

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Bruna Araújo David

Dinâmica de fagócitos mononucleares hepáticos

Belo Horizonte

2015

Bruna Araújo David

Dinâmica de fagócitos mononucleares hepáticos

Texto apresentado 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 para defesa de dissertação de mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

2015

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunobiofotônica, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Também foram utilizados o laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB-UFMG). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

"Todo ser carrega em si o dom de ser capaz..."

(Almir Sater e Renato Teixeira, 1991)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por todos os acontecimentos que me trouxeram até aqui e me tornaram quem eu sou hoje. Por todas as oportunidades e pessoas pelo caminho.

À minha família, em especial meu pai, minha mãe e minha irmã Nicole, pelo amor, apoio e incentivo. Às minhas tias(os) e primas(os), muitíssimo obrigada por tudo que já fizeram por mim. Pelo estabelecimento de laços que jamais serão desfeitos, por serem a melhor e mais encantadora e feliz referência de família, pelo cuidado e afeto, por todos os abraços apertados capazes de fazer o mundo girar mais devagar e tirar o peso de uma vida inteira, pelo aconchego de um lar em todas as visitas, mesmo as mais demoradas. Pela compreensão, risadas, alegrias, festas, brincadeiras, amizade, gordices e fofuras, bom humor, paz, confiança, sabedoria, força, sinceridade, inspiração, liberdade... Obrigada por manterem vivos em mim a esperança e o otimismo que me fizeram nutrir a certeza inabalável de que o impossível é só questão de opinião. Por nunca me deixarem esquecer valores como dignidade, respeito, generosidade, humildade e tudo mais que me permite olhar minha história e sentir orgulho do que enxergo, pois tenho simpatia pela pessoa que o tempo me fez e vocês são responsáveis por isso.

À Eloá, Gau, Lud e Carol, pela amizade, amor e paciência incondicional. Pelo companheirismo, lealdade e incentivo. Tão essenciais quanto o coração que bate dentro de mim.

À Miroca, Vitão, Phil e Fabikinho, a gratidão que sinto vai além do imaginável pela família que e foi permitido escolher, pois não se trata apenas de um ano ou dois e sim de toda uma vida. Muito obrigada pela atenção, generosidade, companheirismo, amizade, conselhos, alegrias, respeito, farras, carinho, incentivo...

Aos membros do NEI pelo dia-a-dia alegre e descontraído. Pela generosidade e companheirismo.

Às vezes me pego pensando sobre os desígnios que nos são dados através do tempo e na maneira com a qual lidamos com cada oportunidade. Nessas horas volto a pensar sobre o poder de nossas escolhas. Da grandiosidade de uma fração de segundo que modifica por inteiro esse caminho antes predefinido. Da força de um sorriso, de um olhar, de um carinho. Sendo assim, torna-se impossível não crer na graça divina que é o fato de termos nos encontrado. Torna-se impossível deixar de agradecer pela existência de cada um de vocês.

Impossível deixar de agradecer pelos milhões de milésimos de segundos que me fizeram estar aqui. Um agradecimento repleto da mais sincera gratidão aos meus amigos Maísa, Rafa, Riri, Sarah (fumo do meu coração), Débora, Brenda, Maria Alice (a IC mais fofa do mundo!), Alan, André e Mônica, acima de tudo pela GENEROSIDADE.

Ao meu orientador, Gustavo Menezes, por acreditar e caminhar comigo. Por me ensinar a navegar em qualquer tempo, qualquer mar. Que o céu é o limite e nós somos imbatíveis. Por me ensinar, não com palavras, mas com exemplos diários a exercer com maestria a profissão que escolhi me dedicar. Pela amizade, companheirismo e fé depositada em mim como pessoa. Por insistir que não existe impossível para quem escolheu procurar e encontrar o lado bom de tudo.

Ao Perna (Pedro Elias), por me pegar pela mão e me auxiliar nos primeiros e tortuosos passos no início da minha carreira científica. Por todos os ensinamentos técnicos, e pelos ensinamentos do que é ser um cientista, que me serão úteis por toda a vida.

Ao Rafa, por permanecer tempo suficiente para me reinventar. Pela atenção, cuidado e carinho. Por me ensinar, mesmo sem saber, a sentir com inteligência e pensar com emoção.

Aos funcionários do biotério, Hermes e Pedro, pelo carinho, atenção e compreensão.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular pelo convívio e aprendizado.

Aos membros da banca por aceitar meu convite e contribuir de forma tão positiva e construtiva para meu trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	13
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo principal	26
2.2. Objetivos específicos	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 Animais experimentais	27
3.2 Microscopia Intravital Confocal	28
3.3 Microcirculação hepática	28
3.4 Quantificação de macrófagos e células dendríticas hepáticas	28
3.5 Quantificação de células de Ito	29
3.6 Modelo de depleção com clodronato (CLL)	29
3.7 Modelo de depleção com toxina diftérica	30
3.8 Citometria de fluxo de medula	30
3.9 Modelo de lesão hepática	31
3.10 Avaliação histológica do fígado	32
3.11 Medida de função hepática por depuração de verde de indocianina (cardiogreen)	33
3.12 Contagem de sangue total e diferencial	33
3.13 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Determinação da microcirculação hepática por microscopia intravital	34

4.2. Visualização de células hepáticas não-parenquimais <i>in vivo</i>	36
4.2.1. Células de Kupffer	36
4.2.2. Células dendríticas	38
4.2.3. Células de Ito (células estreladas hepáticas)	40
4.3. Depleção de células fagocíticas hepáticas por injeção de lipossomos contendo clodronato	42
4.4. O tratamento com clodronato promove a eliminação de macrófagos hepáticos por apoptose	44
4.5. O tratamento com clodronato depleta células dendríticas hepáticas	46
4.6. O tratamento com clodronato não altera parâmetros funcionais hepáticos	48
4.7. O tratamento com clodronato altera a quantidade de precursores hematopoiéticos na medula óssea.....	50
4.8. Após depleção total de células de Kupffer, monócitos migram para o fígado dando origem a macrófagos originados de monócitos (MOMs) e assumindo a mesma localização e morfologia das células "originais"	51
4.9. Estudo da dinâmica de macrófagos hepáticos durante a lesão hepática	54
4.10. Macrófagos hepáticos sofrem depleção parcial 24 horas pós APAP, seguido de inversão do seu padrão de distribuição normal no 3 ^o dia	56
4.11. Em animais depletados a lesão hepática induzida por APAP é mais severa e há uma tendência a maior perda de função.....	58
4.15. Depleção parcial de células dendríticas protege o fígado de lesão causada por sobredose de APAP	60
4.12. A substituição de células fagocíticas “originais” gera uma hiperresponsividade inflamatória hepática.....	62
4.13. Substituição de células de Kupffer por macrófagos originados de monócitos prejudica a função hepática e torna o fígado mais susceptível à perda funcional mediante estímulo inflamatório.....	64
4.14. Macrófagos originados de monócitos são mais sensíveis que células de Kupffer originais no tempo agudo da lesão induzida por APAP	66

4.14. Em animais repovoados não há acúmulo de células F4/80 ⁺ nas Zonas Pericentrais no terceiro dia pós APAP, indicando uma menor capacidade de reorganização hepática	68
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Analysis of Variance

APAP - *Acetaminophen*; N-acetyl-p-aminophenol

BV - Brillhant violet; Violeta brilhante

CDs - Células dendríticas

CEBIO - Centro de bioterismo da UFMG

CETEA - Comitê de ética em experimentação animal da UFMG

CKs - Células de Kupffer

CLL - Clodronato

CLL15d - animais com 15 dias de repovoamento; 15 dias após a depleção

CLL60d - animais com 60 dias de repovoamento; 15 dias após a depleção

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; corante fluorescente intercalante de DNA

DTR - *Diphtheria toxin receptor*; Receptor de toxina diftérica

FIG. - Figura

FITC - *fluorescein isothiocyanate*; Isotiocianato de fluoresceína

FMO - Fluorescence minus one; Fluorescência menos um

GFP - *Green fluorescent protein*; Proteína verde fluorescente

H&E - Hematoxilina e eosina

IFN γ - Interferon gama

IL - Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

LysM - Lisosima M

MIP - *Macrophage Inflammatory Protein*; Proteína inflamatória de macrófagos

MIV - Microscopia intravital

MOMs - Macrófagos originados de monócitos

PBS - Salina tamponada com fosfato

PD - Precursor de células dendríticas

PE - Phycoerythrin; Ficoeritrina

PM - Precursor de macrófagos

PMD - Precursor comum de macrófagos e células dendríticas

RFP - *Red fluorescent protein*; Proteína vermelho fluorescente

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SFB - Soro fetal bovino

SMF - Sistema Mononuclear Fagocitário

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

YFP - *Yellow fluorescent protein*; Proteína amarelo fluorescente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Animais geneticamente modificados utilizados no desenvolvimento do projeto	25
Tabela 2: Escore de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão hepática	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1: Nova visão sobre a origem de macrófagos e de autorrenovação	18
Ilustração 2: Dinâmica de origem de macrófagos	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia intravital de fígado ilustrando a metodologia de quantificação adotada para células de Kupffer e células dendríticas hepáticas.....	28
Figura 2: Estratégia de análise utilizada em citometria fluxo de medula óssea.....	30
Figura 3: Imageamento <i>in vivo</i> da distribuição intravascular de FITC albumina revela espacialmente a localização dos espaços porta e de veias centrolobulares.....	34
Figura 4: Células de Kupffer localizam-se preferencialmente nas zonas sinusoidais.....	36
Figura 5: Células dendríticas distinguem-se de células de Kupffer por sua morfologia e localização características.....	38
Figura 6: Grânulos autofluorescentes de vitamina A revelam a localização de células de Ito e não estão presentes em células de Kupffer e células dendríticas.....	40
Figura 7: Tratamento com clodronato depleta totalmente os macrófagos hepáticos.....	42
Figura 8: A não visualização de células F480 ⁺ é resultado da eliminação dessas células e não de <i>downregulation</i>	44
Figura 9: Tratamento com clodronato depleta células dendríticas hepáticas.....	46
Figura 10: Depleção de células de Kupffer e células dendríticas hepáticas não causa lesão e não altera função hepática.....	48
Figura 11: O tratamento com clodronato depleta precursores comuns de macrófagos/dendríticas e precursores exclusivos de dendríticas na medula óssea.....	50
Figura 12: Após depleção completa, o fígado é repovoado por macrófagos originados de monócitos (MOMs).em mesmo número, distribuição e morfologia	52
Figura 13: Sobredose de paracetamol (APAP) causa lesão tecidual e prejudica a função hepática.....	54
Figura 14: Lesão hepática induzida por APAP causa depleção parcial e inverte o padrão de distribuição de células de Kupffer.....	56

Figura 15: Animais depletados são mais sensíveis à lesão induzida por APAP e tendem a maior perda de função hepática.....	58
Figura 16: Depleção seletiva de células dendríticas protege o fígado de lesão hepática induzida por sobredose de APAP.....	60
Figura 17: Após substituição de células de Kupffer originais por macrófagos originados de monócitos o fígado torna-se mais susceptível à lesão hepática induzida por APAP.....	62
Figura 18: Repovoamento a longo prazo leva à perda de função hepática e torna o fígado mais predisposto à perda funcional mediante tratamento com APAP.....	64
Figura 19: Macrófagos originados de monócitos são mais sensíveis ao processo inflamatório decorrente de sobredose de APAP e em animais repovoados não há aumento de células F4/80.....	66
Figura 20: Em animais repovoados não há acúmulo de células F4/80 ⁺ nas Zonas Pericentrais no terceiro dia pós APAP.....	68

RESUMO

Macrófagos residentes hepáticos são substituídos por macrófagos originados de monócitos (MOMs) durante infecções, lesões hepáticas induzidas por drogas, exposição à radiação e outras hepatopatias. Aqui nós investigamos a dinâmica de repovoamento de macrófagos hepáticos após depleção total e possíveis consequências da substituição de células de Kupffer (CKs) originais por MOMs. Por microscopia intravital confocal (MIV), observamos que CKs ocupam preferencialmente as Zonas Sinusoidais em relação às Zonas Pericentrais. Após a depleção total por injeção i.v. de clodronato (CLL), o repovoamento hepático ocorre gradualmente, atingindo a distribuição original por volta de 15 dias após a depleção. Para investigar a dinâmica de macrófagos hepáticos durante a lesão hepática, acompanhamos a dinâmica de células F4/80⁺ durante uma resposta à agressão tóxica por sobredose de paracetamol (APAP). Tal tratamento causa lesão hepática grave evidenciada por altos níveis de transaminases séricas (alanina aminotransferase - ALT), acompanhada pela redução da função hepática medida pela depuração de verde de indocianina. Além disso, o processo inflamatório, em si, causou depleção parcial de CKs em estágio agudo (24 horas) seguido por aumento significativo e inversão do padrão de distribuição de macrófagos hepáticos, passando nesse estágio a ocupar preferencialmente as Zonas Pericentrais. De forma interessante, em ambos os modelos de depleção (total e parcial) o número e a localização de macrófagos hepáticos é reestabelecido, o que sugere a existência de um processo regulatório hepático para o controle e manutenção dessa população celular. Ainda, células de Kupffer originais possuem papel regulatório em processos inflamatórios uma vez que camundongos depletados apresentaram lesão mais grave quando tratados com APAP. Isso foi consistente com os dados onde animais depletados e, em seguida, repovoados (após 15 e 60 dias) tratados com APAP ainda apresentavam padrões anormais de lesão e função hepática durante o processo inflamatório se comparados com os animais não depletados também tratados com APAP. Animais repovoados apresentam macrófagos residentes mais sensíveis ao estágio agudo da inflamação e ainda um menor acúmulo de células F4/80⁺ no terceiro dia após o tratamento, denotando um comportamento mais estático ou um prejuízo no recrutamento de monócitos. Concluímos então que CKs originais desempenham funções regulatórias durante lesões hepáticas, e por MOMs não assumem fenótipos inflamatórios e migratórios igual à células originais.

ABSTRACT

Liver-resident macrophages are replaced by monocyte-derived macrophages (MDMs) during infections, drug-induced liver injury, exposure to radiation and other liver diseases. Here we investigate the dynamics of replenishment of hepatic macrophages after their total depletion, and possible consequences of the resident cells' – Kupffer cells (KCs) – replacement with MDMs. Using intravital microscopy (IVM), we observe that KCs preferably occupy sinusoidal areas in compared to pericentral areas. After total depletion by i.v. injection of clodronate (CLL), hepatic repopulation takes place gradually, reaching the original distribution around 15 days after depletion. To investigate the dynamics of hepatic macrophages during liver damage, we follow the dynamics of F4/80+ cells during the response to aggression caused by toxic overdose of acetaminophen (APAP). This treatment causes severe liver damage, which is evidenced by high levels of serum transaminases (alanine aminotransferase - ALT), accompanied by reduced liver function, which is measured through the cleansing of Indocyanine Green. In addition, the inflammatory process causes partial depletion of KCs in acute stage (24 hours) followed by a significant increased and reverse pattern of the liver macrophages' distribution, leading to a stage in which most cells are located in pericentral areas. Interestingly, in both depletion models (total and partial), the number and location of hepatic macrophages are restored, suggesting the existence of a regulatory pathway to control and maintain hepatic cells' population. Besides, Kupffer cells present a regulatory role in original inflammatory processes, once mice with depletion of KCs showed worse injury when treated with APAP. This is consistent with data that showed that animals with depletion and, then, repopulation (after 15 and 60 days) and treated with APAP still present abnormal patterns of injury and hepatic function during the inflammatory process compared to the animals without depletion, also treated with APAP. Animals with depletion have more sensitive resident macrophages to acute inflammation stage and less accumulation of F4/80+ cells on the third day after treatment, denoting more static behavior or a loss in the recruitment of monocytes. Therefore, we conclude that the original KCs play regulatory functions during liver damage, and MDMs do not take anti-inflammatory and migratory phenotype like the original cells do.

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros fagócitos foram identificados em organismos marinhos e descritos por Elie Metchnikoff no século XIX (METCHNIKOFF, 1884). Em virtude da sua natureza fagocítica, essas células são extensivamente estudadas em diversos organismos, desde estrelado-mar, mosquitos, pequenos vermes, peixes e até mamíferos de grande porte. Nos mamíferos, são encontrados em praticamente todos os tecidos, onde exibem grande diversidade anatômica e funcional. Têm papéis em inúmeros aspectos da biologia de um organismo; desde desenvolvimento, homeostase e reparo, até respostas imunes a agentes patogênicos.

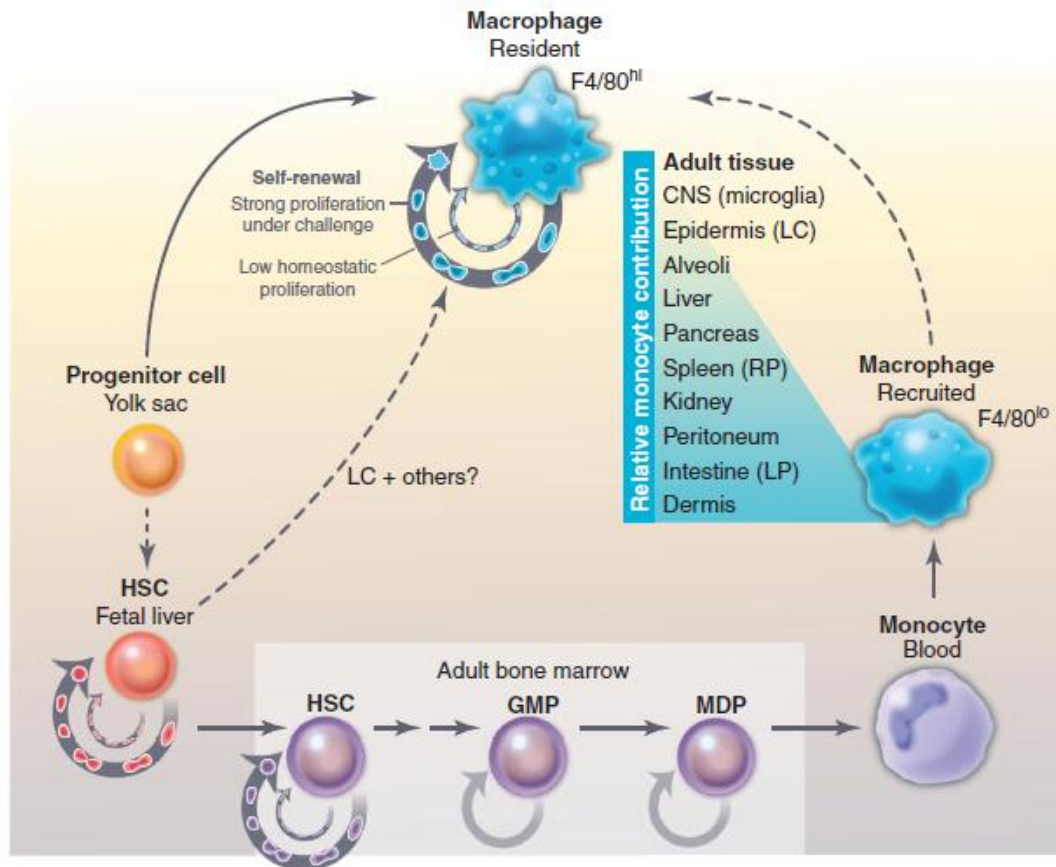
Um dogma fundamental em imunologia é a derivação de macrófagos a partir de monócitos, reforçado pelo conceito que monócitos e macrófagos podem ser agrupados devido à sua origem comum. Contudo, esse dogma foi estabelecido com a teoria do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) (VAN FURTH & COHN, 1968) antes do advento da citometria de fluxo e outras técnicas mais precisas que ajudaram a discriminar os componentes individuais do SMF. Embora o termo SMF tenha criado uma estrutura que ajudou a compreensão da biologia de fagócitos teciduais, também levou à hipótese de que todos os fagócitos teciduais são idênticos em sua origem e função. Atualmente o SMF compreende monócitos, macrófagos e células dendríticas (CDs), bem como progenitores residentes na medula óssea (GEISSMANN *et al.*, 2010). Coletivamente, estas células desempenham papéis centrais na manutenção da integridade dos tecidos durante o desenvolvimento e sua restauração após lesões. Historicamente, as subpopulações de fagócitos mononucleares foram definidas de acordo com a localização e perfil de marcadores de superfície. Mais recentemente, essa definição passou a considerar ainda, a dependência de subpopulações a fatores de crescimento e fatores transcrição intrínsecos (HASHIMOTO *et al.*, 2011), assinaturas específicas de expressão gênica e ontogênese distinta (GEISSMANN *et al.*, 2010).

Macrófagos, de modo geral, podem ser divididos em duas classes: macrófagos residentes teciduais e macrófagos infiltrados (ou macrófagos originados de monócitos - MOMs). Exemplos de macrófagos teciduais incluem células de Kupffer (no fígado), células de Langerhans (na pele), micróglia (no tecido nervoso central), macrófagos peritoneais, alveolares (no pulmão), da polpa vermelha do baço, da medula óssea e de vários outros órgãos. O ponto comum entre essas células é que elas, por definição, executam várias funções

para manutenção da homeostase dos respectivos tecidos (MURRAY & WYNN, 2011). Por outro lado, MOMs são encontrados nos tecidos mediante estímulo ou durante processos inflamatórios. Há hoje uma forte evidência de que os monócitos clássicos (também conhecidos como "inflamatórios" ou Ly6C^{hi}) são a fonte de macrófagos infiltrados encontrados em diversas condições patológicas, como o câncer (QIAN *et al.*, 2011), aterosclerose (INGERSOLL *et al.*, 2011), doenças metabólicas (CHAWLA *et al.*, 2011) e outras. No entanto, a contribuição real de monócitos para populações de macrófagos residentes teciduais ainda é controversa, e parece variar de acordo com o tecido e o dano instaurado.

Na década de 60, estudos *in vivo* envolvendo radioisótopos e animais quimera de medula óssea expostos à radiação fez imunologistas acreditarem que células originadas na medula óssea, provavelmente monócitos, eram responsáveis pela manutenção das populações de macrófagos residentes (VAN FURTH & COHN, 1968). Esses estudos foram corroborados por experimentos iniciais de parabiose que relataram a contribuição de monócitos para conservação de macrófagos peritoneais e células de Kupffer (PARWARESCH & WACKER, 1984; WACKER *et al.*, 1986). No entanto, observações recentes colocaram em conflito a ideia de macrófagos teciduais serem originados exclusivamente de monócitos medulares. Por exemplo, os primeiros macrófagos, denominados macrófagos primitivos, surgem na ontogênese antes do desenvolvimento de monócitos (TAKAHASHI *et al.*, 1989). Além disso, animais deficientes em monócitos apresentam densidade normal de macrófagos teciduais (KUZIEL *et al.*, 1997). Estudos recentes têm mostrado que a maioria dos macrófagos teciduais são derivados de progenitores embrionários (NAITO *et al.*, 1997; SCHULZ *et al.*, 2012; YONA *et al.*, 2013; GINHOUX & JUNG, 2014; ZIGMOND *et al.*, 2014) e o rastreamento de progenitores e linhagens de macrófagos residentes indicam que pelo menos três linhagens de macrófagos se diferenciam em camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento, persistindo até a idade adulta. Os macrófagos, a princípio, poderiam se originar do saco vitelínico, fígado fetal e medula óssea, como mostrado na ilustração 1 (GINHOUX *et al.*, 2010; HOEFFEL *et al.*, 2012; SCHULZ *et al.*, 2012). Macrófagos residentes no sistema nervoso central (microglia) derivam de precursores do saco vitelino e são mantidos independentemente de monócitos (GINHOUX *et al.*, 2010). Isso está em acordo com achados recentes que outras populações de macrófagos residentes, como células de Kupffer e células de Langerhans, também derivam de precursores do saco vitelínico e são mantidos de forma independente de monócitos em condições de repouso (SCHULZ *et al.*,

2012). Reforçando, portanto, a hipótese que macrófagos “originais” podem ser diferentes – no mínimo ontologicamente - de macrófagos infiltrados.



(SIEWEKE & ALLEN, 2013)

Ilustração 1: Nova visão sobre a origem de macrófagos e de autorrenovação. Macrófagos (azul) podem se desenvolver a partir de progenitores embrionários precoces no saco vitelínico (e, em alguns casos, de precursores do fígado fetal) e são mantidos ao longo do desenvolvimento e durante a vida adulta por autorrenovação local (topo). Semelhante às células-tronco, a autorrenovação de macrófagos é caracterizada por baixas taxas de proliferação após a formação dos tecidos (pequenas setas circulares), mas intensa expansão durante o desenvolvimento, após depleção, ou mediante estímulo (grandes setas circulares). Após a função de órgão hematopoiético ser assumido pelo fígado fetal e, em seguida, pela medula óssea, os macrófagos podem se originar a partir de células-tronco hematopoiéticas através de progenitores mielóides (setas grandes circulares) e monócitos circulantes (inferior direito). Monócitos circulantes se diferenciam em macrófagos residentes, sob certas condições, tais como transplante de medula óssea após irradiação. A contribuição de monócitos para manutenção de macrófagos teciduais é altamente dependente do tecido e varia de nenhuma contribuição, como microglia e células de Langerhans, a contribuição plena em macrófagos intestinais da lâmina própria. Embora não seja um marcador definitivo, macrófagos residentes são frequentemente $F4/80^{hi}$, enquanto macrófagos derivados de monócitos são geralmente $F4/80^{low}$. Baseado no conhecimento atual, os tecidos estão indicados de acordo com a contribuição relativa de monócitos circulantes para a manutenção de macrófagos residentes no tecido adulto em condições normais do de maior contribuição para o de maior contribuição (cima para baixo). HSC: células-tronco hematopoiéticas; GMP: células progenitoras de granulócitos-macrófagos; MDP: células progenitoras de macrófagos-dendríticas; LC: células de Langerhans; RP: polpa vermelha; LP: lâmina própria.

Macrófagos residentes regulam a homeostase do tecido atuando como sentinelas e respondendo a alterações fisiológicas e a insultos externos. Durante as adaptações para manter

a homeostase, macrófagos de diferentes fenótipos podem também ser recrutados de reservatórios como sangue, baço e medula óssea (GEISSMANN *et al.*, 2010), e também a partir de progenitores presentes nos tecidos ou através da proliferação local (JENKINS *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2012). Assim, macrófagos constituem um conjunto diversificado de células que mudam constantemente seu estado funcional em resposta a alterações na fisiologia do tecido ou desafios ambientais. Portanto, não devem ser considerados um único tipo celular, e sim subdivididos em diferentes subconjuntos funcionais de acordo com suas diferentes origens. Além disso, o estabelecimento dos perfis de transcrição de macrófagos residentes pelo Projeto Genoma mostrou que essas populações apresentam alta diversidade de transcrição com um mínimo de sobreposição, sugerindo que existem muitas classes de macrófagos (GAUTIER *et al.*, 2012).

Quando os tecidos são danificados por uma infecção, lesão ou inflamação, monócitos circulantes são recrutados e se diferenciam em macrófagos à medida que migram para o tecido afetado (GEISSMANN *et al.*, 2010). Estes macrófagos recrutados apresentam um fenótipo pró-inflamatório nas fases iniciais e secretam uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α , IL-1 e óxido nítrico, que ativam mecanismos de defesa antimicrobianos, incluindo processos oxidativos que contribuem para a eliminação de organismos invasores (MURRAY & WYNN, 2011). Também produzem IL-12 e IL-23, que promovem a diferenciação e expansão de células T_{H1} e T_{H17} (células T auxiliares que expressam o IFN- γ e IL-17, respectivamente), ajudando a guiar respostas inflamatórias. Embora estes macrófagos pró-inflamatórios sejam inicialmente benéficos por facilitarem o reconhecimento de organismos invasores, eles também desencadeiam dano tecidual (NATHAN & DING, 2010). Se a resposta inflamatória não é devidamente regulada, ela pode se tornar patogênica e contribuir para a progressão da doença, como é visto em muitas doenças inflamatórias e autoimunes (KRAUSGRUBER *et al.*, 2011). Em contrapartida, macrófagos apoptóticos, bem como aqueles que apresentam fenótipo anti-inflamatório ou resolutivo, atenuam a resposta inflamatória e ao mesmo tempo promovem o reparo tecidual (MURRAY & WYNN, 2011).

CÉLULAS DE KUPFFER

As células de Kupffer (CKs), identificadas por von Kupffer em 1876, constituem a maior população de macrófagos residentes do organismo. Estão envolvidas no metabolismo de vários compostos, respostas imunológicas e reações inflamatórias. Encontram-se sobre as

células endoteliais dentro dos sinusóides, o que as deixa completamente expostas ao conteúdo sanguíneo, e permite que fagocitem material diretamente da microcirculação hepática. As CKs em conjunto com as células endoteliais dos sinusóides hepáticos formam o maior sistema reticuloendotelial do corpo, que basicamente tem a função de capturar antígenos, microrganismos e células senescentes, e eliminá-los do sangue. Esta função de filtro impede que grandes quantidades de lipopolissacarídeo (LPS), restos celulares e microrganismos atinjam a circulação sistêmica, prevenindo a disseminação de patógenos em condições homeostáticas e patológicas (TOTH & THOMAS, 1992; SEKI *et al.*, 2000; THOMSON & KNOLLE, 2010). Ademais, são cruciais na defesa do hospedeiro contra bacteremia, uma vez que são responsáveis pela eliminação de 70-80% das bactérias que entram na corrente sanguínea.

Embora o tecido hepático seja uniforme a nível histológico, este é heterogêneo em relação à morfometria e histoquímica. CKs localizadas nas regiões periportais (Zonas Sinusoidais) diferem das células das regiões centrolobulares (Zonas Pericentrais) em várias enzimas, receptores e estruturas subcelulares. São cerca de duas vezes mais abundantes nas regiões periportais se comparadas às regiões centrolobulares (SLEYSTER & KNOOK, 1982; DECKER, 1998; ARII & IMAMURA, 2000; LASKIN *et al.*, 2001). As células das regiões periportais são maiores, possuem maior atividade de enzimas lisossomais, apresentam maior capacidade fagocítica e produzem menos ânion superóxido (SLEYSTER & KNOOK, 1982). Por outro lado, células das regiões centrolobulares são mais reativas a processos inflamatórios. Assim, a heterogeneidade funcional e o tamanho das CKs estão relacionados à sua localização nos lóbulos hepáticos (SLEYSTER & KNOOK, 1982).

Apesar da perspectiva de que CKs são macrófagos fixos no tecido, há evidências de que elas têm a capacidade de migrar ao longo das paredes sinusoidais com uma velocidade média de ~ 4,6 micrômetros/minuto (MACPHEE *et al.*, 1992). Macrófagos hepáticos estão envolvidos ainda na patogênese de lesões hepáticas mediadas por substâncias químicas, toxinas e agentes farmacológicos (GREGORY & WING, 2002; SU, 2002), como tetracloreto de carbono (CCl₄), endotoxinas, galactosamina e paracetamol (APAP) através da liberação de substâncias biologicamente ativas que promovem o processo inflamatório (SU, 2002). Em lesões hepáticas e necrose hepatocelular, CKs ativadas são uma importante fonte de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, superóxido, óxido nítrico, enzimas lisossomais e proteolíticas e demonstram aumento de citotoxicidade e quimiotaxia.

Macrófagos infiltrados e residentes desempenham um papel fundamental no reparo da vasculatura hepática e na recuperação global do tecido. Macrófagos residentes produzem

fatores angiogênicos que promovem a proliferação e migração de células do endotélio dos sinusóides (YOU *et al.*, 2013). Além disso, a produção de quimiocinas tais como a proteína inflamatória de macrófagos (*macrophage inflammatory protein* - MIP-2), que induz a proliferação de hepatócitos, também tem uma função protetora em modelos de lesão induzida por APAP (HOGABOAM *et al.*, 1999; HOGABOAM *et al.*, 1999; BONE-LARSON *et al.*, 2000). Esta proteção também é mediada, possivelmente, pela produção de IL-10 e IL-18, uma vez que a depleção dessas células aumenta a susceptibilidade do fígado murino ao APAP (JU *et al.*, 2002).

Os macrófagos residentes "originais" presentes no fígado após o nascimento são originados no início do desenvolvimento embrionário, a partir de precursores do saco vitelínico. Após semearem o fígado fetal, são mantidos por proliferação local com pouca ou nenhuma contribuição relativa de monócitos ao longo da vida adulta. Porém, esse padrão é alterado quando há dano tecidual. Em situações de desequilíbrio, monócitos são recrutados para o fígado em quantidade diretamente proporcional à extensão do insulto. Esses monócitos podem, então, atuar na resolução/restauração tecidual e, em seguida, serem eliminados ou se diferenciarem em macrófagos (MOMs) e permanecerem no tecido. Embora muitos estudos sejam voltados para tal fim, pouco se sabe das possíveis consequências da substituição parcial e gradativa de CKs por MOMs uma vez que ainda não está claro se monócitos infiltrados se diferenciam de forma plena em macrófagos residentes originais.

CÉLULAS DENDRÍTICAS

No início de 1970, Ralph Steinman e Zanvil Cohn identificaram uma população de células hematopoiéticas no baço de ratos que se destacaram por sua capacidade de apresentação de antígenos e estimulação de células T, denominadas células dendríticas (CDs) (STEINMAN & COHN, 1973). Similar a algumas populações de macrófagos, CDs derivam de progenitores hematopoiéticos e são encontradas em tecidos linfóides e não linfóides. Inicialmente acreditou-se que tais células apresentavam baixa capacidade fagocítica. Porém, existem evidências que CDs possuem grande atividade fagocítica que é em grande parte dedicada a informar o sistema imunológico adaptativo sobre alterações em tecidos periféricos. Após fagocitar antígenos presentes nos tecidos essas células migram para os nódulos linfáticos onde apresentam tais antígenos e ativam células T (MELLMAN & STEINMAN, 2001).

CDs são classificados em dois subconjuntos principais que incluem CDs clássicas e plasmocitóides (HEATH & CARBONE, 2009). Como nosso foco são fagócitos teciduais, CDs plasmocitóides não serão discutidas, considerando que em condições de repouso em tecidos não-linfóides, sua capacidade de fagocitar e apresentar antígenos é limitada (VILLADANGOS & YOUNG, 2008). CDs clássicas formam uma população heterogênea de células hematopoiéticas. Um dos maiores desafios para compreender os mecanismos moleculares que controlam as funções atribuídas às CDs tem sido a falta de marcadores específicos para definir suas linhagens. Por esse motivo, CDs continuam a serem definidas como células hematopoiéticas que expressam quantidades elevadas de MHC de classe II (partilhada por células B ativadas e macrófagos) e da integrina CD11c (também expressa por algumas populações de macrófagos, células T ativadas, células B e células NK) (HASHIMOTO *et al.*, 2011).

Os monócitos podem ser facilmente diferenciados em CDs *in vitro* (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994), mas a contribuição exata de monócitos para o *pool* de CDs em condições de repouso permanece obscura. Em contraste com estados de repouso, a diferenciação de monócitos em CDs aumenta dramaticamente nos tecidos inflamados.

Apesar de o tecido hepático ser rico em células dendríticas, pouco se sabe sobre as funções que essas células exercem nesse tecido e como elas o fazem. Embora CKs e DCs tenham ontogênese distinta, macrófagos e células dendríticas são populações celulares bastante semelhantes o que dificulta o estudo individual de ambas as populações no fígado.

Relevância de estudos de fagócitos mononucleares *in vivo*

O programa de transcrição que controla a diferenciação de monócitos em macrófagos foi recentemente revisto (AUFFRAY *et al.*, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010). Contudo, a maioria dos estudos sobre a regulação da transcrição da diferenciação de macrófagos foi feita *in vitro* com enriquecimento de populações de progenitores. Ainda, a maior parte dos estudos que caracterizaram e definiram populações e fenótipos de macrófagos foram feitos com purificação de células teciduais (por exemplo, por digestão) e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Embora esses estudos tenham vantagens em termos de segregação populacional por ocorrência simultânea ou ausência de marcadores celulares de interesse, tais métodos tem como limitante inerente a perda da localização original e a morfologia das células no órgão de interesse. De fato, nestes estudos as células são analisadas fora do seu contexto natural. Logo, o papel exato desses fatores de transcrição na condução do processo

de diferenciação de monócitos em subconjuntos distintos de macrófagos *in vivo* ainda necessita de mais esclarecimentos. Isto é particularmente importante dado que a especialização funcional de macrófagos seja, provavelmente, regulada a nível tecidual e não a nível do progenitor.

O SMF foi fundamental para alertar a comunidade científica da importância dos fagócitos na imune inata. Ressaltar aspectos comuns de um sistema amplamente distribuído por todo o corpo para promover a defesa do hospedeiro contra possíveis antígenos externos facilitou a aceitação de uma nova linhagem celular pela comunidade científica. Mais de um século depois de sua descoberta, a identificação de doenças humanas devido à função comprometida de fagócitos estabeleceu o papel fundamental de tais células na imunidade tecidual e homeostase. No entanto, esses estudos também revelaram a complexidade e heterogeneidade deste sistema celular. De fato, enquanto Aschoff salientou a importância de certa semelhança fundamental entre as células no que diz respeito à fagocitose e armazenamento, ele insistiu que as semelhanças não equivalem a identidade e espera-se que pesquisas futuras sejam capazes de distinguir de forma mais precisa as diferentes populações de fagócitos teciduais.

Uma vez estabelecida e identificada as populações de fagócitos presentes num determinado tecido, faz-se necessário, em seguida, investigar a contribuição de cada uma para a homeostase tecidual, bem como para o reestabelecimento de condições de repouso após insultos. De modo geral, a dinâmica de manutenção das populações de macrófagos teciduais é bastante controversa. Estudos recentes mostram que macrófagos residentes no tecido cardíaco são, sucessivamente, perdidos com a idade durante o desenvolvimento pós-natal (MOLAWI *et al.*, 2014). E, embora se acreditasse inicialmente que monócitos circulantes só contribuem para a manutenção de macrófagos residentes após depleção ou inflamação, tais estudos revelam que macrófagos embrionários são gradualmente substituídos por MOMs durante o desenvolvimento pós-natal (MOLAWI *et al.*, 2014), como mostrado na ilustração 2 (GENTEK *et al.*, 2014).

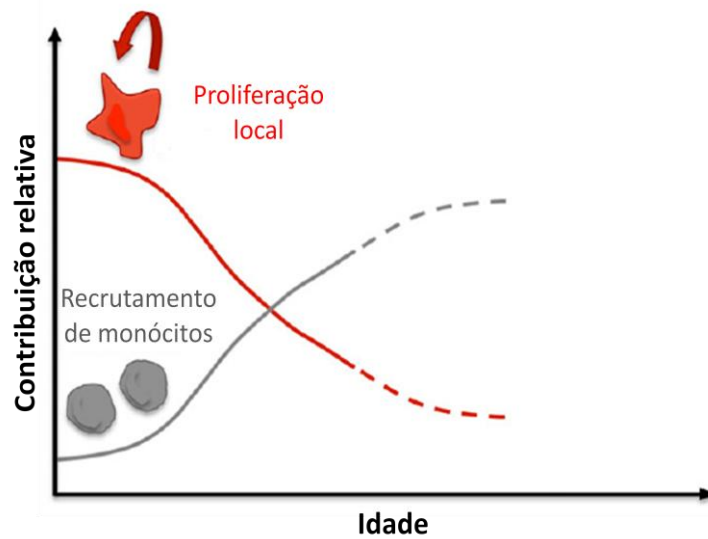


Ilustração 2: Dinâmica de origem de macrófagos. Modelo que descreve a dinâmica de alterações da contribuição relativa da proliferação local (vermelho) e do recrutamento de monócitos (cinza) para a manutenção da população de macrófagos residentes ao longo do tempo após o nascimento.

Desse modo, fatores como idade, infecções, lesões hepáticas induzidas por medicamentos, exposição à radiação e procedimentos cirúrgicos para retirada de tumores hepáticos (hepatectomia) têm em comum a reposição de macrófagos hepáticos embrionários por MOMs. Considerando que as CKs presentes no nascimento têm origem de precursores embrionários do saco vitelínico, sua substituição é feita por células diferentes, ou seja, que apresentam origem e fenótipo distintos. Uma vez estabelecida a importância vital da funcionalidade de macrófagos residentes, neste trabalho objetivamos caracterizar, especialmente por microscopia intravital confocal, a distribuição detalhada dos macrófagos residentes hepáticos, bem como sua dinâmica de repovoamento após sua completa depleção. Ainda, investigamos as consequências hepáticas da substituição dos macrófagos “originais” por novas células de Kupffer, estudando as diferenças na patogênese da lesão hepática aguda e sua regeneração frente a um estímulo inflamatório estéril.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Estudar a dinâmica espacial e funcional de células do sistema mononuclear fagocítico hepático - células de Kupffer e células dendríticas.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer uma metodologia para visualização de parâmetros hemodinâmicos e vasculares hepáticos *in vivo*
- Elucidar a localização bem como a densidade populacional hepática de células de Kupffer e células dendríticas utilizando microscopia intravital (MIV)
- Estudar a dinâmica de reestabelecimento de parâmetros populacionais e morfológicos de macrófagos hepáticos após diferentes desafios que levem a alteração dos parâmetros supracitados - citotoxicidade por drogas e depleção por tratamento com clodronato (CLL)
- Investigar possíveis consequências da substituição de macrófagos originados de precursores do saco vitelínico por macrófagos originados de monócitos

3 METODOLOGIA

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, a partir de oito semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Também utilizamos camundongos C57BL/6 transgênicos para visualização e depleção de células específicas (TABELA 1). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (Labina) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA protocolo 051/11).

Animais	Modificação genética	Fluorescência	Usado, nesse trabalho, para:
LysM-eGFP (MCDONALD <i>et al.</i> , 2010)	Expressão de GFP sob controle da lisosima M, proteína produzida de forma constitutiva pelas células.	<i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP)	Visualização de neutrófilos e células de Kupffer <i>in vivo</i> (MIV).
CD11c-YFP (LINDQUIST <i>et al.</i> , 2004)	Expressão de YFP sob controle do promotor de CD11c.	<i>Yellow Fluorescent Protein</i> (YFP)	Visualização de células dendríticas hepáticas <i>in vivo</i> (MIV).
CX3CR1^{+GFP}CCR2^{+RFP} (JUNG <i>et al.</i> , 2000; SAEDERUP <i>et al.</i> , 2010; YAMASAKI <i>et al.</i> , 2014)	Animais heterozigotos com deleção de um alelo de cada receptor substituído pela inserção de proteína fluorescente.	<i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP) para CX3CR1 e <i>Red Fluorescent Protein</i> (RFP) para CCR2.	Visualização de células dendríticas (GFP) <i>in vivo</i> (MIV).
CD11c-DTR (HOCHWELLER <i>et al.</i> , 2008)	Inserção do gene do receptor de toxina diftérica sob controle do promotor de CD11c.	Não apresenta fluorescência.	Depleção específica de células dendríticas.

Tabela 1: Animais geneticamente modificados utilizados no desenvolvimento do projeto.

3.2 Microscopia Intravital Confocal

A microscopia intravital confocal (MIV) de fígado de camundongos foi realizada utilizando microscópio confocal Nikon Ti C2 equipado com objetivas 10x e 40x. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados e submetidos a uma laparotomia para expor seu fígado em um suporte de acrílico compatível com o microscópio (MARQUES *et al.*, 2015). Antes da aquisição das imagens, os camundongos foram injetados i.v. com os seguintes fluoróforos: 100µl de DAPI (1mM, Molecular Probes), anticorpo anti-F4/80 conjugado com PE ou BV421 (4µg/camundongo, eBioscience) e anticorpo anti-CD31 conjugado com PE ou BV421 (4µg/camundongo, eBioscience).

3.3 Microcirculação hepática

Para elucidar as estruturas e o arranjo dos componentes da vasculatura hepática, realizamos o procedimento para microscopia intravital e após posicionar o camundongo no microscópio injetamos 100µl de FITC albumina (5mg/ml) filmando sem intervalos os 10 minutos subsequentes. O vídeo mostra o sentido do fluxo sanguíneo no tecido e nos permitiu, conseqüentemente, determinar quais eram nossos vasos sanguíneos de interesse, como mostrado em seguida (tópico 3.4).

3.4 Quantificação de macrófagos e células dendríticas hepáticas

Após a aquisição das imagens de microscopia intravital confocal, estabelecemos a metodologia de quantificação utilizada durante todo o mestrado. Foram criadas duas zonas distintas, sendo elas: Zona Sinusoidal e Zona Pericentral (FIG. 1). As Zonas Pericentrais foram estabelecidas sempre a partir de uma veia centrolobular de referência, na qual o diâmetro do vaso foi medido em diferentes pontos ao longo da sua extensão no tecido e uma faixa de duas vezes o valor do diâmetro foi estabelecido em suas laterais. Feito isso, os pontos foram ligados criando uma região de interesse que recebeu o nome de “pericentral” por se tratar de uma área em torno de uma veia centrolobular. A Zona Sinusoidal, então, se trata das

porções de tecido entre veias centrolobulares adjacentes, ou seja, da área total do campo menos a área correspondente às Zonas Pericentrais. Feito isso, quantificamos nossas células de interesse em diferentes tempos e diferentes tratamentos. Além disso, parâmetros como volume e distribuição também foram analisados a partir das imagens obtidas por microscopia utilizando o programa Volocity (PerkinElmer).

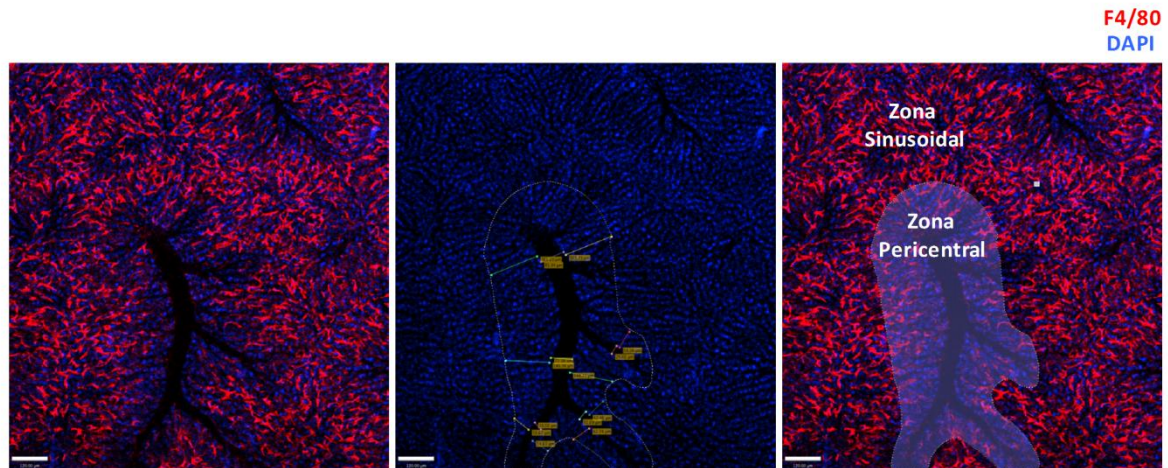


Figura 1: Microscopia intravital de fígado ilustrando a metodologia de quantificação adotada para células de Kupffer e células dendríticas hepáticas. Delimitação das Zonas Pericentrais utilizando veias centrais (ou centrolobulares) como referência e assumindo a área restante como Zona Sinusoidal. Macrófagos residentes corados com anti-F4/80 (vermelho) no interior dos sinusóides e núcleos de hepatócitos corados com DAPI (azul). Células dendríticas não representadas nas imagens.

3.5 Quantificação de células de Ito

A observação indireta de células de Ito foi feita nas imagens de microscopia intravital através da visualização dos grânulos de vitamina A característicos dessas células. A vitamina A apresenta autofluorescência em azul quando excitada pelo laser 405nm e as imagens obtidas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ.

3.6 Modelo de depleção com clodronato (CLL)

Para depleção total de macrófagos e células dendríticas hepáticas, camundongos foram tratados com injeção i.v. de 200µl clodronato (CLL) encapsulado em lipossomos em uma solução a 5mg/ml em suspensão. A depleção completa é observada, em média, 48 horas após o tratamento e confirmada por microscopia intravital.

3.7 Modelo de depleção com toxina diftérica

Animais CD11c-DTR são camundongos transgênicos onde a expressão do receptor para toxina diftérica está condicionada à expressão de CD11c, uma molécula característica de células dendríticas. Dessa forma, ao se administrar toxina diftérica nessas animais, há depleção seletiva de células CD11c⁺. Os camundongos CD11c-DTR, e seus respectivos controles, receberam um volume final de 100µl de solução i.p. contendo 1µg de toxina diftérica (Diphtheria Toxin from *Corynebacterium diphtheriae*, Sigma) diluídos em PBS 1x.

3.8 Citometria de fluxo de medula

Para obtenção de células de medula, camundongos foram eutanaziados por deslocamento cervical, esterilizados com álcool 70% e seus ossos (fêmur e tíbia) retirados. Com uma tesoura cirúrgica, as epífises foram retiradas e o interior dos ossos lavados com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) utilizando uma agulha 30G e seu conteúdo recolhido em um falcon. A solução contendo as células foi centrifugada a 1700 rpm por 8 minutos a 4°C. Em seguida, foi realizada a lise de hemácias adicionando ao pellet de células obtido 9 ml de água estéril, homogeneizando rapidamente, e adicionando 1 ml de PBS 10x. Foi feita uma segunda centrifugação a 1700 rpm por 8 minutos a 4°C e o pellet ressuspenso em 1ml de meio RPMI suplementado 10% SFB. As células foram contadas e normalizadas para 5x10⁵ por amostra para as marcações seguintes. Todas as amostras foram incubadas por 15 minutos com FcBlock (1:100) a 4°C. Os anticorpos utilizados foram: MIX para marcação de linhagens celulares - Lineage (CD3/GR-1/CD11b/CD45R/Ter-119) conjugado com FITC, anti-CD135 conjugado com PE (clone A2F10), anti-CD117 conjugado com PerCP-Cy5.5 (clone 2B8) e anti-CD115 conjugado com APC (clone AFS98) e seus respectivos isotipos, todos obtidos da BioLegend. Após o bloqueio, as células foram marcadas, incubadas por 30 minutos a 4°C, lavadas e adquiridas em um citômetro Accuri C6. Para análise, utilizamos o software BD Accuri C6 e seguimos os passos (YONA *et al.*, 2013): eliminamos debris criando um gate de "células" e, dentro desse, eliminamos *doublets* criando um gate em "*singlets*" (FIG. 2A); dentro de "*singlets*", selecionamos a população negativa para lineage, dentro desses a população CD135⁺ e, finalmente, criamos gates correspondentes à precursores de macrófagos (MARQUES *et al.*), precursores de macrófagos e dendríticas

(PMD) e precursores de dendríticas (PD) dentro da população positiva para CD135 (FIG. 2B); para confirmar as marcações utilizadas foram feitas amostras de FMO (*fluorescence minus one*) para Lineage, CD135, CD115 e CD117 (FIG. 2C).

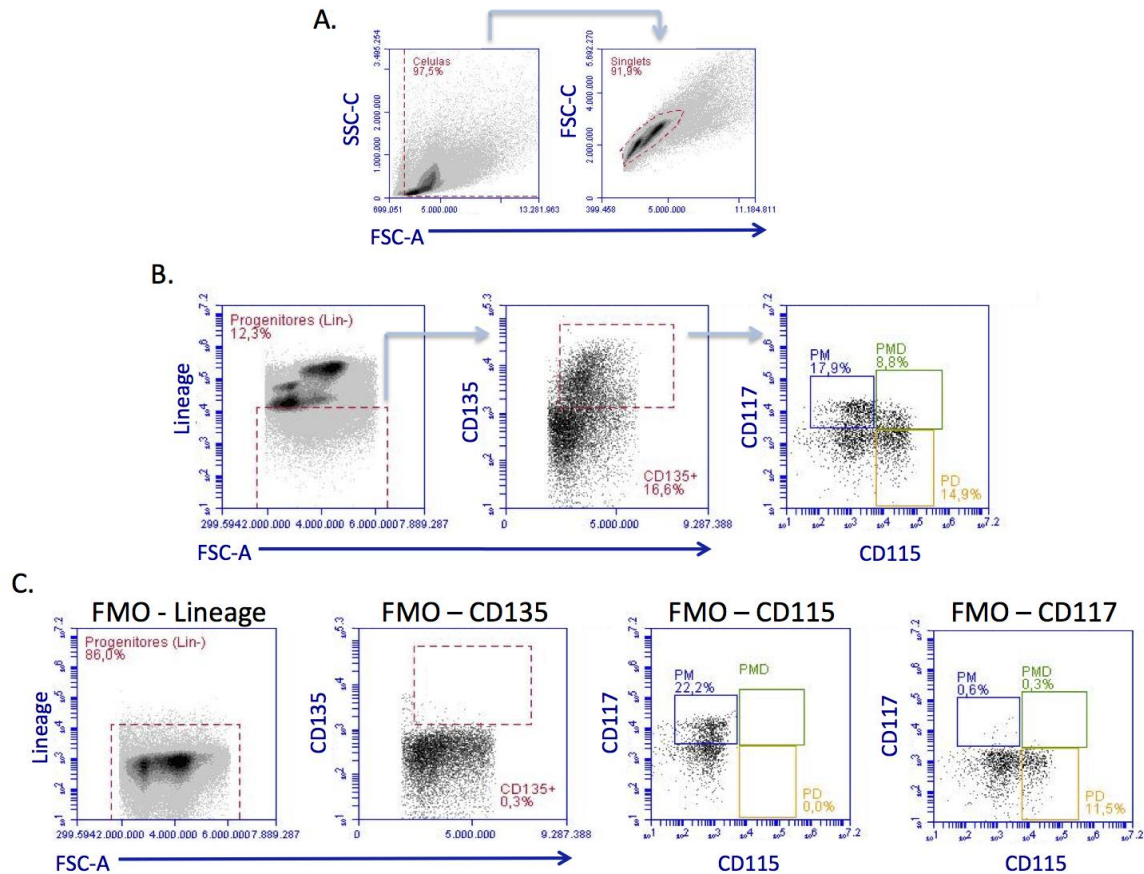


Figura 2: Estratégia de análise utilizada em citometria fluxo de medula óssea. (A) Eliminação de *debris* e *doubles*. (B) Delimitação das populações de precursores de interesse a partir de populações Lineage⁻ e CD135⁺, respectivamente. (C) Amostras de FMO (*fluorescence minus one*) para confirmação de marcações positivas para cada marcador.

3.9 Modelo de lesão hepática

Os camundongos foram submetidos a um jejum de 15 horas na noite anterior ao experimento e então tratados com APAP, por via oral, dissolvido em salina estéril aquecida (600mg/kg para fêmeas e 500mg/kg para machos). Animais controle receberam apenas o veículo aquecido. Para a coleta de amostras, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de ketamina e xilazina e submetidos a uma laparotomia. O sangue foi coletado para

obtenção do soro e o fígado foi retirado e dividido em fragmentos para a realização de histologia (H&E) e ensaios bioquímicos.

Para determinar a atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro utilizamos o kit transaminase ALT cinético (Bioclin). O ensaio cinético é o método recomendado pela *International Federation of Clinical Chemistry*.

3.10 Avaliação histológica do fígado

Os fígados foram lavados com salina e seu lobo inferior foi fixado em formol 4% tamponado. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. Cortes teciduais de 6 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo e corados com hematoxilina & eosina. A visualização dos cortes foi feita em um microscópio óptico BX41 (Olympus) e as imagens obtidas utilizando uma câmera Moticam 2500 (Motic) e o *software* Motic Image Plus 2.0ML.

Para análise histopatológica, as lâminas foram observadas em toda sua extensão e feitas 3 imagens aleatórias de cada fígado a fim de obter uma média representativa do tecido como um todo. A estimativa do grau de lesão hepática foi avaliada subjetivamente considerando o grau de necrose dos hepatócitos e infiltrado inflamatório seguindo os critérios da tabela abaixo:

Tabela 2 - Escore de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão hepática

Score	Crítérios
1	Ausência de lesão - tecido saudável.
2	Poucas camadas de hepatócitos necróticos (1-5) ao redor das veias centrolobulares e presença de infiltrado inflamatório restrito a essas regiões.
3	Áreas de necrose ao redor das veias centrais iniciando contato entre zonas de necrose adjacentes. Presença de infiltrado inflamatório mais abundante.
4	Zonas necróticas extensas ocupando de 1/3 a 1/2 do campo com infiltrado inflamatório em todo o tecido.
5	Zonas de necrose ocupando 3/4 do campo e indistintas em relação à veia central de origem. Pouco ou nenhum parênquima saudável.

Tabela 2: Escore de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão hepática. Critérios adotados para avaliação do grau de lesão tecidual decorrente de sobredose de APAP.

3.11 Medida de função hepática por depuração de verde de indocianina (cardiogreen)

Os camundongos receberam, por via endovenosa, 20mg/kg de verde de indocianina diluída em água de injeção. Exatos vinte minutos após a injeção, os animais foram anestesiados por via endovenosa e submetidos a uma laparotomia para retirada do sangue. O sangue foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro. Em placas de 96 poços, plaqueamos 240µl de soro puro por poço, e nas nas diluições de 1:5 e 1:10 . Foi feita uma curva padrão de 8 pontos com diluições seriadas de 1:2, sendo o primeiro ponto a 100µg/ml. A leitura foi realizada em 800nm.

3.12 Contagem de sangue total e diferencial

Para contagem de leucócitos totais os animais foram imobilizados em um suporte de acrílico deixando apenas a cauda exposta. A cauda foi previamente aquecida com a aproximação de uma lâmpada incandescente para aumentar o fluxo sanguíneo local e facilitar o sangramento. Com uma tesoura cirúrgica, foi retirado aproximadamente 1cm da extremidade da cauda e coletado 5µl de sangue diluído em Turk para contagem em câmara de Neubauer.

3.13 Análise estatística

A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, o teste foi one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. No caso de os dados não possuírem distribuição normal, o teste de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis (para três ou mais) seguido do pós-teste de Dunn foram aplicados. Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (epm), e são referentes a pelo menos dois experimentos independentes, contendo no mínimo 3 replicatas. O nível de significância foi definido como $p < 0.05$. Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da microcirculação hepática por microscopia intravital

Inicialmente, se fez necessário estabelecer as estruturas vasculares que compõe o microambiente hepático para determinarmos os parâmetros de análise localizacional celular por microscopia intravital. Para isso, os animais receberam uma quantidade conhecida de albumina conjugada com um corante fluorescente (FITC albumina), que ao se distribuir pelos vasos corpóreos, revelaria o sentido do fluxo sanguíneo ao longo do tempo. Os animais foram filmados por 10 minutos sendo capturadas imagens a intervalos regulares (4 segundos), possibilitando a captura de *frames* estáticos de cada momento da distribuição do corante. Como demonstrado na FIG. 3, determinamos como é, por microscopia intravital, que o fluxo sanguíneo hepático flui dos vasos que compõem o espaço porta para os sinusóides e desses para as veias centrais. Sendo assim, a sequência de imagens obtida nos permitiu estabelecer que os vasos sanguíneos de grande calibre utilizados como referência para quantificação da distribuição de células de Kupffer (a seguir) são veias centrolobulares. Além disso, foi possível determinar que as estruturas anatômicas hepáticas como, por exemplo, os espaços porta, são vistas de formas distintas na microscopia confocal intravital e cortes histológicos.

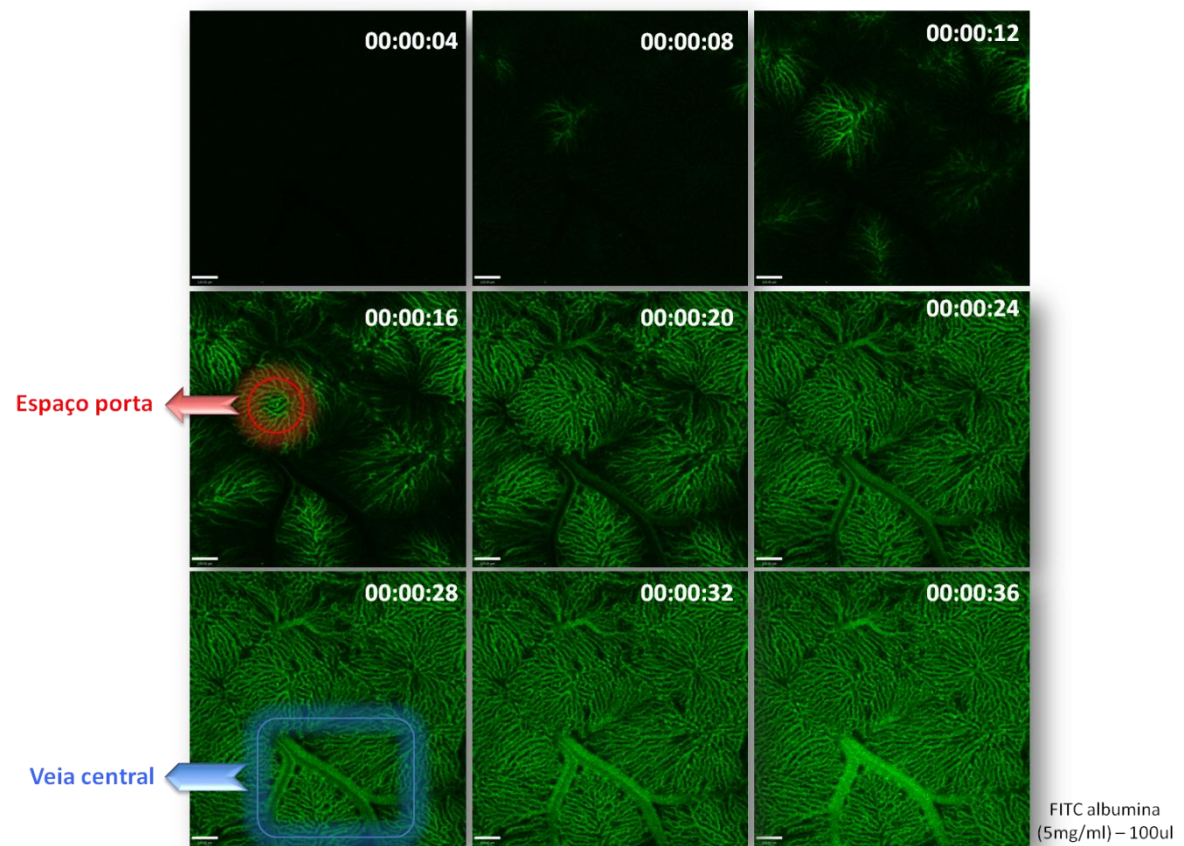


Figura 3: Imageamento *in vivo* da distribuição intravascular de FITC albumina revela especialmente a localização dos espaços porta e de veias centrolobulares. Sequência de imagens de vídeo de microscopia intravital de fígado injetado com 100µl de FITC albumina (5mg/ml) evidenciando o sentido do fluxo sanguíneo no tecido, chegando pelo espaço porta, seguindo para os sinusóides e desses para as veias centrais de onde o fluxo é levado para fora do tecido hepático. Objetiva de 10x.

4.2. Visualização de células hepáticas não-parenquimais *in vivo*

A fim de estudar a dinâmica de macrófagos hepáticos, optamos, a princípio, por definir com clareza nossa população de interesse em relação às demais células hepáticas não parenquimais. Para isso, utilizamos marcadores e animais transgênicos com fluorescências específicas para visualização dessas células por microscopia intravital.

4.2.1. Células de Kupffer

Para observação de células de Kupffer (CKs) utilizamos o anticorpo anti-F4/80 conjugado com PE, um marcador de superfície presente em fagócitos mononucleares e altamente expresso em macrófagos residentes (LIN *et al.*, 2005). CKs encontram-se exclusivamente no lúmen dos sinusóides hepáticos e distribuídos de forma não-aleatória no tecido, sendo encontradas preferencialmente nas Zonas Sinusoidais (FIG. 4A). Em condições normais, a quantidade de macrófagos residentes por área de tecido é aproximadamente duas vezes maior nas Zonas Sinusoidais, o que equivale a 64% do total de células de Kupffer por campo (FIG. 4B e C). Além disso, possuem volume médio de similar ($\sim 1.300 \mu\text{m}^3$) em ambas as zonas (FIG. 4D); ou seja, embora sua distribuição não seja homogênea, não apresentam variação morfológica evidente entre as zonas de interesse.

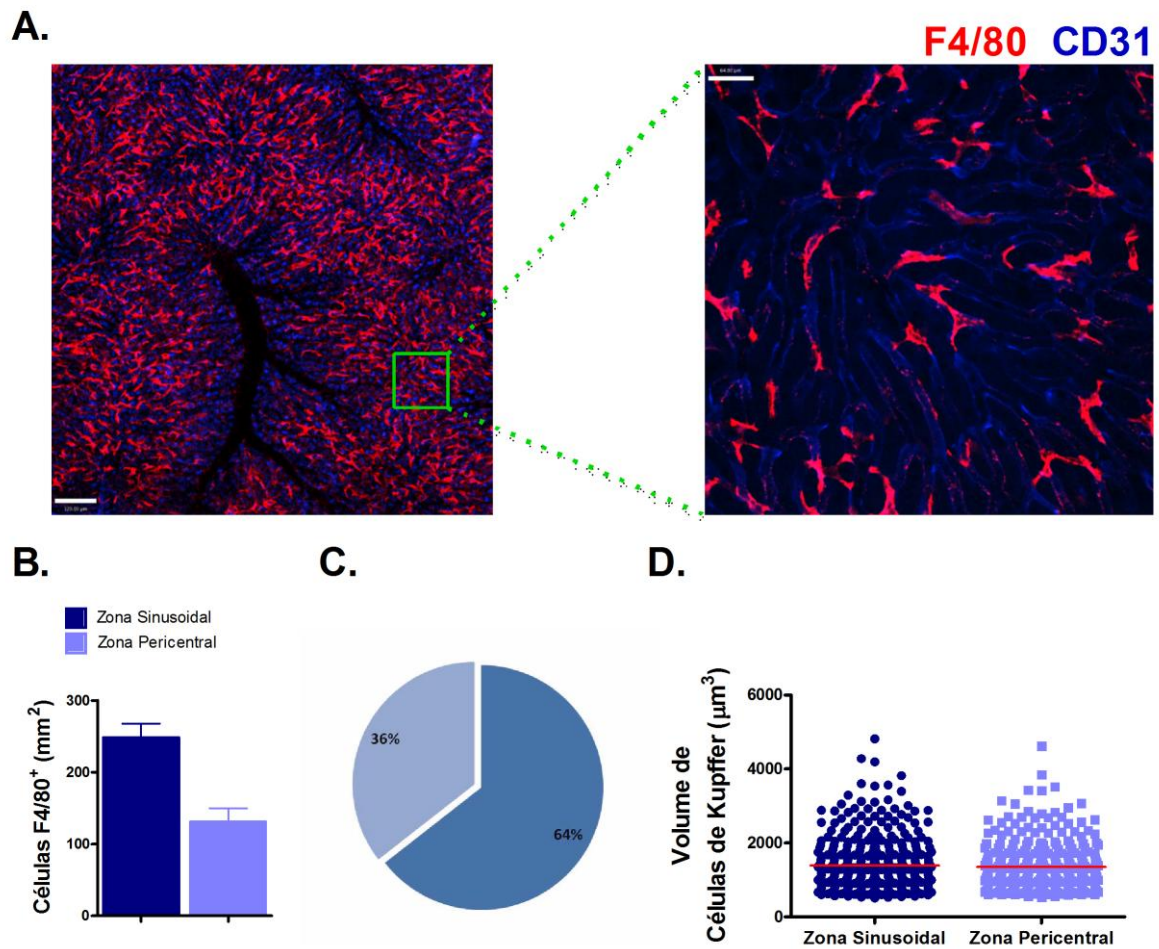


Figura 4: Células de Kupffer localizam-se preferencialmente nas zonas sinusoidais. (A) Microscopia intravital de fígado saudável com células de Kupffer coradas com anti-F480 (vermelho) ressaltando sua distribuição não homogênea e sua localização no interior dos capilares sinusóides. Objetivas 10x e 40x. (B) Quantificação de células de Kupffer por mm² em cada uma das zonas. (C) Representação da distribuição das células de Kupffer em porcentagem. (D) Volume médio de macrófagos hepáticos nas zonas de interesse.

4.2.2. Células dendríticas

Outra população residente hepática de grande relevância e de potencial científico ainda pouco explorado são as células dendríticas. Por meio de imagens de MIV de animais $CX3CR1^{+/GFP}CCR2^{+/RFP}$ definimos que, diferente das células de Kupffer, as células dendríticas hepáticas estão situadas fora dos capilares sinusóides e apresentam distribuição homogênea no tecido com cerca de 420 células por mm^2 e volume aproximado de $2000\mu m^3$ (FIG. 5A-C). Apesar do receptor de fractalquina/CX3CL1 (CX3CR1) não ser exclusivo de células dendríticas, essas células são as únicas residentes positivas para GFP no ambiente hepático em condições normais. Uma vez que a molécula de CD11c é considerada um marcador característico utilizado para identificar células dendríticas, fizemos também o uso de animais CD11c-YFP para confirmar se tais células GFP-positivas se tratavam mesmo de células dendríticas. Para isso, adquirimos imagens de microscopia intravital de ambos os animais. Dada a enorme semelhança morfológica e localizacional dessas células ($CX3CR1^{+/GFP}$ e $CD11c^+$), estabelecemos que se tratam da mesma população celular, que neste caso são as células dendríticas hepáticas (FIG. 5D). Feito isso, com base na localização e morfologia, averiguamos que as células positivas para F4/80 e CD11c/CX3CR1 no fígado saudável consistem em duas populações distintas, sendo células de Kupffer ($F4/80^+CX3CR1^-$) e células dendríticas ($CX3CR1^+$ ou $CD11c^+$ e $F4/80^-$), respectivamente (FIG. 5E).

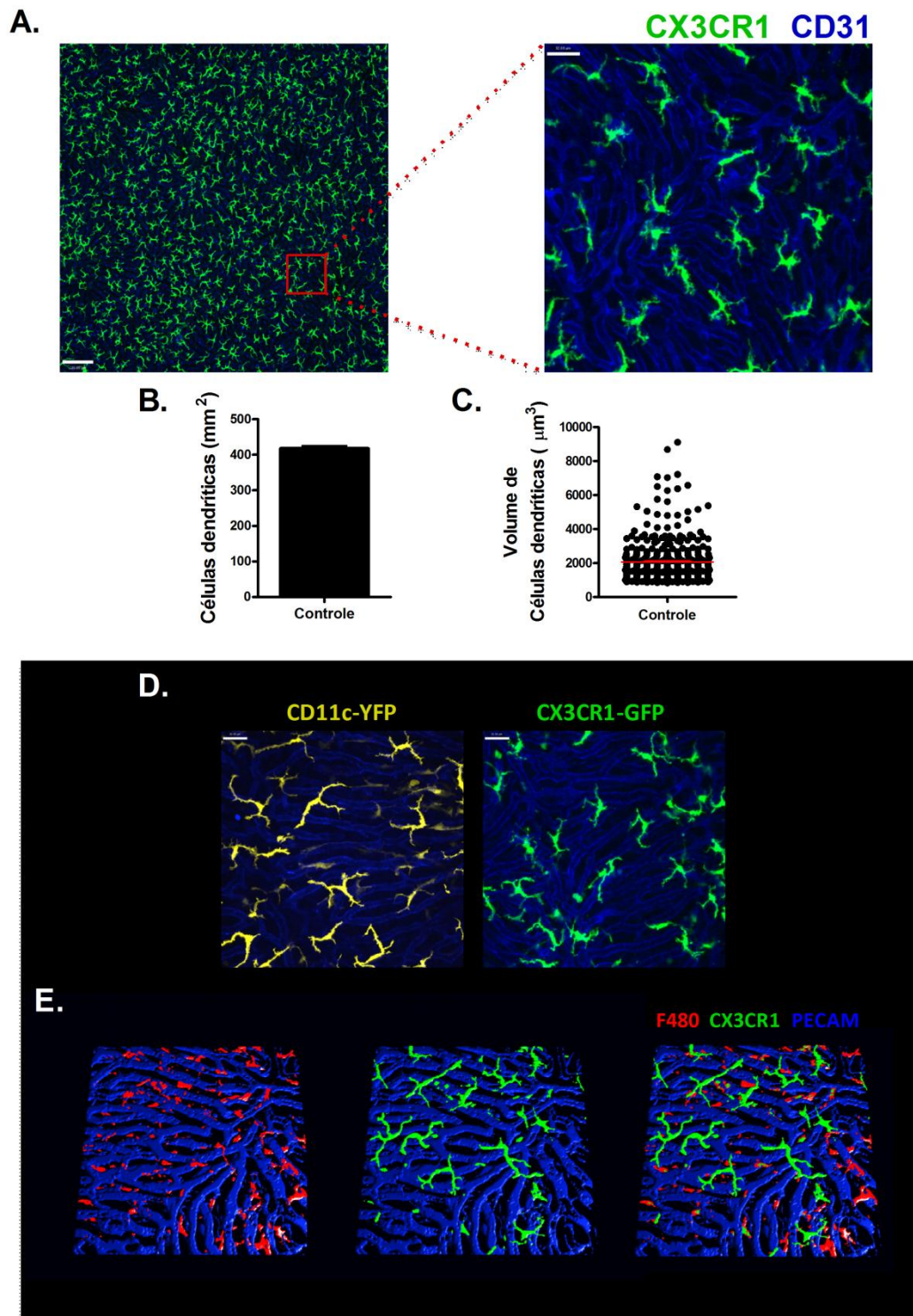


Figura 5: Células dendríticas distinguem-se de células de Kupffer por sua morfologia e localização características. (WAN *et al.*) MIV de animais $CX3CR1^{+/GFP}CCR2^{+/RFP}$ evidenciando a distribuição homogênea de células dendríticas (verde) e seu volume constante. Sinusóides marcados com anti-CD31 BV 421, objetiva de 10x. (D) Microscopia intravital de fígado de animais CD11c-YFP com células dendríticas em amarelo e animais $CX3CR1^{+/GFP}CCR2^{+/RFP}$ com células dendríticas em verde. Células endoteliais marcadas com anti-CD31 (azul). Objetiva 40x. (E) Imagem tridimensional de microscopia intravital de animal $CX3CR1^{+/GFP}CCR2^{+/RFP}$ evidenciando células de Kupffer marcadas com anti-F480 PE (vermelho), células dendríticas (verde) e sinusóides marcados com anti-CD31 BV 421, objetiva de 40x.

4.2.3. Células de Ito (células estreladas hepáticas)

Assim como as células dendríticas, as células de Ito também estão localizadas no espaço de Disse, mas ao contrário das demais, se trata de uma população de difícil marcação *in vivo* e existem escassos animais modificados geneticamente com a finalidade de visualizá-las. Entretanto, células de Ito são ricas em moléculas de vitamina A que se encontram estocadas em grânulos em seu citoplasma (GOTZE *et al.*, 2015). Moléculas de vitamina A são conhecidas por sua autofluorescência (em 405nm) e *photobleaching* característicos o que permite identificar e visualizar indiretamente essas células. Em imagens de microscopia intravital de fígado, observamos que a distribuição dos grânulos de vitamina A é homogênea no tecido (FIG. 6A) e ocupa, aproximadamente, 1% da área total da imagem (FIG. 6B). Após o estabelecimento da metodologia de visualização de grânulos de vitamina A por microscopia intravital, investigamos se tais grânulos estavam presentes também em células de Kupffer e células dendríticas. Como observado na Fig. 6, as gotículas autofluorescentes não colocalizam nem com CKs e nem com CDs, sendo então provavelmente estoques de vitamina A presentes nas células de Ito (FIG. 6C).

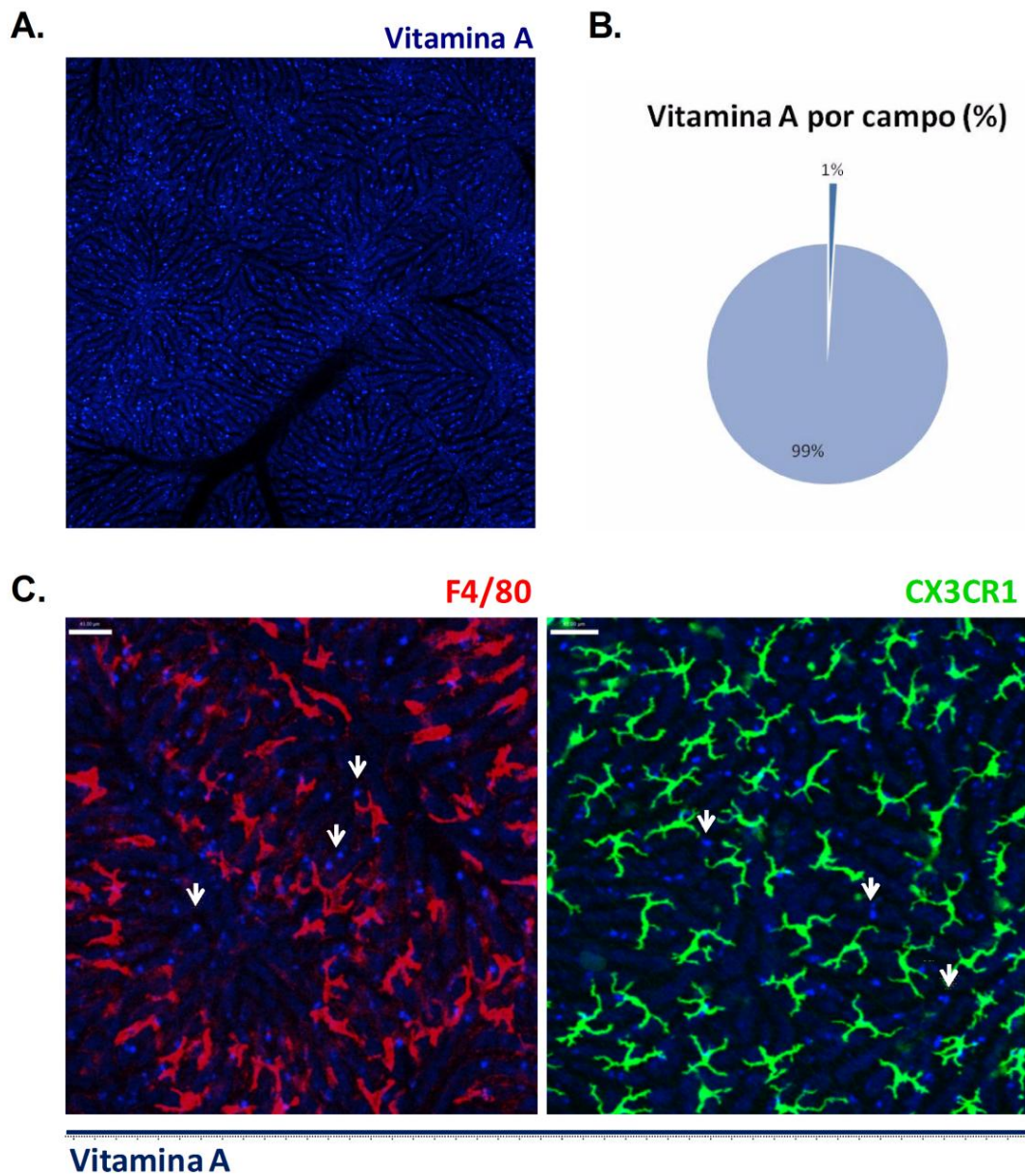


Figura 6: Grânulos autofluorescentes de vitamina A revelam a localização de células de Ito e não estão presentes em células de Kupffer e células dendríticas. (A) MIV de fígado de animal saudável mostrando distribuição de grânulos de vitamina A no fígado, objetiva 10x. (B) Representação gráfica da área ocupada pelos grânulos de vitamina A (%). (C) MIV de fígado de animais WT e $CX3CR1^{+/GFP}CCR2^{+/RFP}$ comprovando que os grânulos de vitamina A não colocalizam com células de Kupffer e células dendríticas, respectivamente. Macrófagos marcados com anti-F480 PE (vermelho) e células dendríticas positivas para CX3CR1 (GFP). Objetiva 10x.

4.3. Depleção de células fagocíticas hepáticas por injeção de lipossomos contendo clodronato

O clodronato é uma droga de uso bastante comum para depleção de macrófagos em diversos tecidos. No fígado, por sua vez, após o tratamento com CLL, as células de Kupffer originais - provenientes de precursores do saco vitelínico e mantidas no tecido adulto por autorrenovação - são completamente eliminadas. A depleção total dessas células se dá 48 horas após o tratamento, o que padronizamos a partir daqui chamarmos de dia 0 (zero). O CLL, entretanto, não altera a distribuição normal de vitamina A (FIG. 7), sugerindo que as células de Ito não são afetadas durante o processo de depleção.

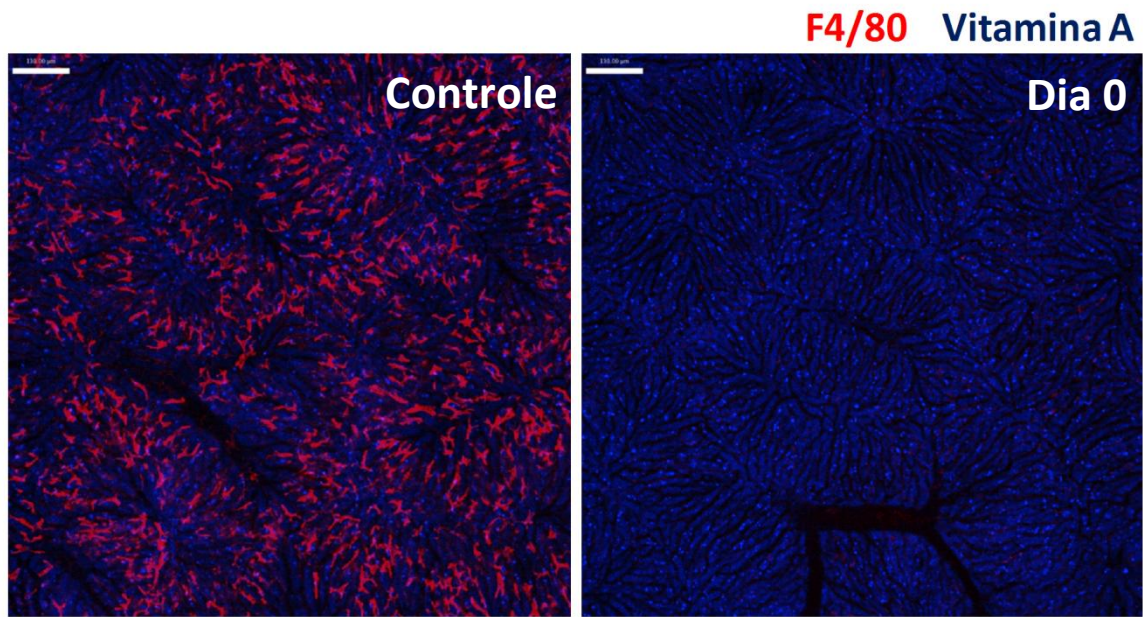


Figura 7: Tratamento com clodronato depleta totalmente os macrófagos hepáticos. MIV de animal saudável sem tratamento prévio mostrando quantidade e distribuição normal de células de Kupffer e MIV 48 horas após o tratamento com CLL evidenciando depleção completa de macrófagos hepáticos. Células de Kupffer marcadas com anti-F480 PE (vermelho) e grânulos de vitamina A em azul. O tratamento com CLL não altera o padrão normal de distribuição de vitamina A. Objetiva 10x.

4.4. O tratamento com clodronato promove a eliminação de macrófagos hepáticos por apoptose

Embora seja estabelecido na literatura que o tratamento com clodronato induz morte celular por apoptose (VAN ROOIJEN & SANDERS, 1996), nós investigamos se no nosso modelo de estudo a não visualização de células de Kupffer após o tratamento com CLL era devido ao *downregulation* do receptor F4/80, impedindo sua marcação com o anticorpo. Para isso, empregamos uma outra estratégia de visualização de CKs utilizando animais geneticamente modificados que expressam GFP sob controle da lisosima M (animais LysM-eGFP), proteína produzida de forma constitutiva pelas células. Dessa forma, é possível visualizar granulócitos (alto brilho) e monócitos/macrófagos (menor brilho) *in vivo* devido à sua expressão de GFP associado à proteína. Para confirmar que o CLL de fato depleta as CKs, animais LysM-eGFP foram tratados com CLL e após 48 horas realizada a microscopia intravital, onde neste momento, estes animais também receberam o anti-F4/80 para confirmar a visualização de quaisquer CKs remanescentes (FIG. 8). O resultado confirmou que o clodronato elimina exclusivamente células GFP de baixo brilho, com morfologia característica de macrófagos hepáticos, e ainda não altera a quantidade de granulócitos circulantes.

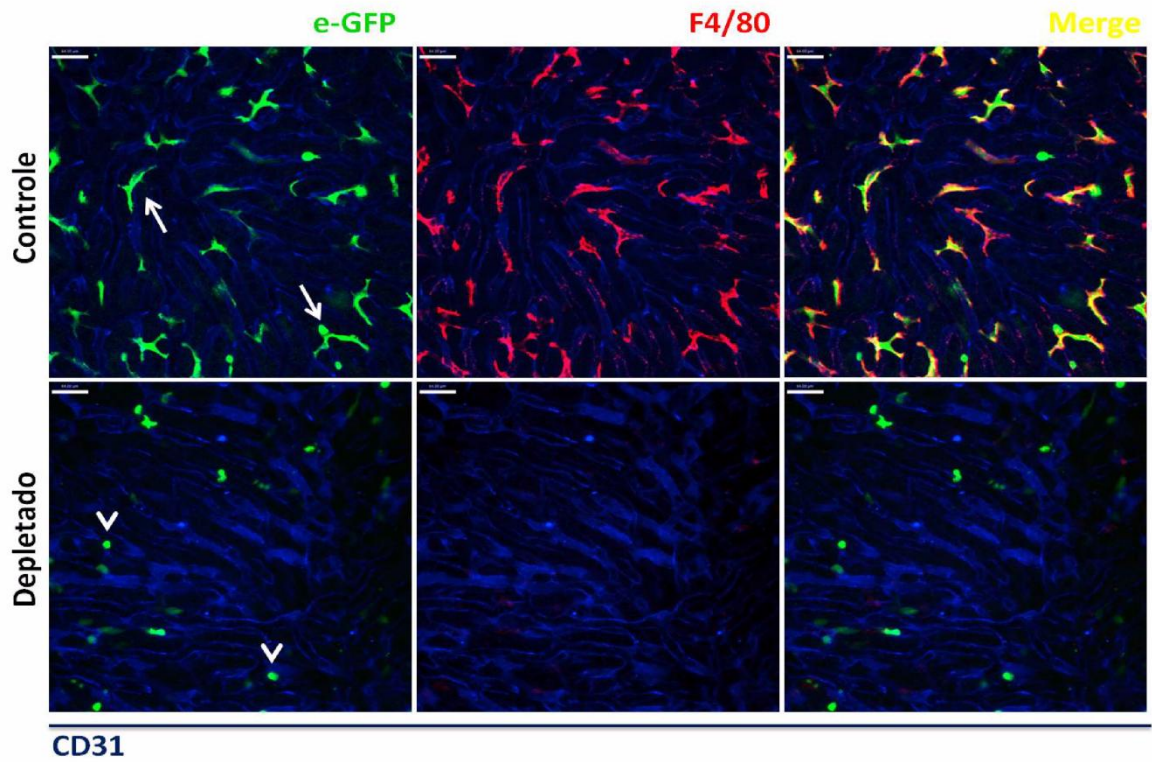


Figura 8: A não visualização de células $F4/80^+$ é resultado da eliminação dessas células e não de *downregulation* do receptor. MIV de fígado de animais LysM controle e depletado. O animal controle apresenta neutrófilos GFP e macrófagos positivos para GFP (seta branca) e PE (anti-F4/80). Após o tratamento com CLL há eliminação completa de macrófagos hepáticos e manutenção de neutrófilos (cabeça de seta). Células endoteliais marcadas com anti-CD31 BV421 (azul). Objetiva 40x.

4.5. O tratamento com clodronato depleta células dendríticas hepáticas

Embora o clodronato seja amplamente usado para depleção de macrófagos teciduais, observamos que no nosso modelo de estudo tal tratamento causa depleção de aproximadamente 90% de células dendríticas (FIG. 9A-B). Dessa forma, é importante considerar que quaisquer alterações subsequentes não sejam atribuídas a ausência ou modificação/substituição de uma única população.

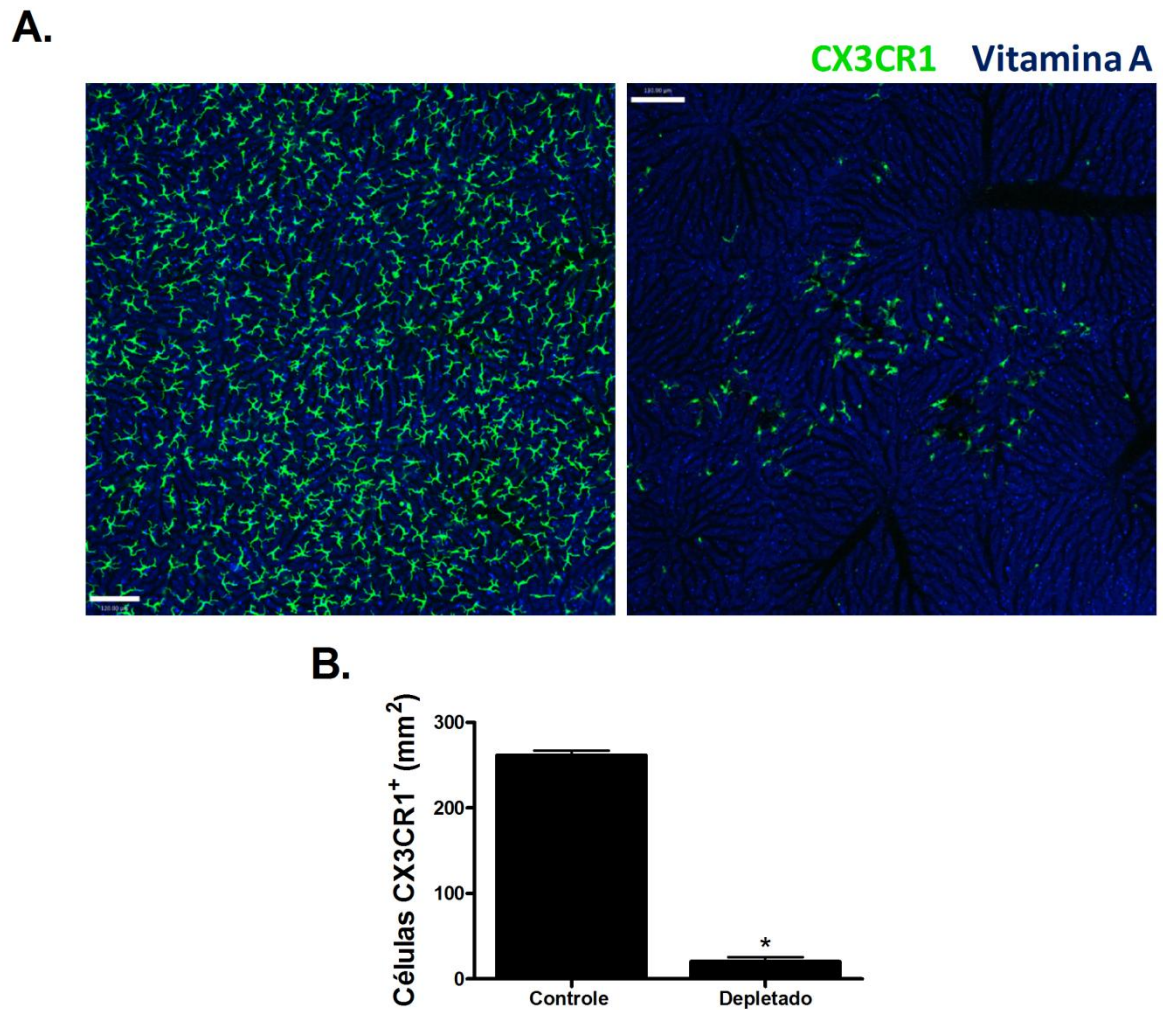


Figura 9: Tratamento com clodronato depleta células dendríticas hepáticas. (A) MIV de animal saudável sem tratamento prévio mostrando quantidade e distribuição normal de células de células CX3CR1⁺ e MIV 48 horas após o tratamento com CLL evidenciando depleção de grande parte das células dendríticas originais. Células dendríticas CX3CR1⁺ (verde) e grânulos de vitamina A em azul. O tratamento com CLL não altera o padrão normal de distribuição de vitamina A. Objetiva 10x. (B) Quantificação de células por área antes e após tratamento com CLL, evidenciando depleção de, aproximadamente, 90% de células dendríticas. *p<0,05 em relação ao controle.

4.6. O tratamento com clodronato não altera parâmetros funcionais hepáticos

Considerando que o tratamento com CLL elimina completamente os macrófagos residentes e grande parte das células dendríticas, populações abundantes no fígado, investigamos se essa depleção altera parâmetros funcionais hepáticos. De maneira importante, podemos observar que o protocolo de depleção de células fagocíticas hepáticas não causa lesão hepática detectável (FIG. 10A), nem tampouco altera a função hepática (FIG. 10B). Ainda, não observamos alterações microscópicas (FIG. 10C) e nem alterações a nível de leucócitos totais circulantes (FIG. 10D).

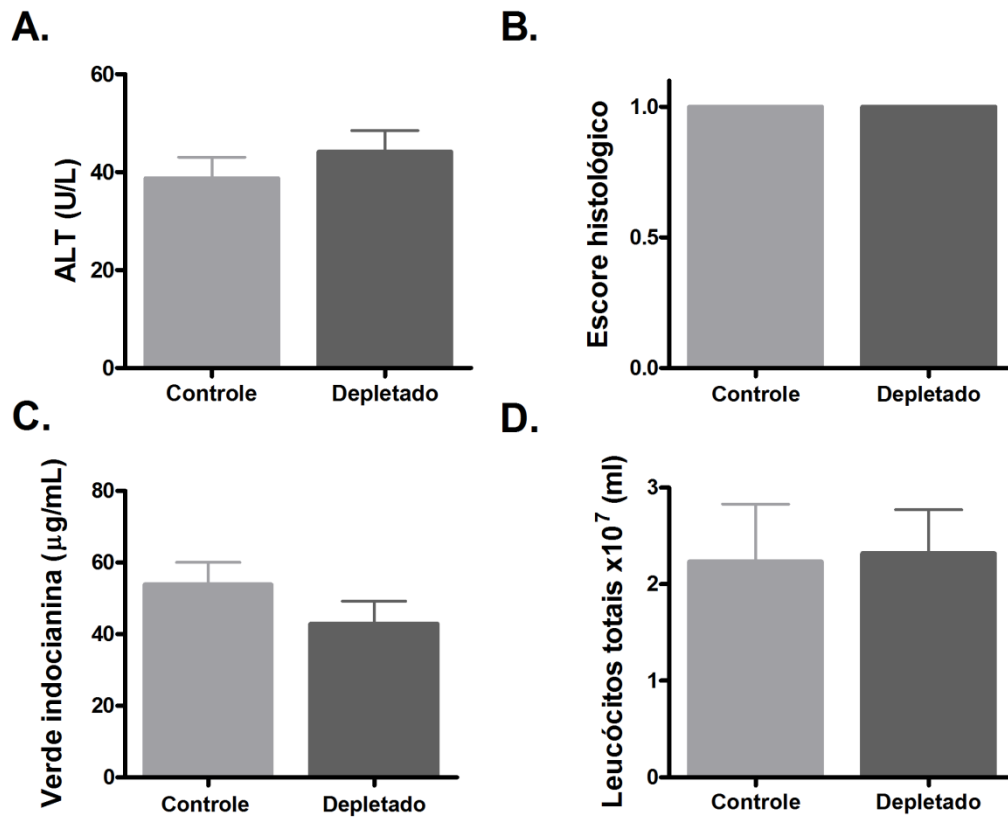


Figura 10: Depleção de células de Kupffer e células dendríticas hepáticas não causa lesão e não altera função hepática. (A) Medida de lesão hepática por meio de dosagem a alanina aminotransferase (ALT). Ambos os animais, controle e depletado, apresentam níveis basais da enzima circulante. (B) Histologia de fígado, corada com H&E, de camundongos controle e tratado com CLL (48 horas) quantificada em escore histopatológico evidenciando que não há alterações microscópicas evidentes. (C) Medida de função hepática por meio de depuração de verde de indocianina. Ambos os animais, controle e depletado, apresentam taxa similar de depuração do corante. (D) Contagem de leucócitos totais no sangue não apresenta alteração.

4.7. O tratamento com clodronato altera a quantidade de precursores hematopoiéticos na medula óssea

Além de depletar macrófagos e outras células residentes, como as células dendríticas hepáticas, investigamos se o tratamento com clodronato também altera populações de precursores presentes na medula óssea. Após estabelecer os critérios de análise ilustrados na metodologia, definimos os *gates* finais correspondentes a: precursores de macrófagos (PM - Lin⁺CD135⁺CD117⁺CD115⁻), precursores comuns de macrófagos e dendríticas (PMD - Lin⁺CD135⁺CD117⁺CD115⁺) e precursores de dendríticas (PD - Lin⁺CD135⁺CD117⁻CD115⁺). No fígado, embora a morte e remoção completa das células seja concluída 48 horas após a administração do clodronato, aproximadamente 6 horas após o tratamento grande parte das células já morreram ou estão morrendo por apoptose (dados não demonstrados). Por esse motivo, escolhemos o tempo de 24 horas pós CLL para análise da dinâmica de precursores mielóides, pois julgamos tempo suficiente para o tecido hepático sinalizar tal desequilíbrio para o organismo e isso ter possíveis efeitos diretos na medula óssea. Ainda, acompanhamos um grupo de animais até tempos mais tardios (4 dias pós CLL).

Não há alteração significativa na população de precursores gerais da medula (células negativas para marcadores de linhagem - lineage⁻) nos grupos analisados. A população de precursores CD135⁺ sofre redução 24 horas pós CLL seguido de completo restabelecimento no 4º dia. Tal variação é refletida nas populações de precursores específicos para dendríticas (PD) e na população de precursores comuns para macrófagos e dendríticas (PMD), como ilustrado na FIG. 11A. Avaliando as populações finais de interesse, observamos que precursores de macrófagos (MARQUES *et al.*) sofrem aumento de aproximadamente 40% nas primeiras 24 horas pós CLL, reduzindo a valores normais no 4º dia (FIG. 11B). Os precursores comuns de macrófagos e dendríticas (PMD) reduzem no primeiro dia e se restabelecem em tempos posteriores (FIG. 11C). Precursores de dendríticas, por sua vez, são quase completamente eliminados 24 horas pós CLL e no 4º dia aumentam para níveis acima dos valores iniciais (FIG. 11D).

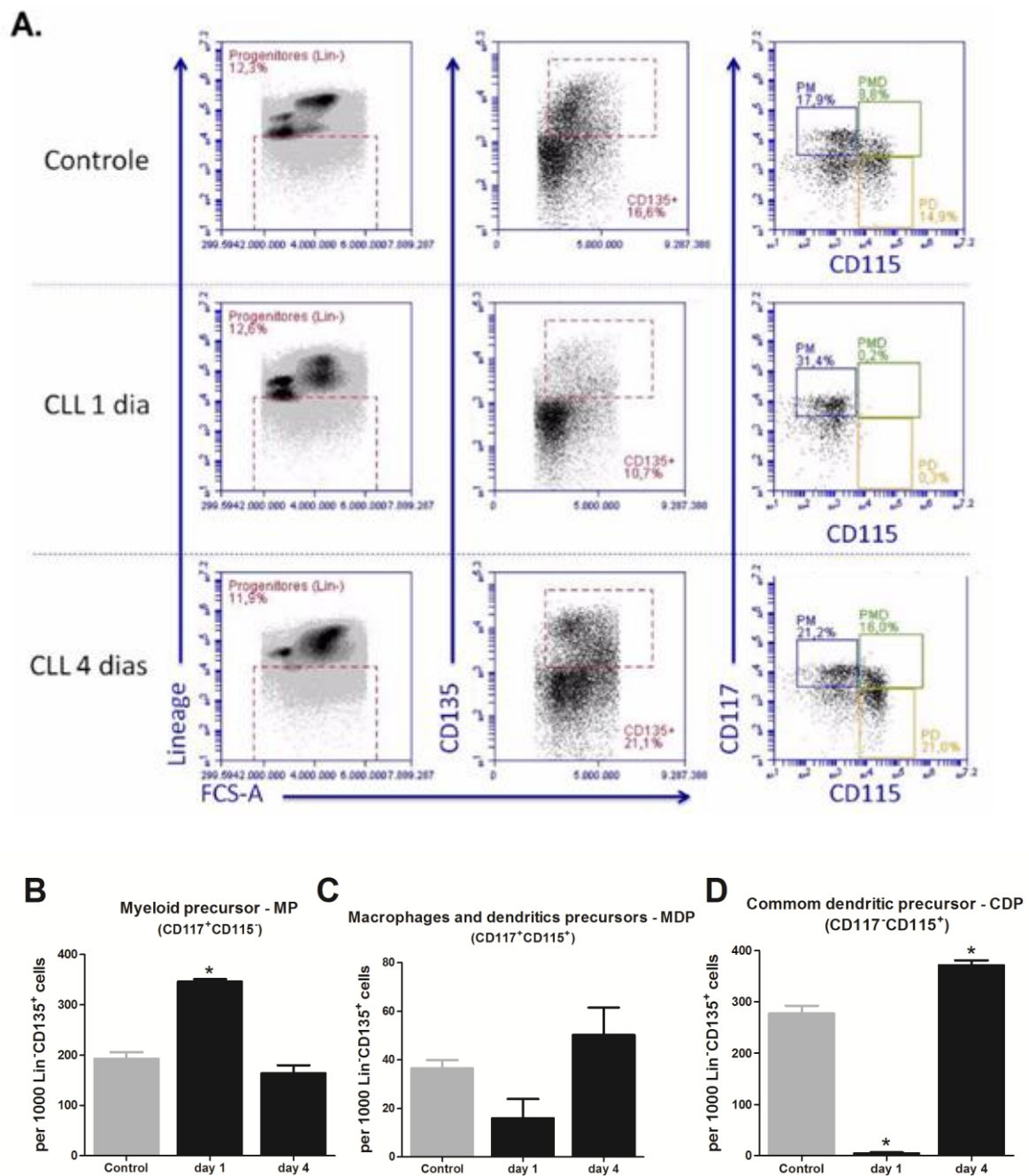


Figura 11: O tratamento com clodronato depleta precusores comuns de macrófagos/dendríticas e precusores exclusivos de dendríticas na medula óssea. (A) Gráficos representativos dos grupos controle, CLL dia 1 e CLL dia 4 em relação à estratégia de análise descrita na metodologia. (B) Precusores de macrófagos sofrem aumento significativo 24 horas pós CLL e retornam aos valores iniciais n 4º dia. (C) Precusores comuns de macrófagos e dendríticas sofrem redução seguida de aumento para valores próximos do controle. (D) Precusores de dendríticas são eliminados 24 horas após o tratamento com CLL e aumentam para valores maiores que os iniciais no 4º dia. * = $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.

4.8. Após depleção total de células de Kupffer, monócitos migram para o fígado dando origem a macrófagos originados de monócitos (MOMs) e assumindo a mesma localização e morfologia das células "originais"

Embora o tratamento com CLL deplete tanto células de Kupffer quanto células dendríticas, optamos inicialmente por estudar o repovoamento dos macrófagos hepáticos.

Dois dias após a depleção completa de células de Kupffer (dia 0) é possível observar a chegada de "novos" macrófagos (células F4/80⁺ arredondadas). No dia 5, o número de macrófagos residentes aumenta progressivamente, e no dia 10 já observamos valores populacionais semelhantes ao controle (FIG. 12A). Após o dia 10, onde a quantidade de células por área já atingiu valores similares ao controle, o número de células se mantém estável ao longo do tempo (FIG. 12B). No que diz respeito à distribuição, com exceção do dia 3 onde a distribuição entre as zonas Sinusoidal e Pericentral é homogênea, os demais tempos apresentam distribuição característica, similar ao animal controle, com predominância de macrófagos residentes nas Zonas Sinusoidais (FIG. 12C). Além do número de células e de sua localização, avaliamos ainda o volume dessas células ao longo do repovoamento hepático. Ao analisar todas as células de forma individual (FIG. 12D) foi possível estabelecer que células de Kupffer de animais analisados em tempos iniciais do repovoamento apresentam volume maior se comparado às originais ou às células de tempos mais tardios (FIG. 12E).

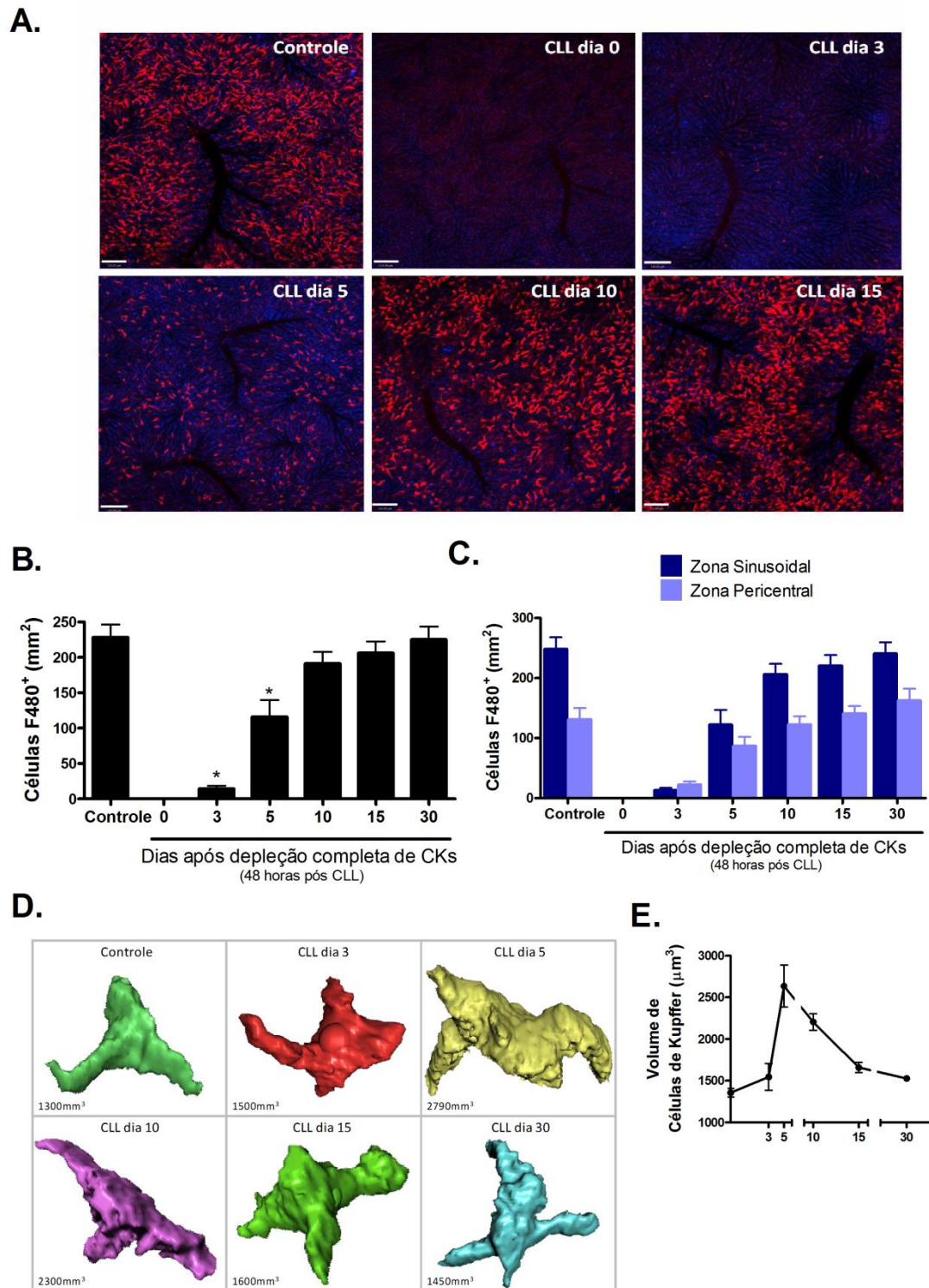


Figura 12: Após depleção completa, o fígado é repovoado por macrófagos originados de monócitos (MOMs) em mesmo número, distribuição e morfologia. (A) MIV de cinética de repovoamento de macrófagos hepáticos. Células de Kupffer marcadas com anti-F4/80 PE (vermelho) e vitamina A em azul. Objetiva 10x. (B) Células de Kupffer por mm² ao longo do repovoamento. (C) Células de Kupffer por mm² nas zonas de interesse ao longo do tempo pós depleção. (D) Macrófagos hepáticos em 3 dimensões evidenciando morfologia a variação do volume durante o repovoamento. (E) Representação gráfica da variação de volume de células de Kupffer observada ao longo do tempo.

4.9. Estudo da dinâmica de macrófagos hepáticos durante a lesão hepática

Após consolidar a dinâmica de repovoamento de macrófagos hepáticos em condições fisiológicas, bem como sua distribuição no tecido, decidimos avaliar a participação desses macrófagos residentes em um processo inflamatório hepático. Para isso, utilizamos um modelo de lesão e inflamação hepática medicamentosa induzida por sobredose de paracetamol (APAP). Nesse modelo, observamos que nas primeiras 24 horas após o tratamento, há extensa lesão hepática que pode ser estimada pelos elevados níveis de alanina aminotransferase (ALT) (FIG. 13A). Tal lesão parece ter relevância clínica, pois observamos concomitante disfunção metabólica hepática, estimada pela velocidade de depuração de verde de indocianina (FIG. 13B) e também pelo escore histológico característico de falência hepática e inflamação aguda (FIG. 13C-D). No terceiro dia após sobredose de APAP ainda se observam padrões alterados dos parâmetros analisados, e somente observamos recuperação completa 10 dias após o tratamento. Cerca de 25% dos animais não sobrevivem nas primeiras 24 horas de administração de APAP (dados não demonstrados).

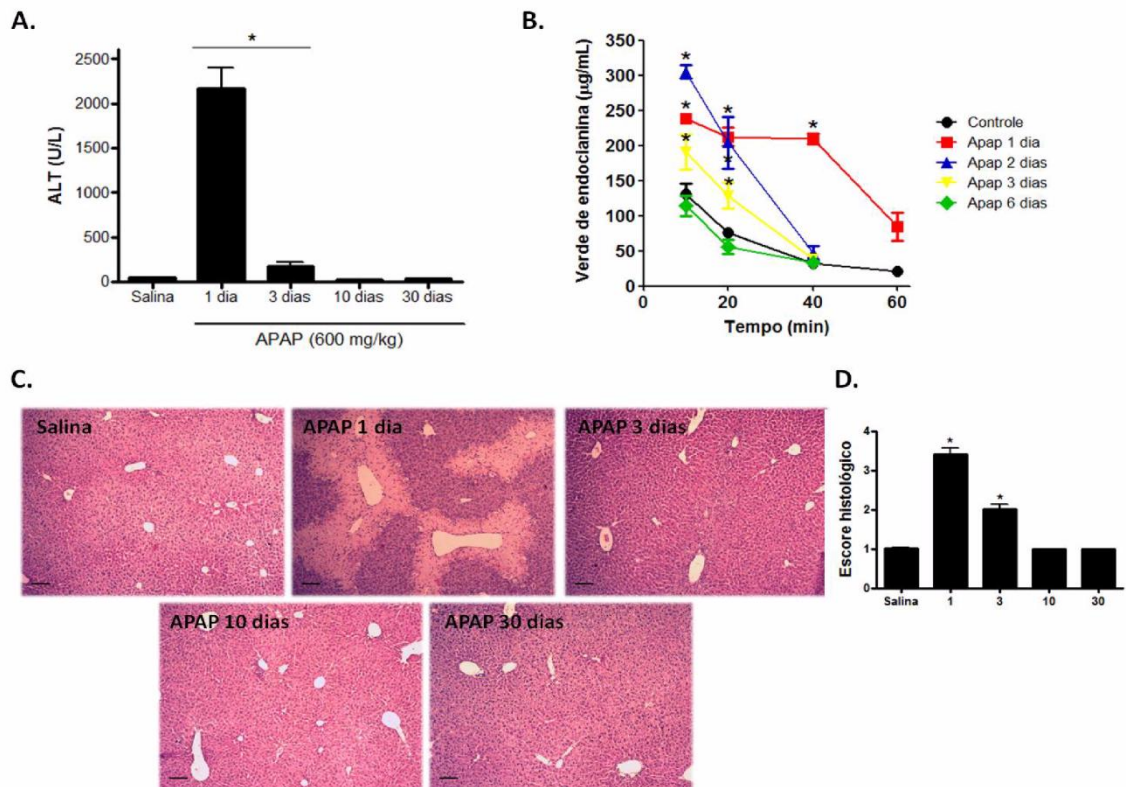


Figura 13: Sobredose de paracetamol (APAP) causa lesão tecidual e prejudica a função hepática. (A) Curva tempo resposta de APAP (600mg/kg). A lesão hepática apresenta pico de alanina aminotransferase (ALT) 24 horas após administração da droga e após 3 dias ainda se observa níveis circulantes anormais. (B) Curva tempo resposta de verde de indocianina, medida que indica perda de função através do atraso na depuração do corante em intervalos pré-estabelecidos. Animais com lesão hepática em fase aguda (1 dia) apresentam disfunção hepática, bem como em tempos mais tardios (2 e 3 dias), embora estes em menor proporção. Após 6 dias de APAP a função já foi reestabelecida. (C) Histologia de fígado, corada com H&E, de camundongos não tratados (salina) e tratados com APAP por 1, 3, 10 e 30 dias. (D) Escore histológico. * $p < 0,05$ em relação ao controle (salina).

4.10. Macrófagos hepáticos sofrem depleção parcial 24 horas pós APAP, seguido de inversão do seu padrão de distribuição normal no 3º dia

Após o tratamento com APAP (600mg/kg), observamos uma depleção parcial de macrófagos hepáticos no tempo agudo da lesão (24 horas). Isso indica que processos inflamatórios também podem, assim como o CLL, eliminar células de Kupffer originais. No terceiro dia, de maneira interessante, há um rearranjo na distribuição normal de F4/80⁺ no fígado. Observamos que há uma inversão completa na distribuição normal de células F4/80⁺, ou seja, nesse estágio do processo inflamatório tais células ocupam preferencialmente as Zonas Pericentrais, região onde em tempos anteriores se encontravam os focos de necrose. Nos tempos seguintes (10, 30 e 60 dias) observamos o reestabelecimento da distribuição original dos macrófagos hepáticos (FIG. 14A). A alteração na quantidade de células de Kupffer por área de tecido 1 dia pós APAP, assim como aumento no terceiro dia, é significativa em relação aos valores do animal não tratado (FIG. 14B). A redução de macrófagos no tempo agudo da lesão hepática induzida por APAP se dá, principalmente, na Zona Sinusoidal e pouca alteração ocorre na Zona Pericentral. No terceiro dia, por sua vez, os valores normais são reestabelecidos na Zona Sinusoidal e na Zona Pericentral observa-se aumento expressivo de células F4/80⁺ (FIG. 14C). Em uma visão geral, no tempo agudo (1 dia), embora haja redução, a proporção de células no tecido se mantém inalterada. Porém, no terceiro dia o aumento de células na Zona Pericentral justifica a alteração de proporção celular observada *in vivo* (FIG. 14D).

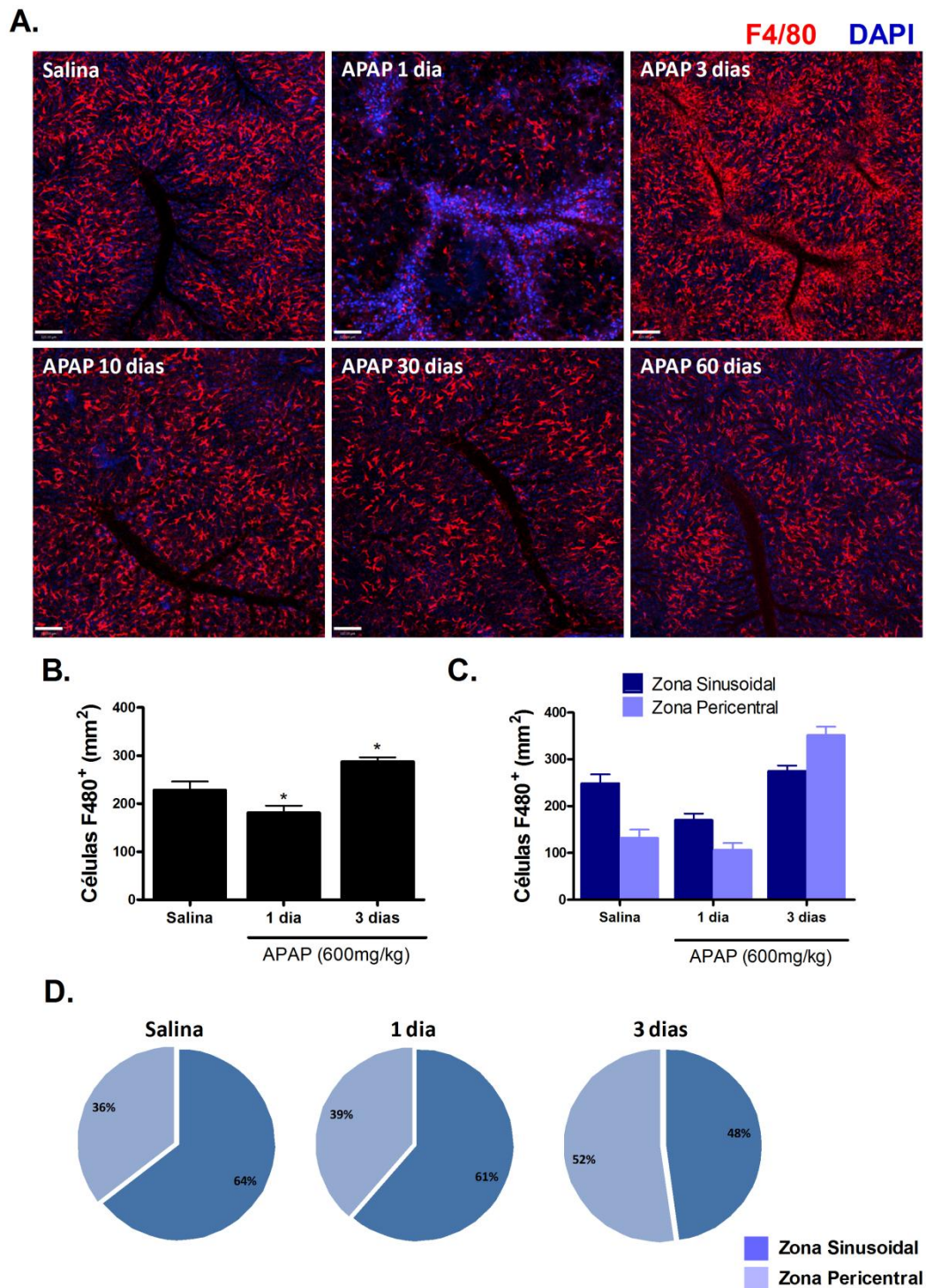


Figura 14: Lesão hepática induzida por APAP causa depleção parcial e inverte o padrão de distribuição de células de Kupffer. (A). Microscopia intravital de fígado de animais tratados com APAP (600mg/kg) evidenciando a cinética da lesão hepática. No processo inflamatório agudo (1 dia) há redução de macrófagos residentes seguido de uma inversão do padrão de localização normal dessas células no 3º dia. No 10º dia, o padrão normal é reestabelecido. (B) Quantidade de células F4/80⁺ por mm² no tecido hepático ao longo do processo inflamatório. * p<0,05 em relação ao salina. (C) Quantificação de células de Kupffer nas zonas de interesse evidenciando redução no dia 1 e inversão na distribuição no terceiro dia. (D) Representação gráfica da porcentagem de macrófagos residentes nas zonas de interesse ao longo do tempo evidenciando a alteração observada no terceiro dia.

4.11. Em animais depletados a lesão hepática induzida por APAP é mais severa e há uma tendência a maior perda de função.

Para estudarmos a participação das células fagocíticas hepáticas (CKs e CDs), induzimos lesão hepática em animais tratados com CLL. Na ausência de macrófagos e células dendríticas hepáticas, os animais com lesão induzida por sobredose de APAP apresentam níveis séricos de ALT mais elevados tanto 24 quanto 72 horas pós APAP em relação a animais não depletados também tratados com APAP (FIG. 15A). Tais lesões mais graves em animais depletados também são observadas pela análise histopatológica (FIG. 15B). Além de medidas de lesão hepática, investigamos a perda de função decorrente do processo inflamatório e observamos que no tempo agudo (24 horas) ambos os grupos apresentam perda de função significativa com uma tendência de perda maior nos animais depletados. De maneira interessante, após 72 horas tanto os animais controles quanto animais depletados apresentam função hepática normal (FIG. 15C).

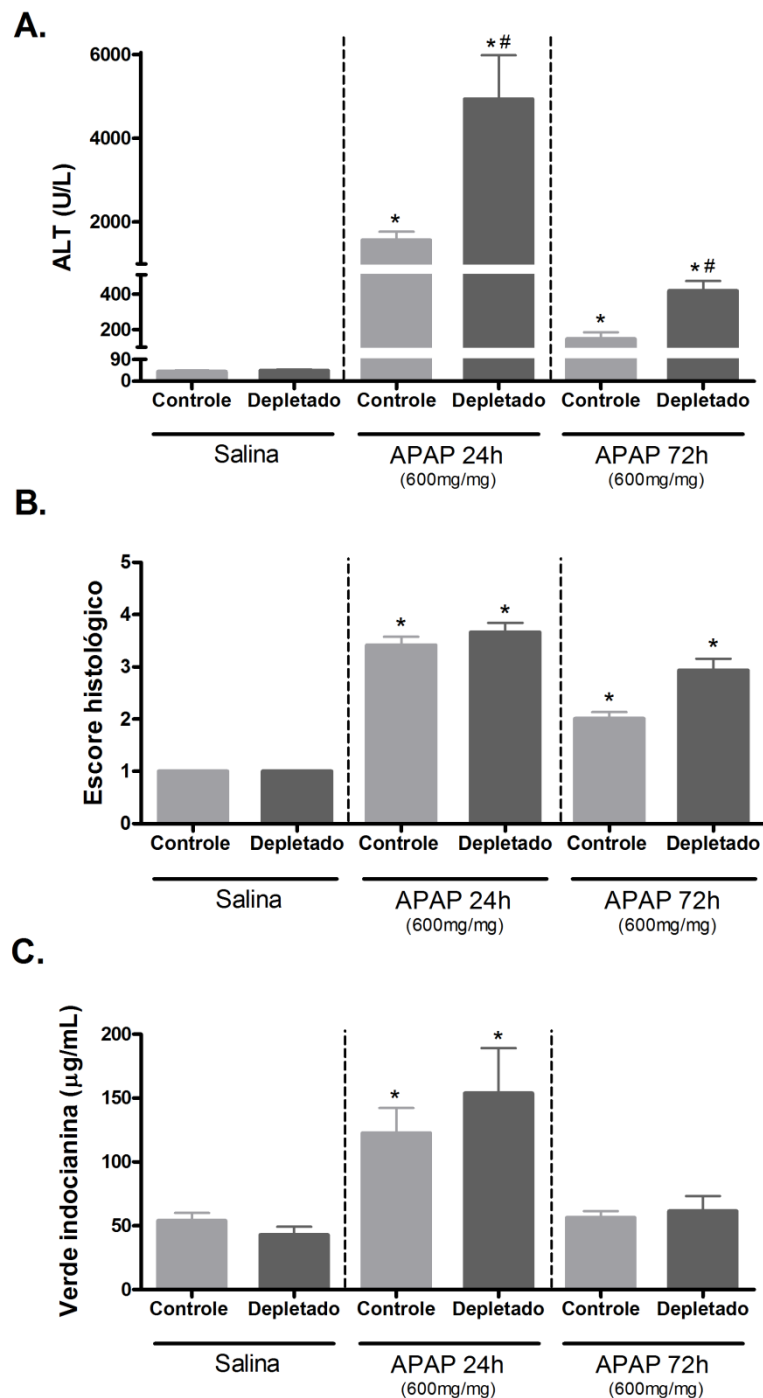


Figura 15: Animais depletados são mais sensíveis à lesão induzida por APAP e tendem a maior perda de função hepática. (A) Dosagem de ALT ilustrando níveis mais elevados da enzima circulante no animal depletado 24 e 72 horas pós APAP. (B) Escore histopatológico de fígado de camundongos tratados com APAP após 24 e 72 horas. Embora não haja diferença significativa entre os grupos, em ambos os tempos os animais depletados apresentam escore mais grave. (C) Medida de função hepática pela depuração de verde de indocianina indicando perda de função 24 horas pós APAP nos animais controle e depletado, com uma tendência a uma perda de função maior no segundo. Após 72 horas ambos os grupos já reestabeleceram a função inicial. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo salina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo tempo.

4.15. Depleção parcial de células dendríticas protege o fígado de lesão causada por sobredose de APAP

O tratamento com CLL depleta tanto células de Kupffer quanto células dendríticas hepáticas. Tendo em vista a piora na lesão hepática observada em animais depletados tratados com CLL, decidimos utilizar um modelo de depleção que eliminasse apenas uma população celular hepática a fim de elucidar se o agravamento observado seria atribuído a apenas um tipo celular ou a ambos. Para isso, utilizamos animais CD11c-DTR, que expressam o receptor para toxina diftérica símio sob controle do promotor de CD11c. Dessa forma, ao se administrar a toxina diftérica nesses animais, células com alta expressão de CD11c morrem por apoptose por ação da toxina.

Animais CD11c-DTR apresentam quantidade e distribuição normal de células de Kupffer e células dendríticas no fígado (dado não mostrado). Após o tratamento com a toxina não houve alteração na quantidade e distribuição de macrófagos hepáticos (células F4/80⁺) e observamos cerca de 40% de depleção de células dendríticas (células extravasculares CD11⁺; FIG. 16A). Em seguida, animais CD11c-DTR com e sem toxina foram tratados com APAP (500mg/kg) para estudarmos possíveis diferenças entre os grupos. O tratamento com a toxina não causa lesão hepática e os animais com depleção parcial de células dendríticas apresentam uma lesão mais branda quando comparado ao animal não depletado tratado com APAP (FIG. 16B). Tal resultado sugere que a piora observada em animais depletados com CLL pode ser atribuído, de maneira mais proeminente, à ausência de células de Kupffer. Por esse motivo, optamos, a princípio, por analisar apenas os parâmetros relacionados aos macrófagos hepáticos.

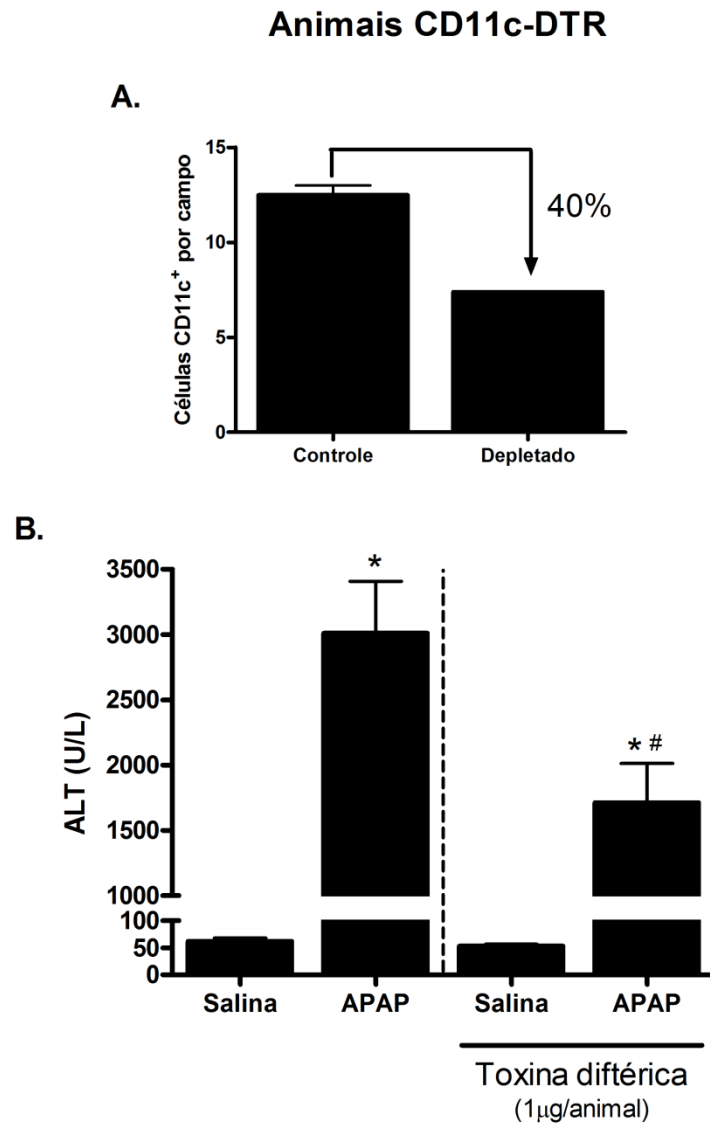


Figura 16: Depleção seletiva de células dendríticas protege o fígado de lesão hepática induzida por sobredose de APAP. (A) Quantificação de células CD11c⁺ por imagem em animais com e sem toxina diftérica indicando depleção de 40% nos animais tratados com a toxina. (B) Dosagem de ALT evidenciando padrão de lesão normal em animais CD11c-DTR, com níveis elevados de ALT, e níveis reduzidos da enzima em animais depletados. O tratamento com a toxina não causa lesão hepática. * $p < 0,05$ em relação ao salina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo APAP sem toxina.

4.12. A substituição de células fagocíticas “originais” gera uma hiperresponsividade inflamatória hepática

Depois de avaliar a lesão induzida por APAP em animais depletados, estudamos o efeito da substituição de macrófagos originados de precursores do saco vitelínico (MOPs) por macrófagos originados de monócitos (MOMs). Para isso, criamos dois grupos que chamamos de CLL15d e CLL60d. Esses grupos consistem em animais que foram depletados com CLL e somente após 15 e 60 dias de repovoamento, respectivamente, foram tratados com APAP. Nos experimentos de repovoamento, nós já havíamos observado que após 15 dias o fígado já se encontrava muito semelhante ao fígado de um animal controle em todos os parâmetros analisados. Após 60 dias de repovoamento o padrão se mantinha e os "novos" macrófagos já estavam há mais tempo em contato com o ambiente hepático. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar:

- Animais onde o fígado houvesse concluído o processo de repovoamento há pouco tempo, ou seja, um fígado recém-repovoado;
- Animais onde o fígado já estivesse repovoado há mais tempo e as células já estivessem no ambiente hepático há tempo suficiente para serem plenamente "educadas" e se tornarem idênticas às células de Kupffer originais.

Animais não tratados com APAP, independente de serem depletados ou repovoados apresentam níveis séricos de ALT semelhantes ao controle (FIG. 17A). No tempo agudo da lesão induzida por APAP animais depletados apresentam níveis de ALT mais elevados em relação ao controle, como mostrado anteriormente. Entre os grupos repovoados, apenas os animais do grupo CLL60d apresentaram níveis mais elevados que o controle (FIG. 17B). No terceiro dia (72 horas) pós APAP, os grupos de animais depletados e CLL15d apresentam níveis de ALT mais elevados em relação ao controle (FIG. 17C). Em conjunto, esses dados indicam que após a depleção total o fígado não retorna às condições originais mesmo que esperado um tempo de 60 dias, e isso pode o tornar mais susceptível a lesões mais severas.

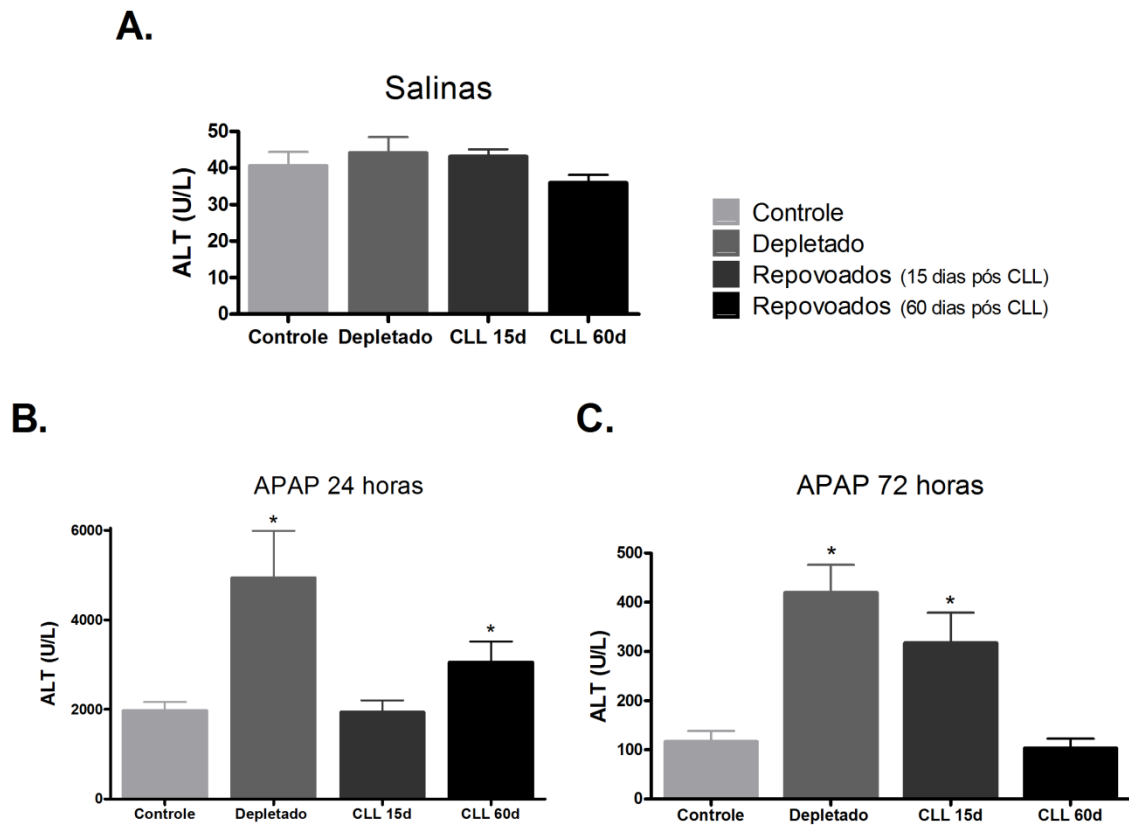


Figura 17: Após substituição de células de Kupffer originais por macrófagos originados de monócitos o fígado torna-se mais susceptível à lesão hepática induzida por APAP. (A) Animais depletados e após 15 e 60 dias de repovoamento não apresentam lesão hepática. (B) Animais depletados e animais após 60 dias de repovoamento apresentam lesão hepática mais severa no tempo agudo do processo inflamatório (24 horas). (C) Após 72 horas, entretanto, níveis elevados da enzima são encontrados nos animais depletados e nos animais após 15 dias de repovoamento. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.13. Substituição de células de Kupffer por macrófagos originados de monócitos prejudica a função hepática e torna o fígado mais susceptível à perda funcional mediante estímulo inflamatório

Além da gravidade da lesão hepática , estudamos o comportamento de grupos de animais repovoados em relação à perda de função hepática decorrente da lesão induzida por sobredose de APAP. Embora não haja lesão hepática observável, animais após 60 dias de repovoamento (CLL60d) apresentam um atraso significativo na depuração de verde de indocianina. Não é claro se isso reflete numa perda de função hepática. Porém, aparentemente, a substituição de macrófagos originados de precursores embrionários por MOMs (FIG. 18A) é capaz de alterar o metabolismo hepático. Já nos grupos de animais que foram desafiados com APAP, podemos observar que houve perda significativa de função em relação ao controle, que foi mais proeminente no grupo CLL15d em ambos os tempos de tratamento (FIG. 18B e C).

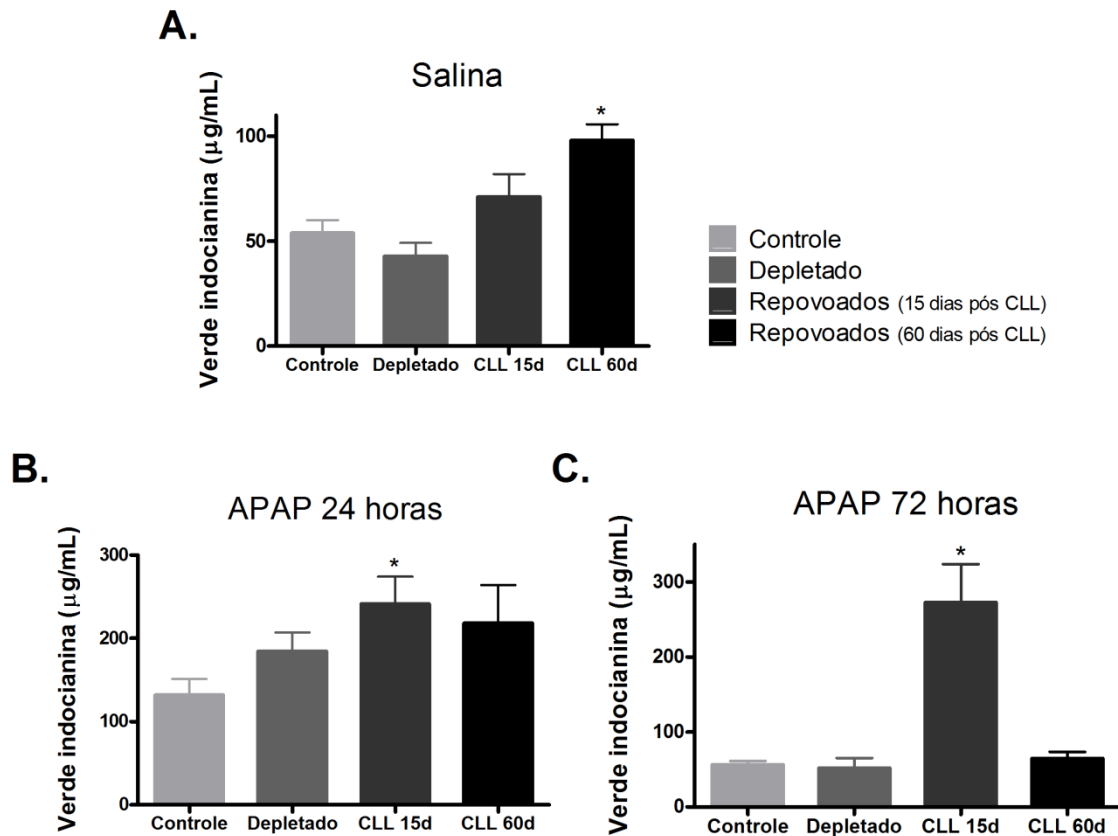


Figura 18: Repovoamento a longo prazo leva à perda de função hepática e torna o fígado mais predisposto à perda funcional mediante tratamento com APAP. (A) Medida de função hepática evidenciando perda de função significativa em animais após 60 dias de repovoamento. (B) Após tratamento com APAP, camundongos após 15 dias de repovoamento apresentam menor taxa de depuração do corante, indicando maior perda de função hepática em relação ao controle. (C) 72 horas pós APAP o grupo CLL15d mantém taxa de depuração do corante semelhante ao observado no tempo de 24 horas, ou seja, persiste o atraso de depuração do corante. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.14. Macrófagos originados de monócitos são mais sensíveis que células de Kupffer originais no tempo agudo da lesão induzida por APAP

De forma indireta, o tratamento com sobredose de APAP pode ser considerado um modelo eficiente de depleção parcial de macrófagos hepáticos, como mostrado anteriormente (4.10). Nos grupos de animais repovoados CLL15d e CLL60d, há uma redução ainda maior de macrófagos hepáticos no tempo agudo da lesão, indicando uma maior sensibilidade desses "novos" macrófagos a processos inflamatórios. No terceiro dia pós APAP, os animais controle apresentam aumento significativo no número de células F4/80⁺ enquanto que os grupos repovoados (CLL15d e CLL60d) apenas retornam aos valores próximos dos iniciais (FIG. 19).

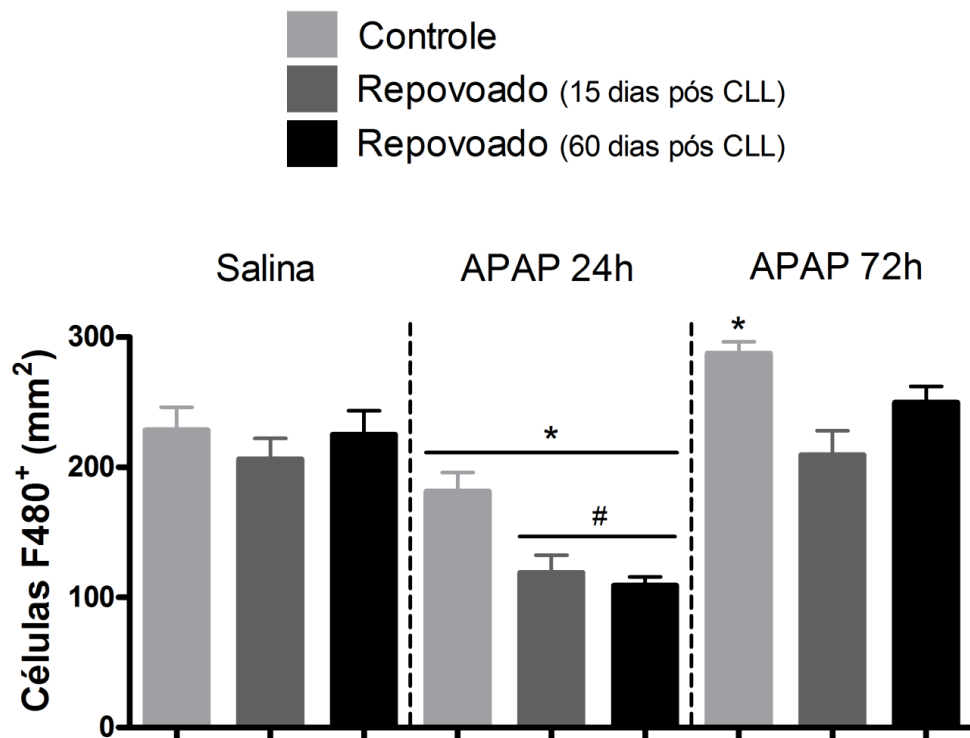


Figura 19: Macrófagos originados de monócitos são mais sensíveis ao processo inflamatório decorrente de sobredose de APAP e em animais repovoados não há aumento de células F4/80⁺ no terceiro dia pós tratamento. Quantificação de macrófagos hepáticos (células F4/80⁺) em animais controle e repovoados antes e depois de tratamento com APAP (600mg/kg) No tempo agudo da lesão há perda significativa de células sendo que nos grupos repovoados a redução é ainda maior. Após 72 horas, há aumento expressivo de células no grupos controle e nos grupos repovoados tal aumento não é observado. *p<0,05 em relação ao respectivo salina do grupo. #p<0,05 em relação ao grupo controle do mesmo tempo.

4.14. Em animais repovoados não há acúmulo de células F4/80⁺ nas Zonas Pericentrais no terceiro dia pós APAP, indicando uma menor capacidade de reorganização hepática

Além do aumento observado no terceiro dia pós APAP nos animais controle, há inversão do padrão normal de distribuição de células F4/80⁺ com acúmulo dessas células nas Zonas Pericentrais. No entanto, em animais repovoados, além de não haver aumento significativo, como mostrado anteriormente, não há inversão no padrão de distribuição de CKs (FIG. 20A e B).

APAP 72 horas

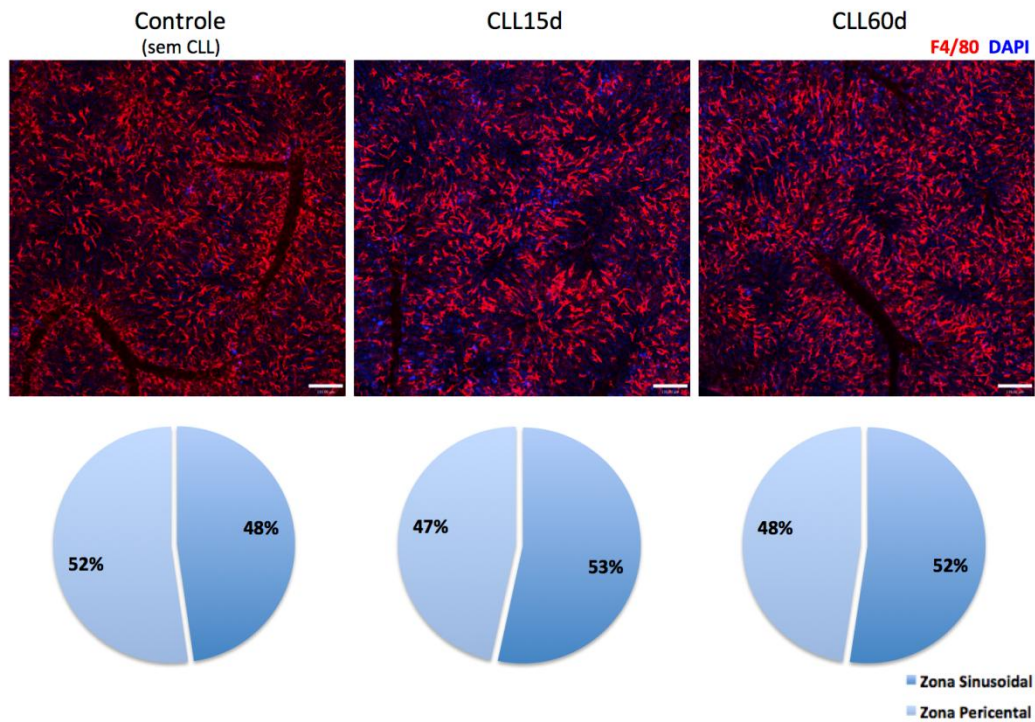


Figura 20: Em animais repovoados não há acúmulo de células F4/80⁺ nas Zonas Pericentraes no terceiro dia pós APAP. (A) MIV de camundongos controle e repovoados 72 horas após o tratamento com APAP (600mg/kg) evidenciando o acúmulo de células F4/80⁺ no controle, fenômeno que não ocorre nos grupos repovoados. (B) Representação gráfica da porcentagem de células por zona de interesse demonstrando a inversão da proporção entre as zonas apenas no animais controle.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, acredita-se que os macrófagos hepáticos são originados de precursores primários do saco vitelínico e mantidos no indivíduo adulto por autorrenovação. Entretanto, eventos de depleção parcial dessas células ocorrem com frequência quando o equilíbrio hepático é perdido por meio de exposição à radiação, infecções e lesões hepáticas causadas por drogas e medicamentos. Em casos assim, a proliferação local não é suficiente para manter o *pool* original e faz-se necessário o recrutamento, estabelecimento e diferenciação de monócitos circulantes no tecido. Nesse trabalho, observamos e estabelecemos parâmetros de visualização dessas células *in vivo*, o que nos permitiu acompanhar a dinâmica de reposição de células de Kupffer após um modelo de depleção completa (tratamento com CLL) e um modelo alternativo de depleção parcial causado por sobredose de APAP. Além disso, elucidamos que a substituição de células de Kupffer originais por macrófagos originados de monócitos tem consequências na capacidade do fígado de responder e resolver processos inflamatórios.

Nosso trabalho teve início com a identificação de estruturas vasculares hepáticas por MIV por meio do imageamento *in vivo* da distribuição intravascular de FITC albumina (FIG. 3). Embora o reconhecimento e identificação de espaços-porta e veias centrolobulares sejam bem estabelecidos em cortes histológicos, os parâmetros para identificação dessas estruturas *in vivo* por MIV ainda não haviam sido estabelecidos. Mostramos, então, que para tal identificação *in vivo* é necessária a observação do fluxo sanguíneo uma vez que esse flui de ramificações do espaço-porta para os sinusóides e desses para veias centrais. Isso é necessário porque embora as veias centrolobulares sejam bastante evidentes o mesmo não acontece com os vasos que compõem os espaços-porta.

Em seguida, estabelecemos uma metodologia de visualização de células de Kupffer por meio da marcação dessas células com o anticorpo anti-F4/80 conjugado com PE (FIG. 1). Ainda que tal marcador não seja exclusivo de macrófagos residentes, células de Kupffer apresentam alta expressão do receptor e em condições de repouso são facilmente distinguidas de células dendríticas F4/80^{low}. Macrófagos hepáticos se distribuem de forma não-homogênea no tecido com preferência nítida pelas Zonas Sinusoidais (FIG. 4A-C). Além disso, CKs diferem em várias enzimas, receptores e estruturas subcelulares de acordo com a região que ocupam (DECKER, 1998; ARII & IMAMURA, 2000; LASKIN *et al.*, 2001). Sleyster e

Knook, mostraram em 1982, que células das Zonas Sinusoidais são maiores, possuem maior atividade de enzimas lisossomais, apresentam maior capacidade fagocítica e produzem menos ânion superóxido. Por outro lado, células das Zonas Periportais são mais reativas a processos inflamatórios. Assim, acreditavam que a heterogeneidade funcional e o tamanho das CKs estão relacionados à sua localização nos lóbulos hepáticos (SLEYSTER & KNOOK, 1982). Entretanto, mostramos nas nossas análises que o tamanho relativo das células, no nosso estudo mensurado por volume (μm^3), não varia de uma região para outra (FIG. 4D). Tal divergência de resultados pode ser explicada pelo uso de diferentes metodologias de quantificação adotadas. Nos estudos de Sleyster e Knook foram utilizadas imagens de microscopia convencional para medida do tamanho das células. Nós, por outro lado, fizemos uso de reconstruções das células em 3D para as medidas realizadas, uma alternativa mais precisa para tal análise proporcionada pelo advento de microscópios mais modernos. Além disso, outra limitação da quantificação de células de Kupffer em um único plano é que essas células apresentam uma estrutura que faz com que elas ocupem diferentes planos no tecido. Dessa forma, em uma imagem é possível adquirir diversas células de tamanhos diferentes simplesmente por variação focal.

Com objetivo, a princípio, de estudar apenas macrófagos hepáticos, tomamos o cuidado de garantir que as células consideradas células de Kupffer não abrangessem outras populações hepáticas. Distinguimos e eliminamos células dendríticas por meio de sua localização e morfologia (FIG. 5A-C), e, embora essas populações sejam semelhantes em muitos aspectos, determinamos células dendríticas como $\text{CD11c}^+/\text{CX3CR1}^+/\text{F4/80}^{\text{low}}$ e células de Kupffer como $\text{CD11c}^-/\text{CX3CR1}^-/\text{F4/80}^{\text{high}}$ (FIG. 5D e E). É importante ressaltar que esses critérios foram adotados com base em animais naive sem nenhum tratamento prévio, onde há separação nítida dessas células. A expressão desses marcadores, em ambas as células, varia de acordo com o tecido e estímulo específicos. Para distinção de células de Ito, outra população hepática não-parenquimal, utilizamos como referência a autofluorescência de grânulos de vitamina A presentes nessas células (GOTZE *et al.*, 2015) (FIG. 6A). A área ocupada por esses grânulos equivale, aproximadamente, a 1% da área total de cada imagem (FIG. 6B) e correspondem, de fato, a uma população distinta (FIG. 6C). Embora a visualização de células de Ito seja indireta, os parâmetros e marcadores utilizados permitem o estudo da dinâmica de três populações hepáticas distintas, condição não existente até o momento.

Para estudar a dinâmica de repovoamento de macrófagos hepáticos adotamos o modelo depleção completa por meio do tratamento com CLL (FIG. 7). Confirmamos a eliminação dessas células utilizando animais LysM e-GFP, onde células de Kupffer apresentam uma fraca, mas visível, expressão de GFP. Caso o tratamento com CLL ocasionasse a endocitose do receptor F4/80, isso justificaria a ausência de estruturas positivas para o mesmo, gerando um resultado de "falsa" depleção. O que ocorre, porém, é, de fato, a eliminação dos macrófagos teciduais já que nos animais LysM as células GFP^{low} (células de Kupffer) também desaparecem (FIG. 8). O CLL é um antitumoral conhecido e amplamente utilizado em modelos de depleção de macrófagos em diferentes tecidos. Entretanto, observamos no nosso modelo, depleção expressiva também de células dendríticas hepáticas (FIG. 9). Tal fenômeno coloca em discussão todos os modelos que estudam depleção por meio do tratamento com CLL e suas consequências, já que a maioria deles não considera a ação dessa droga em outras populações celulares.

Embora elimine duas populações hepáticas, o tratamento com CLL não altera parâmetros hepáticos gerais (FIG. 10), uma vez que essas células morrem por apoptose e são eliminadas do organismo sem causar danos ao tecido (VAN ROOIJEN & SANDERS, 1996). Até o presente momento não se conhece a existência de precursores de células de Kupffer presentes no tecido hepático. Sendo assim, em situações onde todos os macrófagos hepáticos são eliminados, uma fonte alternativa de precursores deve ser acionada. Nesse caso, a medula óssea parece ser a fonte de novas células que irão repovoar o fígado. Em tempos precoces após o tratamento com CLL (24 horas) é observada uma profunda mudança no quadro geral de precursores da medula óssea (FIG. 11A), havendo redução drástica de precursores de dendríticas (PD - Lin⁺CD135⁺CD117⁻CD115⁻) e precursores comuns de dendríticas e macrófagos (PMD - Lin⁺CD135⁺CD117⁺CD115⁺) e, aumento significativo de precursores de macrófagos (PM - Lin⁺CD135⁺CD117⁺CD115⁻) (FIG. 11C-D). Em tempos mais tardios, 4 dias após o tratamento com CLL, a quantidade original dos precursores analisados é reestabelecido. Tal resultado é curioso uma vez que o tratamento com CLL depleta tanto macrófagos quanto células dendríticas. Uma hipótese é que a perda de macrófagos seja mais prejudicial e haja um redirecionamento inicial de linhagens celulares em estágios ainda mais precoces na medula para a diferenciação em precursores de macrófagos apenas. Outra hipótese é o CLL ter acesso à medula óssea e afetar diretamente esses precursores.

No fígado, o repovoamento de macrófagos, após depleção completa, ocorre de maneira gradual atingindo a quantidade de células original (antes da depleção) em torno de 15

dias após o tratamento (FIG. 12A e B). O padrão de distribuição característico, com a maioria das células ocupando as Zonas Sinusoidais é mantido ao longo do repovoamento, com exceção do dia 3 onde a distribuição é homogênea (FIG. 12C), o que acreditamos ser atribuído ao fato de haver poucas células no tecido. Embora os "novos" macrófagos obedçam o mesmo padrão de distribuição das células originais, o volume dessas células em estágios iniciais de repovoamento (dia 5) atingem duas vezes o tamanho das células de Kupffer originais e reduzem ao longo do tempo (FIG. D e E). Considerando que um monócito é significativamente menor que uma célula de Kupffer, tal variação sugere que ao chegar e se estabelecer no tecido hepático essas células sofrem modificações iniciais que refletem no seu tamanho.

Um modelo alternativo de depleção de células de Kupffer é a lesão hepática induzida por APAP (ZIGMOND *et al.*, 2014), assim como outros tratamentos que desencadeiam processo inflamatório e algumas infecções (MOLAWI & SIEWEKE, 2015). Na lesão hepática induzida por sobredose de APAP (600mg/kg) há aumento de ALT circulante, perda de função hepática e lesão tecidual macro e microscópica (FIG. 13). Na dinâmica de células durante o processo inflamatório, consideramos para nossas análises células F4/80⁺ que podem ser, nesse contexto, células de Kupffer e/ou monócitos infiltrados. No tempo agudo (24 horas pós APAP) há redução no número de células por área. Porém, no terceiro dia há acúmulo dessas células nas regiões onde se encontravam as zonas de necrose em tempos mais precoces, caracterizando uma inversão no padrão de distribuição de células F4/80⁺, que nesse estágio se encontram, em sua maioria, nas Zonas Pericentrais (FIG. 14). Ao longo do tempo, assim como na depleção por CLL, o fígado restaura seu padrão original.

Embora diversos autores já tenham mostrado que há recrutamento de monócitos para tecidos inflamados (INGERSOLL *et al.*, 2011; SHI & PAMER, 2011; ZIMMERMANN *et al.*, 2012; POSSAMAI *et al.*, 2014; MOLAWI & SIEWEKE, 2015) no que diz respeito ao modelo de APAP no fígado ainda restam dúvidas. Em experimentos piloto (dados não mostrados), injetamos *beads* fluorescentes nos camundongos 24 horas antes do tratamento com APAP a fim de marcar ("tatuar") as células de Kupffer. As *beads* injetadas são feitas de material inerte e uma vez fagocitadas permanecem nas células por muitos dias (pelo menos 10 dias). Imagens de MIV desses animais mostram que, aproximadamente, 99% das células de Kupffer são *bead*⁺. Feito isso, tratamos os animais com APAP e no terceiro dia após o tratamento as células acumuladas nas Zonas Pericentrais eram, em sua maioria, *bead*⁺. Tal dado é fascinante e bastante curioso. A hipótese principal é que células de Kupffer podem não

ser células sesseis como se acredita, e uma vez frente a um estímulo inflamatório, essas células poderiam migrar pela vasculatura hepática. Alternativamente, os monócitos recrutados sob o estímulo inflamatório fagocitariam as beads no seu local de origem, provavelmente na medula óssea, antes de migrarem para o tecido. Há ainda uma terceira possibilidade, menos provável, de células F4/80⁺ proliferarem dividindo a quantidade de beads em seu citoplasma aleatoriamente entre as células-filhas e essas migrarem para as áreas de necrose.

Animais depletados que receberam APAP apresentam lesão hepática mais severa (FIG. 15) e, como dito anteriormente, o tratamento com CLL depleta tanto células de Kupffer quanto células dendríticas no fígado. Investigamos se a piora observada nesses animais poderia ser atribuída a uma ou ambas as populações eliminadas com o tratamento. Animais com depleção parcial (40%) de células dendríticas apresentam lesão mais branda se comparado a animais não depletados (FIG. 16). Isso sugere que a piora observada em animais depletados tratados com APAP é devido à ausência de células de Kupffer. Em animais repovoados após 15 e 60 dias (CLL15d e CLL60d, respectivamente) tratados com APAP há níveis mais elevados ALT no tempo agudo no grupo CLL60d e no tempo mais tardio (72 horas) o grupo CLL15d apresenta níveis anormais de ALT se comparados com controle (FIG. 17). Além disso, esses animais apresentam variações anormais em nível de função hepática durante e lesão hepática induzida por APAP (FIG. 18). Tais variações em grau de lesão e comprometimento de função sugerem que independentemente do tempo que esses "novos" macrófagos estão inseridos no ambiente hepático há variação fenotípica entre CKs originais e MOMs. Ainda, a depleção parcial de CKs observada em animais sem tratamento prévio com CLL é menor em relação a ambos os grupos de animais repovoados. Indicando que tais células são mais sensíveis ao processo inflamatório agudo (FIG. 19). Em estágios mais tardios (72 horas) o padrão de distribuição de células F4/80⁺ também é alterado. O acúmulo dessas células observado nas Zonas Pericentrais em animais não depletados não ocorre de maneira tão eficiente nos animais repovoados, sendo então, um indício que ou MOMs não são eficientes em proliferar e migrar para as zonas de necrose, ou o recrutamento de monócitos pró-inflamatórios é comprometido.

Em suma, elucidamos nesse trabalho que i) células de Kupffer se distribuem no fígado seguindo um padrão dependente da arquitetura vascular hepática; ii) após estímulos que perturbam o equilíbrio de macrófagos hepáticos o tecido reestabelece o padrão original, e iii) a ausência de células de Kupffer parece alterar o padrão inflamatório hepático, tornando-o mais hiper-responsivo a lesão pelo APAP. Esses dados evidenciam a existência de

mecanismos de controle refinados na manutenção dessa população no fígado. Também, mostramos evidências que a substituição de CKs originais por MOMs pode trazer consequências prejudiciais para o organismo. Portanto, estudos sobre o funcionamento e a regulação desses mecanismos de controle são fundamentais para o entendimento da biologia hepática uma vez que tal entendimento pode proporcionar modelos de intervenção que amenizem ou eliminem os possíveis danos decorrentes dessa troca.

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir com esse trabalho que:

1. O fígado possui mecanismos que governam a reposição de macrófagos hepáticos após depleção completa ou parcial, reestabelecendo a quantidade e a morfologia original.
2. A depleção de macrófagos e células dendríticas hepáticas tornam o fígado mais susceptível à lesões e perda de função decorrentes de sobredose de APAP. Entretanto, depleção parcial (40%) seletiva de células dendríticas protege o tecido sob o mesmo estímulo inflamatório.
3. A substituição de macrófagos originados de precursores do saco vitelínico por macrófagos originados de monócitos tendem a reduzir a capacidade funcional do fígado, além de aumentarem o prejuízo funcional mediante estímulos inflamatórios em estágios precoces de repovoamento.
4. Macrófagos originados de monócitos são mais sensíveis a processos inflamatórios agudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arii, S.; M. Imamura. "Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury." **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 7(1): 40-48. 2000.

Auffray, C.; M. H. Sieweke; F. Geissmann. "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." **Annu Rev Immunol** 27: 669-692. 2009.

Bleriot, C.; T. Dupuis; G. Jouvion; G. Eberl; O. Disson; M. Lecuit. "Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection." **Immunity** 42(1): 145-158. Jan 20. 2015.

Bone-Larson, C. L.; K. J. Simpson; L. M. Colletti; N. W. Lukacs; S. C. Chen; S. Lira; S. L. Kunkel; C. M. Hogaboam. "The role of chemokines in the immunopathology of the liver." **Immunol Rev** 177: 8-20. Oct. 2000.

Chawla, A.; K. D. Nguyen; Y. P. Goh. "Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease." **Nat Rev Immunol** 11(11): 738-749. Nov. 2011.

Decker, K. "The response of liver macrophages to inflammatory stimulation." **Keio J Med** 47(1): 1-9. Mar. 1998.

Gautier, E. L.; T. Shay; J. Miller; M. Greter; C. Jakubzick; S. Ivanov; J. Helft; A. Chow; K. G. Elpek; S. Gordonov; A. R. Mazloom; A. Ma'ayan; W. J. Chua; T. H. Hansen; S. J. Turley; M. Merad; G. J. Randolph. "Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages." **Nat Immunol** 13(11): 1118-1128. Nov. 2012.

Geissmann, F.; M. G. Manz; S. Jung; M. H. Sieweke; M. Merad; K. Ley. "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." **Science** 327(5966): 656-661.Feb 5. 2010.

Gentek, R.; K. Molawi; M. H. Sieweke. "Tissue macrophage identity and self-renewal." **Immunol Rev** 262(1): 56-73.Nov. 2014.

Ginhoux, F.; M. Greter; M. Leboeuf; S. Nandi; P. See; S. Gokhan; M. F. Mehler; S. J. Conway; L. G. Ng; E. R. Stanley; I. M. Samokhvalov; M. Merad. "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." **Science** 330(6005): 841-845.Nov 5. 2010.

Ginhoux, F.; S. Jung. "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis." **Nat Rev Immunol** 14(6): 392-404.Jun. 2014.

Gotze, S.; E. C. Schumacher; C. Kordes; D. Haussinger. "Epigenetic Changes during Hepatic Stellate Cell Activation." **PLoS One** 10(6): e0128745. 2015.

Gregory, S. H.; E. J. Wing. "Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections." **J Leukoc Biol** 72(2): 239-248.Aug. 2002.

Hashimoto, D.; J. Miller; M. Merad. "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo." **Immunity** 35(3): 323-335.Sep 23. 2011.

Heath, W. R.; F. R. Carbone. "Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces." **Nat Immunol** 10(12): 1237-1244.Dec. 2009.

Hochweller, K.; J. Striegler; G. J. Hammerling; N. Garbi. "A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells." **Eur J Immunol** 38(10): 2776-2783.Oct. 2008.

Hoeffel, G.; Y. Wang; M. Greter; P. See; P. Teo; B. Malleret; M. Leboeuf; D. Low; G. Oller; F. Almeida; S. H. Choy; M. Grisotto; L. Renia; S. J. Conway; E. R. Stanley; J. K. Chan; L. G. Ng; I. M. Samokhvalov; M. Merad; F. Ginhoux. "Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages." **J Exp Med** 209(6): 1167-1181.Jun 4. 2012.

Hogaboam, C. M.; C. L. Bone-Larson; M. L. Steinhauser; N. W. Lukacs; L. M. Colletti; K. J. Simpson; R. M. Strieter; S. L. Kunkel. "Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines." **FASEB J** 13(12): 1565-1574.Sep. 1999.

Hogaboam, C. M.; K. J. Simpson; S. W. Chensue; M. L. Steinhauser; N. W. Lukacs; J. Gauldie; R. M. Strieter; S. L. Kunkel. "Macrophage inflammatory protein-2 gene therapy attenuates adenovirus- and acetaminophen-mediated hepatic injury." **Gene Ther** 6(4): 573-584.Apr. 1999.

Ingersoll, M. A.; A. M. Platt; S. Potteaux; G. J. Randolph. "Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation." **Trends Immunol** 32(10): 470-477.Oct. 2011.

Jenkins, S. J.; D. Ruckerl; P. C. Cook; L. H. Jones; F. D. Finkelman; N. van Rooijen; A. S. MacDonald; J. E. Allen. "Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation." **Science** 332(6035): 1284-1288.Jun 10. 2011.

Ju, C.; T. P. Reilly; M. Bourdi; M. F. Radonovich; J. N. Brady; J. W. George; L. R. Pohl. "Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice." **Chem Res Toxicol** 15(12): 1504-1513.Dec. 2002.

Jung, S.; J. Aliberti; P. Graemmel; M. J. Sunshine; G. W. Kreutzberg; A. Sher; D. R. Littman. "Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." **Mol Cell Biol** 20(11): 4106-4114.Jun. 2000.

Krausgruber, T.; K. Blazek; T. Smallie; S. Alzabin; H. Lockstone; N. Sahgal; T. Hussell; M. Feldmann; I. A. Udalova. "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." **Nat Immunol** 12(3): 231-238.Mar. 2011.

Kuziel, W. A.; S. J. Morgan; T. C. Dawson; S. Griffin; O. Smithies; K. Ley; N. Maeda. "Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(22): 12053-12058.Oct 28. 1997.

Laskin, D. L.; B. Weinberger; J. D. Laskin. "Functional heterogeneity in liver and lung macrophages." **J Leukoc Biol** 70(2): 163-170.Aug. 2001.

Lin, H. H.; D. E. Faunce; M. Stacey; A. Terajewicz; T. Nakamura; J. Zhang-Hoover; M. Kerley; M. L. Mucenski; S. Gordon; J. Stein-Streilein. "The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance." **J Exp Med** 201(10): 1615-1625.May 16. 2005.

Lindquist, R. L.; G. Shakhbar; D. Dudziak; H. Wardemann; T. Eisenreich; M. L. Dustin; M. C. Nussenzweig. "Visualizing dendritic cell networks in vivo." **Nat Immunol** 5(12): 1243-1250.Dec. 2004.

MacPhee, P. J.; E. E. Schmidt; A. C. Groom. "Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy." **Am J Physiol** 263(1 Pt 1): G17-23.Jul. 1992.

Marques, P. E.; M. M. Antunes; B. A. David; R. V. Pereira; M. M. Teixeira; G. B. Menezes. "Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy." **Nat Protoc** 10(2): 258-268.Feb. 2015.

Marques, P. E.; A. G. Oliveira; R. V. Pereira; B. A. David; L. F. Gomides; A. M. Saraiva; D. A. Pires; J. T. Novaes; D. O. Patricio; D. Cisalpino; Z. Menezes-Garcia; W. M. Leevy; S. E. Chapman; G. Mahecha; R. E. Marques; R. Guabiraba; V. P. Martins; D. G. Souza; D. S. Mansur; M. M. Teixeira; M. F. Leite; G. B. Menezes. "Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice." **Hepatology** 61(1): 348-360. Jan. 2015.

McDonald, B.; K. Pittman; G. B. Menezes; S. A. Hirota; I. Slaba; C. C. Waterhouse; P. L. Beck; D. A. Muruve; P. Kubes. "Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation." **Science** 330(6002): 362-366. Oct 15. 2010.

Mellman, I.; R. M. Steinman. "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." **Cell** 106(3): 255-258. Aug 10. 2001.

Molawi, K.; M. H. Sieweke. "Monocytes compensate Kupffer cell loss during bacterial infection." **Immunity** 42(1): 10-12. Jan 20. 2015.

Molawi, K.; Y. Wolf; P. K. Kandalla; J. Favret; N. Hagemeyer; K. Frenzel; A. R. Pinto; K. Klapproth; S. Henri; B. Malissen; H. R. Rodewald; N. A. Rosenthal; M. Bajenoff; M. Prinz; S. Jung; M. H. Sieweke. "Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age." **J Exp Med** 211(11): 2151-2158. Oct 20. 2014.

Murray, P. J.; T. A. Wynn. "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." **Nat Rev Immunol** 11(11): 723-737. Nov. 2011.

Naito, M.; G. Hasegawa; K. Takahashi. "Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells." **Microsc Res Tech** 39(4): 350-364. Nov 15. 1997.

Nathan, C.; A. Ding. "Nonresolving inflammation." **Cell** 140(6): 871-882. Mar 19. 2010.

Parwaresch, M. R.; H. H. Wacker. "Origin and kinetics of resident tissue macrophages. Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes." **Cell Tissue Kinet** 17(1): 25-39. Jan. 1984.

Possamai, L. A.; M. R. Thursz; J. A. Wendon; C. G. Antoniades. "Modulation of monocyte/macrophage function: a therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure." **J Hepatol** 61(2): 439-445. Aug. 2014.

Qian, B. Z.; J. Li; H. Zhang; T. Kitamura; J. Zhang; L. R. Campion; E. A. Kaiser; L. A. Snyder; J. W. Pollard. "CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis." **Nature** 475(7355): 222-225. Jul 14. 2011.

Saederup, N.; A. E. Cardona; K. Croft; M. Mizutani; A. C. Coteur; C. L. Tsou; R. M. Ransohoff; I. F. Charo. "Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice." **PLoS One** 5(10): e13693. 2010.

Sallusto, F.; A. Lanzavecchia. "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." **J Exp Med** 179(4): 1109-1118. Apr 1. 1994.

Schulz, C.; E. Gomez Perdiguero; L. Chorro; H. Szabo-Rogers; N. Cagnard; K. Kierdorf; M. Prinz; B. Wu; S. E. Jacobsen; J. W. Pollard; J. Frampton; K. J. Liu; F. Geissmann. "A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells." **Science** 336(6077): 86-90. Apr 6. 2012.

Seki, S.; Y. Habu; T. Kawamura; K. Takeda; H. Dobashi; T. Ohkawa; H. Hiraide. "The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses." **Immunol Rev** 174: 35-46. Apr. 2000.

Shi, C.; E. G. Pamer. "Monocyte recruitment during infection and inflammation." **Nat Rev Immunol** 11(11): 762-774.Nov. 2011.

Sieweke, M. H.; J. E. Allen. "Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages." **Science** 342(6161): 1242974.Nov 22. 2013.

Sleyster, E. C.; D. L. Knook. "Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells." **Lab Invest** 47(5): 484-490.Nov. 1982.

Steinman, R. M.; Z. A. Cohn. "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." **J Exp Med** 137(5): 1142-1162.May 1. 1973.

Su, G. L. "Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation." **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 283(2): G256-265.Aug. 2002.

Takahashi, K.; F. Yamamura; M. Naito. "Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study." **J Leukoc Biol** 45(2): 87-96.Feb. 1989.

Thomson, A. W.; P. A. Knolle. "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment." **Nat Rev Immunol** 10(11): 753-766.Nov. 2010.

Toth, C. A.; P. Thomas. "Liver endocytosis and Kupffer cells." **Hepatology** 16(1): 255-266.Jul. 1992.

van Furth, R.; Z. A. Cohn. "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes." **J Exp Med** 128(3): 415-435.Sep 1. 1968.

Van Rooijen, N.; A. Sanders. "Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid." **Hepatology** 23(5): 1239-1243.May. 1996.

Villadangos, J. A.; L. Young. "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." **Immunity** 29(3): 352-361.Sep 19. 2008.

Wacker, H. H.; H. J. Radzun; M. R. Parwaresch. "Kinetics of Kupffer cells as shown by parabiosis and combined autoradiographic/immunohistochemical analysis." **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol** 51(2): 71-78. 1986.

Wan, J.; M. Benkdane; F. Teixeira-Clerc; S. Bonnafous; A. Louvet; F. Lafdil; F. Pecker; A. Tran; P. Gual; A. Mallat; S. Lotersztajn; C. Pavoine. "M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease." **Hepatology** 59(1): 130-142.Jan. 2014.

Yamasaki, R.; H. Lu; O. Butovsky; N. Ohno; A. M. Rietsch; R. Cialic; P. M. Wu; C. E. Doykan; J. Lin; A. C. Coteleur; G. Kidd; M. M. Zorlu; N. Sun; W. Hu; L. Liu; J. C. Lee; S. E. Taylor; L. Uehlein; D. Dixon; J. Gu; C. M. Floruta; M. Zhu; I. F. Charo; H. L. Weiner; R. M. Ransohoff. "Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system." **J Exp Med** 211(8): 1533-1549.Jul 28. 2014.

Yona, S.; K. W. Kim; Y. Wolf; A. Mildner; D. Varol; M. Breker; D. Strauss-Ayali; S. Viukov; M. Guilliams; A. Misharin; D. A. Hume; H. Perlman; B. Malissen; E. Zelzer; S. Jung. "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." **Immunity** 38(1): 79-91.Jan 24. 2013.

You, Q.; M. Holt; H. Yin; G. Li; C. J. Hu; C. Ju. "Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury." **Biochem Pharmacol** 86(6): 836-843.Sep 15. 2013.

Zigmond, E.; S. Samia-Grinberg; M. Pasmanik-Chor; E. Brazowski; O. Shibolet; Z. Halpern; C. Varol. "Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury." **J Immunol** 193(1): 344-353. Jul 1. 2014.

Zimmermann, H. W.; C. Trautwein; F. Tacke. "Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury." **Front Physiol** 3: 56. 2012.