass (Fluidigm) e os dados foram plotados utilizando análise viSNE. Os eventos foram plotados dentro das células CD45⁺.

3.5. Microscopia confocal *in vivo* e *ex vivo*

A microscopia intravital confocal (MIV) de fígado de camundongos foi realizada conforme descrito anteriormente (Marques et al., 2015) utilizando microscópio Confocal Nikon Ti A1R (Nikon). Resumidamente, os camundongos receberam, por via intravenosa, uma mistura de anticorpos fluorescentes, entre os quais se incluem: anti-F4/80 PE (0,1 µg/g, clone BM8, BioLegend) ou anti-F4/80 APC (0,1 µg/g clone BM8, BioLegend); e anti-CD31 BV-421 (0,15 µg/g, clone 390, BD Bioscience) ou anti-CD31 APC (0,3 µg/g, clone 390, BioLegend). Após 10 minutos, os animais foram anestesiados intraperitonealmente. Para as imagens *ex vivo*, os fígados foram removidos para observação. Para as imagens *in vivo*, os animais foram laparatomizados na linha média e o fígado foi exposto em um suporte de acrílico compatível com o microscópio. Os vídeos foram feitos em definição de pixel 512x512

e aquisição de um frame a cada 10 segundos durante 10 minutos, em posição XYZ fixada, sendo um vídeo por animal. Os dados de microscopia foram analisados utilizando o software Volocity (Perkin Elmer) ou NIS-Elements Advanced Research (Nikon Instruments).

3.6. Cultivos e ensaios com *Escherichia coli*

Foi utilizada a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* GFP (ATCC®25922GFP). As bactérias foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (MP Biomedicals) com adição de ampicilina (100µg/ml) por 12-15 horas, a 37°C em agitação. Após esse tempo, foram submetidas à centrifugação de 1500g por 15 minutos e ressuspendidas em PBS. A concentração de bactérias foi determinada por leitura da densidade óptica (OD) a 600nm em espectrofotômetro (Versamax), considerando que uma OD = 1 corresponde a 8×10^8 células/ml. Para os experimentos de citometria de fluxo, os animais receberam i.v. 5×10^6 *E. coli* por 20g. Após 5 minutos, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado e analisado no citômetro Accuri C6 (BD). O resultado foi baseado no número de eventos GFP por volume de sangue em microlitros (µl) e utilizado para estimar o número de *E. coli* livre na circulação sistêmica. Para os experimentos de sobrevivência e unidades formadoras de colônias (CFU), os animais receberam i.v. 5×10^5 *E. coli* por 20g. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados e o fígado foi homogeneizado de maneira a se obter uma solução de 1mg de tecido hepático para 10uL de salina estéril. A partir dessa 'solução', diluições seriadas foram obtidas e plaqueadas em placas com ágar Luria-Bertani (MP Biomedicals) com adição de ampicilina por 10 horas, a 37°C. Após o término de incubação, as colônias foram contadas e o número de CFU determinado utilizando a seguinte fórmula: $CFU = \text{Número de colônias} / (\text{diluição das amostras} \times \text{volume plaqueado})$. Para os experimentos de MIV, os animais receberam i.v. 5×10^7 *E. coli* por 20g após fígado ser posicionado em placa de acrílico, conforme o protocolo já descrito.

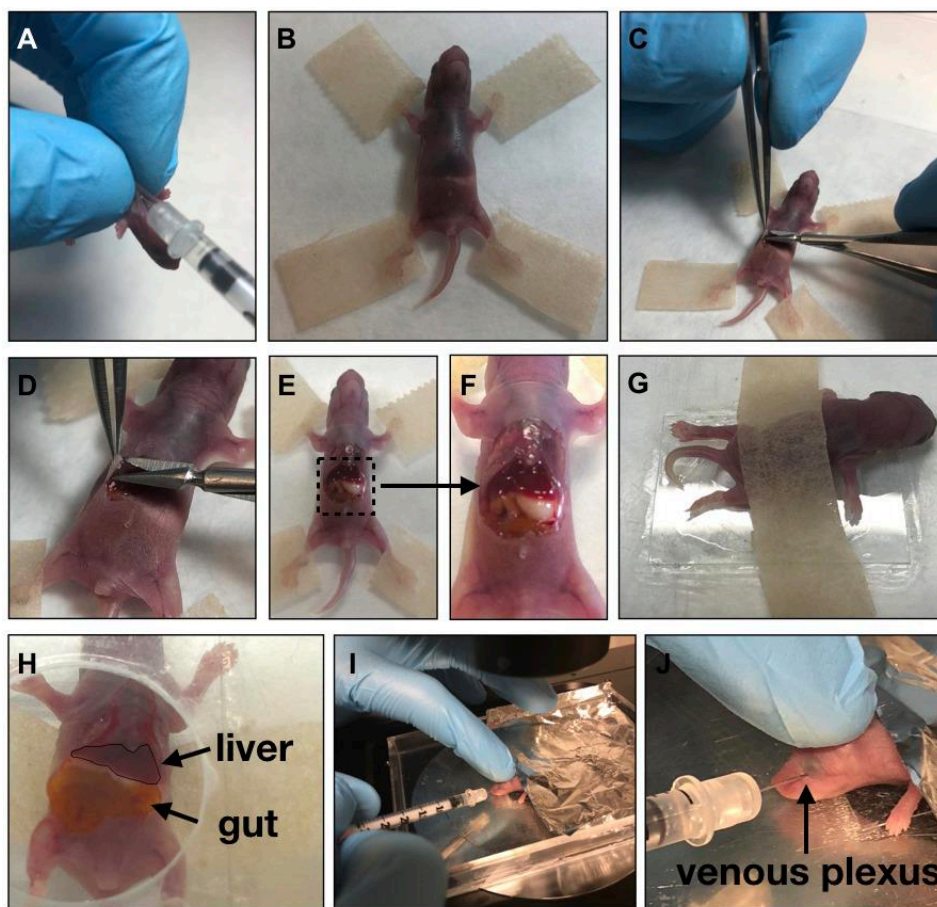


Ilustração 3. Procedimento cirúrgico para desafio bacteriano *in vivo* em neonatos. Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina, o fígado foi exposto em um suporte de acrílico por meio de uma laparotomia mediana, os animais foram posicionados e receberam através do plexo venoso o desafio de *E. coli*.

3.7. Citometria de fluxo de medula óssea e baço

Para a citometria de fluxo, a medula óssea, obtida a partir dos fêmures e tíbias, e o baço foram coletados. Para obtenção de células do baço, o órgão foi macerado; já para a medula, utilizamos a centrifugação direta dos ossos (Dobson et al., 1999). Após retirada das epífises, os ossos foram colocados em um *ependorf* de 0,5ul com um furo na extremidade, posicionado dentro de um *ependorf* de 1,5ul, de maneira que, quando submetidos à centrifugação de 300g por 10 minutos, têm seu conteúdo medular liberado. Ambos os procedimentos foram realizados em meio RPMI-1640 (Sigma) e a suspensão de células obtidas foi filtrada em *cell strainer* 70µm e

submetida à lise por ACK. Os seguintes anticorpos (1:100) foram utilizados para marcação: Lineage (CD3/GR-1/CD11b/CD45R (B220)/Ter-119) FITC (BioLegend), anti-CD135 BV421 (clone A2F10, BioLegend), anti-CD117 PerCP Cy5.5 (clone 2B8, BD Biosciences), anti-CD115 APC (clone AFS98, BioLegend) e anti-Sca1 PE (clone D7, BioLegend). As amostras foram adquiridas no citômetro Cytotflex B-R-V (Beckman Coulter) e analisadas pelo *software* Kaluza 1.5a (Beckman Coulter).

3.8. Análise dos dados de *microarray*

A expressão gênica de KCs de animais 0 dia e adultos foi obtida por meio de dados previamente publicados, depositados no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) - Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), sob número de acesso GSE135790 para as KCs 0 dia e GSE75225 para KCs de adultos (Bonnardel et al., 2019; Scott et al., 2016). O *microarray* foi realizado na Nucleomics facility, VIB Leuven, Bélgica, utilizando o GeneChip Mouse Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix). Os resultados depositados foram, então, analisados com auxílio do R/Bioconductor. O modelo RMA (Robust Multi-array Average) foi utilizado para normalização das amostras (correção de *background* e transformação em \log_2). Os p-valores (p.values) foram corrigidos (p.adj) calculando o FDR (False Discovery Rate, ou Benjamini-Hochberg). Os resultados foram considerados significativos quando $p.adj < 0,05$. Após obtenção do p.adj utilizamos o pacote “clusterProfiler” para programa R (Wu et al., 2021) para fazer enriquecimento de vias através do banco de dados Kegg Pathways (<http://www.kegg.jp/>) (Kanehisa and Goto, 2000). As vias foram consideradas diferencialmente expressa quando $p.adj < 0,05$ (FDR). Em seguida, a análise de componente principal (PCA) foi feita com base no padrão global de expressão de genes das amostras, para identificar se o perfil de expressão foi capaz de separar os tipos celulares. Análise essa que foi feita usando pacote básico do R e o pacote “factoextra”. Por fim, a visualização da expressão gênica de cada via enriquecida foi gerada usando pacote “pathview” do programa R.

3.9. Extração de RNA e PCR em tempo real

A extração de RNA foi realizada com o Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega). Os fragmentos retirados do fígado, juntamente com tampão de lise, foram homogeneizados em macerador de tecidos, centrifugados a 14000g, 3 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado isopropanol para precipitação do material genético. A solução foi então transferida para uma minicoluna, seguido de centrifugação a 14000g por 1 minuto. Após lavagem com RNA Wash Solution a 14000g por 1 minuto, DNase foi adicionada à coluna para degradação do DNA e após 15 minutos, seguiu-se 3 etapas de lavagens para retirada de sais, proteínas e outros componentes celulares (adição de Column Wash Solution, RNA Wash Solution e centrifugações). Por fim, o RNA total foi eluído em água livre de nuclease e sua concentração foi quantificada no NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). Para a síntese do cDNA, utilizou-se o iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). A 1µg da amostra de RNA foram adicionados iScriptReaction Mix 5X, transcriptase reversa e água livre de nuclease. As reações seguiram para o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), onde permaneceram por 5 minutos a 25°C para anelamento dos *primers*, 20 minutos a 46°C para ação da enzima transcriptase reversa e 1 minuto a 95°C para inativação da enzima. As amostras foram, então, armazenadas a -20°C. O cDNA resultante foi amplificado por PCR utilizando-se kit iTaq™ Universal SYBR (BioRad) em um termociclador Rotor-Gene Q. O protocolo de amplificação constituiu de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento de acordo com o *primer* em questão e extensão a 60°C por 1 minuto. Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, utilizou-se GAPDH como controle endógeno, já determinado previamente pelo nosso grupo como o melhor normalizador para os genes avaliados no fígado durante o desenvolvimento. Todos os *primers* utilizados nesse trabalho podem ser encontrados no Apêndice II.

3.10. Ensaio enzimáticos de ALT e AST

Para determinar a atividade das transaminases hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST), foram utilizados os kits transaminase ALT cinético e AST cinético (Bioclin), respectivamente. Para os testes,

aproximamente 50mg de tecido foram homogeneizados em salina em homogeneizador de tecidos, centrifugados a 10000rpm, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado como amostra e processado de acordo com orientações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, em diferentes diluições, junto com o substrato (Tampão HEPES pH 7,8. LDH, L-alanina, NaCl e azida sódica) e coenzimas (alfacetoglutato, NADH e azida sódica). A placa foi mantida a 37°C por 50 segundos e, então, foi lida em espectrofotômetro (340nm) à 37°C. As medidas foram feitas como quatro leituras em intervalos de um minuto, cujo valor médio reflete a atividade da enzima. O resultado final (dado por U/L) foi dividido pelo peso inicial do tecido.

3.11. Ensaio de depuração do verde indocianina

O teste de função de depuração hepática foi realizado por meio do *clearance* do verde de indocianina do sangue. Os animais receberam via i.v. uma dose de 20 mg/Kg do corante (ICG – cardiogreen, Sigma Aldrich) diluído em água tipo I. Após 10 minutos, os animais foram anestesiados e o soro coletado. As amostras foram diluídas e a absorbância medida em espectrofotômetro (800nm). O resultado obtido foi comparado a uma curva padrão e expresso em verde indocianina (µg/ml).

3.12. Extração de DNA das amostras de fezes

A composição da microbiota intestinal foi estudada em amostra de fezes. A partir da segunda semana de vida, os animais foram acompanhados de forma individualizada até a oitava, sendo as fezes coletadas semanalmente e armazenadas à temperatura de -80°C. A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando o kit DNeasy PowerSoil® (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. De maneira resumida, as fezes foram transferidas para um tubo PowerBead, ao qual foi adicionada a solução C1. O tubo foi, então, mantido sob agitação vigorosa em vortex por 10 minutos e, posteriormente, submetido à centrifugação de 10000g por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, a solução C2 foi adicionada (para lise celular), seguida de uma incubação por 5 minutos a 2-8°C e uma

centrifugação de 10000g por 1 minuto. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, a solução C3 foi adicionada, a reação foi incubada por 5 minutos a 2-8°C e centrifugada a 10000g por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, a solução C4 foi adicionada e a mistura foi transferida para a coluna MB Spin, que foi submetida à centrifugação de 10000g por 1 minuto. A solução C4 consiste em uma solução salina de alta concentração, permitindo, dessa forma, a ligação do DNA à sílica da coluna. Assim, o conteúdo contido no tubo coletor foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes, permitindo que toda a solução passasse pela coluna. Por fim, após uma lavagem com a solução C5 e centrifugação a 10000g por 1 minuto, o DNA foi eluído em água livre de nucleases e sua concentração foi quantificada no NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o procedimento de amplificação das sequências-alvo.

3.13. Construção da biblioteca e sequenciamento

A caracterização da microbiota intestinal foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (Parada et al., 2016) e R806 (Apprill et al., 2015). Os *primers* foram construídos com barcodes, seguindo o proposto pelo Earth Microbiome Project (<https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>). Para a reação de PCR, foram utilizados de 20-30ng de DNA e o kit Platinum™ *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher). As reações seguiram para o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), seguindo as condições: 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 1 minuto e 68°C por 45 segundos; 68°C por 10 minutos. Para a purificação da biblioteca, o reagente AMPure XP beads (Beckman Coulter) foi utilizado, permitindo uma remoção eficiente de dNTPs, *primers* não ligados, dímeros de *primers*, sais e outros contaminantes, a partir da utilização de *beads* magnéticas. As *beads* foram adicionadas às reações de PCR, homogeneizadas com auxílio da pipeta 10 vezes e a mistura incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Os *eppendorfs* foram posicionado em estante magnética durante 2 minutos, até a solução apresentar-se límpida. Cuidadosamente, o sobrenadante foi removido, foram realizadas 3 lavagens com etanol 80% e o tubo foi mantido em temperatura ambiente

para secagem completa das *beads*. Após um tempo, água livre de nucleasse foi adicionada à amostra, que foi homogeneizada e o tubo foi posicionado novamente na estante magnética por 1 minuto para separação das *beads*. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O tamanho das bibliotecas amplificadas foi checado por Bioanalyzer DNA 1000 Assay (Agilent) e a concentração foi quantificada utilizando-se o kit Qubit™ 1x dsDNA HS Assay (Invitrogen). As bibliotecas foram, então, normalizadas, misturadas e sequenciadas (2x250) em uma única corrida na plataforma Miseq (Illumina). O sequenciamento foi realizado na plataforma Next Generation Sequencing do Instituto the René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ-MG).

3.14. Processamento dos dados, classificação taxonômica e estatística

Os arquivos de leitura foram processados no ambiente R, utilizando o pacote dada2 (Callahan et al., 2016) e as leituras contendo mais de dois erros foram removidas. As sequências filtradas tiveram seus erros corrigidos pelo algoritmo e foram agrupadas para formar as ASVs (*amplicon sequence variants*). As sequências quiméricas também foram removidas e uma tabela de contagem de amostras foi gerada. A classificação taxonômica foi realizada utilizando o pacote tag.me (Pires et al., 2018). A diversidade beta foi medida pela função de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) do pacote ad4r (Dray and Dufour, 2007) baseado na Divergência Jensen-Shannon calculada pelo pacote philentropy R (Drost, 2018). PERMANOVA foi realizado utilizando 999 permutações para testar o impacto de variáveis categóricas na diversidade beta. A diversidade alfa foi medida pelos índices de Shannon e Simpson. O teste PERMANOVA e os cálculos de Diversidade Alfa foram realizados pelo pacote vegan R. A abundância diferencial entre os grupos foi testada pelo pacote DESeq2 R (Love et al., 2014) utilizando a contagem absoluta das *reads* para cada entrada taxonômica em um teste de Wald. Diferenças suportadas por valores ajustados de $p < ,01$ foram selecionadas para discussão.

3.15. Análise de dados e estatística

Os gráficos e testes estatísticos foram feitos com o auxílio do software GraphPad Prism versão 6 e 8. Os dados passaram por análise de normalidade, sendo apresentados como média \pm erro padrão da média. A comparação entre os grupos das diferentes idades foi feita utilizando-se one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, com todos os grupos sendo comparados ao grupo 8 semanas. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student. Nos experimentos de expressão de citocinas foi utilizado one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, nos animais convencionais ou isentos de germes, com os grupos sendo comparados ao grupo 1 semana; e two-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, na comparação entre as diferentes idades nas duas condições. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (assinaladas com *).

4. Resultados

4.1. A organização morfológica hepática muda drasticamente durante o desenvolvimento hepático pós-natal

Visando caracterizar a arquitetura morfológica do fígado durante o desenvolvimento pós-natal, analisamos a distribuição das populações de hepatócitos e células imunes ao longo do desenvolvimento. Para isso, utilizamos diferentes técnicas histológicas, como coloração por H&E e imunofluorescência, na qual foram utilizados anticorpos para visualização das células parenquimais (anti-albumina) e células imunes (uma combinação de anticorpos para os principais subtipos de células imunes). Ambas as técnicas revelaram mudanças na arquitetura do parênquima, no que diz respeito à densidade, organização e composição celulares. Nos animais recém-nascidos, no dia 0, observamos uma maior densidade celular em comparação a todos estágios do desenvolvimento (Figura 1D), morfologia dos núcleos altamente variável e presença de inúmeras “ilhas” compostas por diferentes tipos de células imunes (Figura 1A-B, primeira coluna). Ainda, nos neonatos, foram encontrados poucos hepatócitos com núcleos globoides, que apresentam uma marcação fraca para albumina no citoplasma, sem delimitação celular evidente. Por outro lado, nos animais adultos, percebemos uma mudança na composição celular, com redução do número de células imunes, que agora estão quase exclusivamente no espaço vascular, e com hepatócitos mais evidenciados – células grandes, organizadas em cordões, com limites celulares bem definidos, citoplasma abundante e algumas binucleadas (Figura 1A-B, última coluna). Essas alterações ocorrem de forma gradual ao longo do desenvolvimento, já que com 1 semana de vida, os hepatócitos parecem iniciar sua organização em cordões, mas ainda há retenção de células imunes no parênquima (Figura 1A-B, segunda coluna). Com 3 semanas, a arquitetura hepática assemelha-se à encontrada em adultos, indicando um processo de reorganização estrutural e celular ao longo do desenvolvimento (Figura 1A-B, terceira coluna).

Além de mudanças no parênquima, observamos também uma reorganização da vasculatura. Nos neonatos, os sinusoides hepáticos apresentam um padrão semelhante à uma colmeia, sendo mais curtos e arredondados, diferente do padrão mais alongado encontrado nos adultos (Figura 2A). Quando analisamos os espaços avasculares, denominados cordões avasculares, percebemos que, ao longo do

desenvolvimento, eles passam de áreas mais circulares para áreas mais alongadas (Figura 2B). Presumivelmente, esses espaços estão ocupados por hepatócitos, o que evidencia a organização dessas células em longos cordões nos adultos (Figura 2C).

Visando avaliar se essas alterações observadas em modelo murino poderiam ser encontradas em humanos, utilizamos amostras de fígado de necrópsias, sendo todas elas coletadas de pacientes com fígado saudável, sem óbito relacionado a doenças hepáticas. Corroborando os resultados do modelo animal, as amostras de neonatos humanos apresentam ilhas de células imunes no parênquima (células de núcleo pequeno, bem corado e pouco citoplasma) e a típica organização histológica hepática descrita para adultos não foi observada (Figura 1C). De fato, fígados humanos de recém-nascidos apresentam uma maior densidade celular em comparação a adultos (Figura 1E). Figuras celulares com característica de hepatócitos foram observadas, mas sua organização em cordões não está tão evidente como no adulto.

Em conjunto, nossos dados revelam que a organização microscópica do fígado em neonatos não se assemelha à de adultos, uma vez que as células não estão organizadas em cordões de hepatócitos, mas constituem um agregado homogêneo sem uma clara compartimentalização e com presença de inúmeras ilhas de células imunes.

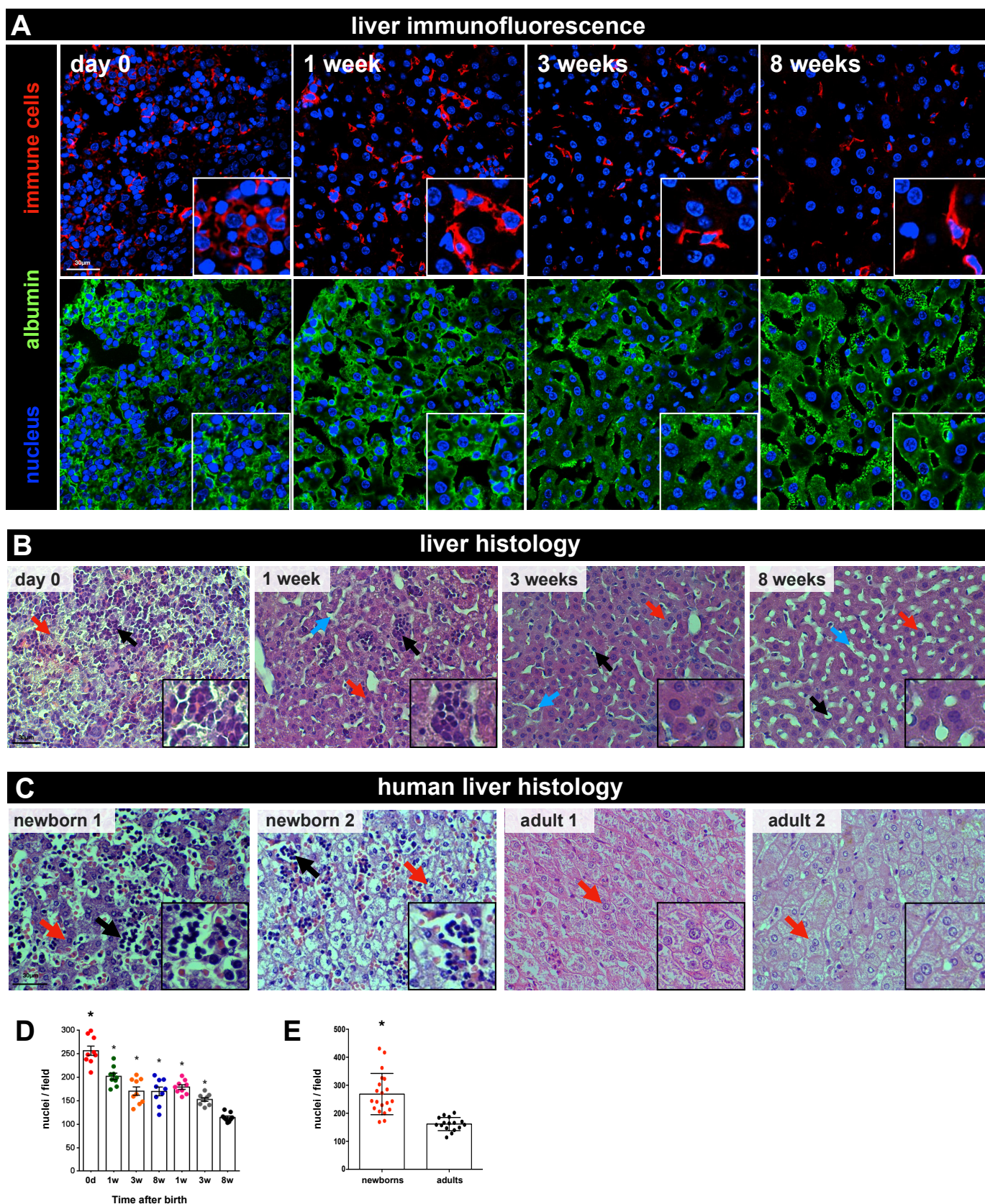


Figura 1. A arquitetura e celularidade hepáticas em neonatos diferem drasticamente das encontradas em adultos. (A) Imunofluorescência de cortes hepáticos congelados com marcação para hepatócitos (anti-albumina, verde), núcleos (DAPI, azul) e células imunes (coquetel de anticorpos imunes, vermelho). **(B)** Cortes histológicos corados em H&E evidenciando células imunes (setas pretas), hepatócitos (setas vermelhas) e vasculatura (setas azuis). **(C)** Biópsias de fígados humanos de recém-nascidos e adultos coradas em H&E evidenciando células imunes (setas pretas) e hepatócitos (setas vermelhas). **(D)** Quantificação do número de núcleos por campo das imagens de imunofluorescência. **(E)** Quantificação do número de núcleos por campo em amostras de recém-nascidos humanos. $n \geq 4$. * indica significância estatística em relação ao adulto ($p < 0,05$).

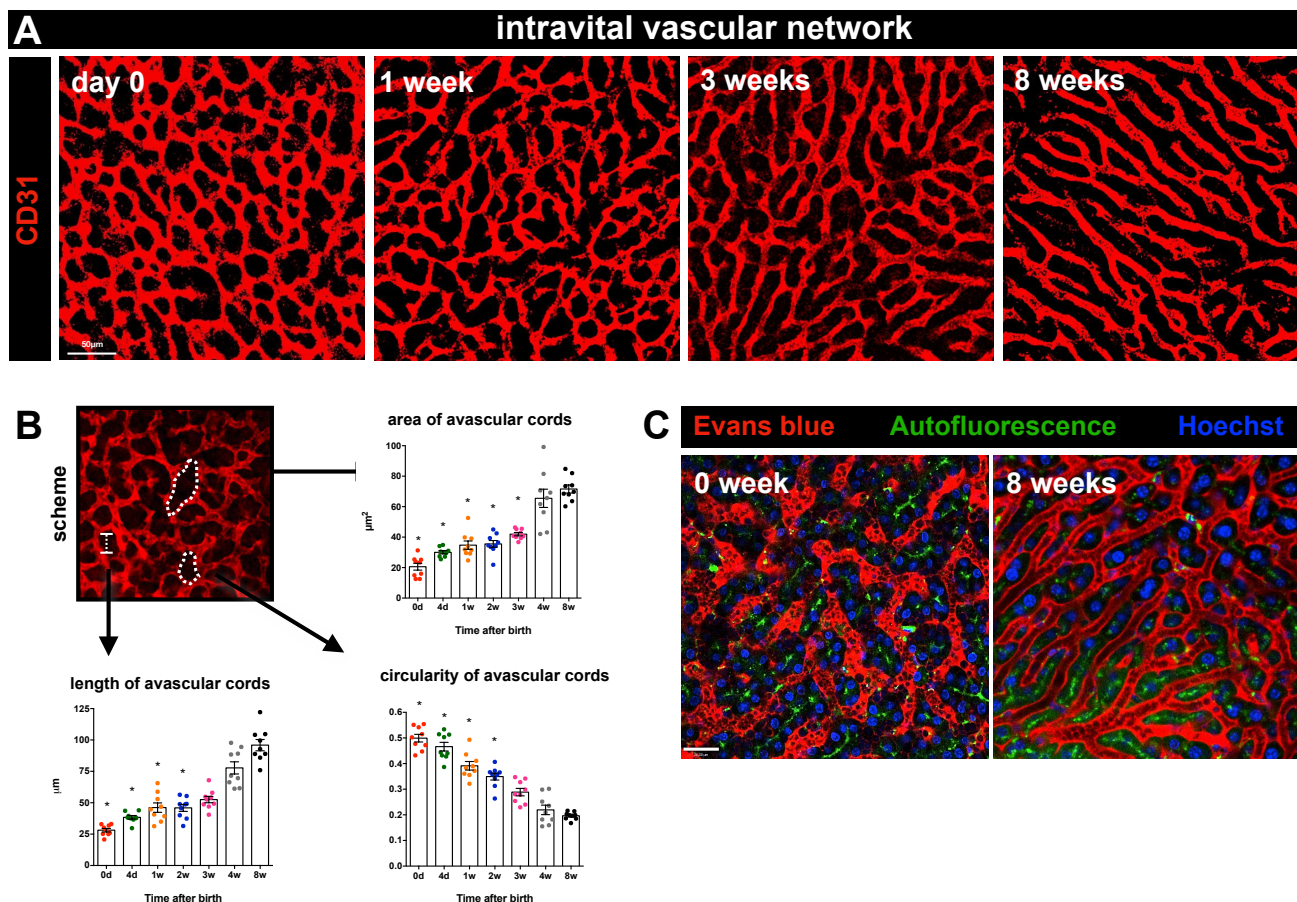


Figura 2. Alterações vasculares acompanham as mudanças no parênquima hepático no desenvolvimento pós-natal. (A) Microvasculatura hepática obtida por microscopia *ex vivo* de animais que receberam anti-CD31 (em vermelho, marcação para sinusoides). **(B)** Quantificação digital dos cordões avasculares (regiões sem marcação) das imagens em (A), para as medidas de área, circularidade e comprimento. **(C)** Microscopia *ex vivo* de animais que receberam Evans blue (em vermelho, para visualização dos sinusoides) e hoechst (em azul, marcação para núcleos). $n \geq 4$. * indica significância estatística em relação ao adulto ($p < 0,05$).

4.2. A composição celular imune muda de mieloide em neonatos para linfoide em adultos

Nossos experimentos de imagens sugeriram fortemente a presença de grandes populações de células imunes no fígado de neonatos. Entretanto, uma completa descrição dessas populações durante o desenvolvimento pós-natal ainda estava ausente na literatura. Para caracterizar precisamente tais células, realizamos a imunofenotipagem em alta dimensão por citometria de massa (CyTOF) (Figura 3A). Os eventos CD45⁺ (marcador global para todas as células imunes) foram inicialmente considerados e posteriormente agrupados de acordo com a expressão de marcadores específicos, que permitiram sua quantificação e classificação dentro dos subtipos principais de leucócitos (Figura 3C).

Nós encontramos que os fígados dos animais no dia do nascimento apresentam a população imune mais diversa comparados às outras idades – identificamos 22 clusters diferentes. De forma interessante, nos neonatos 0 dia – e apenas em tal grupo –, uma porção considerável dos leucócitos encontrados eram CD45^{low} (Figura 3B). Os granulócitos (Ly6G⁺ CD172⁺ CD11b⁺ e/ou Siglec F⁺) são os principais tipos celulares presentes no fígado (~35%) (Figura 3N), seguidos de células B imaturas (CD45^{low} CD19⁺; ~12%) (Figura 3E) e monócitos (Ly6C⁺ CD11b⁺; ~11%) (Figura 3H). Outros linfócitos, como as células T (CD3⁺), NKT (CD3⁺ NK1.1⁺) e NK (CD3⁻ NK1.1⁺) estão presentes em menor quantidade (~1%) ou não foram detectados (Figura 3K-M) e as células B maduras (CD45⁺ CD19⁺) representam ~5% das células imunes (Figura 3D). Macrófagos (F4/80⁺) e DCs têm frequência similar (~1-2%) (Figura 3F-G). Ainda, encontramos uma população considerável de células precursoras (CD117⁺; ~12%) (Figura 3J) e *clusters* que não foram claramente distinguíveis entre macrófagos e monócitos (Ly6C^{hi} F4/80^{hi} CX3CR1⁺, ~2%) (Figura 3I). Portanto, pelo menos 70% de todas as células imunes hepáticas no dia 0 são de linhagem mieloide, com uma manutenção de células hematopoiéticas mesmo após o nascimento.

Após uma semana de vida, os granulócitos continuam dominantes (~45%) (Figura 3N) e as frequências de células T, NKT e NK aumentam (T ~4%, NKT ~5% e NK ~6%) (Figura 3K-M). Observamos ainda presença de precursores (~9%) (Figura 3J) e da população indefinida de macrófagos ou monócitos (~8%) (Figura 3I), sendo

que ambas não são mais detectadas nas idades posteriores. Células B imaturas não são mais encontradas (Figura 3E) e células B maduras representam ~4% dos leucócitos (Figura 3D). Monócitos continuam em frequência similar ao 0 dia (~11%) (Figura 3H) e macrófagos e dendríticas sofrem aumento de duas e três vezes, respectivamente (Figura 3F-G).

Na terceira semana, a composição celular sofre uma profunda modificação e se assemelha mais àquela observada em adultos. A proporção de de granulócitos (~15%) (Figura 3N) e monócitos (~7%) (Figura 3H) diminui significativamente, enquanto a de linfócitos T, NKT e NK aumenta (~18%, ~11 e ~11%, respectivamente) (Figura 3K-M). A frequência de macrófagos (~8%) (Figura 3F) e dendríticas (~5%) (Figura 3G) aumenta, assim como a de células B (~20%) (Figura 3D).

Nos adultos, as populações imunes hepáticas podem ser divididas em dois grandes grupos, sendo aproximadamente 2/3 composta por linfócitos (Figura 3D, K-M) e ~1/3 por macrófagos, DCs, monócitos e granulócitos (populações mieloides) (Figura 3F-H, N). É na idade adulta, entretanto, que encontramos a maior população de macrófagos (~14%) e dendríticas (~4%) (Figura 3F-G) e de células B (~35%) (Figura 3D), comparadas aos outros tempos.

O processo de alteração nas proporções celulares durante o desenvolvimento é ilustrado em um *heat map* (Figura 3O). Esses resultados mostram que células de linhagem mielóide, precursoras e imaturas compõe principalmente o fígado nos períodos iniciais pós-nascimento e, ao longo do desenvolvimento neonatal, ocorre uma transição do perfil imunológico do fígado para linfóide nos adultos.

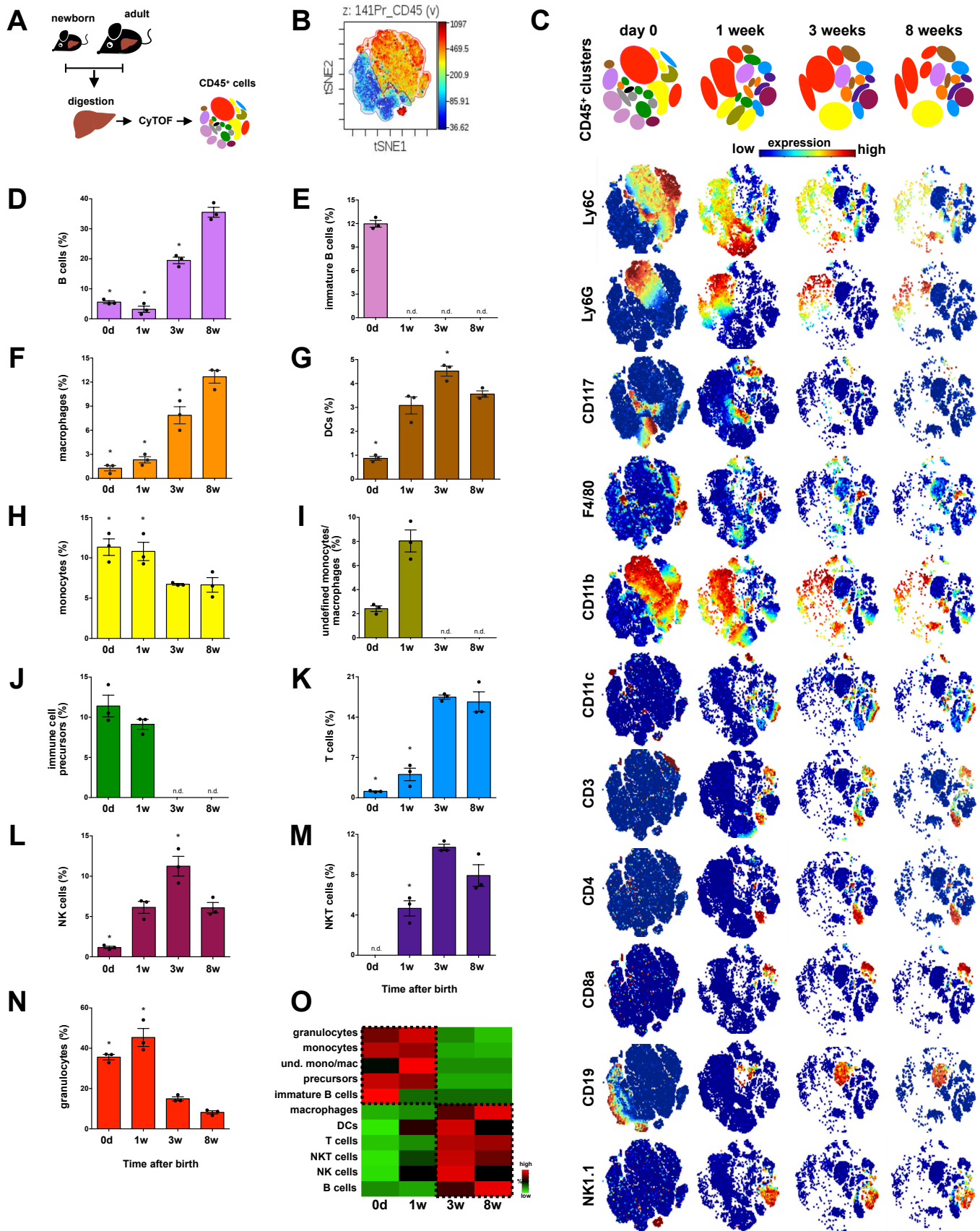


Figura 3. O fígado passa de um órgão mieloide em neonatos para um órgão linfóide em adultos. (A) Estratégia experimental da citometria de massa (CyTOF). **(B)** Expressão de CD45 nos animais no dia 0. **(C)** Expressão diferencial dos marcadores dentro os diferentes clusters, usada para a definição das populações de células imunes. **(D-N)** Frequência (% do total) das diferentes populações de células imunes. **(O)** Representação em *heatmap* da sucessão cronológica das populações imunes hepáticas. n = 3/grupo. * indica significância estatística em relação ao grupo 8 semanas ($p < 0,05$).

4.3. A composição e compartimentalização das células imunes mieloides se altera durante o processo de desenvolvimento

Para confirmar nossos dados de imunofenotipagem em alta dimensão, nós selecionamos animais que expressam a proteína verde fluorescente (GFP) sob controle de diferentes promotores relacionados a células imunes e observamos, por microscopia confocal, sua distribuição ao longo de diferentes zonas hepáticas (Figura 4A). Como a composição celular é predominantemente mioelide no início do desenvolvimento, utilizamos o animal $LysM$ -EGFP, em que neutrófilos, monócitos e macrófagos apresentam fluorescência. Consistente com nossos achados de CyTOF, uma grande população de células $LysM^+$ foi encontrada nos fígados do dia 0 até a primeira semana de vida – células $LysM^{hi}$ e esféricas, possivelmente granulócitos –, uniformemente distribuídas por todo campo de visão (Figura 4B). Com três semanas de idade, a população sofre uma alteração significativa, já que poucas células arredondadas são detectadas, sendo a maioria das células alongadas, em formato de estrela e $LysM^{low}$. Considerando a co-expressão de F4/80 em adultos (um marcador de macrófagos residentes hepáticos), tais células $LysM$ foram definidas como células de Kupffer, macrófagos residentes hepáticos sésseis localizados no interior dos sinusoides sob o endotélio vascular.

Nossa análise de CyTOF revelou, ainda, a manutenção de populações de precursores hematopoiéticos no fígado logo após o nascimento. O receptor de quimiocina CX3CR1 é altamente expresso nos precursores de macrófagos e DCs durante a maturação do sistema imune e é mantido ao longo da vida em monócitos, algumas populações de macrófagos (no fígado, apenas em macrófagos imaturos) e DCs (David et al., 2016; Yona et al., 2013). Assim, utilizamos o animal $CX3CR1^{gfp/wt}$ em combinação com o anticorpo anti-F4/80-PE para tentar visualizar essas populações. Através de cortes transversais do fígado, observamos diferenças na composição e compartimentalização das células (Figura 4C). Em todas as idades, células $CX3CR1^+$ foram encontradas no espaço subcapsular (Figura 4D, setas vermelhas). Entretanto, em animais neonatos, observamos a presença uniforme dessas células por toda extensão do fígado. Tais células vão desaparecendo ao longo do desenvolvimento (Figura 4G) e em adultos, nas camadas mais profundas do órgão, essas células são encontradas apenas ao redor dos grandes vasos (Figura 4E). Já

as células F4/80⁺, durante todo o desenvolvimento, ocupam o interior do órgão, distribuídas ao longo dos sinusoides (Figura 4F e H). Em maior aumento, quando olhamos a sobreposição entre as imagens, percebemos que muitas das células F4/80⁺ são também positivas para CX3CR1⁺ nos animais mais novos (Figura 4F, destaque). Essas células duplo positivas reduzem em número com o tempo (Figura 4I) e no adulto, o compartimento mais interno do órgão se torna predominantemente ocupado por células F4/80⁺ (Figura 4J).

Em conjunto, as imagens de fígado *in situ* e a imunofenotipagem por CyTOF descreveram em detalhes a existência de diferentes fenótipos de células imunes e sua localização diferencial durante o desenvolvimento do fígado após o nascimento.

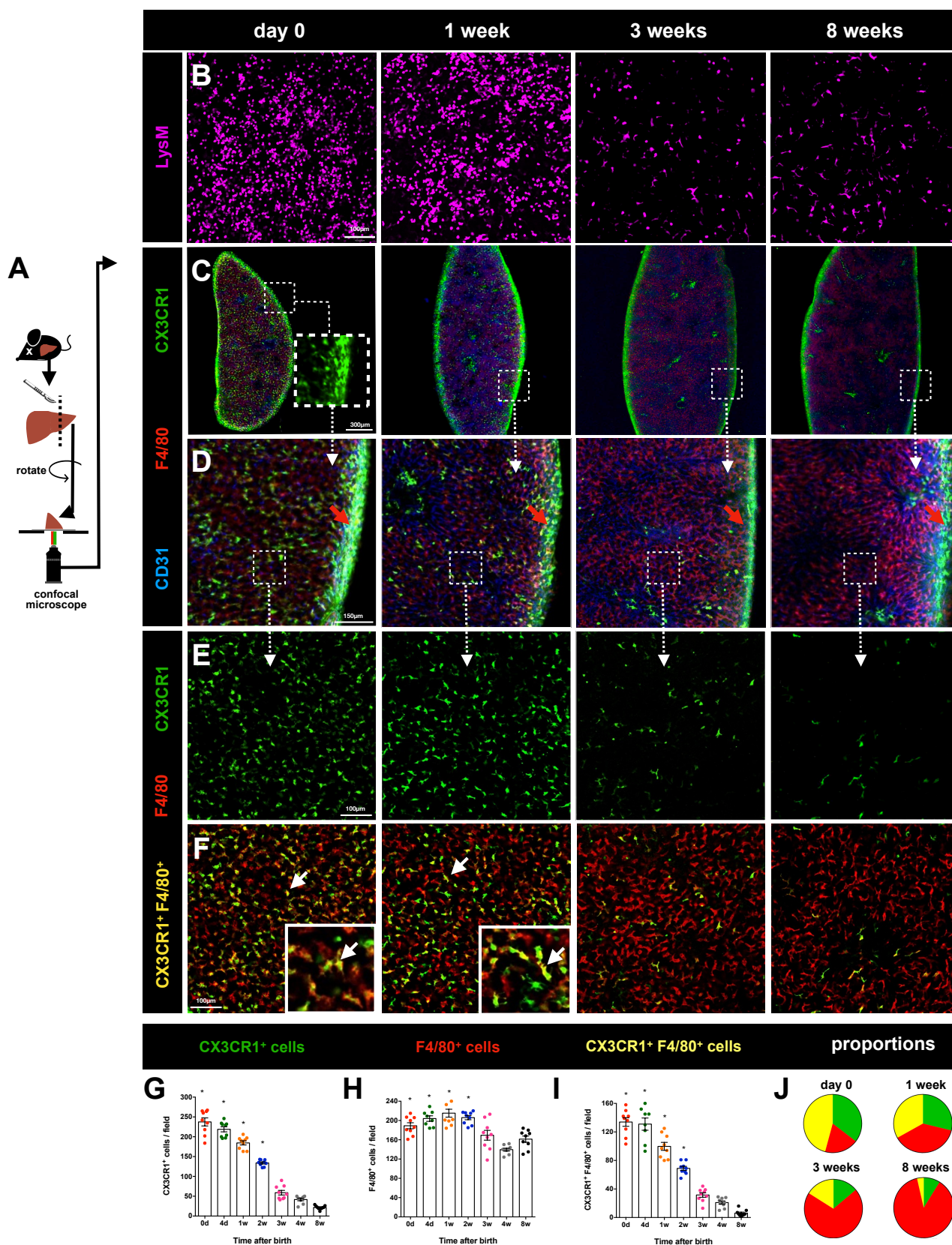


Figura 4. Grandes mudanças na frequência e compartimentalização das células mieloides hepáticas são observadas durante o desenvolvimento. **(A)** Estratégia experimental da microscopia confocal. **(B)** Microscopia *ex vivo* de animais Lysm-eGFP, evidenciando células LysM⁺ (magenta). **(C)** Microscopia *ex vivo* de animais CX3CR1-GFP, que receberam i.v. anti-CD31 (em azul, marcação para sinusoides) e anti-F4/80 (em vermelho, marcação para macrófagos). **(D-F)** Campos ampliados de (C), evidenciando células CX3CR1⁺ (em verde), F4/80⁺ (em vermelho) e células duplo positivas para CX3CR1 e F4/80 (em amarelo, setas brancas). **(G-I)** Quantificação das populações celulares de (F) por campo de visão. **(J)** Proporções das das populações celulares de (F) durante o desenvolvimento. n ≥ 5/grupo. * indica significância estatística em relação ao grupo 8 semanas (p < 0,05).

4.4. O fígado é o principal detentor de precursores hematopoiéticos nos estágios iniciais do desenvolvimento, enquanto a medula óssea e o baço são aplásicos

Atualmente, é aceito que a medula óssea se torna o principal local de hematopoiese do organismo ainda no final da gestação (Mikkola and Orkin, 2006). No entanto, levantamos a hipótese de que a abundância de células mieloides e precursores hematopoiéticos no fígado de neonatos poderia estar relacionada a uma frequência reduzida dessas células em outros locais hematopoiéticos nas fases iniciais pós-nascimento. Nós então investigamos por citometria de fluxo a frequência de HSCs na medula óssea e baço nas diferentes idades, começando no dia 0 (Figura 5A). Células Lin⁻ compreendem precursores hematopoiéticos variados e células Lin⁻ CD135⁺, precursores comprometidos com a linhagem mioide. De fato, encontramos uma grande redução de precursores hematopoiéticos na medula (Figura 5D-E) e baço (Figura 5G-H) de camundongos no dia do nascimento e números similares aos do adulto foram encontrados com uma semana de idade. Na medula, precursores mieloides foram as células Lin⁻ mais frequentes ao longo de todo desenvolvimento (Figura 5F). Assim, o fígado neonatal pode ser a principal fonte de precursores de células mieloides durante uma aplasia temporária em outros órgãos linfoides.

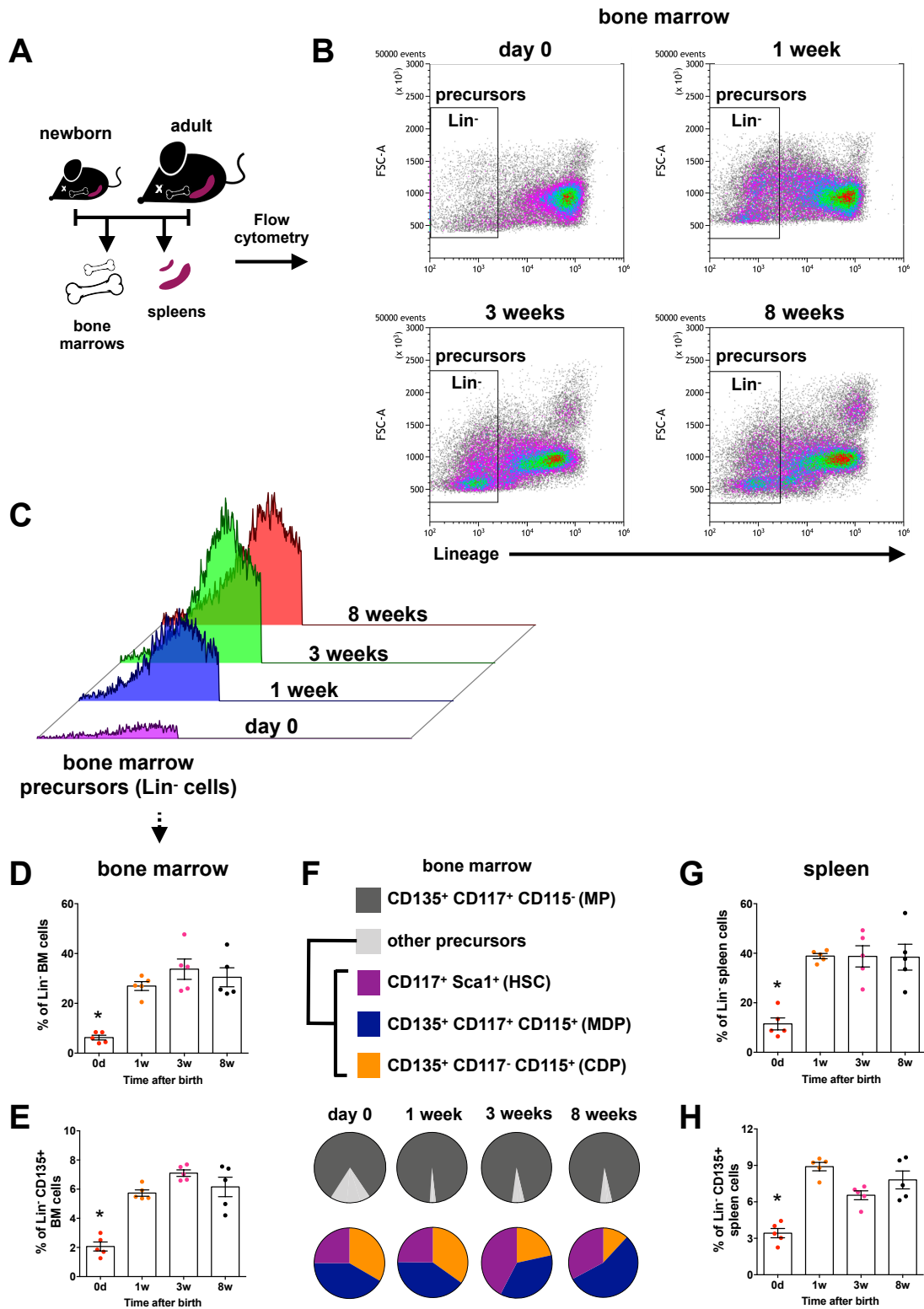


Figura 5. Aplasia temporária na medula óssea e baço de neonatos. (A) Estratégia experimental da citometria de fluxo. **(B-C)** Estratégia de gate utilizada na citometria de fluxo para definir a frequência dos precursores hematopoiéticos. **(D)** Frequência de células Lin⁻, **(E)** Lin⁻ CD135⁺ e **(F)** outros precursores na medula óssea. **(G)** Frequência de células Lin⁻ e **(H)** Lin⁻ CD135⁺ no baço. n = 5/grupo. * indica significância estatística em relação ao grupo 8 semanas (p<0,05).

4.5. Os fagócitos hepáticos rapidamente se tornam funcionais para capturar e eliminar bactérias circulantes

A maior frequência de fagócitos e células imunes inatas foi encontrada no fígado de neonatos (0-1 semana de idade), sugerindo que o órgão já seria, nos primeiros momentos após o nascimento, um local eficaz para a eliminação de bactérias da circulação – visto que essas células são as principais na execução dessa função. Para testar essa hipótese, nós desafiamos os camundongos nas diferentes fases do desenvolvimento com *Escherichia coli* GFP (Figura 6A), o patógeno mais comum responsável por quadros de sepse no período neonatal (Gladstone et al., 1990). Neonatos no dia 0 apresentaram o maior número de *E. coli* livre na circulação sistêmica após o desafio (Figura 6B) e contagens significativamente maiores de unidades formadoras de colônias (CFU) no tecido hepático 24 horas após a infecção (Figura 6C-D). Ainda, nós encontramos nessa idade uma mortalidade de 60% após um único desafio de bactéria (Figura 6E). Quatro dias após o nascimento, os animais já foram mais eficazes na eliminação de bactérias circulantes em comparação com os animais no dia do nascimento, embora o CFU no sangue e fígado ainda estivesse elevado em comparação aos animais adultos (Figura 6B-C). Nas idades subsequentes, a capacidade hepática de capturar e eliminar bactérias circulantes já estava similar à dos adultos (Figura 6B-C) e nenhuma morte foi observada (Figura 6E).

Para visualizar a imunoevasão de *E. coli* durante a infecção em neonatos, nós utilizamos a microscopia intravital confocal, em que a captura de bactérias pelos fagócitos foi filmada em tempo real no fígado (Figura 6F). Após uma injeção intravenosa de *E. coli* em adultos, inúmeras bactérias alcançam o órgão, sendo quase instantaneamente capturadas pelas KCs no interior dos sinusoides hepáticos (Figura 6H). Uma vez capturadas, as bactérias permanecem colocalizadas com as KCs até o final do tempo experimental (10 minutos). Em contraste, a maioria das bactérias que alcançam a microcirculação hepática em neonatos transita livremente pelos sinusoides, com captura reduzida ou atrasada pelas KCs (Figura 6H). O rastreamento digital do movimento de *E. coli* revelou que, enquanto KCs de adultos instantaneamente retêm as bactérias circulantes, as bactérias percorrem distâncias mais longas dentro dos microvasos hepáticos em neonatos, o que pode predispor seu

trânsito através do fígado e sua propagação para órgãos remotos (Figura 6G). Entretanto, na 1ª semana de vida, as KCs já se tornam funcionais para capturar as bactérias circulantes.

Assim, camundongos neonatos são mais susceptíveis à infecção apenas nos primeiros dias após o nascimento, o que pode ser resultado de uma remoção ineficiente de bactérias da circulação pelos macrófagos hepáticos neonatais.

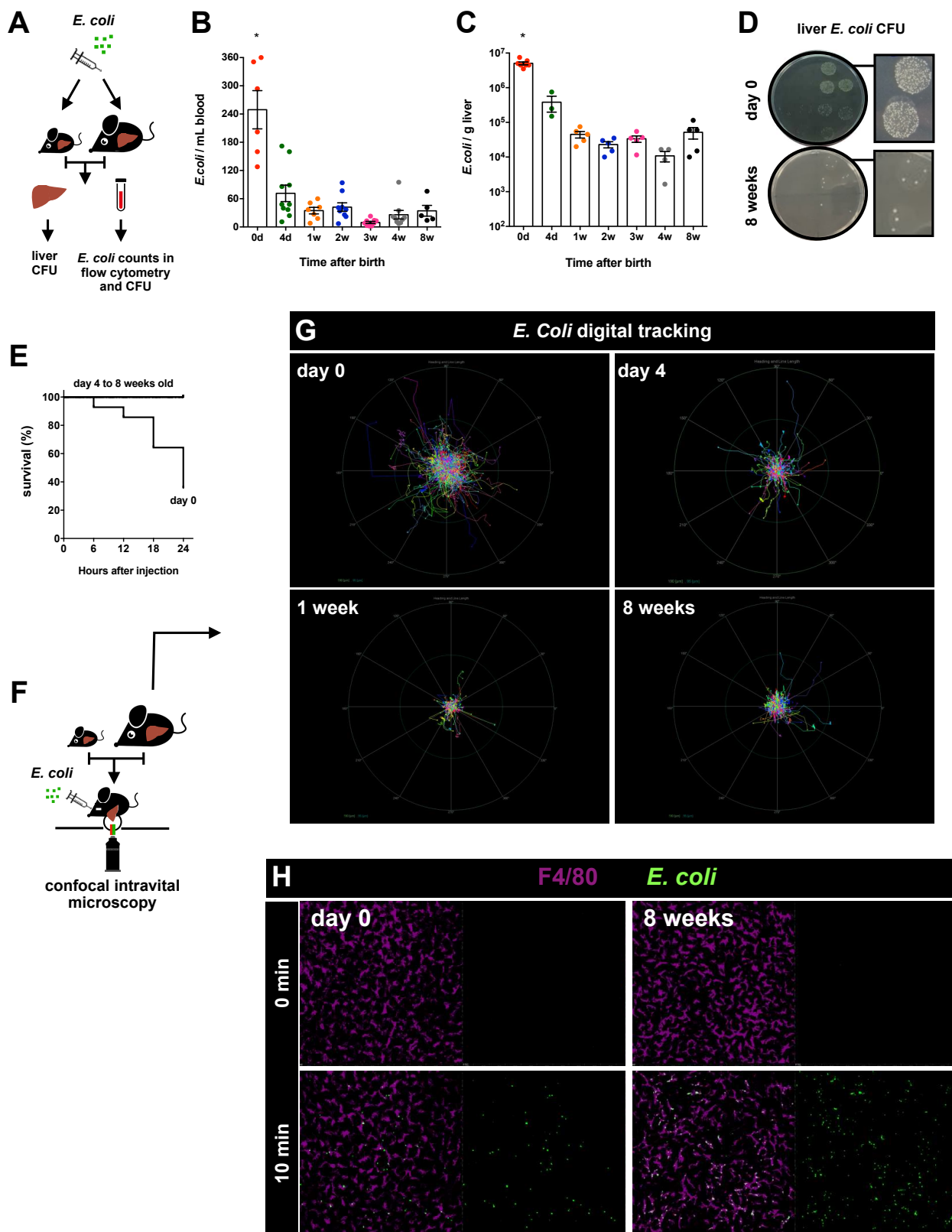


Figura 6. Neonatos apresentam um atraso na resposta à infecção por *E. coli*. (A) Estratégia experimental dos ensaios de infecção por *E. coli*. (B) Número de bactérias no sangue 5 minutos após o desafio, medido por citometria de fluxo. (C-D) CFU do fígado 24 horas após o desafio. (E) Curva de sobrevivência após infecção por *E. coli*. (F) Estratégia experimental da microscopia intravital. (G) *Tracking* digital do movimento de *E. coli*. (H) Microscopia intravital mostrando macrófagos (anti-F4/80, em magenta) e *E. coli* (GFP, em verde) 0 e 10 minutos após inóculo i.v. da bactéria. $N \geq 4$ /grupo. * indica significância estatística em relação ao grupo 8 semanas ($p < 0,05$).

4.6. Genes relacionados ao processo de fagocitose e eliminação de patógenos estão reduzidos nas KCs de neonatos

Para determinar os possíveis mecanismos responsáveis pela ineficiência de captura bacteriana em recém-nascidos pelas KCs, investigamos diferenças nessas células fagocíticas nas diferentes idades. Reanalizando o perfil transcricional obtido por microarray e depositado no banco de dados público do NCBI, podemos perceber grandes diferenças entre KCs de neonatos comparadas às de adultos (Figura 7A). Foram encontrados 5284 transcritos diferencialmente expressos, sendo a maioria mais expressa nas KCs de neonatos (Figuras 7B-C). Uma análise de enriquecimento funcional evidenciou as principais vias as quais pertencem tais transcritos, de acordo com o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Figura 7D). Observamos que algumas vias relacionadas ao processo de captura, internalização e eliminação de microrganismos se encontram, de forma geral, alteradas. Assim, realizamos uma análise mais acurada dos genes incluídos em cada uma delas na tentativa de explicar o fenótipo observado.

A primeira via analisada foi a do complemento, na qual observamos que a maioria dos genes se encontrava menos expressa nas KCs de neonatos (em vermelho) em comparação com as de adultos (Figura 8A). Esses genes codificam proteínas plasmáticas que atuam de maneira regulada promovendo a opsonização do patógeno e pertencem aos três tipos de vias envolvidas na cascata do complemento: a via clássica (desencadeada por anticorpos ligados à superfície do patógeno), a via da lectina (ativada após reconhecimento de resíduos de manose na superfície do microrganismo pela lectina ligadora de manose) e a via alternativa (ativada por diferentes padrões moleculares associados a microrganismos) (Reis et al., 2019). No fim, a opsonização direciona o patógeno para eliminação por fagocitose através do reconhecimento de diferentes componentes do complemento por receptores na membrana dos fagócitos. Genes para receptores importantes no reconhecimento dessas moléculas, como CR3 (receptor de complemento 3) e CRIg (receptor do complemento da superfamília das imunoglobulinas) também se mostraram menos expressos nas KCs de neonatos.

Outras vias analisadas correspondem às vias do fagossomo e lisossomo, envolvidas desde a captura até a destruição do microrganismo. Novamente,

receptores importantes para o reconhecimento dos patógenos pelas KCs apresentaram expressão reduzida nos neonatos (Figura 8B). Apesar dos genes $Fc\gamma R$ (receptor $Fc\gamma$) e MARCO (receptor de macrófago com estrutura de colágeno) se encontrarem inalterados, diferenças foram encontradas para TLR4 (receptor tipo-toll 4) e MR (receptor de manose tipo lectina-C). Essa redução também foi observada em genes envolvidos na internalização – VAMP3 (proteína 3 de membrana associada à vesícula) –, na maturação do fagossomo – vATPase (ATPase vacuolar) –, na fusão com lisossomo – LAMP (proteína 2 de membrana associada ao lisossomo) e na formação de espécies reativas de oxigênio no interior do fagolisossomo – subunidade gp91 do complexo da NADPH oxidase (Figura 8C).

Em conjunto, a menor expressão de genes que atuam em diferentes passos do processo de fagocitose pode explicar a susceptibilidade de neonatos à infecção por *E. coli*.

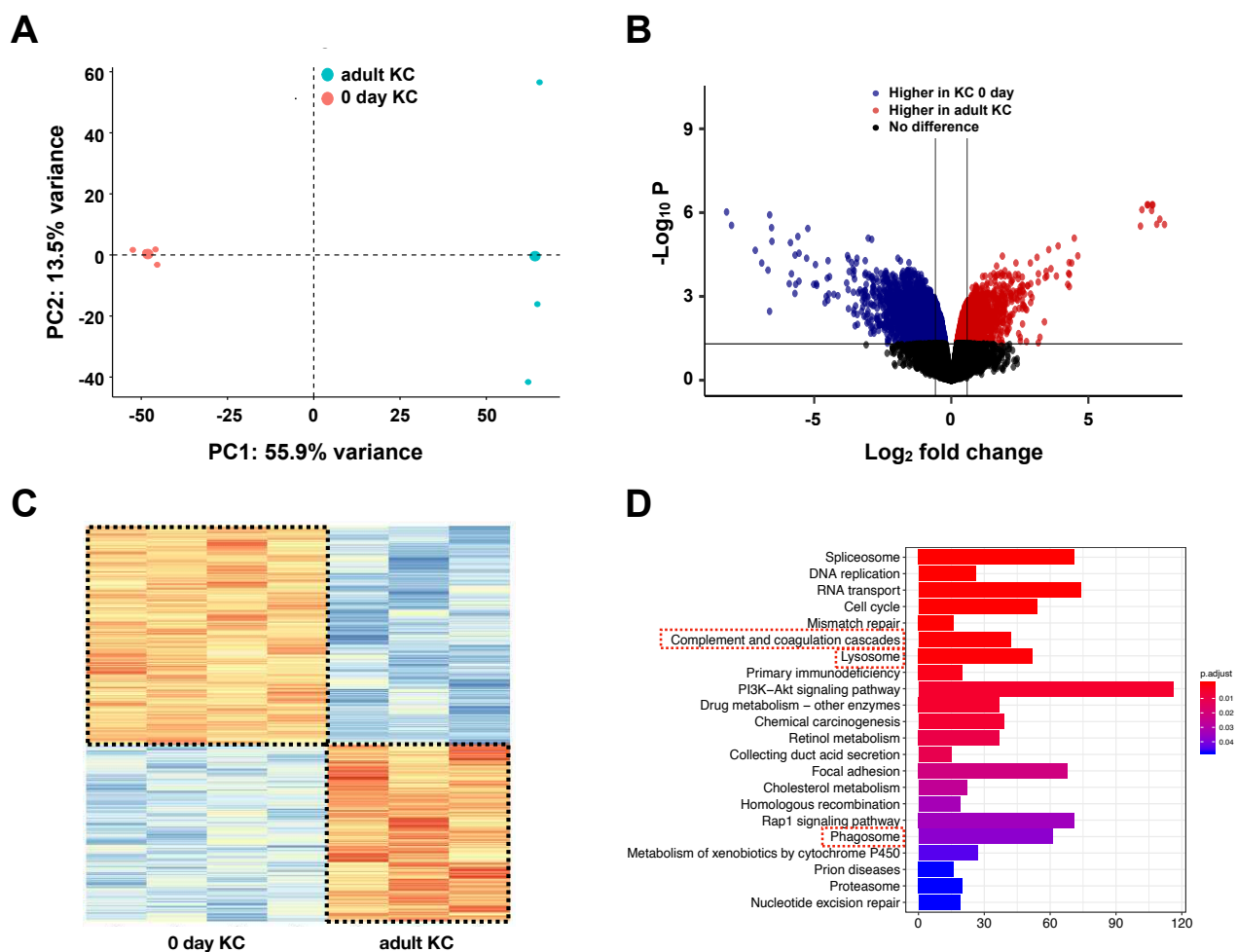


Figura 7. Diferenças entre KCs de neonatos e adultos. (A) Análise de componentes principais (PCA) dos dados de expressão gênica de KCs de animais 0 dia e 8 semanas, obtidos por microarray. (B) *Volcano plot* contendo todos os genes analisados para as KCs (em vermelho, os mais expressos em adultos; em azul, os mais expressos em neonatos; em preto, os não estatisticamente diferentes). (C) Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos. (D) Principais vias diferencialmente expressas em KCs de neonatos e adultos. Enriquecimento funcional dos genes baseado no banco de dados KEGG. $n = 3$ para o grupo KC adulto e $n = 4$ para o grupo KC 0 dia. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

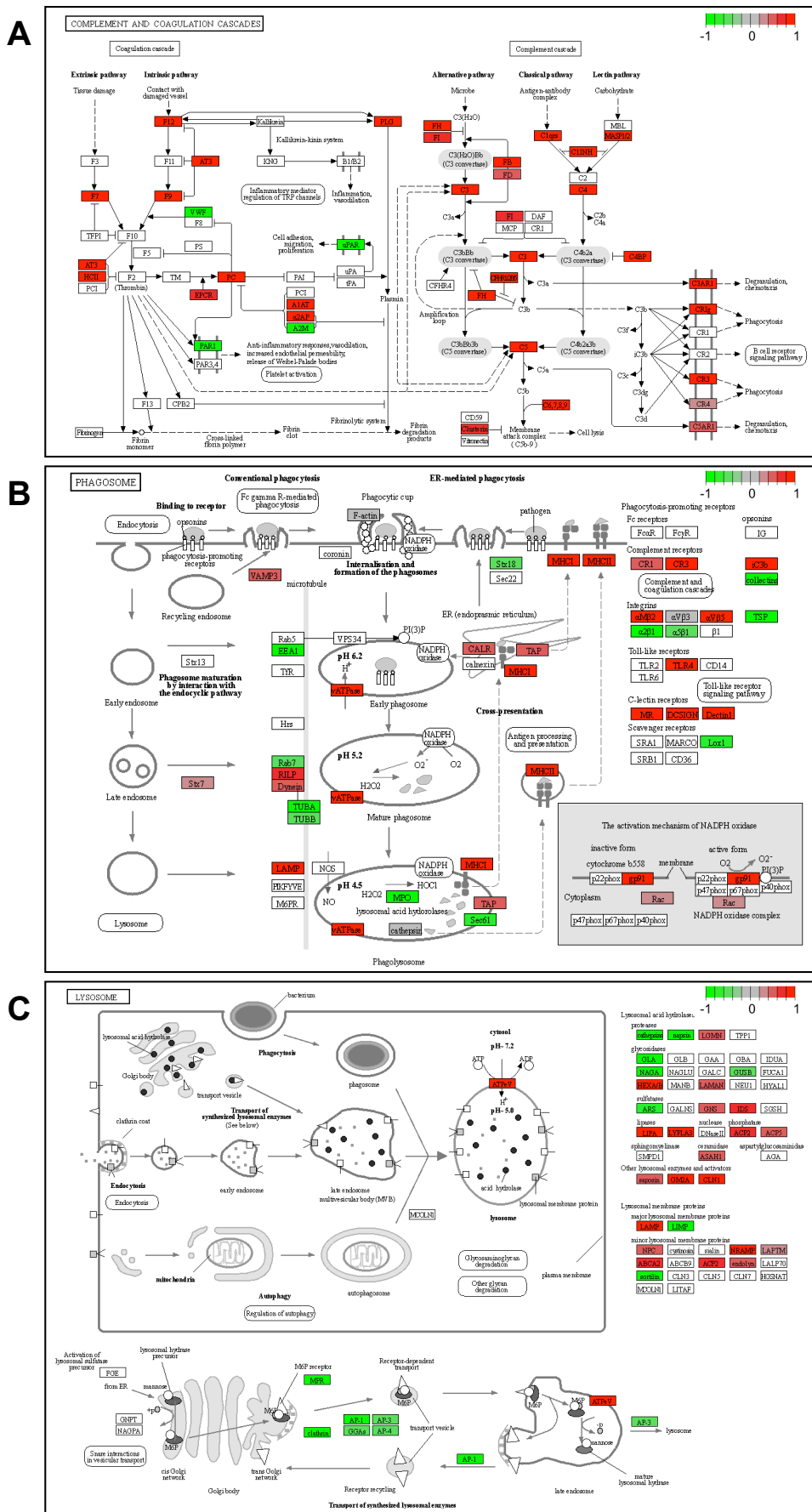


Figura 8. Diferenças na expressão entre KCs de neonatos e adultos de vias relacionadas ao processo de captura, internalização e eliminação de microrganismos. Vias diferencialmente expressas entre o grupo KCs de adultos em comparação com o grupo KCs de neonatos. (A) Via do complemento. (B) Via do fagossomo. (C) Via do lisossomo. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7. A capacidade metabólica hepática total é adquirida durante o período de desmame

Uma vez caracterizadas as populações imunes e a cronologia da maturação da resposta imune em neonatos, buscamos então investigar durante o desenvolvimento uma função fundamental do fígado: o metabolismo hepático. Para isso, desenvolvemos um painel contendo genes pertencentes a vias de transporte, catabolismo e metabolismo de carboidratos, lipídios e xenobióticos e analisamos sua expressão por qPCR (Figura 9A). Novamente, os genes foram alocados em categorias funcionais com base em sua ontogenia sugerida pelo KEGG. Nós encontramos quase todos os genes associados às vias metabólicas analisadas menos expressos nos dias 0 e 4 após o nascimento em comparação com adultos (Figura 9B). A expressão de genes envolvidos na síntese biliar, metabolismo de xenobióticos, metabolismo lipídico e alongamento, incluindo *Elovl3* (ácido graxo elongase 3), *Cyp8b1* (Citocromo P450 8b1) e *Fasn* (ácido graxo sintase) foi significativamente menor em comparação com adultos até uma a duas semanas após o nascimento. Isso sugere que a atividade metabólica dos ácidos graxos, a secreção biliar e a detoxificação – funções-chave desempenhadas pelo fígado na vida adulta – estão reduzidas nos períodos iniciais da vida. Vários genes relacionados ao metabolismo de carboidratos também estão menos expressos nos primeiros dias pós-nascimento, mas tiveram um padrão mais rápido de elevação aos níveis de adulto. Assim, esses achados revelam uma latência metabólica relativa em fígados de neonatos, mais evidenciada para as vias de metabolismo lipídico.

Outra função do fígado bem conhecida é a produção de transaminases, sendo o órgão capaz de produzir mais de 60 dessas enzimas. Duas de maior importância clínica são a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST), em que, em caso de elevação dos níveis séricos, são utilizadas como indicativo de lesão hepática, constituindo uma ferramenta padrão-ouro de diagnóstico para doenças hepáticas agudas. Tanto por qPCR (Figura 9E-F) quanto por ensaio de atividade (Figura 9C-D), os animais até a 2ª semana apresentaram níveis reduzidos de ALT e AST, sendo que somente após 3 semanas de vida, se encontraram similares ao adulto. A ausência de ALT no fígado foi confirmada utilizando uma linhagem de camundongos não-isogênica (camundongos Swiss) (Figura 9G). Além das

transaminases, o fígado é responsável pela produção de albumina e em neonatos de 0-4 dias, foram encontrados valores menores de expressão para essa proteína (Figura 9I). Em contraste, até a 3ª semana de vida, os níveis de mRNA para alfafetoproteína – um análogo fetal da albumina – estavam elevados, chegando a valores indetectáveis nos adultos (Figura 9J).

Ainda, visando expandir funcionalmente nossos estudos para além da expressão gênica enzimática, nós medimos diretamente a capacidade depurativa do fígado durante as diferentes fases do desenvolvimento. Para isso, utilizamos o teste de depuração do corante verde de indocianina (ICG), que se liga a proteínas plasmáticas, como a albumina, sendo eliminado exclusivamente pelos hepatócitos, juntamente com a bile, sem sofrer alteração. Os animais até a 2ª semana de vida possuem um atraso na função de *clearance* desse corante, uma vez que níveis mais elevados de ICG foram detectados no soro após o desafio (Figura 9H).

Em conjunto, o teste funcional, a atividade de aminotransferase e a expressão cronológica dos diferentes genes demonstraram que a capacidade metabólica total do fígado é atingida na 3ª semana após o nascimento. De maneira interessante, esse período se sobrepõe ao período de desmame, sugerindo que a introdução de uma nova dieta pode impactar na regulação do perfil metabólico e do desenvolvimento hepático em camundongos.

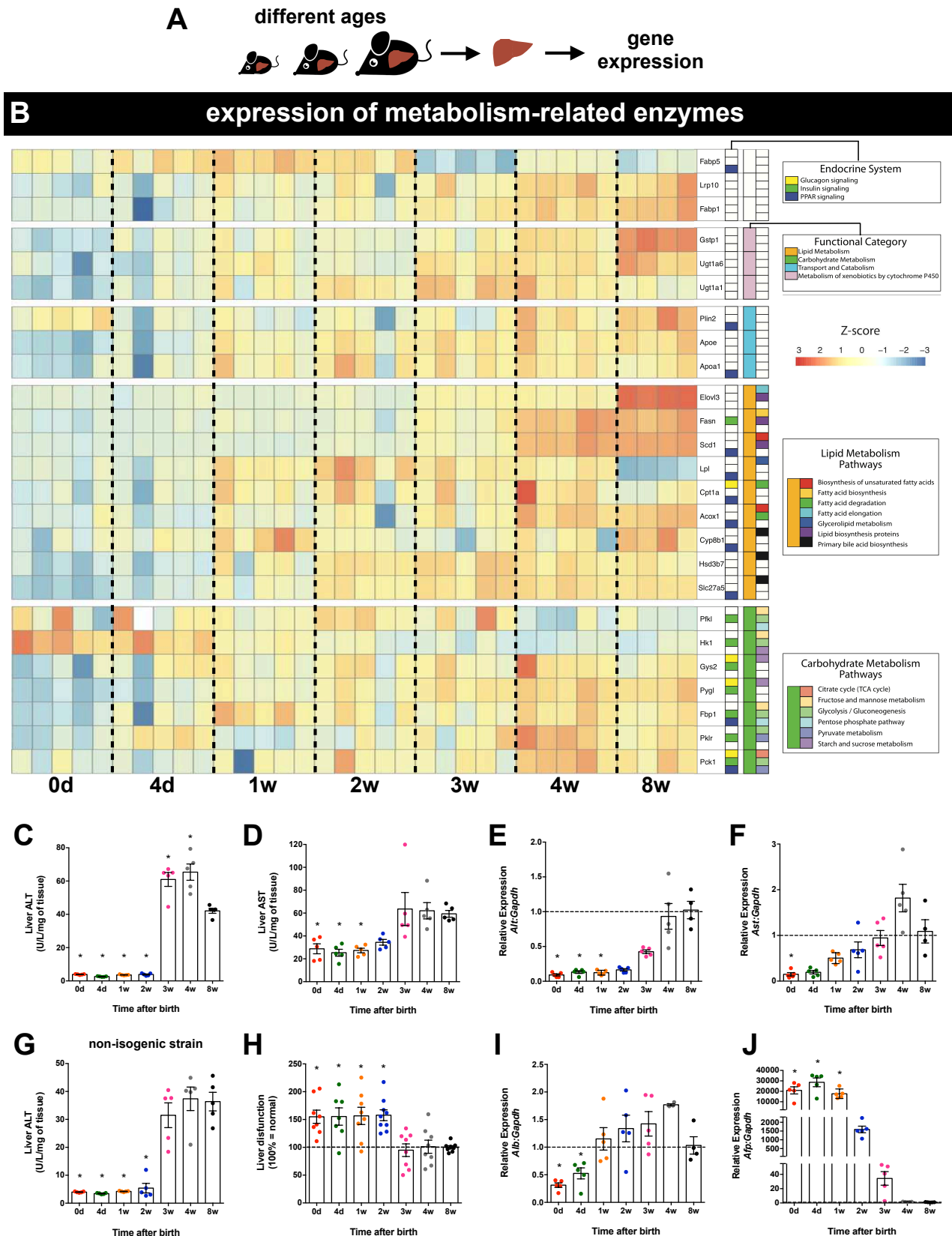


Figura 9. Metabolismo hepático quiescente em neonatos. (A) Estratégia experimental para análise das funções metabólicas. (B) Representação em *heatmap* dos genes pertencentes a diferentes vias metabólicas definidas por KEGG. (C) Atividade enzimática de ALT e (D) AST em amostras de fígado. (E) Análise da expressão gênica de ALT e (F) AST por qPCR. (G) Atividade enzimática de ALT em amostras de fígado de camundongos Swiss. (H) Função de depuração hepática medida pelo clearance de verde de indocianina, 10 minutos após injeção i.v. do corante. (I) Análise da expressão gênica de albumina e (J) AFP por qPCR. $n = 5/\text{grupo}$. * indica significância estatística em relação ao grupo 8 semanas ($p < 0,05$).

4.8. O período de transição alimentar é chave para o desenvolvimento hepático

Observando a composição celular e arquitetura hepáticas, bem como o perfil de expressão dos genes metabólicos e as análises funcionais, podemos perceber que a completa maturação metabólica e imune do fígado ocorre na 3ª semana de vida. Como essa fase coincide com o período de desmame dos animais, nos perguntamos se as alterações alimentares poderiam estar, de alguma forma, guiando o desenvolvimento hepático. Para tal, decidimos desmamar precocemente os animais com duas semanas de idade (uma semana antes do período normal), oferecendo, no lugar, uma dieta com mesmo conteúdo nutricional da utilizada para adultos (Figura 10A) e analisamos alguns parâmetros metabólicos e imunológicos. O desmame precoce promoveu um aumento da expressão dos genes metabólicos em comparação com o grupo controle em todos os tempos analisados (Figura 10B). Ou seja, animais com 3, 4 e 8 semanas que sofreram desmame precoce na 2ª semana apresentaram um maior nível de expressão de um mesmo gene em relação aos animais de 3, 4 e 8 semanas, que foram amamentados normalmente até a 3ª semana de vida.

Para entender se, além do metabolismo, o desmame precoce poderia influenciar na maturação imunológica, desafiamos camundongos de 4 semanas de idade submetidos aos diferentes protocolos de desmame com *E. coli*. Primeiro, percebemos que os animais desmamados precocemente perdem mais peso 24h pós-infecção (Figura 10C), assim como também apresentam contagens significativamente maiores de CFU no fígado (Figura 10D), apesar do número de bactérias não apresentar diferença no baço (Figura 10E). Curiosamente, utilizando a microscopia intravital confocal, encontramos que a captura de bactérias pelas KCs não foi prejudicada (Figura 10F). Assim, nos animais que sofreram desmame prematuro, as bactérias foram capturadas normalmente, mas não foram eliminadas do órgão, o que resulta em uma reduzida capacidade de lidar com infecções.

Esses resultados sugerem que a transição da amamentação para os alimentos sólidos no intervalo de tempo correto é importante para garantir a maturação hepática adequada.

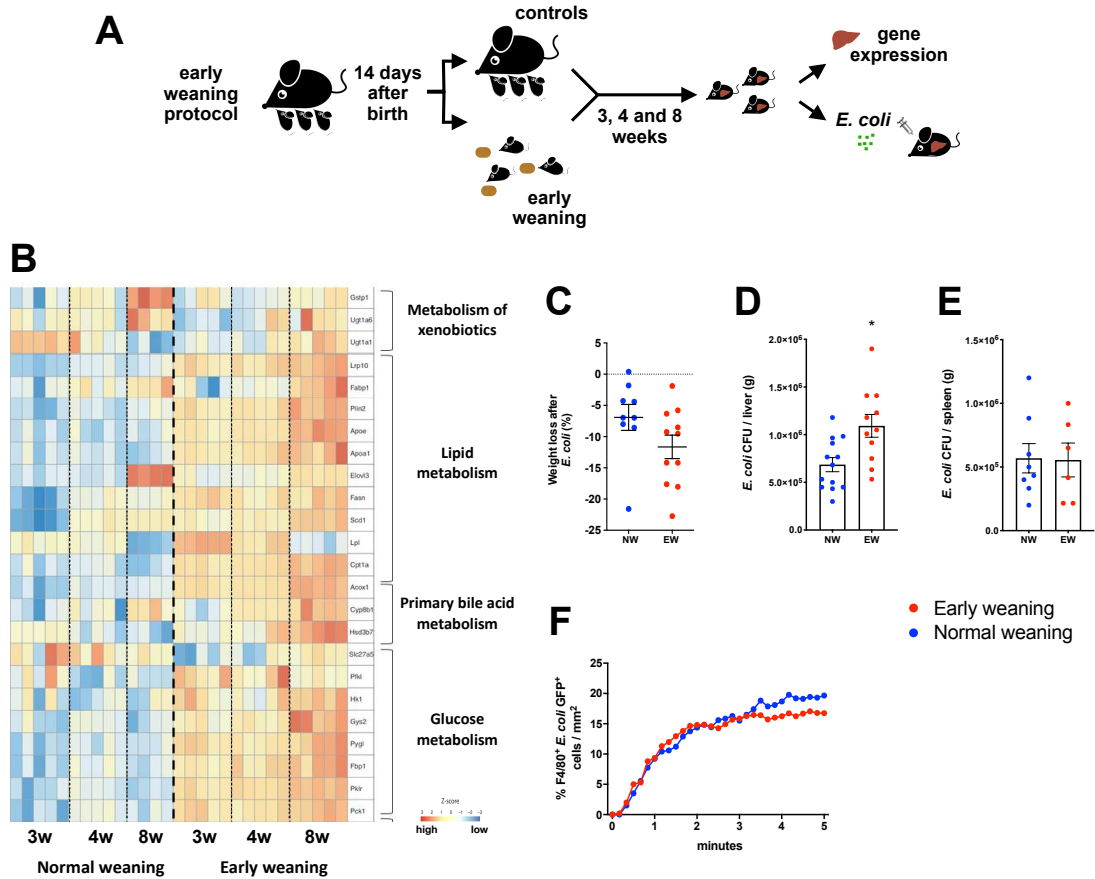


Figura 10. O desmame prematuro perturba a maturação hepática. (A) Estratégia experimental de desmame prematuro e análise das funções metabólicas e imunológicas. **(B)** Representação em *heatmap* dos genes pertencentes a diferentes vias metabólicas definidas por KEGG. **(C)** Perda de peso, **(D)** CFU do fígado e **(E)** CFU do baço 24 horas após desafio com *E. coli*. **(F)** Porcentagem de células F4/80⁺ infectadas com *E. Coli* observadas na microscopia intravital. $n \geq 5$ /grupo. * indica significância estatística em relação ao grupo desmame normal ($p < 0,05$).

4.9. O desmame prematuro altera a composição da microbiota intestinal

Até agora, observamos que o período de transição alimentar é importante para o desenvolvimento do fígado e que o desmame prematuro perturba alguns parâmetros hepáticos, como a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo e a eliminação de bactérias. Nesse período, a mudança na composição do alimento é uma das maiores contribuintes para o desenvolvimento da microbiota intestinal (Bokulich et al., 2016). Como o fígado está diretamente ligado ao trato gastrointestinal, recebendo, via porta, nutrientes, antígenos e produtos microbianos, é de se esperar que a colonização do intestino pela microbiota influencie na maturação hepática. Assim, hipotetizamos que o desmame prematuro causaria alterações na composição da microbiota intestinal, o que poderia resultar em perturbações na maturação hepática.

Para isso, buscamos caracterizar a composição da microbiota intestinal ao longo do desenvolvimento pós-natal, desde o primeiro dia de vida até a fase adulta, nos animais que passaram pelos diferentes protocolos de desmame. Comparando os animais no período pré-desmame (de 1 dia até 2 semanas de vida), em que a alimentação é baseada exclusivamente no leite materno, observamos diferenças na abundância de algumas famílias de bactérias (Figura 11). No primeiro dia após o nascimento, encontramos majoritariamente a família Pasteurellaceae (gênero *Rodentibacter*) (Figura 11B), seguida de Lactobacillaceae (Figura 11A) e Streptococcaceae (*Streptococcus*) (Figura 11C). Especialmente na 1ª semana, há presença de bactérias gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae (incluindo os gêneros *Escherichia*, *Shigella* e *Citrobacter*) (Figura 11C). Com 2 semanas de vida, além das famílias já citadas, outras passam a aparecer em maior frequência (Figura 12).

Já após a 2ª semana, como resultado da introdução de alimentos sólidos, percebemos alterações na composição da microbiota, com redução drástica de Lactobacillaceae (Figura 11A) e aumento de membros de outras famílias de bactérias (Figura 12). Como os animais a partir dessa idade foram submetidos a protocolos de desmame diferentes, sendo um grupo privado de forma brusca do leite materno e o outro passando pelo período de transição, avaliamos o efeito do tempo de desmame na composição da microbiota, comparando os diversos grupos de bactérias nas duas

condições de desmame nas diferentes idades. Do nascimento até a 3ª semana de vida, há um aumento crescente na diversidade microbiana, determinada pelo índice de diversidade de Shannon, e, após esse período, observamos uma estabilização (Figura 12A). Entretanto, para os animais submetidos ao desmame prematuro, ocorre uma maior flutuação na diversidade, que apresenta elevação na 3ª e 4ª semanas e redução na 6ª e 8ª.

Em relação ao desmame prematuro, o desmame normal apresentou, em todas as idades, uma maior abundância das famílias Bacteroidaceae (gênero *Bacteroides*) (Figura 12B) e Rikenellaceae (Figura 12C) e, exceto no adulto, uma maior abundância de Erysipelotrichaceae (Figura 12D). Já com 3 e 4 semanas, observamos, nos animais desmamados prematuramente, um aumento de Lachnospiraceae (Figura 12E) e, nos animais do desmame normal, um aumento de Akkermansiaceae (Figura 12F). Membros não classificados dentro da ordem Clostridiales foram encontrados em maior abundância no desmame normal (Figura 12G), enquanto membros não classificados dentro da ordem Bacteroidales estavam mais abundantes no desmame prematuro, chegando a compor aproximadamente 60% da microbiota (Figura 12F).

Esses resultados sugerem que, assim como perturbações na maturação adequada do fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal, o desmame prematuro causa alterações na composição da microbiota intestinal.

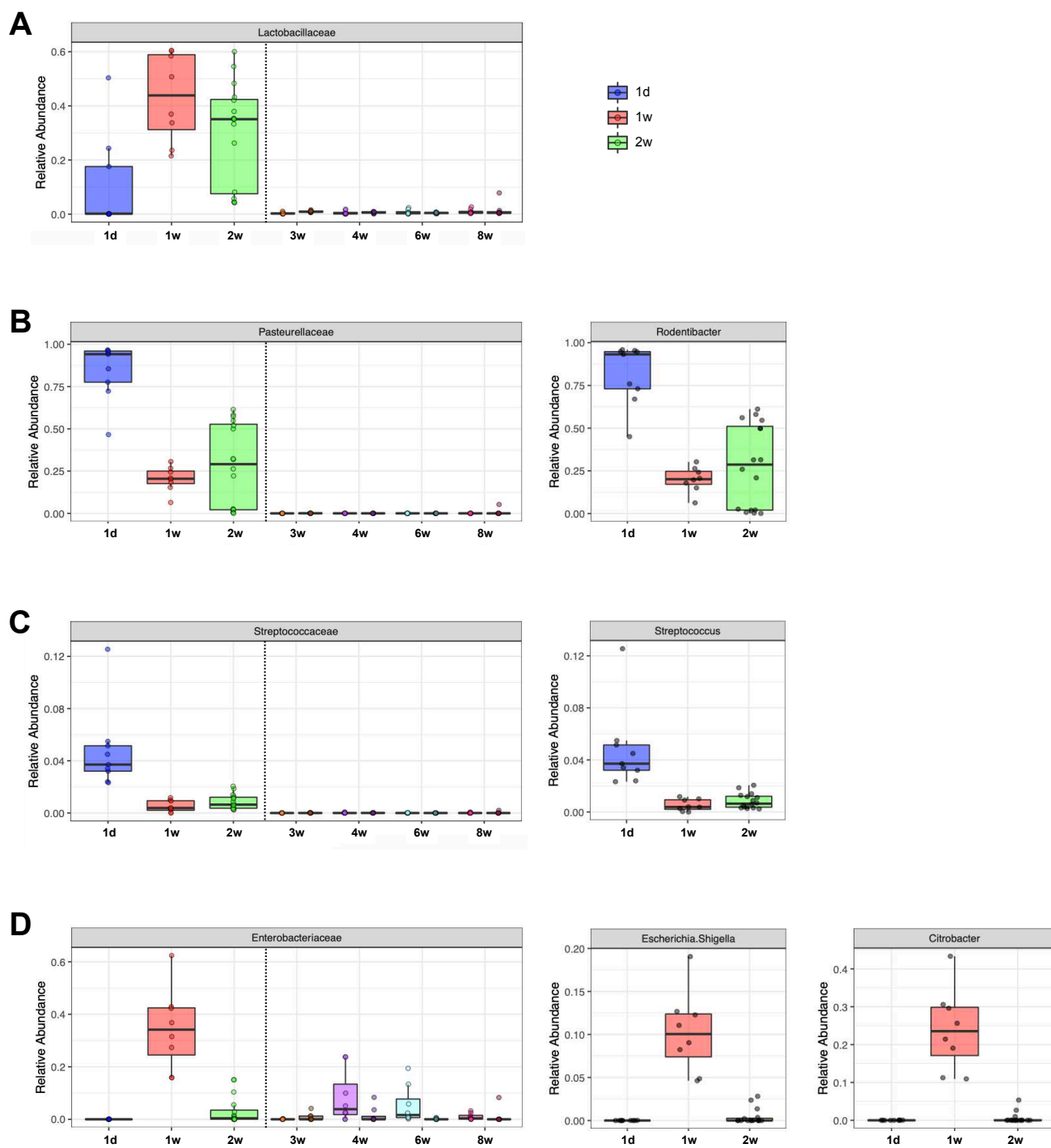


Figura 11. Principais grupos de bactérias encontradas nos animais no período pré-desmame. Comparação da abundância relativa das OTUs do primeiro dia pós-natal até a segunda semana de vida. **(A)** Lactobacillaceae. **(B)** Pasteurellaceae - *Rodentibacter*. **(C)** Streptococcaceae - *Streptococcus*. **(D)** Enterobacteriaceae - *Escherichia.Shigella* e *Citrobacter*. $n \geq 8$ /grupo. A abundância diferencial entre as 3 idades foi identificada utilizando Deseq2, com $p < 0,01$ (exceto para Lactobacillaceae).

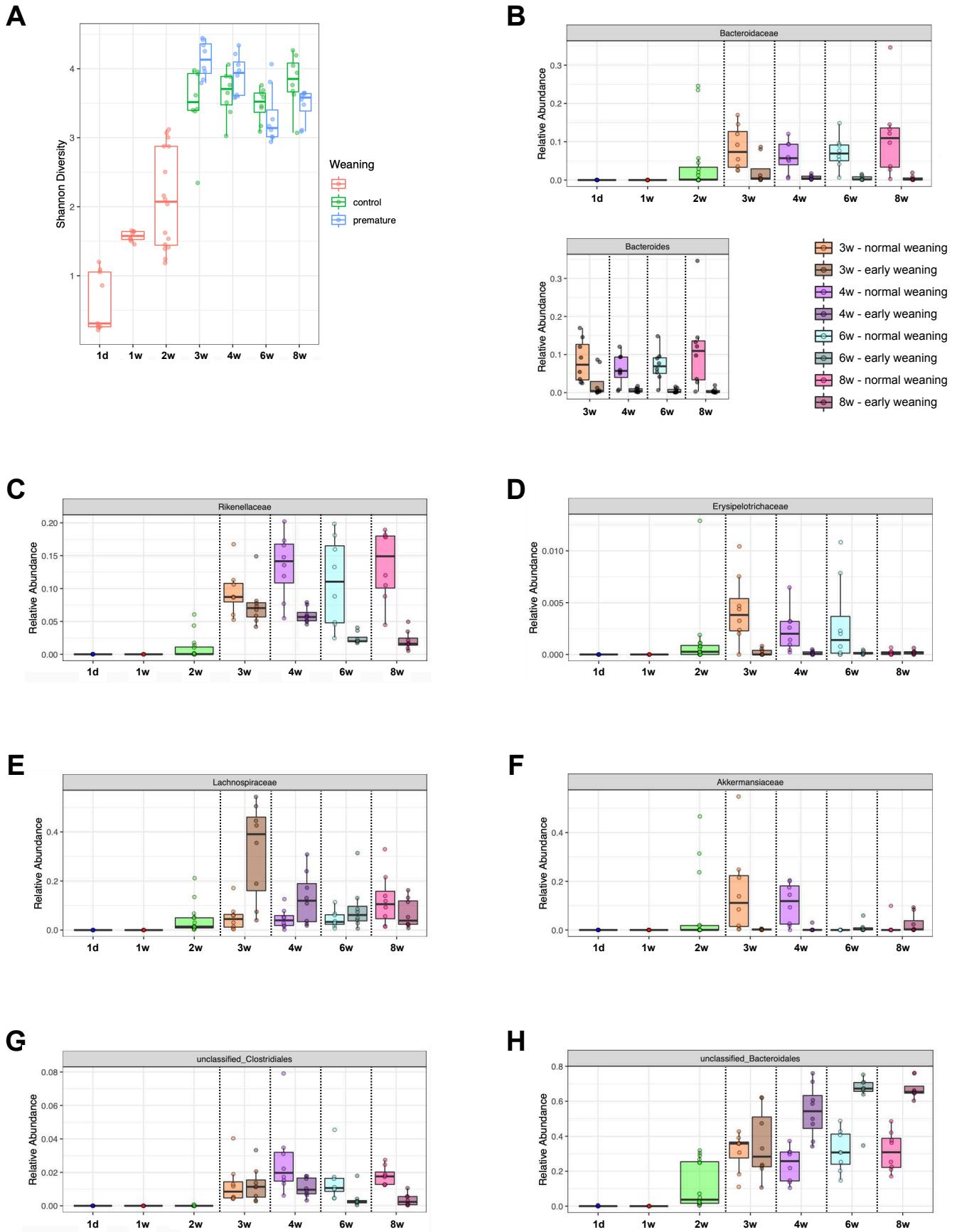


Figura 12. Principais grupos de bactérias que sofreram alterações com o desmame prematuro. (A) Diversidade de Shannon de todas as idades e condições de desmame. **(B-H)** Comparação da abundância relativa das OTUs entre os grupos desmame prematuro e desmame normal nas diferentes idades: **(B)** Bacteroidaceae - *Bacteroides*. **(C)** Rikenellaceae. **(D)** Erysipelotrichaceae. **(E)** Lachnospiraceae. **(F)** Akkermansiaceae. **(G)** Unclassified_Clostridiales. **(H)** Unclassified_Bacteroidales. $n = 8/\text{grupo}$. A abundância diferencial do efeito do desmame considerando todas as idades foi identificada utilizando Deseq2, com $p < 0,01$ (exceto para Akkermansiaceae, que apresentou diferença apenas na 3ª e 4ª semana).

4.10. O processo de colonização e estabelecimento da microbiota intestinal interfere com a tolerância hepática

Na primeira parte desse trabalho, caracterizamos tanto imune quanto metabolicamente todo o desenvolvimento hepático, desde o nascimento até a vida adulta, e, uma vez que importantes alterações foram encontradas na 3ª semana de vida, tentamos desvendar o papel do desmame no processo. Ainda, observamos que o desmame prematuro causou alterações na microbiota intestinal, que persistiram até a vida adulta. Como está se tornando cada vez mais evidente a importância da microbiota nas fases iniciais da vida para a maturação adequada dos órgãos (Ganal-Vonarburg et al., 2020), buscamos investigar se a presença desses microrganismos poderia guiar o desenvolvimento hepático pós-natal.

Já foi descrito para o intestino que no período de desmame (3 semanas), a microbiota intestinal induz uma reatividade imunológica forte e ampla, com expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$, o que previne patologias inflamatórias no adulto (Al Nabhani et al., 2019). Buscamos, então, avaliar se a expansão da microbiota que ocorre nesse período também estaria sendo percebida pelo fígado, induzindo uma reação imunológica. Encontramos que *Tnfa* se encontra aumentada na 1ª semana de vida, apresenta redução na 3ª semana e se mantém em níveis mais baixos no adulto (Figura 13A). Para *Ifng* observamos a mesma tendência, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística (Figura 13B). Como o ambiente hepático é sabidamente tolerogênico, também investigamos o perfil de expressão de citocinas anti-inflamatórias. Da mesma maneira, os níveis de expressão de *Il-10* e *Tgfb* estão elevados com 1 semana, caem com 3 semanas e continuam mais baixos no adulto (Figura 13C e D). Dessa forma, não encontramos uma reação ao desmame na 3ª semana como ocorre no intestino, mas observamos um balanço regulado entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias.

Na tentativa de entender o papel da microbiota no processo, avaliamos os níveis de expressão das mesmas citocinas em animais isentos de germes. *Tnfa*, *Ifng* e *Tgfb* apresentaram o mesmo perfil dos animais convencionais, apresentando maior expressão na 1ª semana de vida, redução com 3 semanas e manutenção de níveis mais baixos no adulto (Figura 13E, F e H). Já para *Il10*, a principal citocina envolvida

na tolerogênese hepática, observamos uma inversão, sendo encontrada em níveis menores com 1 semana, apresentando aumento na 3ª semana e depois uma tendência à redução no adulto. Comparando os animais convencionais com os *germ free* (Figura 13I-L), percebemos que os animais *germ free* apresentam, no início da vida, um desbalanço de expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias, o que poderia representar uma quebra de tolerância hepática.

Decidimos, então, avaliar como esses animais reagiriam frente a um desafio bacteriano, desafiando com *E. coli* os camundongos na 1ª e 8ª semana de vida (Figura 14A). O rastreamento digital do movimento das bactérias, obtido por microscopia intravital, revelou que os camundongos *germ free* de 1 semana capturam as bactérias circulantes mais rapidamente que os camundongos convencionais, de forma que as bactérias percorrem menores distâncias nos sinusoides hepáticos, sendo instantaneamente capturadas pelas KCs (Figura 14B, linha superior). Já nos animais adultos, a captura de *E. coli* pelas KCs ocorre de maneira semelhante nos animais com ou sem microbiota (Figura 14B, linha inferior).

Esses resultados indicam que os animais com 1 semana de vida apresentam um ambiente hepático menos tolerogênico na ausência de microbiota, o que poderia interferir com a reatividade do fígado a produtos microbianos com potencial inflamatório, que o órgão, em condições fisiológicas, deve tolerar. Mais parâmetros na sequência ao reconhecimento e captura das bactérias, como o recrutamento e ativação de outros tipos celulares e a produção de mediadores inflamatórios, devem ser avaliados, a fim de determinar o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento das respostas imunológicas frente à infecção.

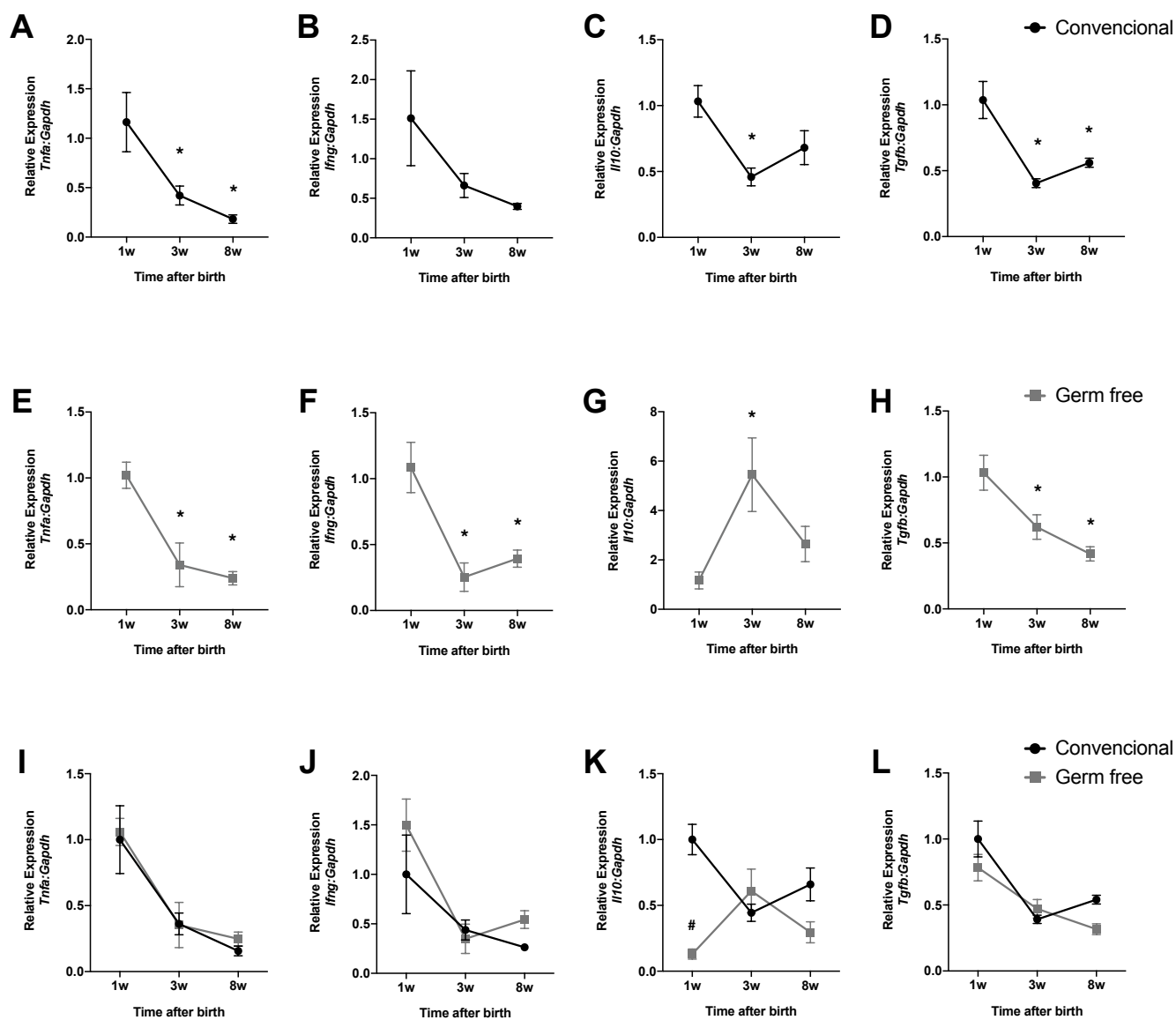


Figura 13. Desbalanço de citocinas pró- e anti-inflamatórias nos animais *germ free* na primeira semana de vida. (A-D) Perfil de expressão gênica dos animais convencionais: (A) *Tnfa*, (B) *Ifng*, (C) *Il10* e (D) *Tgfb* por qPCR. (E-H) Perfil de expressão gênica dos animais *germ free*: (E) *Tnfa*, (F) *Ifng*, (G) *Il10* e (H) *Tgfb* por qPCR. (I-L) Comparação do perfil de expressão dos animais convencionais e *germ free*: (I) *Tnfa*, (J) *Ifng*, (K) *Il10* e (L) *Tgfb*. n = 5/grupo. * indica significância estatística em relação ao grupo 1 semana ($p < 0,05$). # indica significância estatística em relação ao grupo convencional na mesma idade ($p < 0,05$).

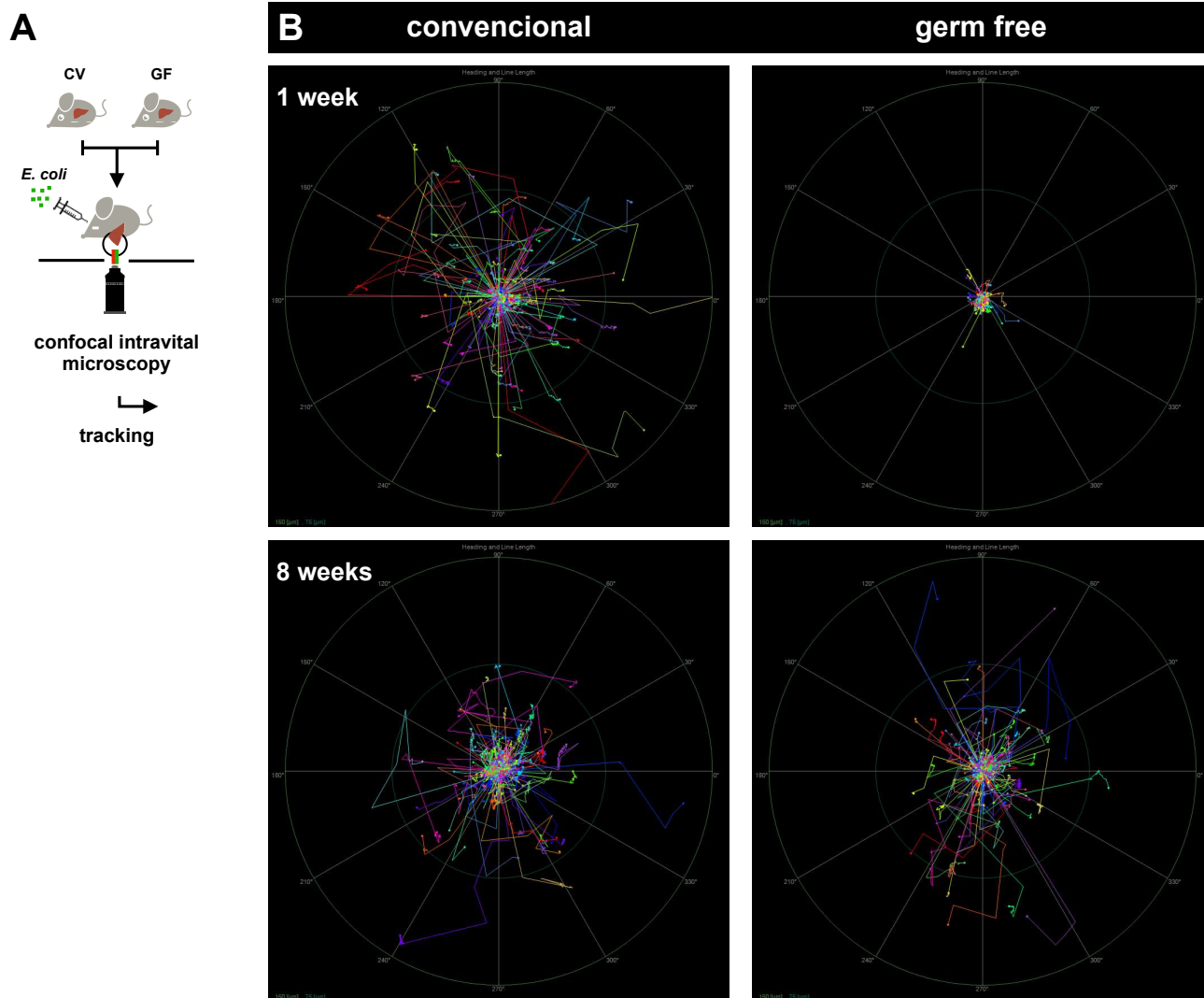


Figura 14. KCs de animais isentos de germes capturam *E.coli* mais rapidamente com uma semana de vida. (A) Estrategia experimental da microscopia intravital. (B) Tracking digital do movimento de *E. coli*. N = 4/grupo.

5. Discussão

O fígado desempenha inúmeras funções essenciais ao organismo adulto, sendo de extrema importância entender seu desenvolvimento e funções exercidas ao longo desse processo. O desenvolvimento hepático no período embrionário tem sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores. Entretanto, as particularidades do desenvolvimento do órgão nos períodos pós-nascimento, que permitem sua transição de um órgão fetal hematopoiético para metabólico e de vigilância imune no adulto, ainda não são bem caracterizadas. De fato, grandes mudanças são esperadas nesse período de transição para vida extrauterina (Hillman et al., 2012) e o fígado deve ser capaz de se adaptar aos desafios impostos, como mudanças na alimentação e colonização do trato gastrointestinal pela microbiota (Chen et al., 2018), o que reflete na entrada constante no órgão de antígenos microbianos, antígenos alimentares, moléculas complexas para processamento e compostos xenobióticos. Assim, buscamos, por meio deste trabalho, caracterizar o fígado de camundongos em diferentes idades pós-nascimento.

Utilizando uma combinação complexa e nova de abordagens experimentais, nós demonstramos que os fígados de recém-nascidos são muito diferentes dos fígados de adultos. Essas disparidades podem ser atribuídas à uma arquitetura morfológica única, tanto em camundongos quanto em humanos: enquanto o fígado dos adultos é completamente organizado em cordões de hepatócitos entremeados por longos capilares sinusoides, com a maior parte das células imunes no interior dos vasos, o órgão em neonatos não possui uma organização lobular clara, apresentando inúmeras ilhas de células imunes no parênquima, não sendo possível identificar com clareza os cordões de hepatócitos. As alterações na arquitetura hepática que ocorrem ao longo do desenvolvimento podem ser explicadas, em parte, por eventos vasculares que ocorrem ao nascimento: a degeneração dos elementos que participam da circulação fetal – devido a cessação da circulação placentária e do clampamento do cordão umbilical –, bem como o aumento da circulação portal – uma vez que o intestino inicia suas funções horas após o nascimento –, induzem mudanças significativas no parênquima hepático (Meyer and Lind, 1966).

Visando caracterizar as populações imunes observadas, realizamos uma imunofenotipagem em alta dimensão utilizando citometria de massa e descrevemos

de forma inédita a composição celular hepática no desenvolvimento pós-natal. Observamos que, além de uma completa transição no perfil celular de mieloide para linfoide, há uma sucessão cronológica entre a redução de precursores, células indefinidas e imaturas e o aumento de linfócitos e células maduras residentes (macrófagos e dendríticas) durante o desenvolvimento. Após nosso trabalho, outros confirmaram essas dinâmicas nas populações de células imunes e hematopoiéticas, utilizando análise do transcriptoma de célula única no fígado (Liang et al., 2022; Xu et al., 2022).

Apesar de alguns trabalhos sugerirem que as funções hematopoiéticas do fígado terminam nas fases tardias da gestação (Mikkola and Orkin, 2006), outros propõem que o órgão ainda retém a hematopoiese extra medular até 14 dias pós nascimento (Wolber et al., 2002). Nossas observações morfológicas e os dados de CyTOF corroboram a ideia de que o fígado ainda exibe atividade hematopoiética até a segunda semana de vida, uma vez que quantidades significativas de células progenitoras Lin⁻CD117⁺ foram encontradas. Posteriormente, foi descrito que essas células hematopoiéticas estão conectadas a três principais caminhos de desenvolvimento celular, podendo originar progenitores granulocíticos-monocíticos (GMPs), células da linhagem eritroide e células B (Liang et al., 2022; Xu et al., 2022). Ainda, exploramos concomitantemente a frequência de precursores hematopoiéticos na medula óssea e baço e encontramos uma redução de tais células ao nascimento. Assim, o fígado ainda retém potencial hematopoiético nos períodos iniciais da vida, podendo fornecer precursores enquanto outros órgãos linfoides não assumem completamente essa função.

Além de células precursoras, identificamos nos animais dia 0, populações de células B que exibiram uma baixa expressão de CD45 (CD45^{low}) e foram classificadas como células B imaturas, já que a expressão desse marcador aumenta durante a maturação de tal tipo celular (Kirberg and Brocker, 1996) – e uma delas expressa ainda, CD117, um marcador de células precursoras (Rumfelt et al., 2006). Considerando que a linfopoiese de células B ocorre primariamente no fígado fetal e ao final da gestação (dia embrionário 17.5) (Kawamoto et al., 2000), não é de espantar que essas células ainda estejam presentes ao nascimento. Mais uma vez, esses resultados foram posteriormente confirmados, sendo a linhagem de células B dividida

em vários estágios: células pró-B, pré-B pequenas, pré-B grandes e B maduras (Liang et al., 2022). Do contrário, progenitores da linhagem dos linfócitos T estão presentes no fígado mais no início da gestação, anteriores aos progenitores de células B, migrando para o timo aproximadamente no dia embrionário 13, onde completam seu desenvolvimento (Gale, 1987), o que pode explicar a relativa ausência de células T nas fases iniciais após o nascimento.

Ainda, no dia 0 e especialmente na primeira semana de vida, foram encontradas células que não conseguimos distinguir entre monócitos e macrófagos, o que pensamos se tratar de células em estágio de desenvolvimento. Para identificação correta dessas células, uma análise mais acurada deve ser realizada, utilizando outros marcadores apropriados para sua distinção (Krenkel and Tacke, 2017). De maneira interessante, já foi reportada a presença de um subtipo único de macrófago, que emerge transientemente por volta do dia pós-natal 7, com perfil de expressão que exhibe simultaneamente marcadores de macrófagos e células endoteliais (Liang et al., 2022; Xu et al., 2022). Foi proposto que essas células provavelmente derivaram de KCs e adquiriram marcadores de células endoteliais, passando a interagir com LSEC, HSC e células T reguladoras (Treg), promovendo seu recrutamento e atividade. Se as células indefinidas que identificamos em nosso CyTOF corresponderiam a esse tipo celular único ainda é uma questão em aberto, que necessita de marcadores vasculares para ser respondida.

Corroborando os dados de imunofenotipagem, nossas imagens *in situ* também revelaram o perfil mielóide hepático pós-nascimento, bem como a presença de precursores e células imaturas. A frequência elevada de granulócitos nos neonatos foi visualizada nos animais LysM-GFP, em que uma grande população de células arredondadas LysM^{hi} foi encontrada, provavelmente neutrófilos (Resnitzky et al., 1994). Como esse tipo celular, em condições fisiológicas, não é normalmente encontrado em número elevado no fígado adulto, hipotetizamos que essas células, presentes nos períodos iniciais da vida, corresponderiam a neutrófilos em estágio de desenvolvimento, remanescentes da atividade hematopoiética hepática. De fato, sabemos que não são células recrutadas ao nascimento, estando também presentes no fígado embrionário (dado não publicado). Confirmando essa ideia, foi identificado que, ao longo do desenvolvimento, as linhagens hepáticas de neutrófilos exibem três

estágios principais: neutrófilos imaturos (promielócitos), neutrófilos intermediários (mielócitos e metamielócitos) e neutrófilos maduros, sendo que os dois primeiros prevalecem nas idades mais novas pós-natal (Liang et al., 2022).

Para visualizar outras populações mieloides e confirmar os dados de imunofenotipagem, utilizamos camundongos CX3CR1^{gfp/wt}. Como descrito previamente, o receptor de quimiocinas CX3CR1 é altamente expresso por precursores comuns de macrófagos e DCs, incluindo monócitos (Auffray et al., 2009; Geissmann et al., 2003; Liu et al., 2019), bem como por uma população subcapsular de DCs (David et al., 2016). Ainda, com uso do anticorpo anti-F4/80, conseguimos visualizar as KCs. Cortes transversais no fígado revelaram diferenças na localização das células CX3CR1⁺, sendo que nos neonatos, elas se distribuem por todo o órgão e nos adultos, são encontradas apenas abaixo da cápsula e ao redor de grandes vasos, havendo assim, uma compartimentalização. Quando olhamos em maior aumento para as porções mais profundas do fígado encontramos, nos adultos, majoritariamente células F4/80⁺, com formato estrelado característico de KCs. Nas idades mais novas, entretanto, as células positivas apenas para F4/80 não são a maioria, sendo encontradas também células positivas apenas para CX3CR1, bem como células duplo positivas para esses marcadores, provavelmente precursores mieloides em diferenciação. De maneira interessante, um trabalho prévio do nosso grupo demonstrou que após depleção total da população de fagócitos residentes por lipossomos de clodronato, os precursores que repovoam o fígado são justamente células com marcação dupla para CX3CR1 e F4/80 (David et al., 2016). Assim, essas células, em neonatos, podem pertencer aos *clusters* de precursores ou de células que não conseguimos definir entre macrófagos e monócitos, que foram observados em nossa análise de CyTOF.

Sabendo do importante papel das KCs nas funções imunes hepáticas, especialmente na fagocitose de bactérias dentro dos sinusoides (Balmer et al., 2014), e visto que nossas análises de imunofenotipagem e de imagem apontaram uma possível imaturidade dessas células, buscamos avaliar sua capacidade de capturar bactérias em tempo real utilizando microscopia intravital. Encontramos que as KCs em neonatos apresentaram uma captura ineficiente de *E. coli* comparada às KCs de adultos, o que pode explicar porque recém-nascidos são mais susceptíveis à sepse,

particularmente devido a infecções por *E. coli* (Shane et al., 2017). De forma semelhante, o trabalho anterior do nosso grupo também encontrou uma reduzida captura de bactérias pelos precursores da medula (células CX3CR1⁺F4/80⁺) que dão origem a novas KCs em situações de repovoamento, após depleção dessas células induzida por lipossomos de clodronato (David et al., 2016). No nosso trabalho, além da captura, as KCs exibiram uma capacidade de eliminação de bactérias reduzida, já que contagens maiores de CFU foram encontradas nos neonatos 24 horas pós-desafio infeccioso.

Apesar da importância fundamental das KCs como filtro intravascular, os mecanismos que regulam a fagocitose e destruição de patógenos circulantes não são completamente descritos, uma vez que essas células capturam as bactérias no interior dos sinusoides hepáticos sob as intensas forças de tensão do fluxo sanguíneo. Além disso, dependendo da natureza do patógeno (bactérias gram-positivas ou negativas), diferentes mecanismos se encontram envolvidos no processo (Llorente and Schnabl, 2016). De toda forma, para que a fagocitose aconteça, o primeiro passo constitui o reconhecimento do patógeno pelas KCs por meio de receptores de membrana importantes. A primeira classe de receptores, classificados como opsônicos, reconhece bactérias opsonizadas tanto por complemento quanto por anticorpos (Gordon, 2016). Alguns estudos identificaram o papel do receptor de complemento CR1g na fagocitose de microrganismos cobertos por moléculas do complemento, bem como no reconhecimento de bactérias gram-positivas através da ligação direta ao ácido lipoteicoico da parede (Broadley et al., 2016; Helmy et al., 2006; Zeng et al., 2016). Outros estudos elucidaram o papel de anticorpos no processo, o que ressalta a importância de receptores que reconhecem a porção Fc nas KCs (Zeng et al., 2018). A outra classe de receptores, denominados não-opsônicos, reconhece domínios conservados dos microrganismos, sendo importantes para a captura de bactérias livres na circulação. Esses receptores de reconhecimento de padrões incluem receptores *scavenger* (Ono et al., 2006), receptores do tipo lectina-C (Dominguez-Soto et al., 2009) e receptores do tipo Toll, especialmente TLR-4, que reconhece o LPS das bactérias gram-negativas (Nakamoto and Kanai, 2014). Alguns desses não são receptores de entrada fagocítica, mas são importantes no reconhecimento dos patógenos, atuando sinergicamente com receptores que medeiam a fagocitose (Gordon, 2016; Llorente and Schnabl, 2016).

Uma vez que o patógeno é reconhecido, outras etapas se seguem para completar o processo de fagocitose. A fixação do patógeno à membrana plasmática através dos receptores é necessária, mas não suficiente para a internalização (Gordon, 2016; Swanson, 2008). Assim, após a ligação dos receptores aos ligantes, uma cascata de sinalização intracelular é induzida, ativando o rearranjo do citoesqueleto de actina e resultando na internalização do patógeno em um fagossomo nascente. Esse fagossomo passa por uma série de etapas de maturação para formar um compartimento cada vez mais acidificado, gerando um ambiente propício à degradação. Por fim, o fagossomo maduro se funde ao lisossomo, formando o fagolisossomo, que apresenta um ambiente extremamente ácido, oxidante e repleto de enzimas hidrolíticas em seu interior (Lee et al., 2020; Surewaard and Kubes, 2017).

No nosso trabalho, para tentar entender os mecanismos envolvidos na ineficiência da resposta de neonatos à infecção por *E. coli*, iniciamos um estudo comparativo entre o perfil de expressão gênica das KCs de neonatos e adultos. Nossa análise revelou que diferentes tipos de receptores envolvidos na detecção inicial de patógenos, pertencentes a ambas as classes citadas, se encontram menos expressos nas KCs de neonatos em comparação com às de adultos, o que pode resultar em um menor reconhecimento e captura de bactérias da circulação por essas células. Além disso, as KCs de neonatos também apresentaram menor expressão de genes importantes em todas as etapas seguintes do processo de fagocitose, desde a internalização até a maturação do fagossomo, fusão com o lisossomo e destruição do microrganismo. Assim, no período pós-natal, essas células se encontram imaturas no que diz respeito à capacidade de eliminação de patógenos.

Embasados na predominância de células imunes no fígado de neonatos, buscamos avaliar quais seriam as consequências metabólicas de tal aglomeração imunológica em um órgão classicamente considerado metabólico. Assim, realizamos uma caracterização da expressão gênica de proteínas hepáticas que atuam no processo metabólico do fígado ao longo do desenvolvimento. A dieta neonatal difere gradualmente da dieta fetal, sendo que a ingestão de leite e, posteriormente, de alimentos sólidos traz maior riqueza nutricional e força o neonato a assumir o controle das suas necessidades metabólicas (Sadava et al., 1992). A composição nutricional da dieta nos períodos pré-natal e neonatal é fundamental para o entendimento do

metabolismo: durante a fase fetal, os nutrientes são fornecidos exclusivamente pela placenta, sendo a glicose a principal fonte de energia (Herrera and Amusquivar, 2000); já após o nascimento, a gordura fornece cerca de 69% da energia disponível do leite, enquanto os carboidratos fornecem 8% e as proteínas, 23% (Angel and Back, 1985), assim, a gordura é o principal combustível metabólico durante essa fase (Pégrier and Girard, 1998). Com o nascimento, a interrupção do fornecimento de glicose pela mãe gera um ambiente hipoglicêmico e o recém-nascido pode adotar diferentes estratégias para superar o problema: aumento da produção de glicose através da gliconeogênese e glicogenólise e aumento da β -oxidação de lipídeos, gerando acetil-CoA para a síntese de corpos cetônicos como fonte de energia. Ainda, espera-se que os níveis de glicólise e lipogênese caiam durante o período de amamentação (Madvig and Abraham, 1980; Taylor et al., 1967; Ward Platt and Deshpande, 2005). Com o desmame natural por volta da terceira semana de vida, ocorre um aumento progressivo na proporção da energia fornecida pelos carboidratos, em detrimento da gordura – que reduz para menos de 30% da ingestão calórica (Palkovic et al., 1976) –, e espera-se que um padrão oposto seja encontrado.

Nossos dados revelaram, entretanto, que a maioria das enzimas analisadas estão menos expressa em neonatos, principalmente nos dias 0 e 4 após o nascimento, e, portanto, nem todas seguem o padrão esperado. Dessa forma, o fígado no período pós-natal pode estar se adaptando às novas condições de vida extrauterina, necessitando de mais tempo e estímulo para adquirir maturidade metabólica. Ainda, como o órgão ainda se encontra em formação e apresenta atividade hematopoiética nas fases iniciais após o nascimento, genes envolvidos no desenvolvimento, proliferação, ciclo e morte celulares, organização tecidual e morfologia podem estar em maior atividade durante esse período (Gunewardena et al., 2015). De fato, outros estudos reportaram que, apesar de algumas vias metabólicas atingirem um pico em neonatos, apresentando um decréscimo mais tarde, a maioria das vias segue uma tendência de crescimento (Gong et al., 2020; Liang et al., 2022).

Além do metabolismo, a função de depuração hepática também se mostrou menos eficiente em neonatos. Tais funções hepáticas atrasadas podem estar de acordo com a relativa redução na quantidade de hepatócitos encontrada nas idades

iniciais. Além disso, o atraso na eliminação de substâncias pode estar relacionado a um sistema de transporte hepático (transportadores de membrana) imaturo (Balistreri, 1983; Grijalva and Vakili, 2013). Como consequência, os efeitos terapêuticos de drogas podem ser prolongados ou anulados em neonatos, como resultado de uma eliminação ou biotransformação ineficientes, e que tratamentos ou drogas que interfiram no metabolismo hepático podem ter efeitos diferentes em recém-nascidos. Isso pode, em alguns casos, oferecer resistência aumentada, por exemplo, a predominância de sulfatação em relação a glicuronidação é protetora contra a toxicidade do acetaminofeno (Pineiro-Carrero and Pineiro, 2004).

Como observado que a maioria dos genes metabólicos apresenta uma elevação no padrão de expressão por volta da terceira semana de vida, o que corresponde ao período de desmame, buscamos entender o impacto do desmame no desenvolvimento tanto imune quanto metabólico do fígado. Assim, desmamamos prematuramente os animais, uma semana antes do período normal. A separação repentina e não natural da mãe significa uma mudança abrupta de um leite materno rico em gorduras para uma dieta padrão de laboratório rica em carboidratos. Encontramos que o desmame prematuro causa alterações a curto e longo prazo no metabolismo hepático, causando um aumento da expressão da maioria dos genes analisados, que se estendeu até a vida adulta. De fato, há muito já foi descrito que o desmame prematuro, em ratos, promove um aumento da atividade de enzimas hepáticas que participam da utilização de glicose (Vernon and Walker, 1968), bem como de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos (Palkovic et al., 1976). Dessa forma, um insulto nutricional nas fases iniciais da vida, quando o fígado ainda está em processo de maturação, resulta em adaptações metabólicas, que podem alterar a maneira com a qual o organismo responde a estímulos de dietas posteriormente (Angel and Back, 1985). Como o período de desmame está dentro de uma janela crítica de desenvolvimento, alterações nutricionais podem induzir mudanças permanentes no metabolismo – por exemplo, por meio de mecanismos epigenéticos –, o que pode levar a doenças ou desordens metabólicas no futuro (Souza et al., 2020). Entretanto, nesse trabalho, não descrevemos qual o fenótipo funcional desse aumento de expressão gênica nos animais.

Além disso, o desmame prematuro trouxe consequências imunológicas, com os animais desmamados precocemente apresentando uma reduzida capacidade de lidar com infecções, especialmente no fígado, onde contagens maiores de CFU foram encontradas. Apesar de bem estabelecido que a amamentação protege contra infecções (Duijts et al., 2010; Palmeira and Carneiro-Sampaio, 2016; Victora, 1996), o impacto do desmame prematuro na imunologia hepática, em um período em que o órgão está em transição para um órgão metabólico e de defesa imune, não está claro. O leite materno, além dos aspectos nutricionais, contém várias proteínas com atividade antimicrobiana, como imunoglobulinas (especialmente IgA e, em menor proporção, IgG), componentes do complemento, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, entre outras, que contribuem na defesa do recém-nascido contra infecções. Além disso, algumas proteínas e peptídeos possuem atividade imunomodulatória (citocinas), enquanto outras (fatores de crescimento) estão envolvidas no desenvolvimento apropriado dos órgãos, bem como na maturação adequada do sistema imune (Lonnerdal, 2003; Palmeira and Carneiro-Sampaio, 2016). Considerando todos esses benefícios do leite, fica claro que a interrupção prévia da amamentação pode acarretar em prejuízos imunológicos em diferentes órgãos, incluindo o fígado.

Ainda, as práticas alimentares no início da vida são uma das maiores contribuintes para o desenvolvimento da microbiota intestinal do neonato, sendo que grande parte dos microrganismos se originam durante o período de lactação, devido tanto aos efeitos prebióticos do leite materno quanto ao microbioma contido nele (Almeida et al., 2022; Cacho and Lawrence, 2017). O leite materno contém 10^2 - 10^4 bactérias viáveis por ml, podendo afetar diretamente o estabelecimento da microbiota neonatal – por exemplo, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, ambos encontrados até a segunda semana de vida em nosso trabalho, são transferidos através da amamentação (Fernandez et al., 2013). Durante o período de desmame, a introdução dos alimentos sólidos leva a uma nova fase no desenvolvimento da microbiota, caracterizada por um grande aumento em número e diversidade de bactérias, que passam a se assemelhar à composição encontrada no adulto (Al Nabhani et al., 2019). De fato, nossos dados de sequenciamento revelaram um salto na diversidade da microbiota nesse período da vida. Já foi descrito que essa microbiota em expansão induz, no intestino, uma reatividade imunológica vigorosa, nomeada “reação ao

desmame”, que deve ocorrer em uma janela de tempo específica e que é necessária para o desenvolvimento adequado do sistema imune nesse órgão. Inibição dessa reação causa um *imprinting* patológico e aumento da susceptibilidade à colite, inflamação alérgica e câncer, nos animais adultos (Al Nabhani et al., 2019; Al Nabhani and Eberl, 2020). Também foi demonstrado que existe um intervalo crítico nesse período de desmame em que os antígenos provenientes da microbiota intestinal são encontrados pelo sistema imune, induzindo tolerância às bactérias intestinais – modificações nesse período promovem uma falha na indução de tolerância e respostas robustas a essas bactérias em um cenário inflamatório (Knoop et al., 2017).

Sabendo da importância desse período de transição alimentar para a colonização do trato gastrointestinal por microrganismos, o efeito do desmame prematuro na composição da microbiota foi alvo de investigação pelo nosso grupo – um tema, em camundongos, muito pouco explorado na literatura. Em humanos, muitos estudos têm comparado as diferenças na microbiota intestinal entre bebês que consomem leite materno e fórmula (Backhed et al., 2015). Associar esses trabalhos com nossos dados é uma tarefa complicada, uma vez que o desmame prematuro, em humanos, passa, geralmente, por um período de alimentação que simula o leite, e, só depois, há introdução de alimentos sólidos. No nosso caso, além da janela de tempo para intervenção ser muito curta, há a substituição imediata de leite por uma dieta sólida, com composição nutricional completamente diferente. Assim, a disponibilidade de substratos muda drasticamente, o que promove uma adaptação da microbiota às novas fontes de energia disponíveis (Tremaroli and Backhed, 2012). Em um primeiro momento, o desmame prematuro aumentou a diversidade da microbiota, assim como acontece em bebês que consomem fórmula (Thompson et al., 2015), porém, nos adultos, encontramos uma diversidade reduzida. Mesmo com uma janela de tempo pequena, o adiantamento do desmame em uma semana já foi suficiente para causar modificações na microbiota que persistiram até a vida adulta. De fato, quantidades relativamente pequenas de suplementação com fórmula, apenas durante os primeiros dias de vida, em bebês que estão amamentando já induzem modificações na composição dos microrganismos intestinais (Forbes et al., 2018).

Essas perturbações da microbiota nos períodos iniciais da vida – causadas, por exemplo, por um desmame prematuro ou uso de antibióticos – levam a perturbações no desenvolvimento imunológico e metabólico do organismo e, como consequência, resultam, posteriormente, em desregulações das respostas imunes (Arrieta et al., 2014; Brodin, 2022; Gollwitzer and Marsland, 2015; Tamburini et al., 2016), bem como em distúrbios metabólicos (Cho et al., 2012; Cox et al., 2014). Em nosso trabalho, encontramos que o desmame prematuro causou alterações na expressão de enzimas metabólicas a curto e longo prazo, além de consequências imunológicas. Ainda, observamos mudanças na composição da microbiota desses animais, que se estenderam até os animais adultos. Não podemos, com esses dados, fazer uma correlação casual, sendo necessário mais estudos para tentar estabelecer melhor essas relações.

Entretanto, está cada vez mais clara a associação entre a microbiota intestinal e o metabolismo do hospedeiro. Metabólitos produzidos pelos microrganismos têm potencial de transitar e alcançar diferentes órgãos, atuando como moléculas sinalizadoras e substratos para reações metabólicas – no fígado, os SCFA acetato e propionato, por exemplo, são substratos para gliconeogênese e lipogênese (Krautkramer et al., 2021; Tremaroli and Backhed, 2012). Um estudo descreveu que bactérias do gênero *Bacteroides* – que, no nosso trabalho, apresentou grande redução nos animais desmamados prematuramente – sintetizam metabólitos do tipo esfingolipídios, que chegam até o fígado e influenciam o metabolismo de ácidos graxos, melhorando a esteatose hepática em animais submetidos à dieta rica em sacarose (Le et al., 2022). Outro estudo demonstrou que um componente do leite materno, a betaína, estaria modulando, em neonatos, a abundância de *Akkermansia*, o que resulta em uma melhora na saúde metabólica a longo prazo (Ribo et al., 2021). Em nosso trabalho, membros de Akkermansiacea foram encontrados em nossos grupos do desmame normal de 3 e 4 semanas. Nesse mesmo período, observamos, nos animais desmamados prematuramente, um aumento de Lachnospiraceae e, nos animais do desmame normal, um aumento de Erysipelotrichaceae. Já foi descrito que após tratamento com antibióticos no período pré-desmame, animais recolonizados por Lachnospiraceae apresentavam uma disfunção metabólica mais tarde na vida, o que não acontecia com animais recolonizados por Erysipelotrichaceae (Lynn et al., 2021). Se as alterações metabólicas que encontramos têm relação com as mudanças

na composição dos microrganismos intestinais e se isso acarretaria em distúrbios metabólicos ainda é algo a ser determinado.

Além de influenciar o metabolismo, a colonização pela microbiota é um dos principais eventos responsáveis pela modulação da imunidade do organismo nas fases iniciais da vida (Gensollen et al., 2016; Kelly et al., 2007; Spreckels and Zhernakova, 2021). Uma vez que o animal deixa o ambiente estéril uterino, o sistema imunológico não está totalmente maduro e, portanto, as células imunológicas são educadas de acordo com estímulos ambientais. Assim, os eventos que ocorrem durante essa “janela de oportunidade neonatal” podem fortemente influenciar a maturação imunológica e tecidual, com consequências duradouras (Gollwitzer et al., 2014; Olszak et al., 2012). Muito se tem explorado a influência da microbiota intestinal nos processos imunes do intestino (Round and Mazmanian, 2009), bem como na morfogênese e maturação pós-natal do trato gastrointestinal (Sommer and Backhed, 2013). Além disso, efeitos sistêmicos, em órgãos distantes, estão ganhando cada vez mais atenção (Grigg and Sonnenberg, 2017; Mazmanian et al., 2005; Thion et al., 2018).

Considerando a íntima comunicação entre o fígado e o intestino, fica cada vez mais evidente que a microbiota intestinal desempenha um papel importante na modulação das respostas imunes hepáticas (Adolph et al., 2018; Tripathi et al., 2018). Foi demonstrado que a microbiota influencia diretamente a captura e eliminação de *Staphylococcus aureus* da circulação pelas KCs em adultos (McDonald et al., 2020). O envolvimento da microbiota em inúmeras doenças hepáticas também foi bastante explorado (Hartmann et al., 2019; Sarin et al., 2019). Entretanto, poucos trabalhos elucidam seus efeitos durante o desenvolvimento hepático pós-natal. Para os linfócitos, foi descrito que a microbiota mantém a homeostase de uma população de células $T\gamma\delta$ residentes no fígado, sustentando sua ativação, sobrevivência e proliferação (Li et al., 2017). Outro estudo encontrou que bactérias comensais são responsáveis por uma polarização espacial das células imunes hepáticas, que ocorre no período do desmame e que, comparado a uma distribuição uniforme, é mais eficiente em proteger contra uma disseminação bacteriana sistêmica (Gola et al., 2021).

Buscamos, então, por meio do uso de animais isentos de germes, entender como a microbiota influencia alguns parâmetros imunológicos hepáticos. Não encontramos, nos animais convencionais, uma reação ao desmame como descrito para o intestino, mas sim um balanço bem regulado entre citocinas pró e anti-inflamatórias – com níveis mais elevados no início da vida e mais baixos no adulto. Os animais *germ free*, por outro lado, apresentaram um desbalanço na primeira semana após o nascimento, com níveis menores de IL-10, o que pode indicar uma quebra de tolerância. De fato, a microbiota é importante na modulação da tolerogênese, o que evita uma exacerbação das respostas imunológicas contra antígenos derivados tanto da alimentação quanto de microrganismos comensais (Kim et al., 2018). A exposição constante a níveis baixos de componentes bacterianos, como LPS presente em bactérias gram-negativas – que em nosso trabalho já foram encontradas com uma semana de vida –, induz a produção de moléculas regulatórias como IL-10 e TGF- β por diferentes tipos celulares, resultando em uma supressão das respostas imunes inatas e adaptativas (Thomson and Knolle, 2010). Esses animais *germ free* de uma semana de vida, quando desafiados com *E. coli*, apresentaram uma captura mais rápida das bactérias do que animais convencionais. Dessa forma, o microambiente hepático – mais ou menos tolerogênico – estaria influenciando o estado de ativação das KCs, interferindo inclusive com a capacidade fagocítica. Alguns trabalhos já mostraram o potencial da IL-10 em inibir respostas a diferentes microrganismos (Fleming et al., 1999; Lee et al., 2011; Redford et al., 2011). Mais estudos são necessários para entender a sequência da resposta imune nesses animais, que envolve, além da captura, a destruição das bactérias, a produção de citocinas em resposta à infecção e a ativação de outros tipos celulares. Ainda, seria interessante investigar se a quebra da tolerância hepática nessa fase acarretaria em um *imprinting* patológico, que poderia influenciar processos inflamatórios no futuro, uma vez que, exatamente durante esse período pós-nascimento, ocorre um acúmulo de células T regulatórias no fígado, o que é essencial para a tolerogênese e maturação do órgão (Li et al., 2020). Além disso, outros parâmetros imunológicos precisam ser analisados para entender o papel da microbiota no desenvolvimento imune hepático.

6. Conclusões

Em conclusão, nossos dados fornecem um novo panorama do desenvolvimento imunológico e metabólico hepático. O fígado em neonatos é um órgão diferente do encontrado em adultos, exercendo, inclusive, algumas funções distintas. Enquanto em adultos o fígado atua como um órgão metabólico e de vigilância imunológica, em neonatos, pode funcionar principalmente como um reservatório de células em diferentes estágios de desenvolvimento e pluripotência, sendo um órgão central para a maturação imune nos primeiros momentos da vida. É de extrema importância entender as etapas do desenvolvimento hepático pós-nascimento, uma vez que estratégias de estudo de função e terapias que visam lidar com respostas inflamatórias hepáticas podem ter implicações completamente diferentes em neonatos. Ainda, determinar os fatores que guiam ou influenciam tal desenvolvimento torna-se essencial, para entender o impacto que doenças e estratégias alimentares em neonatos têm a longo prazo nos sistemas imunológico e metabólico em adultos.

Referências bibliográficas

Adolph, T.E., Grander, C., Moschen, A.R., and Tilg, H. (2018). Liver-Microbiome Axis in Health and Disease. *Trends Immunol* 39, 712-723.

Al Nabhani, Z., Dulauroy, S., Marques, R., Cousu, C., Al Bounny, S., De Jardin, F., Sparwasser, T., Berard, M., Cerf-Bensussan, N., and Eberl, G. (2019). A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity* 50, 1276-1288 e1275.

Al Nabhani, Z., and Eberl, G. (2020). Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol* 13, 183-189.

Albillos, A., de Gottardi, A., and Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol* 72, 558-577.

Almeida, J.I., Tenreiro, M.F., Martinez-Santamaria, L., Guerrero-Aspizua, S., Gisbert, J.P., Alves, P.M., Serra, M., and Baptista, P.M. (2022). Hallmarks of the human intestinal microbiome on liver maturation and function. *J Hepatol* 76, 694-725.

Angel, J.F., and Back, D.W. (1985). Weaning and metabolic regulation in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 63, 538-545.

Aprill, A., McNally, S., Parsons, R., and Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 75, 129-137.

Arrieta, M.C., Stiemsma, L.T., Amenyogbe, N., Brown, E.M., and Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* 5, 427.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., *et al.* (2009). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.

Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., *et al.* (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17, 690-703.

Balistreri, W.F. (1983). Immaturity of hepatic excretory function and the ontogeny of bile acid metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2 *Suppl* 1, S207-214.

Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., *et al.* (2014). The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Science translational medicine* 6, 237ra266.

- Bamboot, Z.M., Stableford, J.A., Plitas, G., Burt, B.M., Nguyen, H.M., Welles, A.P., Gonen, M., Young, J.W., and DeMatteo, R.P. (2009). Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol* 182, 1901-1911.
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., and Williams, D.A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med* 32, 9-25.
- Ben-Moshe, S., and Itzkovitz, S. (2019). Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 395-410.
- Bilzer, M., Roggel, F., and Gerbes, A.L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26, 1175-1186.
- Blaser, M.J., Devkota, S., McCoy, K.D., Relman, D.A., Yassour, M., and Young, V.B. (2021). Lessons learned from the prenatal microbiome controversy. *Microbiome* 9, 8.
- Bokulich, N.A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., A, D.L., Wu, F., Perez-Perez, G.I., Chen, Y., *et al.* (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 8, 343ra382.
- Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C.L., Martens, L., Vanneste, B., De Prijck, S., Nedospasov, S.A., Kremer, A., *et al.* (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* 51, 638-654 e639.
- Broadley, S.P., Plaumann, A., Coletti, R., Lehmann, C., Wanisch, A., Seidlmeier, A., Esser, K., Luo, S., Ramer, P.C., Massberg, S., *et al.* (2016). Dual-Track Clearance of Circulating Bacteria Balances Rapid Restoration of Blood Sterility with Induction of Adaptive Immunity. *Cell host & microbe* 20, 36-48.
- Brodin, P. (2022). Immune-microbe interactions early in life: A determinant of health and disease long term. *Science* 376, 945-950.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., *et al.* (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278, 11312-11319.
- Cacho, N.T., and Lawrence, R.M. (2017). Innate Immunity and Breast Milk. *Front Immunol* 8, 584.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., and Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13, 581-583.

Chen, C., Soto-Gutierrez, A., Baptista, P.M., and Spee, B. (2018). Biotechnology Challenges to In Vitro Maturation of Hepatic Stem Cells. *Gastroenterology* 154, 1258-1272.

Chiang, J. (2014). *Liver Physiology: Metabolism and Detoxification*.

Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methe, B.A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., *et al.* (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 488, 621-626.

Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A.V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., *et al.* (2014). Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 158, 705-721.

Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27, 147-163.

David, B.A., Rezende, R.M., Antunes, M.M., Santos, M.M., Freitas Lopes, M.A., Diniz, A.B., Sousa Pereira, R.V., Marchesi, S.C., Alvarenga, D.M., Nakagaki, B.N., *et al.* (2016). Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology* 151, 1176-1191.

den Besten, G., Lange, K., Havinga, R., van Dijk, T.H., Gerding, A., van Eunen, K., Muller, M., Groen, A.K., Hooiveld, G.J., Bakker, B.M., and Reijngoud, D.J. (2013). Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G900-910.

Dobson, K.R., Reading, L., Haberey, M., Marine, X., and Scutt, A. (1999). Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femurae. *Calcif Tissue Int* 65, 411-413.

Dominguez-Soto, A., Aragonese-Fenoll, L., Gomez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Claria, J., Garcia-Monzon, C., Bustos, M., and Corbi, A.L. (2009). The pathogen receptor liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin is expressed in human Kupffer cells and regulated by PU.1. *Hepatology* 49, 287-296.

Dray, S., and Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* 22, 1 - 20.

Drost, H. (2018). *Philentropy: Information Theory and Distance Quantification with R*. *The Journal of Open Source Software* 3.

Duijts, L., Jaddoe, V.W., Hofman, A., and Moll, H.A. (2010). Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics* 126, e18-25.

Duncan, A.W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol* 24, 347-356.

Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., and Rodriguez, J.M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 69, 1-10.

Fleming, S.D., Leenen, P.J., Freed, J.H., and Campbell, P.A. (1999). Surface interleukin-10 inhibits listericidal activity by primary macrophages. *J Leukoc Biol* 66, 961-967.

Forbes, J.D., Azad, M.B., Vehling, L., Tun, H.M., Konya, T.B., Guttman, D.S., Field, C.J., Lefebvre, D., Sears, M.R., Becker, A.B., *et al.* (2018). Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. *JAMA Pediatr* 172, e181161.

Freitas-Lopes, M.A., Mafra, K., David, B.A., Carvalho-Gontijo, R., and Menezes, G.B. (2017). Differential Location and Distribution of Hepatic Immune Cells. *Cells* 6.

Gale, R.P. (1987). Development of the immune system in human fetal liver. *Thymus* 10, 45-56.

Ganal-Vonarburg, S.C., Hornef, M.W., and Macpherson, A.J. (2020). Microbial-host molecular exchange and its functional consequences in early mammalian life. *Science* 368, 604-607.

Geissmann, F., Cameron, T.O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M.J., Dustin, M.L., and Littman, D.R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 3, e113.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.

Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., and Blumberg, R.S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 352, 539-544.

Giancotti, A., Monti, M., Nevi, L., Safarikia, S., D'Ambrosio, V., Brunelli, R., Pajno, C., Corno, S., Di Donato, V., Musella, A., *et al.* (2019). Functions and the Emerging Role of the Foetal Liver into Regenerative Medicine. *Cells* 8.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439-449.

Giuffre, M., Campigotto, M., Campisciano, G., Comar, M., and Croce, L.S. (2020). A story of liver and gut microbes: how does the intestinal flora affect liver disease? A review of the literature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 318, G889-G906.

Gladstone, I.M., Ehrenkranz, R.A., Edberg, S.C., and Baltimore, R.S. (1990). A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J* 9, 819-825.

Gola, A., Dorrington, M.G., Speranza, E., Sala, C., Shih, R.M., Radtke, A.J., Wong, H.S., Baptista, A.P., Hernandez, J.M., Castellani, G., *et al.* (2021). Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence. *Nature* 589, 131-136.

Gollwitzer, E.S., and Marsland, B.J. (2015). Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease. *Trends Immunol* 36, 684-696.

Gollwitzer, E.S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K.D., Nicod, L.P., Lloyd, C.M., and Marsland, B.J. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* 20, 642-647.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551.

Gong, T., Zhang, C., Ni, X., Li, X., Li, J., Liu, M., Zhan, D., Xia, X., Song, L., Zhou, Q., *et al.* (2020). A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse liver. *Genome Res* 30, 263-275.

Gordillo, M., Evans, T., and Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development* 142, 2094-2108.

Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463-475.

Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., and Wing, E.J. (1996). Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J Immunol* 157, 2514-2520.

Grigg, J.B., and Sonnenberg, G.F. (2017). Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases. *J Immunol* 198, 564-571.

Grijalva, J., and Vakili, K. (2013). Neonatal liver physiology. *Semin Pediatr Surg* 22, 185-189.

Gunewardena, S.S., Yoo, B., Peng, L., Lu, H., Zhong, X., Klaassen, C.D., and Cui, J.Y. (2015). Deciphering the Developmental Dynamics of the Mouse Liver Transcriptome. *PLoS One* 10, e0141220.

Halpern, K.B., Shenhav, R., Matcovitch-Natan, O., Toth, B., Lemze, D., Golan, M., Massasa, E.E., Baydatch, S., Landen, S., Moor, A.E., *et al.* (2017). Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature* 542, 352-356.

Hartmann, P., Chu, H., Duan, Y., and Schnabl, B. (2019). Gut microbiota in liver disease: too much is harmful, nothing at all is not helpful either. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 316, G563-G573.

Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Jr., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M. (2006). CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124, 915-927.

Herrera, E., and Amusquivar, E. (2000). Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 202-210.

Heymann, F., and Tacke, F. (2016). Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 88-110.

Hillman, N.H., Kallapur, S.G., and Jobe, A.H. (2012). Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clin Perinatol* 39, 769-783.

Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Frontiers in immunology* 6, 486.

Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nature immunology* 14, 996-1006.

Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30.

Kawamoto, H., Ikawa, T., Ohmura, K., Fujimoto, S., and Katsura, Y. (2000). T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity* 12, 441-450.

Kelly, D., King, T., and Aminov, R. (2007). Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res* 622, 58-69.

Kiernan, F. (1834). *Anatomy and Physiology of the Liver*. *Med Chir Rev* 20, 305-315.

Kim, M., Galan, C., Hill, A.A., Wu, W.J., Fehlner-Peach, H., Song, H.W., Schady, D., Bettini, M.L., Simpson, K.W., Longman, R.S., *et al.* (2018). Critical Role for the Microbiota in CX3CR1(+) Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. *Immunity* 49, 151-163 e155.

Kirberg, J., and Brocker, T. (1996). CD45 up-regulation during lymphocyte maturation. *Int Immunol* 8, 1743-1749.

Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 22, 226-229.

Knolle, P.A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Loser, E., Schmitt, E., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1998). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol* 114, 427-433.

Knoop, K.A., Gustafsson, J.K., McDonald, K.G., Kulkarni, D.H., Coughlin, P.E., McCrate, S., Kim, D., Hsieh, C.S., Hogan, S.P., Elson, C.O., *et al.* (2017). Microbial antigen encounter during a preweaning interval is critical for tolerance to gut bacteria. *Sci Immunol* 2.

Krautkramer, K.A., Fan, J., and Backhed, F. (2021). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat Rev Microbiol* 19, 77-94.

Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 17, 306-321.

Kubes, P., and Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol* 36, 247-277.

Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T., and Ogawa, M. (1997). A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 185, 777-784.

Lau, A.H., de Creus, A., Lu, L., and Thomson, A.W. (2003). Liver tolerance mediated by antigen presenting cells: fact or fiction? *Gut* 52, 1075-1078.

Le, H.H., Lee, M.T., Besler, K.R., and Johnson, E.L. (2022). Host hepatic metabolism is modulated by gut microbiota-derived sphingolipids. *Cell Host Microbe*.

Lee, H.J., Woo, Y., Hahn, T.W., Jung, Y.M., and Jung, Y.J. (2020). Formation and Maturation of the Phagosome: A Key Mechanism in Innate Immunity against Intracellular Bacterial Infection. *Microorganisms* 8.

Lee, K.S., Jeong, E.S., Heo, S.H., Seo, J.H., Jeong, D.G., and Choi, Y.K. (2011). IL-10 suppresses bactericidal response of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *J Microbiol* 49, 1050-1053.

Li, F., Hao, X., Chen, Y., Bai, L., Gao, X., Lian, Z., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2017). The microbiota maintain homeostasis of liver-resident gammadeltaT-17 cells in a lipid antigen/CD1d-dependent manner. *Nat Commun* 7, 13839.

Li, M., Zhao, W., Wang, Y., Jin, L., Jin, G., Sun, X., Wang, W., Wang, K., Xu, X., Hao, J., *et al.* (2020). A wave of Foxp3(+) regulatory T cell accumulation in the neonatal liver plays unique roles in maintaining self-tolerance. *Cell Mol Immunol* 17, 507-518.

Li, T., Huang, J., Jiang, Y., Zeng, Y., He, F., Zhang, M.Q., Han, Z., and Zhang, X. (2009). Multi-stage analysis of gene expression and transcription regulation in C57/B6 mouse liver development. *Genomics* 93, 235-242.

Liang, Y., Kaneko, K., Xin, B., Lee, J., Sun, X., Zhang, K., and Feng, G.S. (2022). Temporal analyses of postnatal liver development and maturation by single-cell transcriptomics. *Dev Cell* 57, 398-414 e395.

Liu, Z., Gu, Y., Chakarov, S., Bleriot, C., Kwok, I., Chen, X., Shin, A., Huang, W., Dress, R.J., Dutertre, C.A., *et al.* (2019). Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. *Cell* 178, 1509-1525 e1519.

Llorente, C., and Schnabl, B. (2016). Fast-Track Clearance of Bacteria from the Liver. *Cell Host Microbe* 20, 1-2.

Lonnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 77, 1537S-1543S.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

Lynn, M.A., Eden, G., Ryan, F.J., Bensalem, J., Wang, X., Blake, S.J., Choo, J.M., Chern, Y.T., Sribnaia, A., James, J., *et al.* (2021). The composition of the gut microbiota following early-life antibiotic exposure affects host health and longevity in later life. *Cell Rep* 36, 109564.

Madvig, P., and Abraham, S. (1980). Relationship of malic enzyme activity to fatty acid synthesis and the pathways of glucose catabolism in developing rat liver. *J Nutr* 110, 90-99.

Mafra, K., Nakagaki, B.N., Castro Oliveira, H.M., Rezende, R.M., Antunes, M.M., and Menezes, G.B. (2019). The liver as a nursery for leukocytes. *J Leukoc Biol* 106, 687-693.

Marques, P.E., Amaral, S.S., Pires, D.A., Nogueira, L.L., Soriani, F.M., Lima, B.H., Lopes, G.A., Russo, R.C., Avila, T.V., Melgaco, J.G., *et al.* (2012). Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* 56, 1971-1982.

Marques, P.E., Antunes, M.M., David, B.A., Pereira, R.V., Teixeira, M.M., and Menezes, G.B. (2015). Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nat Protoc* 10, 258-268.

Maslak, E., Gregorius, A., and Chlopicki, S. (2015). Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver. *Pharmacol Rep* 67, 689-694.

Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., and Zaret, K.S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294, 559-563.

Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107-118.

McDonald, B., and Kubes, P. (2016). Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. *Gastroenterology* 151, 1087-1095.

McDonald, B., Zucoloto, A.Z., Yu, I.L., Burkhard, R., Brown, K., Geuking, M.B., and McCoy, K.D. (2020). Programming of an Intravascular Immune Firewall by the Gut Microbiota Protects against Pathogen Dissemination during Infection. *Cell Host Microbe*.

McLin, V.A., and Zorn, A.M. (2006). Molecular control of liver development. *Clin Liver Dis* 10, 1-25, v.

Meyer, W.W., and Lind, J. (1966). Postnatal changes in the portal circulation. *Arch Dis Child* 41, 606-612.

Mikkola, H.K., and Orkin, S.H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133, 3733-3744.

Morton, S.U., and Brodsky, D. (2016). Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clin Perinatol* 43, 395-407.

Nakamoto, N., and Kanai, T. (2014). Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Front Immunol* 5, 221.

Oda, M., Yokomori, H., and Han, J.Y. (2006). Regulatory mechanisms of hepatic microcirculatory hemodynamics: hepatic arterial system. *Clin Hemorheol Microcirc* 34, 11-26.

Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., and Blumberg, R.S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489-493.

Ono, K., Nishitani, C., Mitsuzawa, H., Shimizu, T., Sano, H., Suzuki, H., Kodama, T., Fujii, N., Fukase, K., Hirata, K., and Kuroki, Y. (2006). Mannose-binding lectin augments the uptake of lipid A, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* by Kupffer cells through increased cell surface expression of scavenger receptor A. *J Immunol* 177, 5517-5523.

Palkovic, M., Macho, L., Skottova, N., and Hostacka, A. (1976). Influence of early weaning on the activity of several enzymes in the liver of rat. *Biol Neonate* 29, 41-47.

Palmeira, P., and Carneiro-Sampaio, M. (2016). Immunology of breast milk. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 62, 584-593.

Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* 18, 1403-1414.

Pégorier, J.-P., and Girard, J. (1998). Liver Metabolism in the Fetus and Neonate. In *Principles of Perinatal—Neonatal Metabolism*, R.M. Cowett, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 601-626.

Perry, R.J., Borders, C.B., Cline, G.W., Zhang, X.M., Alves, T.C., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Kibbey, R.G., and Shulman, G.I. (2016). Propionate Increases Hepatic Pyruvate Cycling and Anaplerosis and Alters Mitochondrial Metabolism. *J Biol Chem* 291, 12161-12170.

Pillarisetty, V.G., Shah, A.B., Miller, G., Bleier, J.I., and DeMatteo, R.P. (2004). Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. *J Immunol* 172, 1009-1017.

Pineiro-Carrero, V.M., and Pineiro, E.O. (2004). Liver. *Pediatrics* 113, 1097-1106.

Pires, D.E.V., Oliveira, F.S., Correa, F.B., Morais, D.K., and Fernandes, G.R. (2018). TAG.ME: Taxonomic Assignment of Genetic Markers for Ecology. *bioRxiv*, 263293.

Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., and Rautou, P.E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol* 66, 212-227.

- Prickett, T.C., McKenzie, J.L., and Hart, D.N. (1988). Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 46, 754-761.
- Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-62.
- Redford, P.S., Murray, P.J., and O'Garra, A. (2011). The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol* 4, 261-270.
- Reis, E.S., Mastellos, D.C., Hajishengallis, G., and Lambris, J.D. (2019). New insights into the immune functions of complement. *Nat Rev Immunol* 19, 503-516.
- Resnitzky, P., Shaft, D., Yaari, A., and Nir, E. (1994). Distinct intracellular lysozyme content in normal granulocytes and monocytes: a quantitative immunoperoxidase and ultrastructural immunogold study. *J Histochem Cytochem* 42, 1471-1477.
- Ribo, S., Sanchez-Infantes, D., Martinez-Guino, L., Garcia-Mantrana, I., Ramon-Krauel, M., Tondo, M., Arning, E., Nofrarias, M., Osorio-Conles, O., Fernandez-Perez, A., *et al.* (2021). Increasing breast milk betaine modulates *Akkermansia* abundance in mammalian neonates and improves long-term metabolic health. *Sci Transl Med* 13.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313-323.
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 4, 177-197.
- Rumfelt, L.L., Zhou, Y., Rowley, B.M., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2006). Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med* 203, 675-687.
- Sadava, D., Frykman, P., Harris, E., Majerus, D., Mustard, J., and Bernard, B. (1992). Development of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in human fetal liver. *Biol Neonate* 62, 89-95.
- Sarin, S.K., Pande, A., and Schnabl, B. (2019). Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease. *J Hepatol* 70, 260-272.
- Sato, T., Yamamoto, H., Sasaki, C., and Wake, K. (1998). Maturation of rat dendritic cells during intrahepatic translocation evaluated using monoclonal antibodies and electron microscopy. *Cell Tissue Res* 294, 503-514.
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., *et al.* (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 7, 10321.

- Shane, A.L., Sanchez, P.J., and Stoll, B.J. (2017). Neonatal sepsis. *Lancet* 390, 1770-1780.
- Sheth, K., and Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. *Curr Opin Crit Care* 7, 99-104.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 18, 175-189.
- Sierro, F., Evrard, M., Rizzetto, S., Melino, M., Mitchell, A.J., Florido, M., Beattie, L., Walters, S.B., Tay, S.S., Lu, B., *et al.* (2017). A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity* 47, 374-388 e376.
- Sommer, F., and Backhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11, 227-238.
- Souza, L.L., de Moura, E.G., and Lisboa, P.C. (2020). Does early weaning shape future endocrine and metabolic disorders? Lessons from animal models. *J Dev Orig Health Dis* 11, 441-451.
- Spreckels, J.E., and Zhernakova, A. (2021). Milk and bugs educate infant immune systems. *Immunity* 54, 1633-1635.
- Strazzabosco, M., and Fabris, L. (2008). Functional anatomy of normal bile ducts. *Anat Rec (Hoboken)* 291, 653-660.
- Surewaard, B.G.J., and Kubes, P. (2017). Measurement of bacterial capture and phagosome maturation of Kupffer cells by intravital microscopy. *Methods* 128, 12-19.
- Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 639-649.
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H.C., and Clemente, J.C. (2016). The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med* 22, 713-722.
- Taylor, C.B., Bailey, E., and Bartley, W. (1967). Changes in hepatic lipogenesis during development of the rat. *Biochem J* 105, 717-722.
- Thion, M.S., Low, D., Silvin, A., Chen, J., Grisel, P., Schulte-Schrepping, J., Blecher, R., Ulas, T., Squarzone, P., Hoeffel, G., *et al.* (2018). Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* 172, 500-516 e516.
- Thompson, A.L., Monteagudo-Mera, A., Cadenas, M.B., Lampl, M.L., and Azcarate-Peril, M.A. (2015). Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and

metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 3.

Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 10, 753-766.

Torow, N., and Hornef, M.W. (2017). The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. *J Immunol* 198, 557-563.

Tremaroli, V., and Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242-249.

Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D.A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B., and Knight, R. (2018). The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 397-411.

Vernon, R.G., and Walker, D.G. (1968). Adaptive behaviour of some enzymes involved in glucose utilization and formation in rat liver during the weaning period. *Biochem J* 106, 331-338.

Victoria, C.G. (1996). Infection and Disease: The Impact of Early Weaning. *Food and Nutrition Bulletin* 17, 1-8.

Vollmar, B., and Menger, M.D. (2009). The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 89, 1269-1339.

Ward Platt, M., and Deshpande, S. (2005). Metabolic adaptation at birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 10, 341-350.

Warren, A., Le Couteur, D.G., Fraser, R., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2006). T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182-1190.

Wolber, F.M., Leonard, E., Michael, S., Orschell-Traycoff, C.M., Yoder, M.C., and Srour, E.F. (2002). Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol* 30, 1010-1019.

Wong, M.T., Ong, D.E., Lim, F.S., Teng, K.W., McGovern, N., Narayanan, S., Ho, W.Q., Cerny, D., Tan, H.K., Anicete, R., *et al.* (2016). A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures. *Immunity* 45, 442-456.

Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., *et al.* (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* 2, 100141.

Xu, J., Hao, S., Shi, Q., Deng, Q., Jiang, Y., Guo, P., Yuan, Y., Shi, X., Shangguan, S., Zheng, H., *et al.* (2022). Transcriptomic Profile of the Mouse Postnatal Liver Development by Single-Nucleus RNA Sequencing. *Front Cell Dev Biol* 10, 833392.

Yang, L., Wang, W.H., Qiu, W.L., Guo, Z., Bi, E., and Xu, C.R. (2017). A single-cell transcriptomic analysis reveals precise pathways and regulatory mechanisms underlying hepatoblast differentiation. *Hepatology* 66, 1387-1401.

Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., *et al.* (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91.

Zeng, Z., Surewaard, B.G., Wong, C.H., Geoghegan, J.A., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2016). CR1g Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria. *Cell host & microbe* 20, 99-106.

Zeng, Z., Surewaard, B.G.J., Wong, C.H.Y., Guettler, C., Petri, B., Burkhard, R., Wyss, M., Le Moual, H., Devinney, R., Thompson, G.C., *et al.* (2018). Sex-hormone-driven innate antibodies protect females and infants against EPEC infection. *Nature immunology* 19, 1100-1111.

Zhao, R., and Duncan, S.A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41, 956-967.

Apêndice A: anticorpos utilizados no CyTOF

Anticorpo	Isótopo	Clone
Ly6C	151Eu	HK1.4
CD172a	153Eu	P82
CD103	154Sm	2,00E+07
CD24	156Gd	M1/69
TCRgd	165Ho	GL3
F4-80	175Lu	BM8
IL-7R	148Nd	A7R34
CD3	152Sm	145-2C11
CD25	167Er	3C7
CD115	142Nd	AFS98
CD5	144Nd	53-7.3
CD4	145Nd	RM4-5
CD19	149Sm	6D5
NK1.1	155Gd	PK136
Ly6G	158Gd	1A8

Anticorpo	Isótopo	Clone
CD41	159Tb	MWReg30
Sca-1	160Gd	E13-161.7
CD8a	164Dy	53-6.7
CD117	168Er	2B8
CD11b	169Tm	M1/70
Siglec-F	170Er	E50-2440
CD197	172Yb	4B12
MHC-II	174Yb	M5/114.15.2
CD26	161Dy	BA5b
CD11c	146Nd	N418
CD135	162Dy	A2F10
XCR1	163Dy	-
CD209	171Yb	-
Cleac9-a	173Yb	-
CD45	141Pr	30-F11

Apêndice B: *primers* utilizados no trabalho

<i>Acox 1</i>	F: TAACTTCCTCACTCGAAGCCA
	R: AGTTCCATGACCCATCTCTGTC
<i>Apoa1</i>	F: GGCACGTATGGCAGCAAGAT
	R: CCAAGGAGGAGGATTCAAACCTG
<i>Apoe</i>	F: CTGACAGGATGCCTAGCCG
	R: CGCAGGTAATCCCAGAAGC
<i>Afp</i>	F: CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC
	R: ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG
<i>Alb</i>	F: TGCTTTTTCCAGGGGTGTGTT
	R: TTACTTCCTGCACTAATTTGGCA
<i>Cpt1a</i>	F: CTCCGCCTGAGCCATGAAG
	R: CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Cyp8b1</i>	F: CCTCTGGACAAGGGTTTTGTG
	R: GCACCGTGAAGACATCCCC
<i>Elovl3</i>	F: TTCTCACGCGGGTTAAAAATGG
	R: GAGCAACAGATAGACGACCAC
<i>Fabp1</i>	F: ATGAACTTCTCCGGCAAGTACC
	R: CTGACACCCCCTTGATGTCC
<i>Fabp5</i>	F: TGAAAGAGCTAGGAGTAGGACTG
	R: CTCTCGGTTTTGACCGTGATG
<i>Fasn</i>	F: GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
	R: TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
<i>Fbp1</i>	F: CACCGCGATCAAAGCCATCT
	R: AGGTAGCGTAGGACGACTTCA
<i>Gapdh</i>	F: AGGTCCGGTGTGAACGGATTTG
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Gstp1</i>	F: ATGCCACCATACACCATTGTC
	R: GGGAGCTGCCATACAGAC
<i>Gys2</i>	F: ACCAAGGCCAAAACGACAG
	R: GGGCTCACATTGTTCTACTTGA
<i>Hk1</i>	F: CGGAATGGGGAGCCTTTGG
	R: GCCTTCCTTATCCGTTTTCAATGG
<i>Hsd3b7</i>	F: GGGAGCTGCGTGTCTTTGA
	R: GTGGATGGTCTTTGGACTGGC

<i>Lrp10</i>	F: GGATCACTTTCCCACGTTCTG R: GAGTGCAGGATTAATGCTCTGA
<i>Lpl</i>	F: GGGAGTTTGGCTCCAGAGTTT R: TGTGTCTTCAGGGGTCCTTAG
<i>Pck1</i>	F: CTGCATAACGGTCTGGACTTC R: CAGCAACTGCCCGTACTCC
<i>Pfkl</i>	F: GGAGGCGAGAACATCAAGCC R: CGGCCTTCCCTCGTAGTGA
<i>Pklr</i>	F: TCAAGGCAGGGATGAACATTG R: CACGGGTCTGTAGCTGAGTG
<i>Plin2</i>	F: GACCTTGTGTCCTCCGCTTAT R: CAACCGCAATTTGTGGCTC
<i>Pygl</i>	F: GAGAAGCGACGGCAGATCAG R: CTTGACCAGAGTGAAGTGCAG
<i>Slc27a5</i>	F: CTACGCTGGCTGCATATAGATG R: CCACAAAGGTCTCTGGAGGAT
<i>Ugt1a1</i>	F: GCTTCTTCCGTACCTTCTGTTG R: GCTGCTGAATAACTCCAAGCAT
<i>Il10</i>	F: CTTACTGACTGGCATGAGGATCA R: GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
<i>Tgfb</i>	F: CTC CCG TGG CTT CTA GTG C R: GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G
<i>Ifng</i>	F: GCCACGGCACAGTCATTGA R: TGCTGATGGCCTGATTGTCTT
<i>Tnfa</i>	F: CAGGCGGTGCCTATGTCTC R: CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
515F	TATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
806R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTCAGCCAGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT
R2seq	AGTCAGCCAGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT

Apêndice C: produção científica

1. Nakagaki, Brenda Naemi; Mafra, Kassiana; De Carvalho, Érika; Lopes, Mateus Eustáquio; Carvalho-Gontijo, Raquel; De Castro-Oliveira, Hortência Maciel; Campolina-Silva, Gabriel Henrique; De Miranda, Camila Dutra Moreira; Antunes, Maísa Mota; Silva, Ana Carolina Carvalho; Diniz, Ariane Barros; Alvarenga, Débora Moreira; Lopes, Maria Alice Freitas; De Souza Lacerda, Viviane Aparecida; Mattos, Matheus Silvério; Araújo, Alan Moreira; Vidigal, Paula Vieira Teixeira; Lima, Cristiano Xavier; Mahecha, Germán A.B.; Madeira, Mila Fernandes Moreira; Fernandes, Gabriel Rocha; Nogueira, Raquel Ferraz; Moreira, Thais Garcias; David, Bruna Araújo; Rezende, Rafael Machado; Menezes, Gustavo Batista. **Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. Journal of Hepatology.** v.69, p.1294 - 1307, 2018.

2. Araujo, Alan; Antunes, Maísa; Mattos, Matheus; Diniz, Ariane; Alvarenga, Débora; **Nakagaki, Brenda;** Carvalho, Érika; Lacerda, Viviane; Carvalho-Gontijo, Raquel; Goulart, Jorge; Mafra, Kassiana; Freitas-Lopes, Maria; Oliveira, Hortência; Dutra, Camila; David, Bruna; Mendes Silva, Aristóbolo; Quesniaux, Valerie; Ryffel, Bernhard; Oliveira, Sergio; Barber, Glen; Mansur, Daniel; Cunha, Thiago; Rezende, Rafael; Oliveira, André; Menezes, Gustavo. **Liver Immune Cells Release Type 1 Interferon Due to DNA Sensing and Amplify Liver Injury from Acetaminophen Overdose. Cells.** v.7, p.88 - 2018.

3. Alvarenga, Débora; Mattos, Matheus; Lopes, Mateus; Marchesi, Sarah; Araújo, Alan; **Nakagaki, Brenda;** Santos, Mônica; David, Bruna; De Souza, Viviane; Carvalho, Érika; Sousa Pereira, Rafaela; Marques, Pedro; Mafra, Kassiana; De Castro Oliveira, Hortência; De Miranda, Camila; Diniz, Ariane; De Oliveira, Thiago; Teixeira, Mauro; Rezende, Rafael; Antunes, Maísa; Menezes, Gustavo. **Paradoxical Role of Matrix Metalloproteinases in Liver Injury and Regeneration after Sterile Acute Hepatic Failure. Cells.** v.7, p.247 - 2018.

4. Mafra, Kassiana; **Nakagaki, Brenda Naemi;** Castro Oliveira, Hortência Maciel; Rezende, Rafael Machado; Antunes, Maísa Mota; Menezes, Gustavo Batista. **The liver as a nursery for leukocytes. Journal Of Leukocyte Biology.** v. -, p.- 2019.

5. Rezende, Rafael M.; **Nakagaki, Brenda N.**; Moreira, Thais G.; Lopes, Juliana R.; Kuhn, Chantal; Tatematsu, Bruna K.; Boulenouar, Selma; Maghzi, Amir-Hadi; Rubino, Stephen; Menezes, Gustavo B.; Chitnis, Tanuja; Weiner, Howard L. **$\gamma\delta$ T Cell-Secreted XCL1 Mediates Anti-CD3-Induced Oral Tolerance.** *Journal Of Immunology*. v.8, p.ji1900784 - , 2019.

6. Mattos, Matheus Silvério; Lopes, Mateus Eustáquio; Araujo, Alan Moreira; Alvarenga, Débora Moreira; **Nakagaki, Brenda Naemi**; Mafra, Kassiana; Miranda, Camila Dutra Moreira; Diniz, Ariane Barros; Antunes, Maísa Mota; Lopes, Maria Alice Freitas; Rezende, Rafael Machado; Menezes, Gustavo Batista. **Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation.** *Journal Of Leukocyte Biology*. v.-, p.JLB.1MA0420-634R, 2020.

7. Diniz, Ariane Barros; Antunes, Maísa Mota; Lacerda, Viviane Aparecida De Souza; **Nakagaki, Brenda Naemi**; Freitas Lopes, Maria Alice; Castro-Oliveira, Hortência Maciel De; Mattos, Matheus Silvério; Mafra, Kassiana; De Miranda, Camila Dutra Moreira; De Oliveira Costa, Karen Marques; Lopes, Mateus Eustáquio; Alvarenga, Débora Moreira; Carvalho-Gontijo, Raquel; Marchesi, Sarah Cozzer; Lacerda, Debora Romualdo; De Araújo, Alan Moreira; De Carvalho, Érika; David, Bruna Araújo; Santos, Mônica Moraes; Lima, Cristiano Xavier; Silva Gomes, Juliana Assis; Minto Fontes Cal, Tereza Cristina; De Souza, Bruna Roque; Couto, Cláudia Alves; Faria, Luciana Costa; Teixeira Vidigal, Paula Vieira; Matos Ferreira, Adaliene Versiane; Radhakrishnnan, Sridhar; Ricci, Matthew; Oliveira, André Gustavo; Rezende, Rafael Machado; Menezes, Gustavo Batista. **Imaging and immunometabolic phenotyping uncover changes in the hepatic immune response in the early phases of NAFLD.** *JHEP Reports*. v.2, p.100117, 2020.

8. Antunes, Maísa Mota; Diniz, Ariane Barros; Castro-Oliveira, Hortência Maciel; Mendes, Gabriel Alvim Machado; Freitas-Lopes, Maria Alice; De Oliveira Costa, Karen Marques; Bicalho, Kassiana Mafra; **Nakagaki, Brenda Naemi Lanza**; Mattos, Matheus Silvério; De Miranda, Camila Dutra Moreira; Lopes, Mateus Eustáquio; Melão, Alesandra Corte Reis; Carvalho-Gontijo, Raquel; Radhakrishnnan, Sridhar; Ricci, Matthew; Rezende, Rafael Machado; Menezes, Gustavo Batista. **Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections.** *Nutrition*. v.81, p.110938 , 2020.