

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

Brenda Naemi Lanza Nakagaki

**Metamorfose morfológica e imune no
desenvolvimento hepático neonatal**

Belo Horizonte

2018

Brenda Naemi Lanza Nakagaki

Metamorfose morfológica e imune no desenvolvimento hepático neonatal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Co-orientadora: Dra. Bruna Araújo David.

Belo Horizonte

2018



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

BRENDA NAEMI LANZA NAKAGAKI

301/2018
entrada
1º/2016
2016694313

Às **nove horas** do dia **07 de fevereiro de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**METAMORFOSE MORFOLÓGICA E IMUNE NO DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO NEONATAL**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADA
Dr. Cristiano Xavier Lima	UFMG	APROVADA
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2018.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Dr. Cristiano Xavier Lima _____

Dra. Erika Cristina Jorge _____

Prof.ª Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

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

Este trabalho foi realizado no Center for Gastrointestinal Biology, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante

Do que ter aquela velha opinião

Formada sobre tudo”

(Raul Seixas)

AGRADECIMENTOS

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

Ao Gustavo, pela oportunidade, orientação e aprendizado; pelos desafios e por acreditar sempre em mim.

Ao Mateus, pelo companheirismo, amor e incentivo; pelo apoio quando mais precisava.

Ao CGB – Érika, Kassi, Vivi, Maísa, Xu, Riri, Lice, Raquel, Ana, Horts, Camila, Matheus, Gu, Alan e Jorge –, pela convivência diária, momentos de descontração, pela ajuda nos experimentos e por tornarem meus dias alegres.

Ao André, Robs e Lorena, por fazerem parte do que somos hoje.

Às ICs Horts e Camila, um agradecimento especial, pelas inúmeras quantificações, trocas de caixas; pela oportunidade de orientar.

A Rafa, Mônica, Sarah, Bruna e Lindys, pela amizade e pelos antigos tempos de lab.

A Rita, Mari e Santuza, pelo primeiro contato com a ciência.

À Nat, pelo quase-casamento de 5 anos, por fazer da república, um lar.

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

Ao Gabriel, German, Rafael e Thais, pela ajuda e colaboração.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. Introdução	14
1.1. O fígado	14
1.2. O fígado embrionário	17
1.3. O fígado neonatal.....	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA.....	21
3.1. Animais experimentais	21
3.2. Citometria de massa	21
3.2.1. Obtenção de células totais e células não-parenquimais hepáticas..	21
3.2.2. CyTOF	22
3.2.3. Estratégias de gates	22
3.3. Microscopia.....	23
3.3.1. Cortes congelados	23
3.3.2. Metacrilato	24
3.3.3. Microscopia <i>ex vivo</i>	24
3.3.4. Histologia dos fígados humanos.....	25
3.3.5. Quantificação do número de células e análise dos espaços avasculares.....	25
3.4. Ensaio enzimáticos	26
3.5. PCR em Tempo Real (qPCR)	26
3.5.1 Extração de RNA	26
3.5.2. Síntese de cDNA	27
3.5.3. PCR quantitativo (qPCR)	27
3.6. Teste de depuração do verde indocianina (cardiogreen).....	28

3.7. Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1. A arquitetura do parênquima hepático muda durante o desenvolvimento	30
4.2. Coloração para albumina confirma organização de cordões de hepatócitos em estágios mais tardios do desenvolvimento	35
4.3. Mudanças vasculares acompanham as modificações celulares.....	38
4.4. A composição celular imune muda drasticamente ao longo do tempo ..	41
4.5. O perfil mielóide também é observado por imagem <i>ex vivo</i>	45
4.6. Uma população com marcação tanto de macrófago quanto de monócito é também vista por imagem.....	47
4.7. A população subcapsular CX3CR1 ⁺ já está presente assim que o animal nasce	55
4.8. Algumas funções hepáticas se encontram reduzidas nos neonatos.....	60
4.9. Um perfil histológico diferente também é observado em neonatos humanos	62
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato transaminase

CyTOF – *time-of-flight mass cytometry*

DCs – células dendríticas

EMPs – progenitores eritro-mieloides

GFP – *green fluorescent protein*; proteína fluorescente verde

i.p. – intraperitoneal

i.v. – intravenoso

ICG – *indocyanine green*; verde de indocianina

KCs – células de Kupffer

LMPs – progenitores linfo-mieloides

LSECs - células endoteliais sinusoidais

NK – células *natural killer*

NKT – células T *natural killer*

PECAM-1 - *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*

qPCR – PCR em tempo real

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1	Estrutura do lóbulo hepático	17
Ilustração 2	Hematopoiese no fígado embrionário.....	19
Ilustração 3	Estratégia utilizada para imagens <i>ex vivo</i>	25
Ilustração 4	Estratégia utilizada para análise dos espaços avasculares	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Arquitetura do parênquima hepático durante o desenvolvimento	31
Figura 2	Arquitetura do parênquima hepático durante o desenvolvimento	33
Figura 3	Visualização do parênquima hepático pela marcação para albumina	36
Figura 4	Estrutura vascular hepática ao longo da vida	39
Figura 5	Composição celular do fígado.....	43
Figura 6	Células LysM ⁺ no fígado ao longo do desenvolvimento	46
Figura 7	Distribuição das células CX3CR1 ⁺ e F4/80 ⁺ ao longo do fígado	48
Figura 8	Células CX3CR1 ⁺ e F4/80 ⁺ no interior do fígado	50
Figura 9	Células CX3CR1 ⁺ e F4/80 ⁺ no espaço subcapsular	56
Figura 10	Funções hepáticas ao longo do desenvolvimento	60
Figura 11	Organização histológica de fígados humanos	63

RESUMO

O fígado é um órgão vital para o funcionamento do organismo e realiza inúmeras funções essenciais. Dentre elas estão funções metabólicas, catabólicas, excretoras, secretoras, de síntese e armazenamento e de defesa imune. Os processos de organogênese e desenvolvimento embrionário do fígado têm sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores. Entretanto, as particularidades do desenvolvimento hepático neonatal são negligenciadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o desenvolvimento pós-natal do órgão, com foco na morfologia e nas populações de células imunes. Encontramos mudanças na arquitetura do parênquima, no que diz respeito à densidade, organização e composição celulares. Enquanto o fígado do adulto é completamente organizado em cordões de hepatócitos entremeados por sinusoides com células imunes dentro dos vasos, neonatos possuem uma arquitetura hepática sem um padrão claro de organização, com ilhas de células imunes no parênquima hepático e vasos em forma de colméia. Na caracterização das populações celulares imunes, o fígado adulto é especialmente um órgão linfóide enquanto o fígado neonatal é majoritariamente composto por células mielóides. Observamos ainda, uma sucessão cronológica entre populações celulares, sugerindo que células precursoras com características monocíticas dão origem a células maduras residentes, que são realocadas nos diferentes compartimentos hepáticos. Por fim, estudos funcionais revelaram uma ineficiência em neonatos na função de *clearance* hepático e na produção de transaminases. Amostras histológicas humanas confirmam que há retenção de células imunes no parênquima hepático de neonatos, formando ilhas de células muito similares aos camundongos. Dessa forma, nossos dados demonstraram que existe uma enorme diferença, tanto morfológica quanto imunológica e funcional, do fígado do neonato em comparação ao fígado do adulto.

ABSTRACT

The liver is a vital organ performs numerous essential functions. Among them, there are metabolic, catabolic, excretory, secretory, synthesis and storage and immune defense functions. The processes of organogenesis and embryonic development of the liver have been studied by many researchers. However, the complexities of neonatal liver development are still neglected. Thus, the aim of this work was to study the postnatal development of the organ, focusing on the morphology and populations of immune cells. We found changes in the architecture of the parenchyma, related to cell density, organization and composition. While the adult liver is completely organized in strings of hepatocytes interspersed by sinusoids with immune cells inside the vessels, neonates have a liver architecture without a clear pattern of organization, with islands of immune cells in the hepatic parenchyma and bee-shaped vessels. In the characterization of immune cell populations, the adult liver is especially a lymphoid organ, and neonatal liver is mostly composed of myeloid cells. We also observed a chronological sequence between cell populations suggesting that precursor cells with monocytic characteristics give rise to resident mature cells that are relocated in the different hepatic compartments. Finally, functional studies revealed an inefficiency in neonates related to their function of hepatic clearance and to the production of transaminases. Human histological samples confirm retention of immune cells in the hepatic parenchyma of neonates, forming islands of cells very similar to the mice. Therefore, our data demonstrated that there is a huge difference, morphologically, immunologically and functionally, in the liver of the neonate compared to the adult liver.

1. Introdução

1.1. O fígado

O fígado é um órgão vital para o funcionamento do organismo e realiza inúmeras funções essenciais. É o maior órgão interno do corpo humano, pesando aproximadamente 1,5 kg em um homem adulto, o que corresponde a até 2,5% da massa corporal total (Vollmar and Menger 2009). Localiza-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, possuindo posição anatômica estratégica no sistema porta-hepático, ligado diretamente ao trato digestivo. O fígado é altamente vascularizado, sendo banhado por 30% do volume sanguíneo corpóreo a cada minuto. Aproximadamente 80% do sangue é proveniente da veia porta, pouco oxigenado e rico em nutrientes absorvidos no intestino e os 20% restantes, sangue oxigenado fornecido pela artéria hepática (Vollmar and Menger 2009). Essa mistura sanguínea circula pelo fígado lentamente, em baixa pressão e tensão de oxigênio, através de uma enorme rede de vasos capilares de parede fina, os sinusoides. Essa dupla irrigação confere ao órgão heterogeneidade funcional e grande capacidade metabólica (Jenne and Kubes 2013).

Revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, o fígado se divide macroscopicamente em quatro lobos. Microscopicamente, os lobos apresentam unidades funcionais complexas e altamente organizadas, denominadas lóbulos hepáticos, os quais são formados por cordões de hepatócitos entremeados por sinusoides, que se estendem radialmente de uma veia central até a periferia do lóbulo (Gordillo et al. 2015). Na periferia, se encontram de 3 a 6 espaços porta, contendo a tríade portal – um ducto biliar, um ramo da artéria hepática e um ramo da veia porta. O sangue flui do espaço porta em direção à veia centrolobular pelos sinusoides, entrando em íntimo contato com os hepatócitos, alcança a veia hepática e deixa o órgão através da veia cava inferior (Vollmar and Menger 2009).

A anatomia hepática e a arquitetura do parênquima são essenciais para que o órgão desempenhe suas funções no organismo. Sendo a maior glândula do corpo, o fígado exhibe tanto propriedades endócrinas – secreção de hormônios, como fator de crescimento semelhante à insulina, angiotensina,

trombopoietina – quanto exócrinas – produção de bile. Também é responsável pela secreção de inúmeras proteínas plasmáticas como fatores de coagulação, albumina e proteínas carreadoras. O fígado, ainda, é responsável pela biotransformação e *clearance* de substâncias endógenas e exógenas circulantes: amônia, hormônios esteroides, proteínas séricas, fármacos, toxinas, contaminantes ambientais, álcool e até produtos de degradação bacteriana originados do trato gastrointestinal. Como principal órgão envolvido na regulação do metabolismo energético do organismo, controla o estoque de glicogênio, a homeostase de glicose e a síntese e transporte de colesterol (Chiang 2014). Ainda, do ponto de vista imunológico, o fígado é um órgão importante, responsável pela produção de proteínas de fase aguda, componentes do complemento, citocinas e quimiocinas e um componente crítico na defesa contra infecção por via sanguínea, com papel na detecção e *clearance* de patógenos (Jenne and Kubes 2013).

Correspondendo a 80% da massa hepática, os hepatócitos são as principais células do parênquima e realizam a maioria das funções metabólicas e secretoras atribuídas ao órgão, o que requer em termos energéticos, que sejam células muito ativas. Assim, uma particularidade dos hepatócitos é possuir um grande número de mitocôndrias em seu citoplasma, abundante retículo endoplasmático, além de conter múltiplas cópias do genoma acumuladas em seus núcleos (Duncan 2013). O segundo tipo celular mais abundante são as células endoteliais sinusoidais (LSECs), bastante diferenciadas do endotélio convencional. As LSECs são células altamente delgadas, fenestradas e desprovidas de lâmina basal, o que permite um fluxo bidirecional de substâncias do plasma para o hepatócito e um contato íntimo, embora seletivo, de células carreadas pelo sangue com o parênquima hepático (Hickey and Westhorpe 2013).

Para cumprir a função imunológica do fígado, inúmeras populações de células imunes tanto residem quando transitam pelo órgão (Ilustração 1). As células de Kupffer (KCs), a maior população de macrófagos residentes do corpo, são encontradas dentro dos sinusoides hepáticos, sobre as LSECs. Tal localização estratégica deixa as KCs diretamente expostas ao fluxo sanguíneo, permitindo a fagocitose de conteúdo direto da microcirculação hepática.

Juntamente com as LSECs, KCs formam o maior sistema reticulo-endotelial do organismo, cuja função básica é capturar antígenos, microrganismos e células senescentes, e eliminá-los do sangue (Jenne and Kubes 2013). Esta função de filtro impede que grandes quantidades de lipopolissacarídeo, restos celulares e microrganismos da microbiota atinjam a circulação sistêmica, prevenindo a disseminação de patógenos em condições homeostáticas e de doença (Balmer et al. 2014). Outra população de células residentes hepáticas foi descrita recentemente ocupando o espaço subcapsular. Ainda não está claro se essas células correspondem a células dendríticas (DCs) subcapsulares (David et al. 2016; Freitas-Lopes et al. 2017) ou à uma população de macrófagos fenotipicamente e espacialmente divergente das KCs (Sierro et al. 2017). Uma vez que a cápsula hepática está exposta à cavidade peritoneal, permitindo uma comunicação entre os compartimentos, pode-se inferir que a localização dessas células é estratégica para prevenir a disseminação de bactérias da cavidade peritoneal para o fígado. Essas células, diferente das KCs, parecem não fagocitar diretamente patógenos, mas sim recrutar outro grupo de células fagocíticas, os neutrófilos. Em condições fisiológicas, poucos neutrófilos são encontrados no fígado. No entanto, a população de neutrófilos pode aumentar rapidamente em resposta a um estímulo patogênico (Gregory et al. 1996) ou estéril (Marques et al. 2012; McDonald and Kubes 2016).

Além de células mieloides, distintas populações de linfócitos habitam o fígado, protegendo o corpo contra infecções e tumores, contribuindo tanto para a regulação quanto amplificação de processos patológicos, como desordens autoimunes e alérgicas (Doherty 2016) e modulando a inflamação em uma variedade de doenças hepáticas (Adams et al. 2010). Localizados intravascularmente, nos septos de tecido conjuntivo ou intercalados entre as células do parênquima hepático (Heymann and Tacke 2016), as populações de linfócitos incluem células do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo, sendo que sua composição difere da do sangue ou de qualquer outro tecido (Jenne and Kubes 2013). Os linfócitos imunes que participam da imunidade adaptativa orquestram respostas potentes e altamente específicas contra patógenos invasores (Wong et al. 2016) e incluem os linfócitos B e as células TCD4⁺ e TCD8⁺. Já os linfócitos que participam da imunidade inata

respondem rapidamente a ligantes conservados expressos por patógenos microbianos, células infectadas por patógenos ou células tumorais e incluem as células *natural killer* (NK). *T natural killer* (NKT) e $T\gamma\delta$.

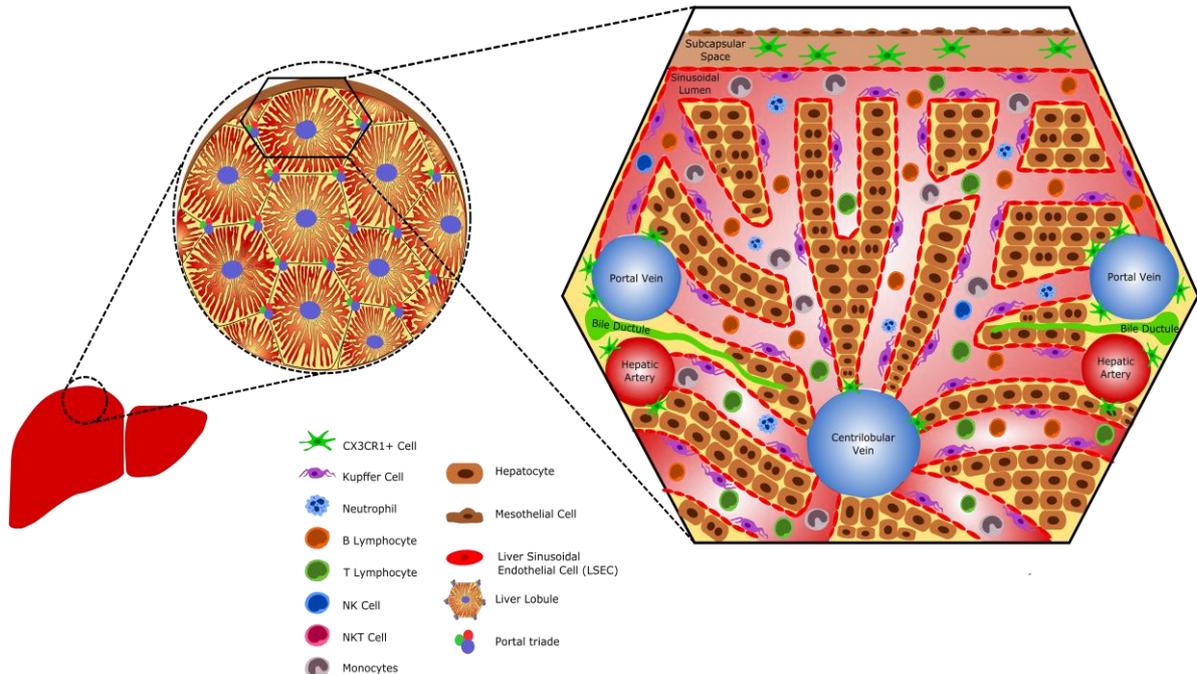


Ilustração 1. Estrutura do lóbulo hepático. Organização dos componentes de um lóbulo hepático. Cordões de hepatócitos entremeados por capilares sinusoides, células imunes no interior dos vasos e no espaço subcapsular. Artéria hepática, veia porta e ducto biliar formando o espaço porta; veia centrolobulillar, destino do sangue proveniente do espaço porta. Adaptado de Freitas-Lopes et al. 2017.

1.2. O fígado embrionário

O processo de embriogênese hepática é bastante conservado entre as espécies de vertebrados. Considerando que uma gestação normal de camundongo dura de 19-21 dias, o fígado começa a se formar no dia E9.0 (dia embrionário 9.0), a partir do endoderma do domínio ventral do intestino adjacente ao mesoderma cardíaco e septo transversal, que se torna mais espesso para formar o divertículo hepático (Gordillo et al. 2015). Subsequentemente, o divertículo se expande e o endoderma passa de uma monocamada de células cubóides para uma multicamada de células pseudoestratificadas, os hepatoblastos, que proliferam e invadem o septo transversal, formando o primórdio do fígado (Bort et al. 2006). Hepatoblastos são células precursoras bipotenciais e, por volta do dia E13.5, os mais

próximos à veia porta se diferenciam em colangiócitos, e os mais distantes se diferenciam em hepatócitos, as principais células constituintes do parênquima hepático (Ruebner et al. 1990). Esse processo de maturação continua ainda pelo período após o nascimento (Gordillo et al. 2015). No dia E9.5, o fígado inicia seu papel hematopoiético, sendo o principal sítio de hematopoiese fetal (Lee et al. 2012).

A hematopoiese envolvendo o fígado fetal ocorre em duas ondas diferentes: uma transiente-definitiva e outra definitiva (Ilustração 2) (Hoeffel and Ginhoux 2015; Ginhoux and Williams 2016). Em ambas, o fígado não é capaz de produzir progenitores *de novo*, mas sim de recrutá-los do saco vitelínico e outros sítios hemogênicos do embrião para iniciar a hematopoiese (Swiers et al. 2013). A transiente-definitiva envolve a emergência de progenitores eritromieloides (EMPs) e linfo-mieloides (LMPs), que emergem do endotélio hemogênico do saco vitelínico nos dias E8.5 e 9.5, respectivamente. Uma vez estabelecida a circulação no feto, tais progenitores migram então, para o fígado e iniciam a primeira fase da hematopoiese intra-embriônica, sofrendo ali, expansão e diferenciação, antes de colonizarem outros tecidos (Hoeffel and Ginhoux 2015). As EMPs dão origem às populações de macrófagos residentes no adulto – incluindo as células de Kupffer – que se auto-renovam e são independentes de monócitos da medula (Yona et al. 2013). A onda definitiva se inicia no dia E10.5 na aorta-gônada-mesonefros (AGM) do embrião com o surgimento de células tronco hematopoiéticas (HSCs), que colonizam o fígado, estabelecendo a hematopoiese definitiva até os tempos tardios da gestação (Ginhoux and Williams 2016). Do fígado, essas células colonizam a medula óssea, levando à geração das HSCs encontradas na medula óssea dos adultos.

Nesse período embrionário, hematopoiese e desenvolvimento do fígado co-existem. De forma interessante, num primeiro momento, em que a hematopoiese está em fase expansiva – com pico de atividade no dia E14.5 –, algumas funções metabólicas hepáticas estão reduzidas, de acordo com a ainda incompleta formação dos hepatócitos (Gordillo et al. 2015). À medida que ocorre a diferenciação dos hepatoblastos e maturação dos hepatócitos, o órgão não suporta mais essa função, que então, é assumida pela medula óssea

pouco antes do nascimento (Gruppuso and Sanders 2016). Com a redução da hematopoiese no dia E15.5, funções hepáticas aumentam (Guo et al. 2009).

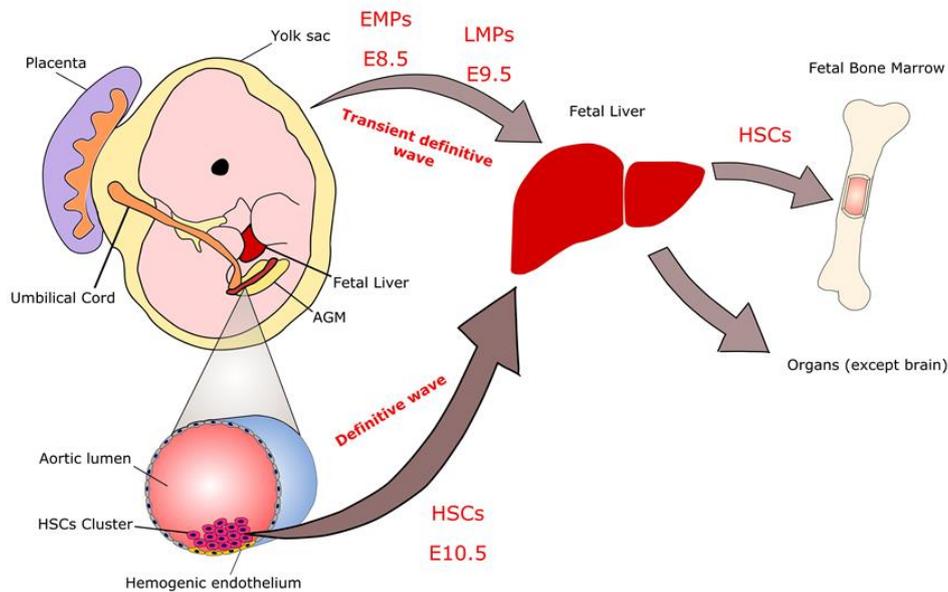


Ilustração 2. Hematopoiese no fígado embrionário. Diferentes ondas de precursores provenientes do saco vitelínico (EMPs e LMPs) e outros sítios hemogênicos do embrião (HSCs) colonizam o fígado fetal, sustentando a hematopoiese. Do fígado, essas células colonizam outros órgãos, incluindo a medula óssea. Adaptado de Freitas-Lopes et al. 2017.

1.3. O fígado neonatal

O processo de organogênese e desenvolvimento embrionário hepáticos são bem descritos, incluindo a origem do fígado, os fatores de transcrição envolvidos na especificação do órgão, a função hematopoiética e a diferenciação dos tipos celulares (Si-Tayeb et al. 2010; Gordillo et al. 2015). Da mesma forma, inúmeros estudos descrevem o papel do fígado no adulto, destacando sua importante função metabólica, catabólica, excretora, secretora, de síntese e armazenamento e de defesa imunológica (Chiang 2014). Apesar de estudos em humanos elucidarem parte da fisiologia hepática neonatal (Grijalva and Vakili 2013), o período pós-nascimento é muitas vezes, negligenciado no que diz respeito à organização morfológica e composição celular, sendo considerado semelhante ao do adulto. Buscamos assim, por meio desse trabalho, estudar as particularidades do desenvolvimento hepático neonatal.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar as mudanças morfológicas, imunológicas e funcionais durante o desenvolvimento pós-natal do fígado.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar a arquitetura hepática ao longo do desenvolvimento pós-natal, no que diz respeito à organização do parênquima, das células imunes e da microvasculatura;

2. Determinar a composição celular imune do fígado nas diferentes fases do desenvolvimento;

3. Estudar a compartimentalização das diferentes populações mielóides no nos espaços subcapsulares e parenquimais;

4. Avaliar parâmetros de função hepática – depuração de substâncias e produção de transaminases – ao longo do tempo;

5. Estudar as similaridades do perfil arquitetural e celular hepático usando biópsias de fígados de neonatos humanos.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 WT provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG); e C57BL/6 CX3CR1^{gfp/wt} (B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J) e LysM-EGFP (Lyz2tm1.1Graf), provenientes do Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Animais de diferentes idades (0 e 4 dias, 2, 3, 4 e 8 semanas) foram gerados de matrizes acondicionadas em grupos de 2 fêmeas para cada macho em ambiente com temperatura controlada (24°C), períodos alternados de 12h luz/escuridão, com ração (NUVILAB) e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas da Comissão de Ética de Uso Animal da UFMG (CEUA 34/2017).

3.2. Citometria de massa

3.2.1. Obtenção de células totais e células não-parenquimais hepáticas

Para os tempos de 0 dia e 1 semana, foram obtidas células totais hepáticas, devido à uma limitação na separação das células parquimais dos hepatócitos por centrifugação diferencial. Para os tempos de 3 e 8 semanas, as células não parenquimais foram isoladas, conforme descrito anteriormente (David et al. 2017). De forma resumida, os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (*i.p.*) (ketamina 80 mg / kg e xilazina 15 mg / kg; Syntec), sangrados; os fígados removidos, picados, e digeridos em meio RPMI 2% SFB com colagenase tipo 8 (0,25mg / g animal; Sigma-Aldrich) sob agitação constante, a 37°C, por 45 minutos. A suspensão foi centrifugada a 300 xg, 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet de células, correspondendo ao fígado total, foi utilizado para os animais de 0 dia e 1 semana. Para os demais, o pellet foi ressuspendido em meio RPMI 2% SFB e centrifugado a 60 xg, 4°C, por 3 minutos, para separação dos hepatócitos. O sobrenadante resultante foi colhido e centrifugado novamente a 60 xg, 4°C, por 3 minutos. O sobredanante resultante foi filtrado em cell strainer de 70 µm

(Becton-Dickinson) e centrifugado a 300 xg, 4°C, por 5 minutos. O pellet final de células, correspondendo às células não parenquimais foi utilizado para os animais de 3 e 8 semanas. Nos isolados de células foi então empregada a técnica de citometria de massa.

3.2.2. CyTOF

Para citometria de massa (time-of-flight mass cytometry – CyTOF), após a etapa de isolamento celular, 1×10^6 células foram marcadas com anticorpos conjugados a radioisótopos na diluição de 1:100, como descrito previamente (Becher et al. 2014; David et al. 2017). A lista completa dos 30 anticorpos utilizados se encontra no anexo I. As amostras foram adquiridas no citômetro Helios Mass (Fluidigm, South San Francisco, CA) e os dados foram plotados utilizando análise viSNE. Os eventos foram plotados dentro das células CD45⁺.

3.2.3. Estratégias de gates

A representação de *dot plot* da análise viSNE de todas as idades (um animal representativo) se encontra no anexo II, bem como as porcentagens referentes a cada animal. As populações de leucócitos foram definidas por meio da estratégia abaixo.

Populações	Estratégia
Granulócitos	Ly6C ^{int} Ly6G ⁺ F4/80 ⁺ SiglecF ⁺
Monócitos	Ly6C ^{hi} Ly6G ⁻ F4/80 ^{low}
Macrófagos/DCs	CD11c ⁺ MHCII ⁺ CD26 ⁺ F4/80 ^{hi}
Células B	CD19 ⁺
Células NKT	CD3 ⁺ NK1.1 ⁺

Células T	CD3 ⁺ NK1.1 ⁻ CD4 ⁺ CD3 ⁺ NK1.1 ⁻ CD8 ⁺
Células NK	CD3 ⁻ NK1.1 ⁺
Monócitos/Macrófago (indefinido)	Ly6C ^{hi} F4/80 ^{hi/int}
Precursosores	Lin ⁻ CD117 ⁺ CD11b ^{-/low} CD117 ⁺ Ly6C ⁺

3.3. Microscopia

3.3.1. Cortes congelados

Os animais foram anestesiados *i.p.* e perfundidos via transcardíaca com 20mL de solução salina (Ringer's solution) e em seguida, com 40 mL de formalina neutra tamponada (NBF) a 10%. O fígado foi então removido e fragmentos foram fixados em NBF 10% por 3 horas e em seguida, imersos em solução de sacarose a 15% (por 1 hora) e 30% (por 3 horas ou overnight). Após, os tecidos foram montados em OCT, congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e então seccionados a 12 µm (-22 °C) em criostato (Leica CM3050 S). Lâminas contendo as secções de tecido foram imersas em solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) por 15 minutos e submetidos a recuperação antigênica em tampão citrato 0,06% (pH 6,0) e aquecimento em microondas por 10 minutos. Após permeabilização por 15 minutos em solução PBS contendo 0,5% de triton X-100, os cortes foram submetidos ao bloqueio de ligações inespecíficas pela incubação por 1 hora com soro normal de cabra (NGS) a 3% e em seguida, incubados overnight (4°C) com o anticorpo primário camundongo anti-albumina (clone 188835, RD systems) diluído 1:250 em PBS. Para os controles negativos, os cortes foram incubados em ausência do anticorpo primário. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente com o anticorpo secundário cabra-anti-camundongo conjugado com Alexa 647 (clone Poly4055, BioLegend) diluído 1:

100 em PBS. O núcleo das células foram contracorados com 4,6-diamidino-2-phenylindole staining (DAPI - D1306, Life Technology). As lâminas obtidas foram montadas em glicerol contendo Tris-HCl 0,1M na proporção (9:1) e seladas. A fluorescência foi observada no microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 (Nikon, Japão).

3.3.2. Metacrilato

Os animais foram anestesiados *i.p.* e perfundidos via transcardíaca com 20mL de solução salina (Ringer's solution) e em seguida, com 40 mL de formalina neutra tamponada (NBF) a 10%. O fígado foi então removido e fragmentos foram fixados e, lavados em salina tampão fosfato (PBS), desidratados em série crescente de etanol e incluídos em resina glicolmetacrilato (Technovit 7100 – Heraeus Kulzer, Alemanha), de acordo com orientações do fabricante. Secções de 3 µm de espessura foram obtidas dos tecidos emblocados e as lâminas resultantes foram hidratadas em água destilada precedente a coloração com azul de toluidina-borato de sódio para análise. 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.

3.3.3. Microscopia *ex vivo*

Os animais receberam uma dose intravenosa (*i.v.*) dos anticorpos fluorescentes anti-F4/80 phycoerythrin (0,1 µg/g, clone BM8, BioLegend) e anti-CD31 BV-421 (0,15 µg/g, clone 390, BD) ou anti-CD31 APC (0,3 µg/g, clone 390, BioLegend). Após 10 minutos, foram anestesiados, sangrados e os fígados retirados para observação *ex vivo* utilizando o microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 (Nikon, Japão). Duas estratégias de imagens foram utilizadas: imagens transversais e através da cápsula, conforme ilustração abaixo. Após aquisição, as imagens foram geradas no programa Velocity (PerkinElmer).

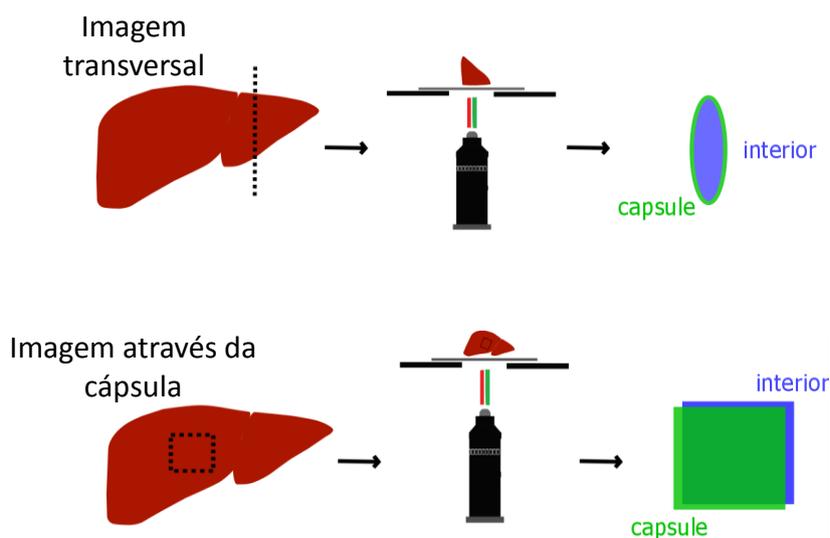


Ilustração 3. Estratégia utilizada para imagens *ex vivo*.

3.3.4. Histologia dos fígados humanos

As amostras de fígados humanos foram recebidas da Faculdade de Medicina da UFMG fixadas em formol 4% tamponado. Posteriormente, foram desidratadas em soluções de álcool etílico, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. Cortes teciduais de 5 μm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo e corados com hematoxilina & eosina (H&E). A visualização dos cortes foi feita em microscópio Nikon Eclipse E600 e as imagens obtidas utilizando o sistema de imagem Axiocam (Zeiss). Os procedimentos realizados estão de acordo com as normas da COEP (CAAE – 00907612.0.0000.5149).

3.3.5. Quantificação do número de células e análise dos espaços avasculares

A quantificação celular e a análise dos espaços avasculares foram feitas com o auxílio do software ImageJ. Nos parâmetros avasculares, consideramos o eixo mais longo, a área, o perímetro e a circularidade (consideramos a média dos espaços mais circulares encontrados igual a 1), conforme ilustrado abaixo.

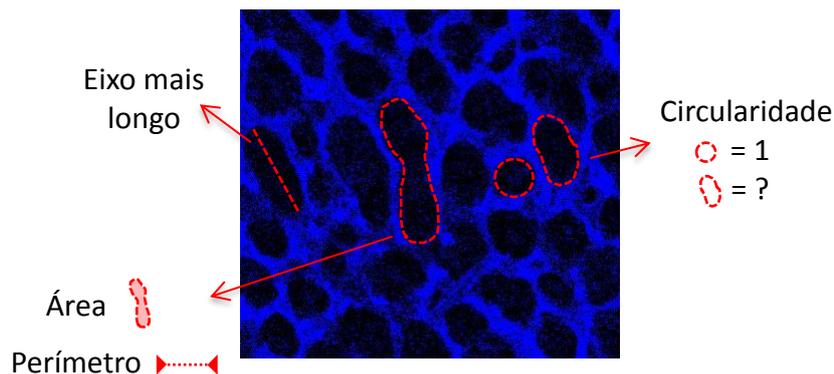


Ilustração 4. Estratégia utilizada para análise dos espaços avasculares.

3.4. Ensaios enzimáticos

Para determinar a atividade das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST) no fígado, foram utilizados os kits transaminase ALT cinético e AST cinético (Bioclin), respectivamente. Para os testes, 50 mg de tecido foram homogeneizados em salina em macerador de tecidos, centrifugados a 10000 rpm, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado como amostra. Em suma, os testes consistem em duas reações, em que primeiramente as enzimas catalisam reações de transferência de grupamentos aminas, gerando produtos que reagem com o NADH oxidando-o a NAD⁺. A velocidade de diminuição da concentração de NADH é proporcional a atividade das transaminases. As medidas foram feitas como quatro leituras de absorbância a 340 nm, em intervalos de um minuto, cujo valor médio reflete a atividade da enzima. O resultado final (dado por U/L) foi dividido pelo peso inicial do tecido, sendo então expresso em U/L/mg. Estes métodos são recomendados pela International Federation of Clinical Chemistry.

3.5. PCR em Tempo Real (qPCR)

3.5.1 Extração de RNA

A extração de RNA total do fígado foi realizada com o auxílio do kit ReliaPrep™ RNA TissueMiniprep System, Promega® e seguindo o protocolo

do fabricante. Os fragmentos retirados do fígado, juntamente com tampão de lise, foram homogeneizados em macerador de tecidos, centrifugados a 14000 xg , 3 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado isopropanol para precipitação do material genético. A solução foi então transferida para uma minicoluna, seguido de centrifugação a 14000 xg por 1 minuto. Após lavagem com RNA Wash Solution a 14000 xg por 1 minuto, o líquido do tubo coletor foi descartado e DNase foi adicionada à coluna para degradação do DNA. Após 15 minutos, seguiu-se 3 etapas de lavagens para retirada de sais, proteínas e outros componentes celulares (adição de Column Wash Solution, RNA Wash Solution e centrifugações). Por fim, o RNA foi desligado da coluna pela adição de Nuclease-free Water, seguido de centrifugação a 14000 xg por 1 minuto, e coletado em microtubos de polipropileno Eppendorf®. O RNA obtido foi quantificado em NanoDrop®, com leitura em 260nm, e armazenado até o uso em freezer -80°C.

3.5.2. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, utilizou-se o iScript cDNA Synthesis Kit, BioRad® seguindo as instruções do fabricante. À 1µg da amostra de RNA foram adicionados iScriptReaction Mix 5X, transcriptase reversa e água nuclease-free. As reações seguiram então, para o termociclador onde permaneceram por 5 min a 25°C para anelamento dos primers, 20 min a 46°C para ação da enzima transcriptase reversa e 1 min a 95°C para inativação da enzima. As amostras foram, então, armazenadas a -20°C.

3.5.3. PCR quantitativo (qPCR)

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, utilizou-se GAPDH como controle endógeno, já determinado previamente como o melhor normalizador para os genes avaliados no fígado. O nível de expressão de ALT e AST foi determinado utilizando-se SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen™, EUA), primers específicos e o cDNA produzido. O protocolo de amplificação constituiu-se de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos,

seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo. As sequências dos primers para os genes relacionados foram:

Gene	Primer	Sequência
Gapdh	Foward	5'ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA3'
	Reverse	5'CGGCCAAATCCGTTACACCGA3'
ALT	Foward	5'AACCATTCACTGAGGTAATCCGA3'
	Reverse	5'GGGCTGTTTAGTAGGTTTGGGTA3'
AST	Foward	5'GCGCCTCCATCAGTCTTTG3'
	Reverse	5'ATTCATCTGTGCGGTACGCTC3'

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (threshold cycle) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes de interesse foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (GAPDH) de cada amostra. Com esse valor, agora chamado de ΔCt , calculou-se o $\Delta\Delta Ct$, que corresponde ao ΔCt amostra – ΔCt do controle. Nesse estudo, o controle utilizado foi o adulto (8 semanas). A relação da expressão gênica entre a amostra e o controle foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “curva de *melting*”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

3.6. Teste de depuração do verde indocianina (cardiogreen)

O teste de função hepática foi realizado por meio do *clearance* do verde de indocianina do sangue. Os animais receberam via *i.v.* uma solução de 20 mg/Kg do corante (ICG – *cardiogreen*, Sigma Aldrich) diluído em água tipo I.

Após 10 minutos, os animais foram anestesiados, eutanasiados e o soro coletado. As amostras foram diluídas e a absorbância medida em 800 nm em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader). O resultado obtido foi comparado a uma curva padrão e expresso em verde indocianina ($\mu\text{g} / \text{ml}$).

3.7. Análise Estatística

Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do software GraphPad Prism 6. Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se one-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. Todos os grupos foram comparados ao grupo 8 semanas. O nível de significância foi definido como $p < 0.05$.

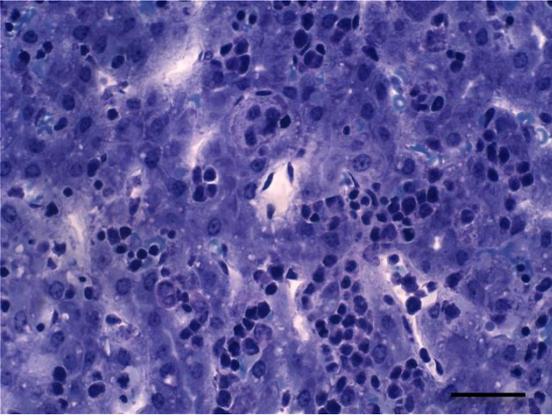
4. RESULTADOS

4.1. A arquitetura do parênquima hepático muda durante o desenvolvimento

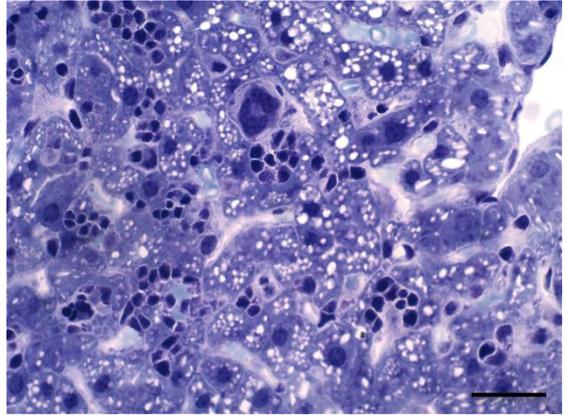
Visando caracterizar a arquitetura hepática, observamos cortes histológicos de fígados ao longo do desenvolvimento, por diferentes técnicas histopatológicas. Tanto cortes de material incluído em metacrilato quanto congelados revelaram mudanças na arquitetura do parênquima, no que diz respeito à densidade, organização e composição celulares (Figura 1A, 2A). Podemos perceber uma maior densidade de células (núcleos) nos animais mais novos, que cai com o tempo (Figura 2B). Nos dias 0 e 4, percebemos a presença de aglomerados celulares, “ilhas de células”, que se tornam menos comuns nas semanas seguintes, até praticamente desaparecerem na 3^a, 4^a e 8^a semana. A composição celular parece variar também entre as idades. Nos animais adultos (8 semanas), observamos grandes células, com aspecto de hepatócitos, organizadas em cordões, com limites celulares bem definidos, citoplasma abundante e algumas binucleadas. Núcleos nos espaços entre os cordões de células – possivelmente vasos – são também vistos. Esse padrão também é observado na semana 3 e 4 – porém as células aparentam ser menores – e parece ficar cada vez mais desorganizado nas idades mais novas, nas quais os limites celulares não são muito claros e os núcleos parecem envoltos por um fino citoplasma, característica de células imunes. Grandes figuras celulares que se assemelham a megacariócitos são comuns nos cortes dos dias 0, 4 e na semana 1 e menos comuns, mas encontradas, na semana 2 (Figura 1B, 2C).

A

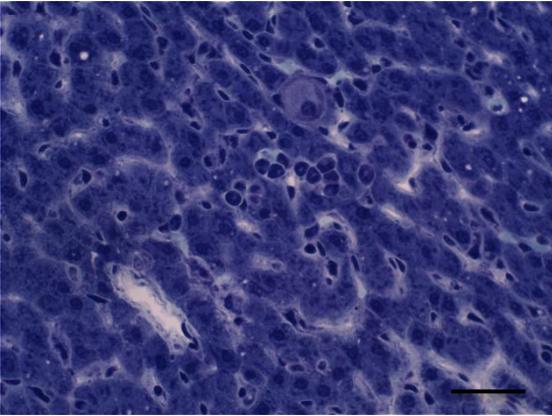
0 dia



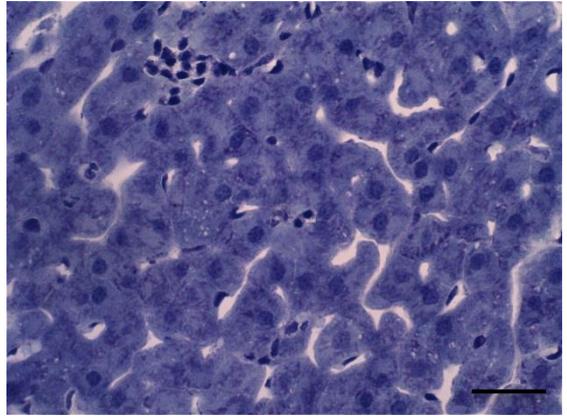
4 dias



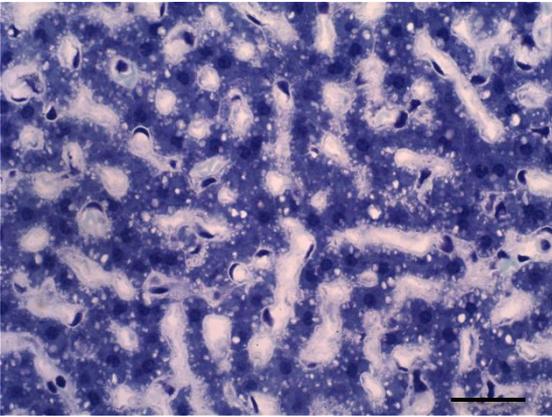
1 semana



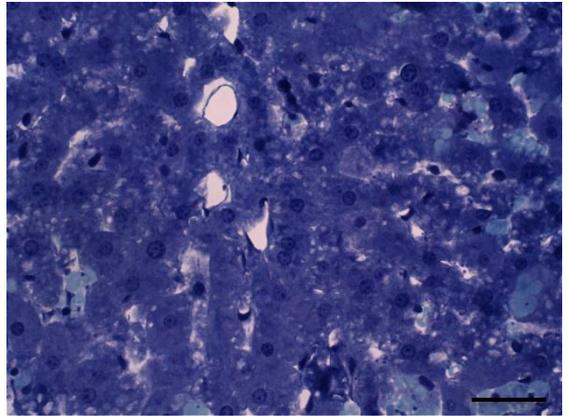
2 semanas



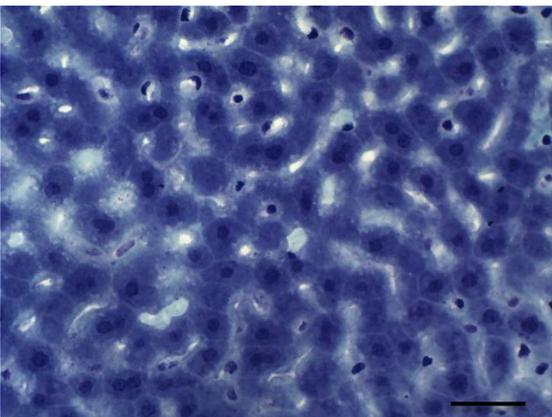
3 semanas



4 semanas



8 semanas



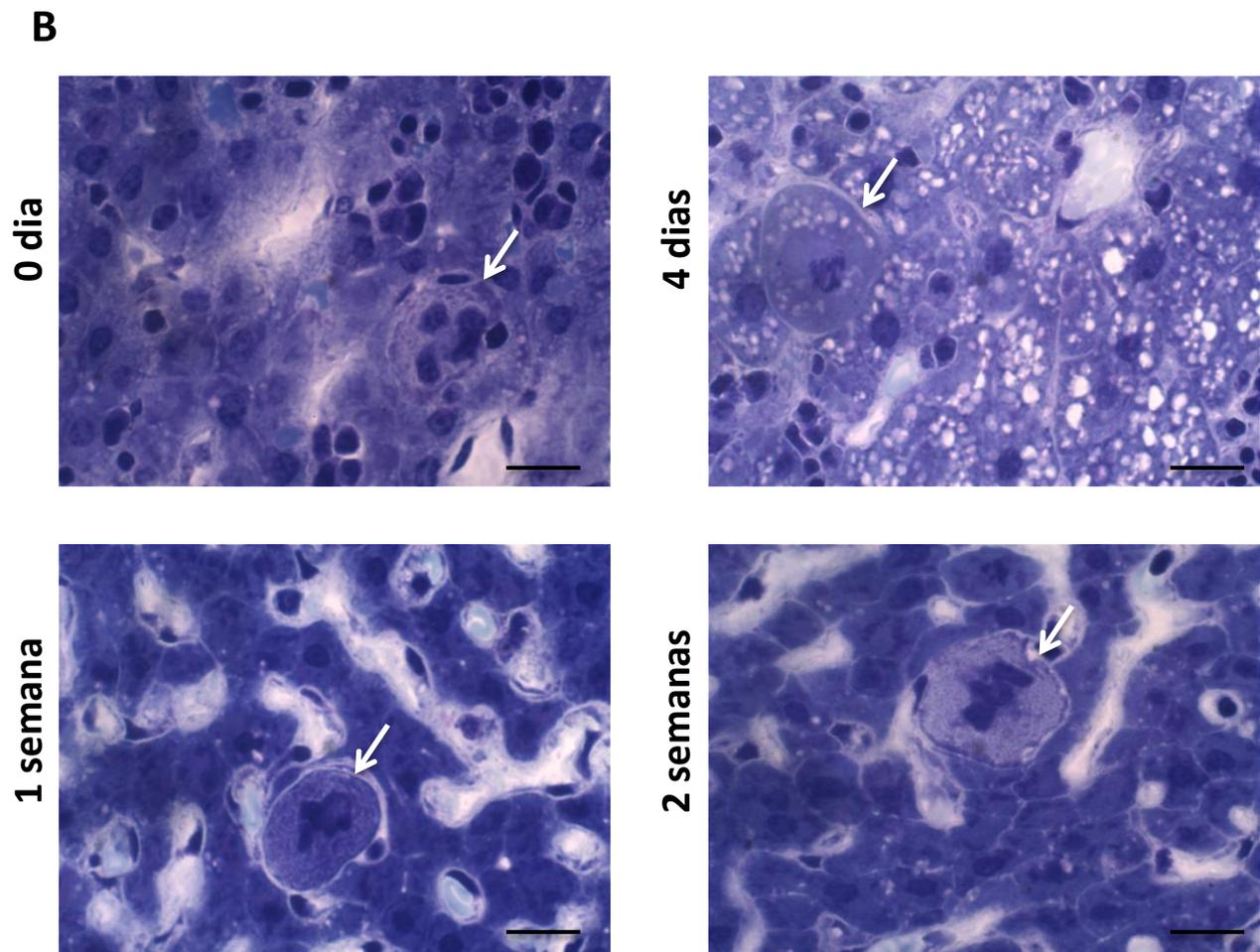
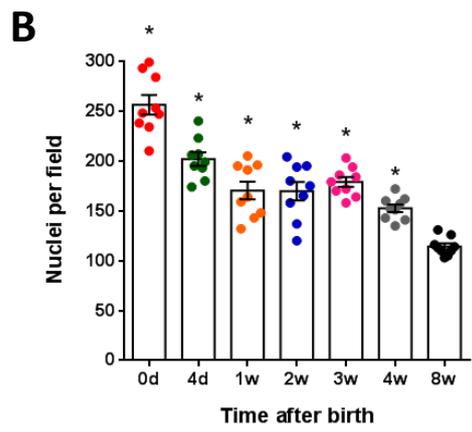
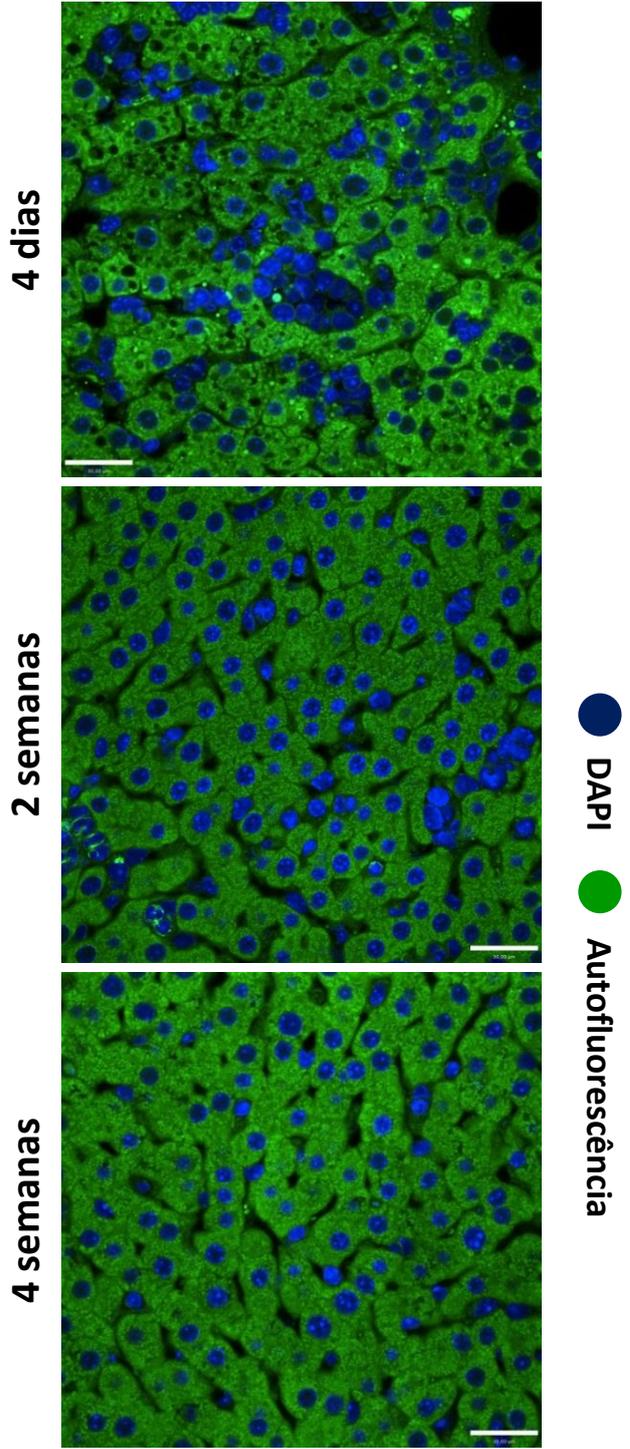
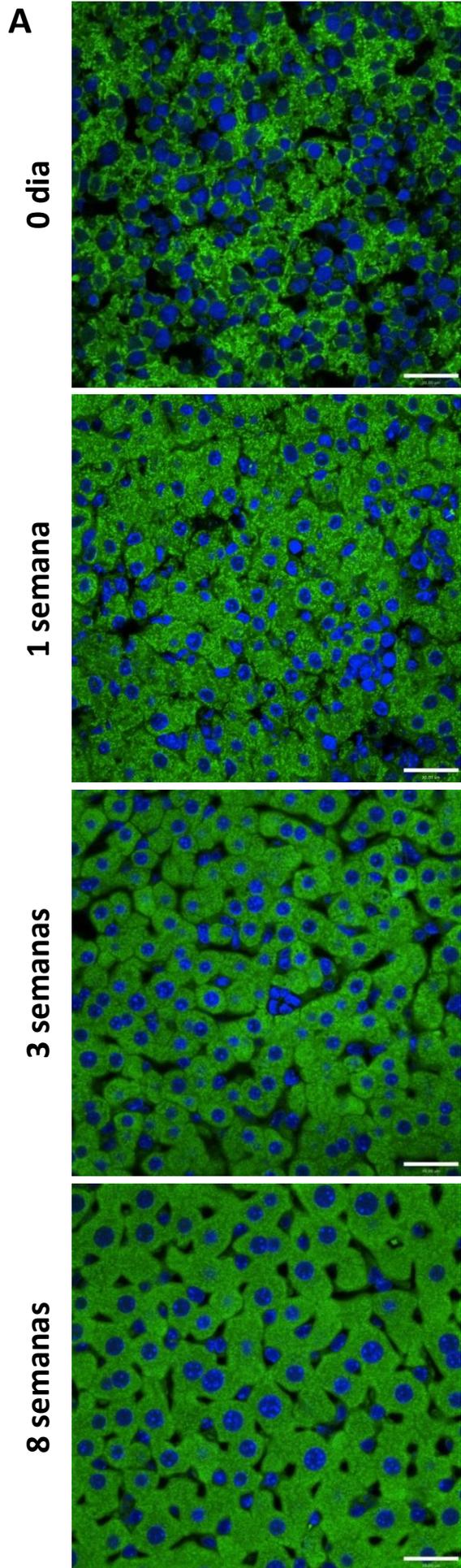


Figura 1. Arquitetura do parênquima hepático durante o desenvolvimento. (A) Histologias de cortes de fígados incluídos em metacrilato e corados por azul de toluidina. A barra de escala representa 40 μ m. **(B)** Cortes evidenciando megacariócitos (setas). A barra de escala representa 20 μ m.



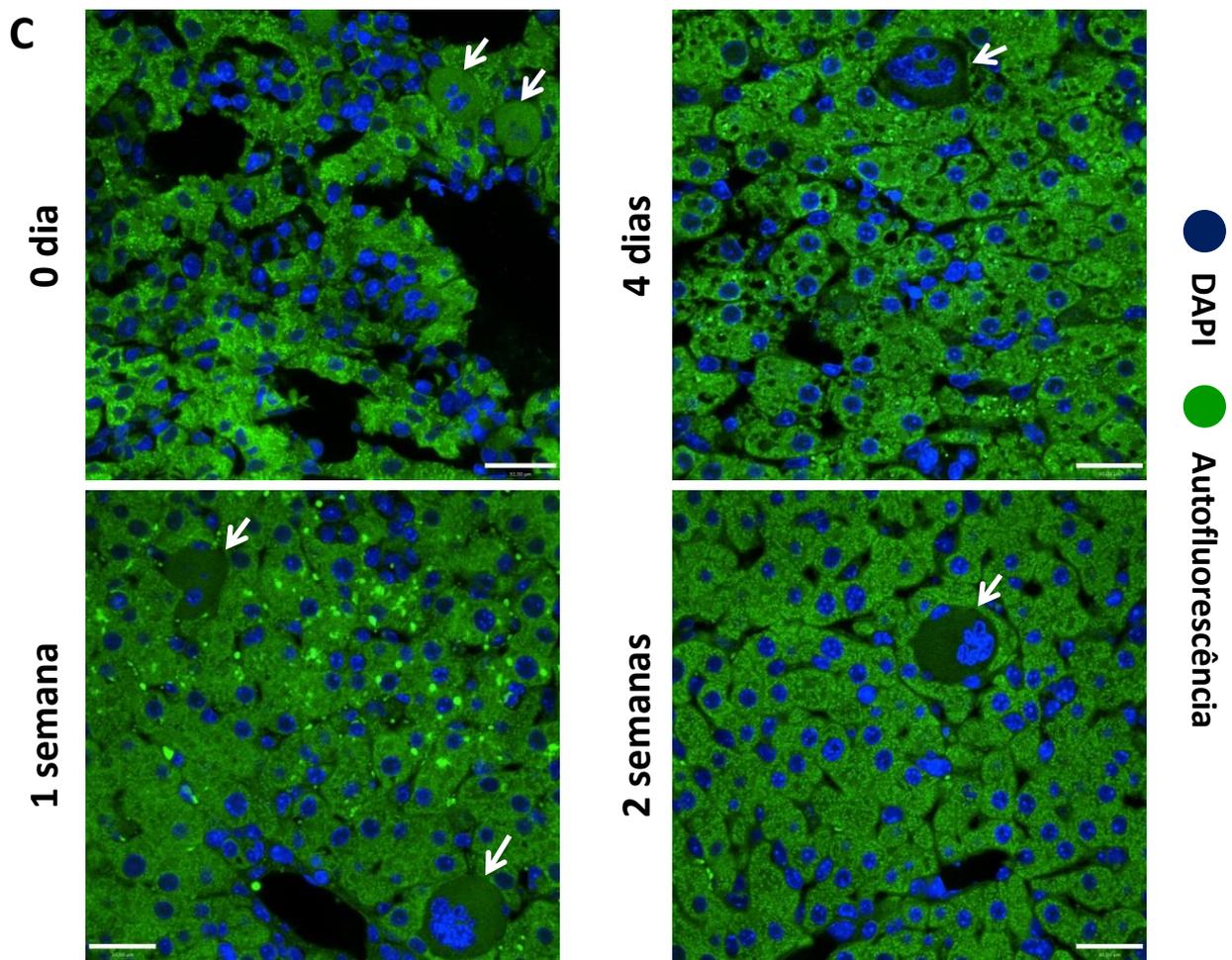


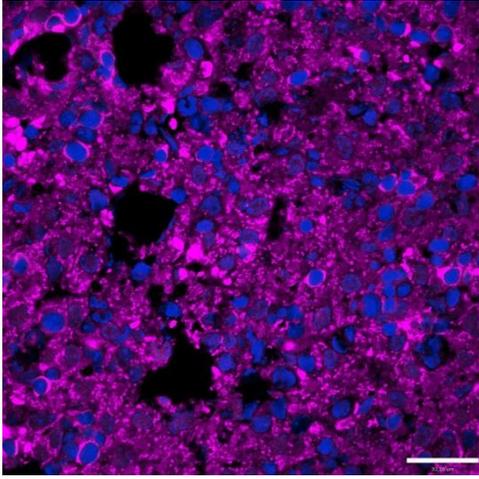
Figura 2. Arquitetura do parênquima hepático durante o desenvolvimento. (A) Histologias de cortes congelados do fígado, mostrando autofluorescência (verde) e núcleos celulares (azul). **(B)** Quantificação do número de núcleos por campo. **(C)** Cortes evidenciando megacariócitos (setas). Número de animais por grupo = 3. Campos contados por animal = 3. * indica significância estatística em relação ao 8 semanas ($p < 0,05$). A barra de escala representa $30\mu\text{m}$.

4.2. Coloração para albumina confirma organização de cordões de hepatócitos em estágios mais tardios do desenvolvimento

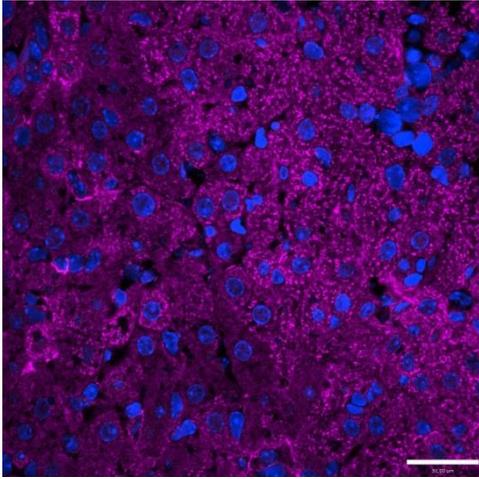
A observação da autofluorescência do citoplasma hepático revelou uma estrutura histológica confusa no neonato e mais organizada no adulto, no qual cordões de células com características de hepatócitos são observados. Assim, buscamos visualizar tais tipos celulares por meio da marcação com anti-albumina, uma vez que essa proteína é especialmente produzida por hepatócitos. A coloração nos estágios iniciais se mostrou inconclusiva e novamente, não conseguimos definir bem a estrutura do tecido, individualizar ou determinar quais células seriam hepatócitos (Figura 3A). Em estágios posteriores, entretanto, conseguimos identificar melhor os limites celulares e a marcação citoplasmática, confirmando que os cordões de células eram de fato, hepatócitos.

A

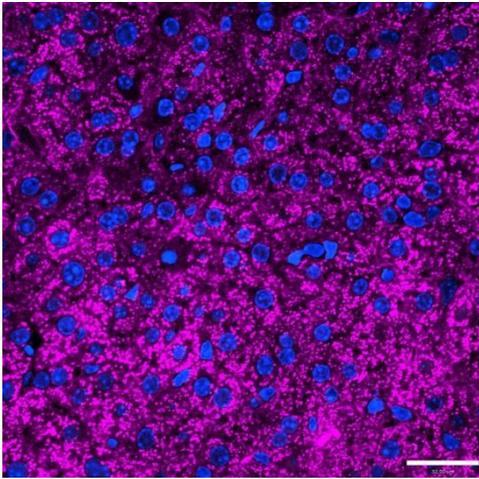
0 dia



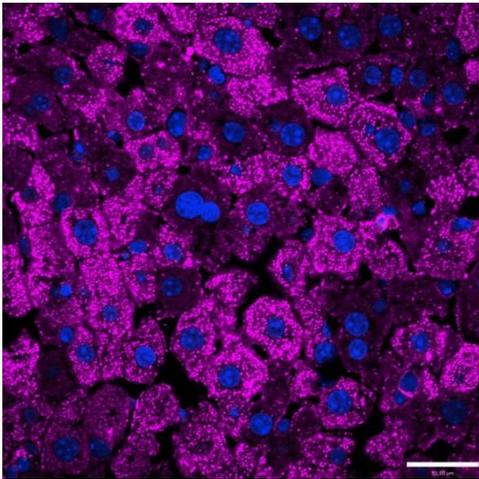
1 semana



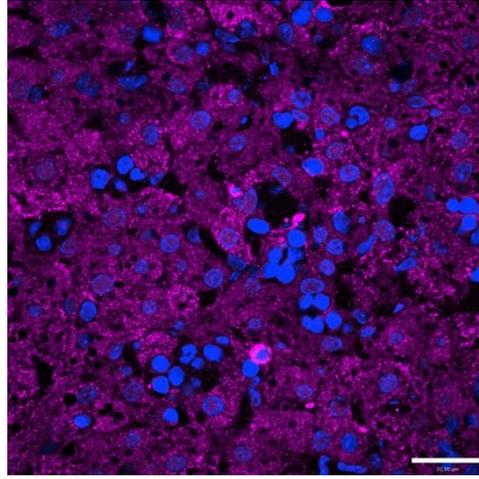
3 semanas



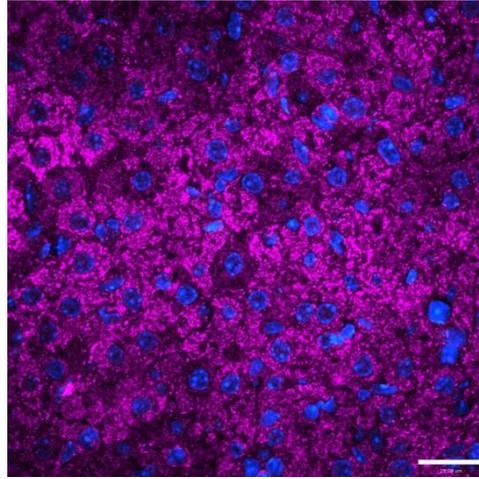
8 semanas



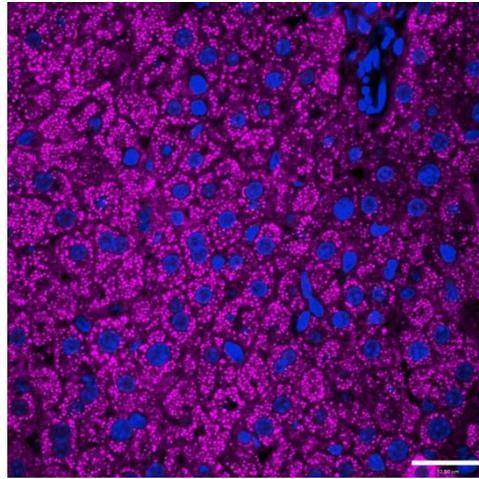
4 dias



2 semanas



4 semanas



● DAPI ● Albumin

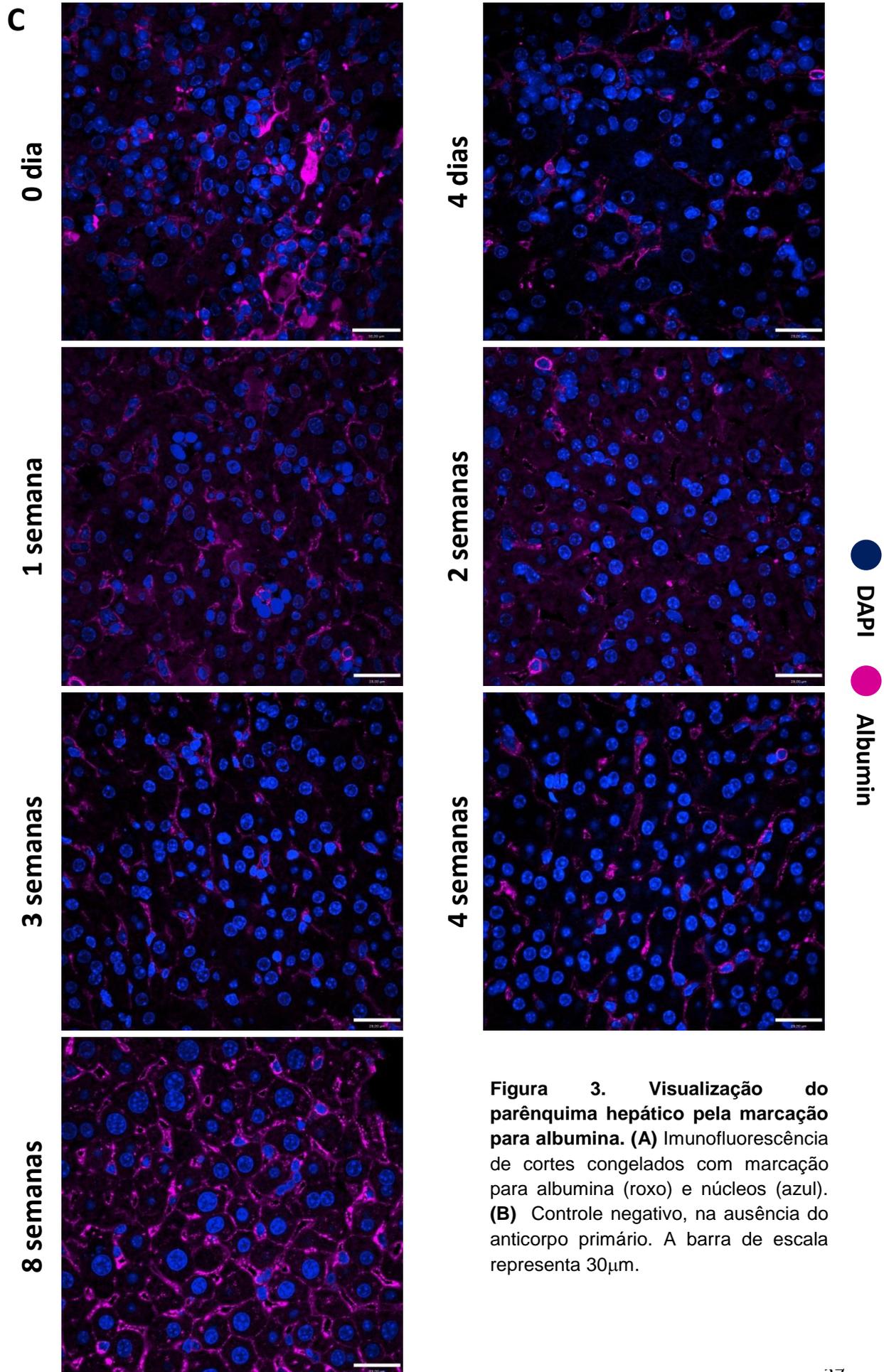


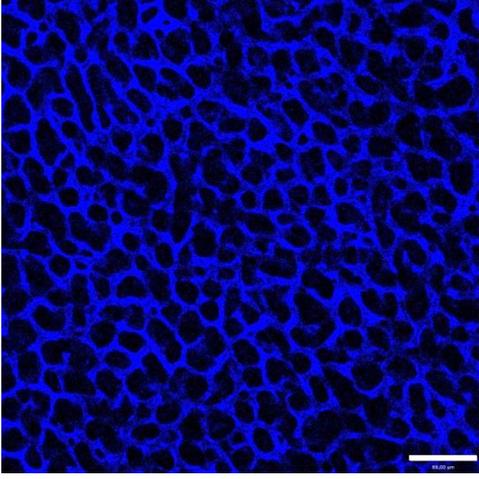
Figura 3. Visualização do parênquima hepático pela marcação para albumina. (A) Imunofluorescência de cortes congelados com marcação para albumina (roxo) e núcleos (azul). **(B)** Controle negativo, na ausência do anticorpo primário. A barra de escala representa 30 μ m.

4.3. Mudanças vasculares acompanham as modificações celulares

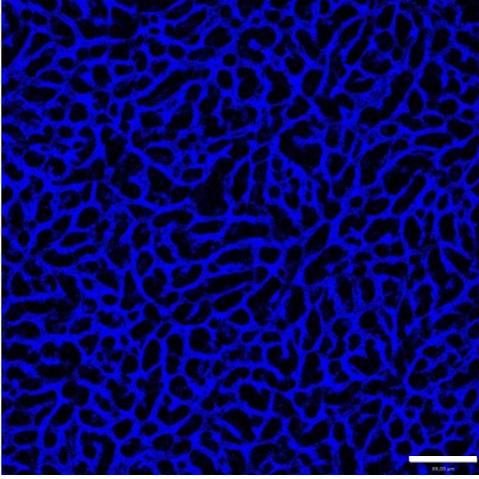
Uma vez que, no fígado adulto, os longos cordões de hepatócitos estão entremeados por capilares sinusoides e modificações na organização do parênquima hepático foram observadas, buscamos visualizar a vasculatura do órgão por meio de microscopia *ex vivo*, em que os animais receberam anti-CD31-APC ou BV421, para visualização dos vasos. Grandes mudanças na malha vascular puderam ser percebidas (Figura 4A). A estrutura vascular no 0 dia assemelha-se a uma colméia, com os vasos apresentando um comprimento curto antes de se ramificarem. Com o tempo, os vasos se tornam cada vez mais alongados. Os espaços avasculares – possivelmente ocupados pelos hepatócitos e ilhotas de células – passam de espaços mais circulares (Figura 4B) para espaços mais alongados (Figura 4C), apresentando maior área (Figura 4D) e perímetro (Figura 4E).

A

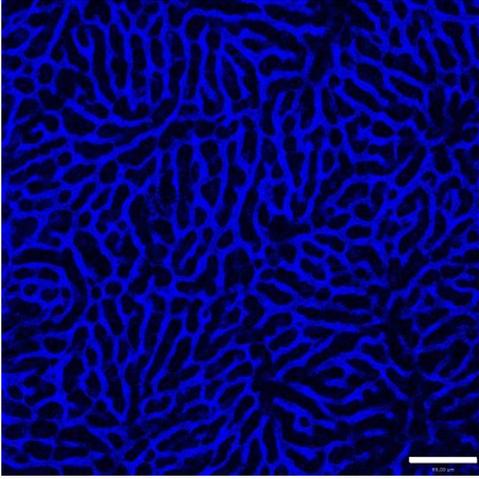
0 dia



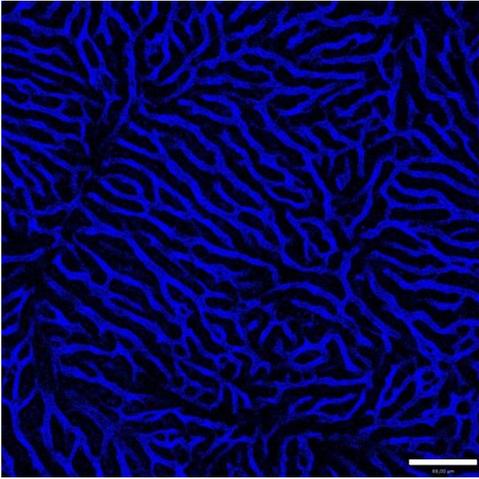
1 semana



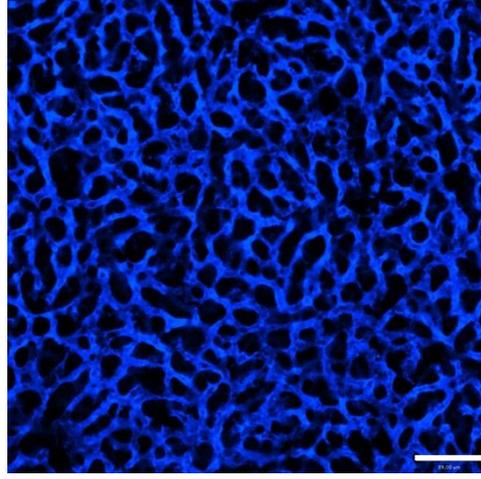
3 semanas



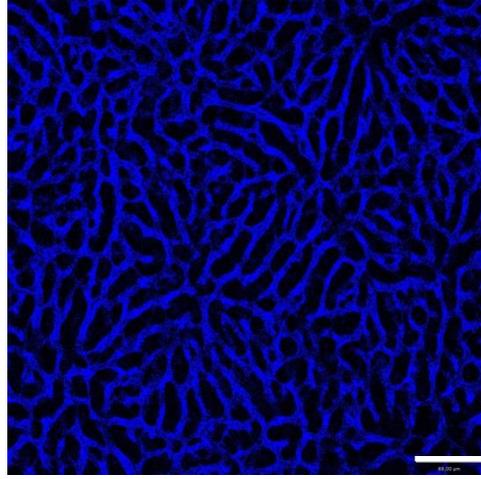
8 semanas



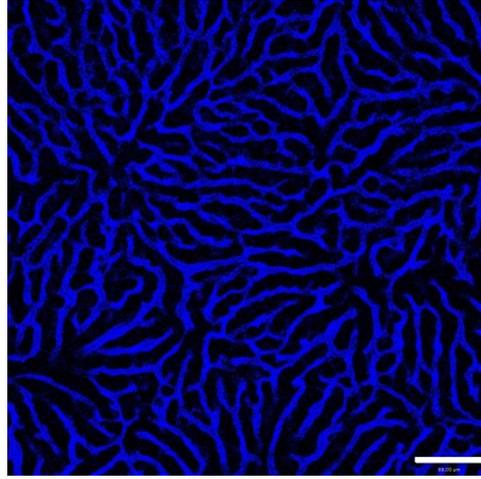
4 dias



2 semanas



4 semanas



 **PECAMI**

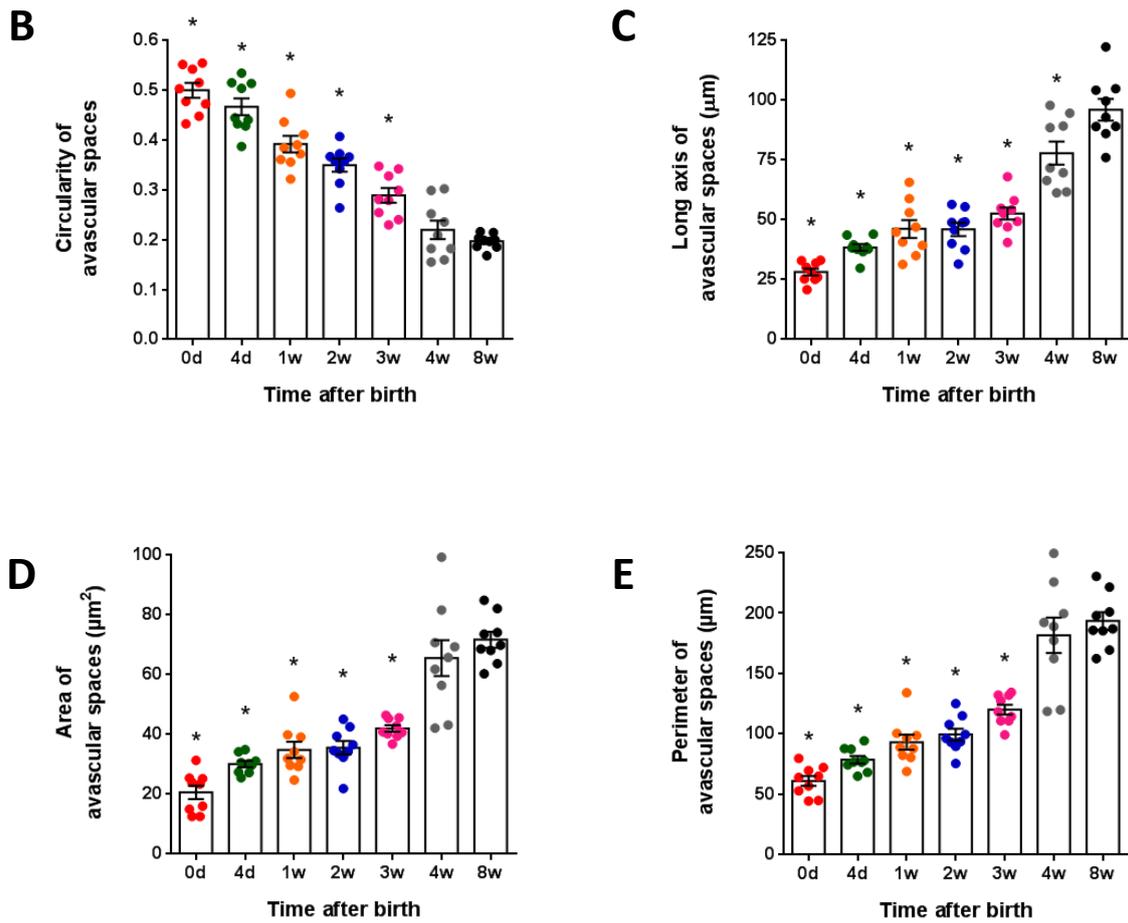


Figura 4. Estrutura vascular hepática ao longo da vida. (A) Microscopia *ex vivo*, mostrando sinusoides (azul). **(B-D)** Quantificação dos espaços avasculares. **(B)** Circularidade (1 = espaços mais circulares encontrados). **(C)** Eixo mais longo. **(D)** Área. **(E)** Perímetro. Número de animais por grupo = 3. Campos contados por animal = 3. Espaços avasculares medidos por campo = 20. * indica significância estatística em relação ao 8 semanas ($p < 0,05$). A barra de escala representa $90\mu\text{m}$.

4.4. A composição celular imune muda drasticamente ao longo do tempo

Visto que a densidade de células é muito diferente no neonato comparado ao adulto, estudamos a composição celular do fígado das diferentes idades, buscando identificar quais as populações celulares presentes. Para tal, empregamos a técnica de citometria de massa, em que isótopos de metais elementais são conjugados a anticorpos monoclonais, o que permite a análise de mais de 30 marcações simultaneamente, com mínimo *overlap* entre canais. Considerando os eventos CD45⁺ e, de acordo com os marcadores escolhidos, encontramos diferentes populações celulares, sendo que no 0 dia, 22 populações foram identificadas; na semana 1, 19; na semana 3, 14; e na semana 8, 15 (Anexo I). Essas populações foram agrupadas nos grandes grupos de leucócitos (Figura 5A).

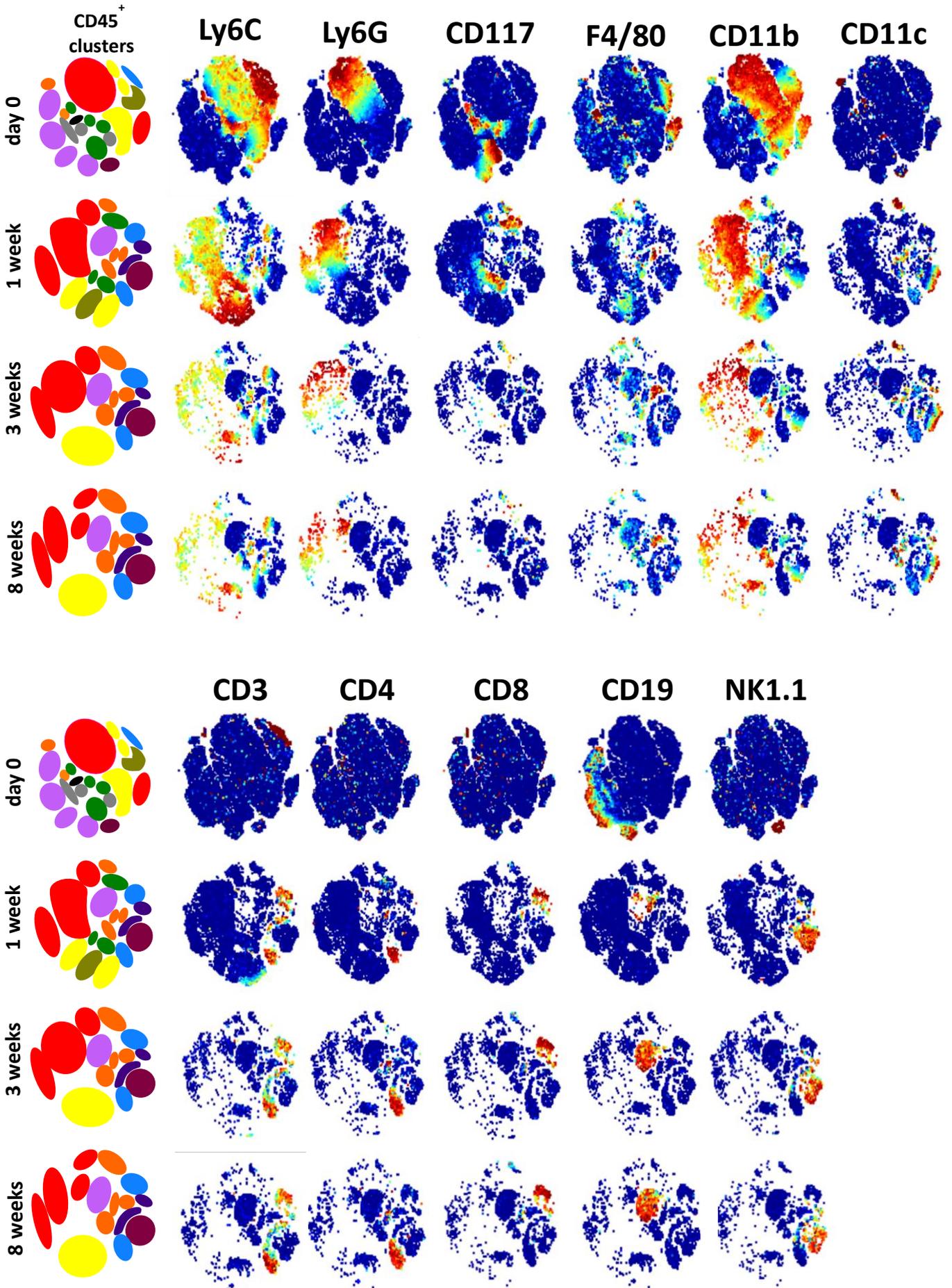
Nos animais 0 dia, granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) são os principais tipos celulares presentes no fígado (~35%) (Figura 5B), seguidos de células B (~18%) (Figura 5J). Outros linfócitos, como as células T, NKT e NK estão presentes em menor quantidade (~1,1%) ou não foram detectados (Figura 5G-I). Células precursoras foram encontradas (~11%) (Figura 5F), bem como uma população indefinida de macrófagos ou monócitos (~3%) (Figura 5E). Monócitos estão aumentados em número em relação ao adulto (11% *versus* 7%) (Figura 5C), enquanto macrófagos e dendríticas diminuídos (3% *versus* 17%) (Figura 5D). De forma interessante, nos neonatos 0 dia – e apenas em tal grupo –, uma porção considerável dos leucócitos encontrados eram CD45^{low}.

Após uma semana de vida, modificações nesse perfil celular foram percebidas. Os granulócitos continuam majoritários (~45%) (Figura 5B), mas as células B apresentam-se reduzidas (~3%) (Figura 5J). Outros linfócitos aumentam (T ~4%, NKT ~5% e NK ~6%) (Figura 5G-I). Há ainda presença de precursoras (~9%) (Figura 5F) e uma população indefinida ainda maior de macrófagos ou monócitos (~8%) (Figura 5E). Monócitos continuam em maior número comparado ao adulto (~11%) (Figura 5C) e macrófagos e dendríticas em menor (~5%) (Figura 5D).

Na terceira semana, a composição celular sofre uma profunda modificação e se assemelha mais àquela observada no adulto. O número de granulócitos (~15%) e monócitos diminui significativamente (~7%) (Figura 5B,C), enquanto o de linfócitos T, NKT e NK aumentam (~18%, ~11 e ~11%, respectivamente) (Figura 5G-I) e a população indefinida e os precursores (Figura 5F) não são mais detectados (Figura 5E, F). A frequência de macrófagos e dendríticas aumenta (~12%) (Figura 5D), assim como as células B (~20%) (Figura 5J).

No adulto, as populações imunes hepáticas podem ser divididas em dois grandes grupos, sendo ~2/3 composta por linfócitos (Figura 5G-J) e ~1/3 por macrófagos, DCs, monócitos e granulócitos (populações mieloides) (Figura 5B-D). É na idade adulta, entretanto, que encontramos a maior população de macrófagos e dendríticas (~16%) (Figura 5D) e de células B (~35%), comparadas aos outros tempos. Um *heat map* resumindo as porcentagens em todas as idades foi gerado, no qual podemos perceber a inversão no perfil celular de mielóide no início para linfóide no fim (Figura 5K).

A



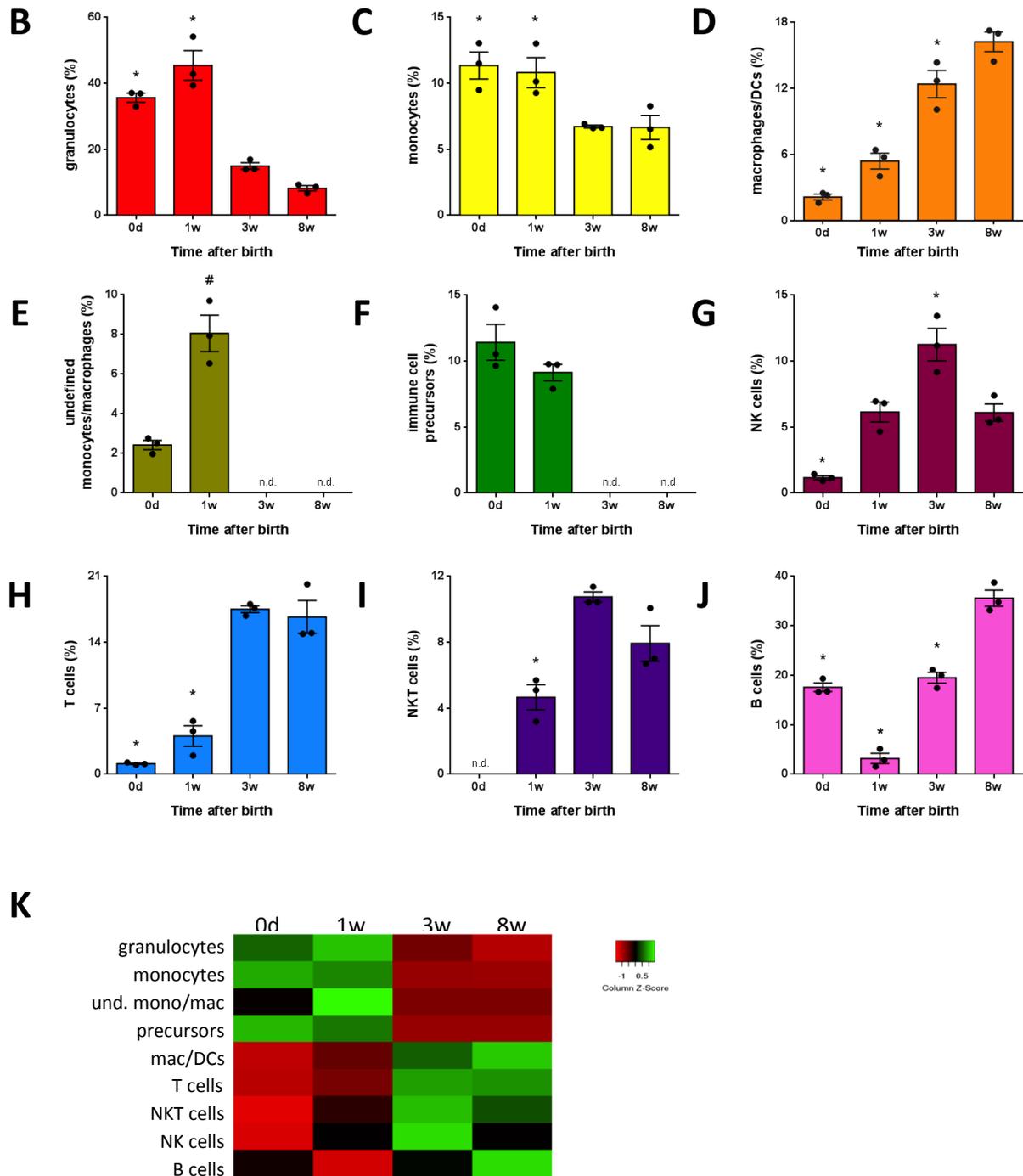


Figura 5. Composição celular do fígado. (A) Representação de *dot plot* da análise viSNE de CyTOF das células CD45⁺ mostrando diferentes *clusters* e a expressão dos principais marcadores de superfície que permitiram a distinção das populações. (B-J) Porcentagens das populações. (B) Granulócitos. (C) Monócitos. (D) Macrófagos/DCs. (E) População indefinida de macrófagos ou monócitos. (F) Precursores imunes. (G) Células NK. (H) Células T. (I) NKT. (J) Células B. (K) *Heat map* mostrando as porcentagens das populações por idade. * indica significância estatística em relação ao 8 semanas e # em relação ao 0 dia.

4.5. O perfil mieloide também é observado por imagem *ex vivo*

Tendo observado que após o nascimento (0 dia e 1 semana) a composição celular é predominantemente mieloide e que tal perfil se inverte a partir da 3^a semana (Figura 5K), buscamos visualizar essas células por microscopia *ex vivo*. Para isso, utilizamos um animal em que a proteína fluorescente GFP está sob controle do promotor da lisozima M, de maneira que neutrófilos, monócitos e macrófagos apresentam fluorescência. De encontro com o CyTOF, nas idades iniciais – especialmente até a 2^a semana –, podemos perceber uma maior quantidade de células LysM⁺ (Figura 6). Além do número, as células mudam seu formato e fluorescência, sendo arredondadas e muito brilhantes nos animais mais novos e alongadas e menos brilhantes nos mais velhos.

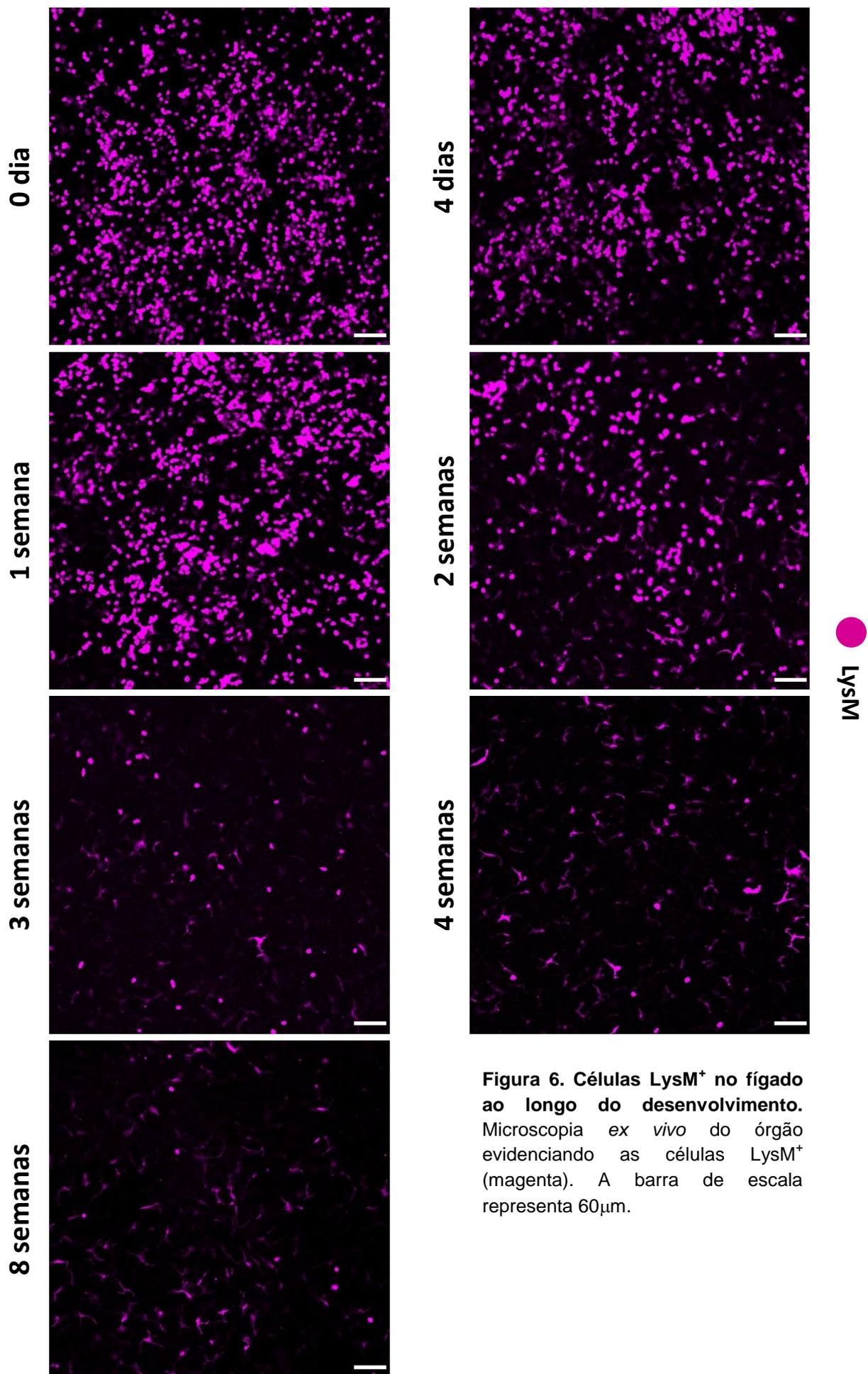


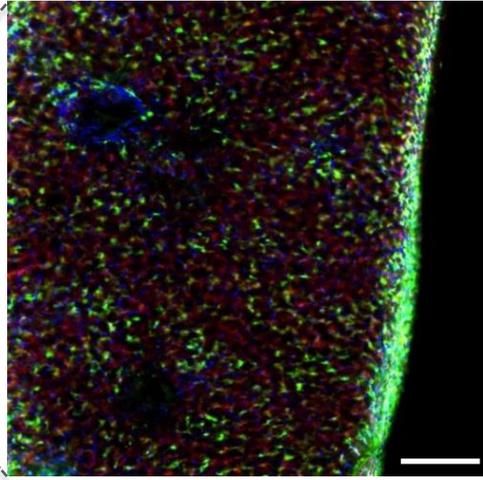
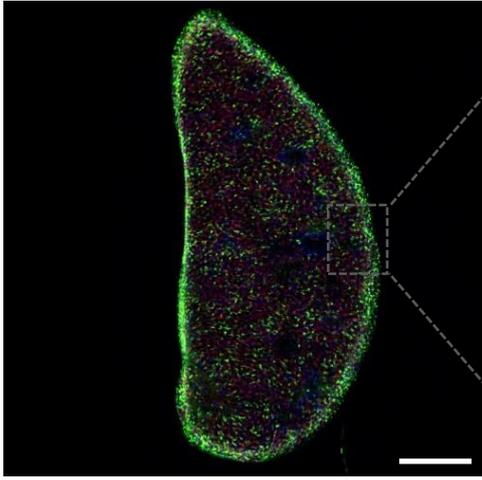
Figura 6. Células LysM⁺ no fígado ao longo do desenvolvimento. Microscopia *ex vivo* do órgão evidenciando as células LysM⁺ (magenta). A barra de escala representa 60µm.

4.6. Uma população com marcação tanto de macrófago quanto de monócito é também vista por imagem

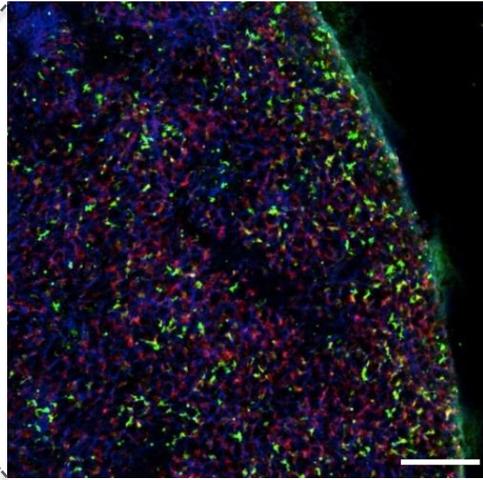
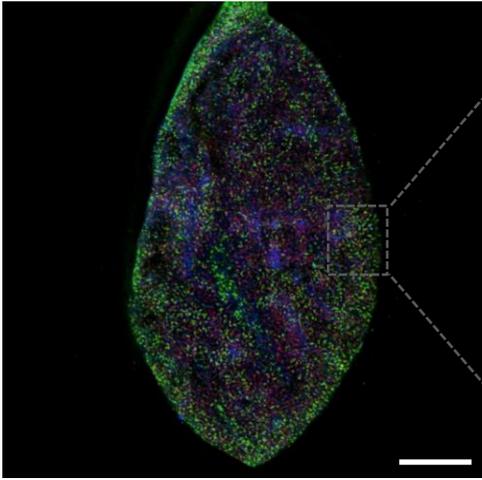
Uma vez que encontramos nos tempos de 0 e 8 dias uma população indefinida, que pode ser tanto macrófagos quanto monócitos (Figura 5E), buscamos, por meio de imagens identificar essas populações celulares. Assim, utilizamos animais em que um dos alelos do gene CX3CR1 está substituído por GFP, de maneira que precursores mieloides, monócitos e uma população de células dendríticas subcapsulares hepáticas expressassem GFP. Além disso, injetamos nos animais, antes das imagens *ex vivo*, anti-F4/80-PE, o melhor marcador para células de Kupffer e ainda anti-CD31-APC ou BV421, para visualização dos vasos. Um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (David et al. 2016) caracterizou bem a distribuição das células CX3CR1⁺ e F4/80⁺, sendo que a primeira se encontrava predominantemente subcapsular (DCs subcapsulares), apesar de também ser encontrada no interior do fígado ao redor dos grandes vasos ou no interior dos vasos (monócitos), e a segunda localizada dentro dos vasos (células de Kupffer). Assim, fizemos imagens transversais do fígado, que mostram a cápsula envolvendo o órgão (Figura 7).

No adulto, confirmamos a compartimentalização celular visualizada anteriormente. Entretanto, em animais neonatos, observamos que as células CX3CR1⁺ se encontram localizadas por toda a extensão do fígado. Tais células vão desaparecendo do interior do órgão ao longo do desenvolvimento (Figura 8A, B). Já as células F4/80⁺ estão presentes em números similares em todas as idades (Figura 8C, D). Quando olhamos a sobreposição entre as imagens, percebemos que muitas das células F4/80⁺ são também positivas para CX3CR1⁺ nos animais mais novos (Figura 8G). Tais células duplo positivas reduzem em número com o tempo (Figura 8F) e no adulto, o compartimento mais interno do órgão se torna predominantemente ocupado por células F4/80⁺ (Figura 8H). Mudanças no formato celular são também observadas, com as células passando de um formato amebóide no começo da vida, para um formato estrelado ou dendrítico no adulto. A sobreposição com os vasos (Figura 8G) mostra que as células ocupam o compartimento intravascular.

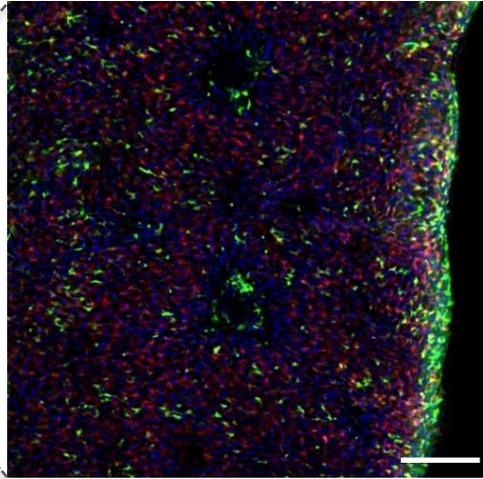
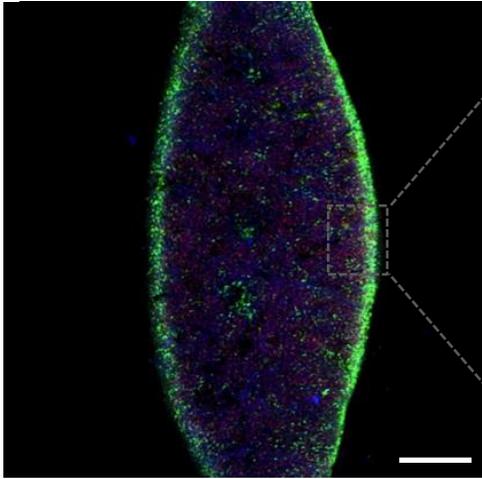
0 dia



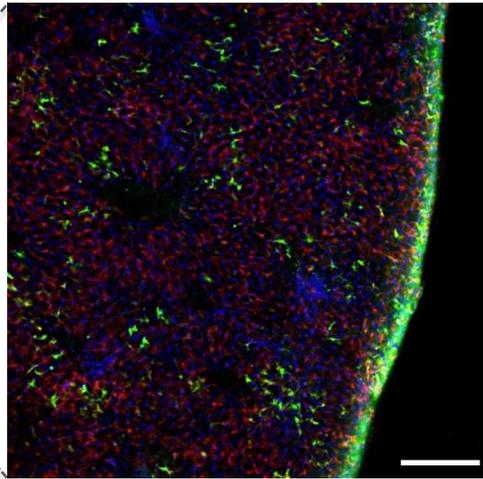
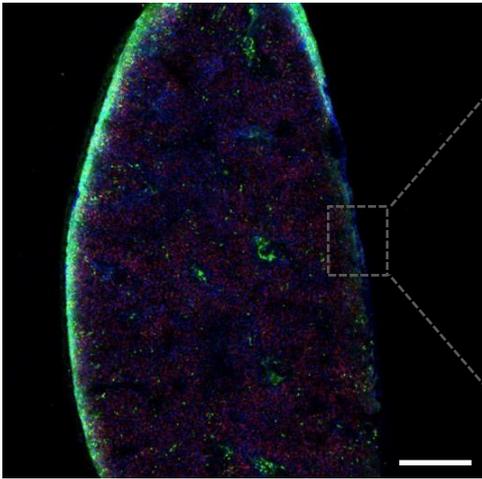
4 dias



1 semana



2 semanas



● PECAM1 ● CX3CR1 ● F480

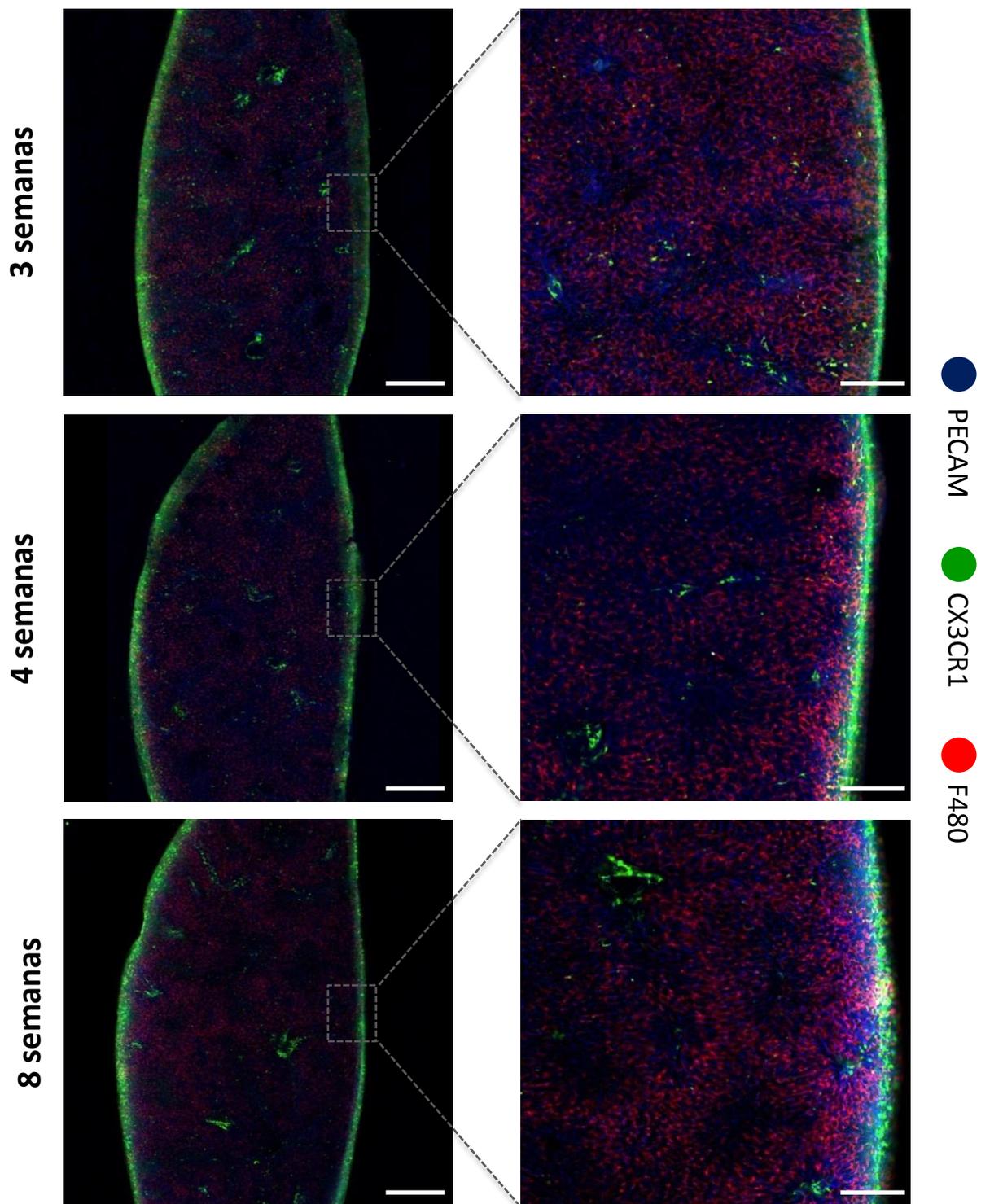
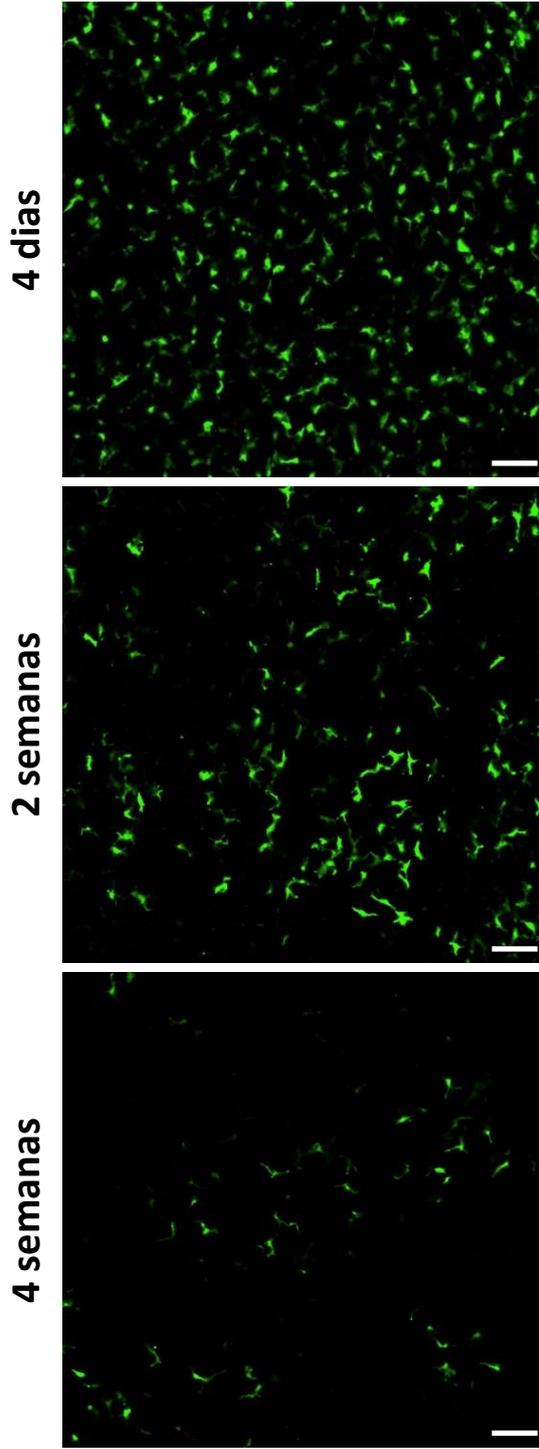
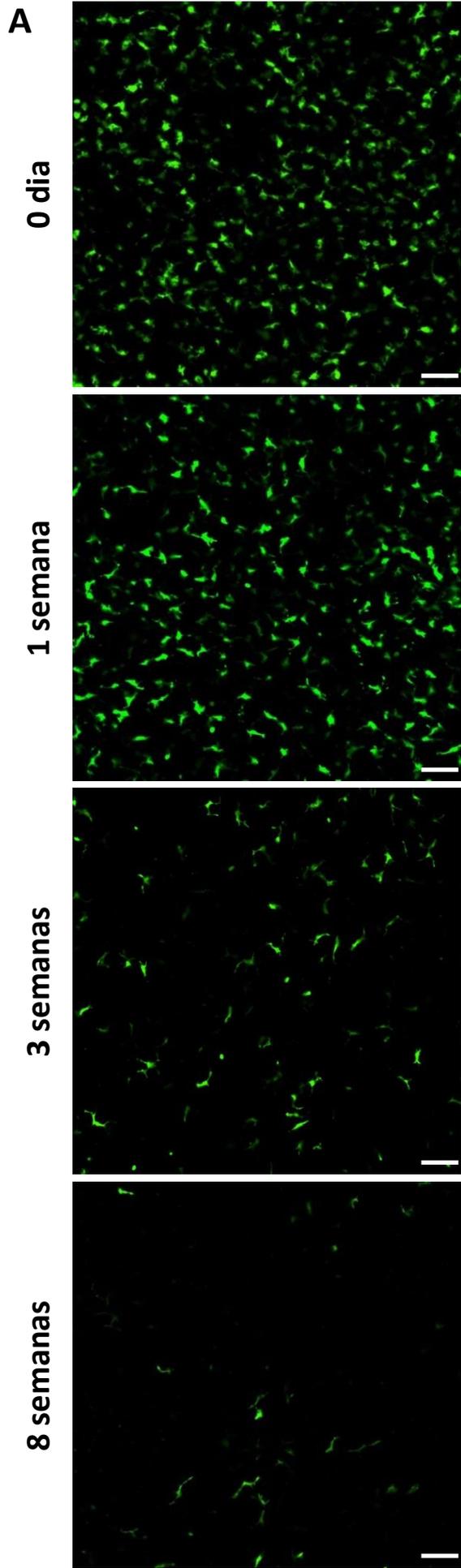
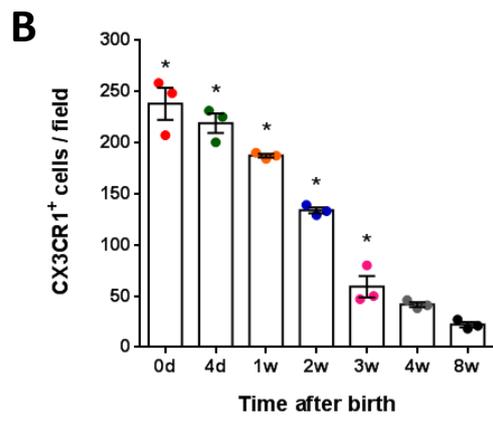
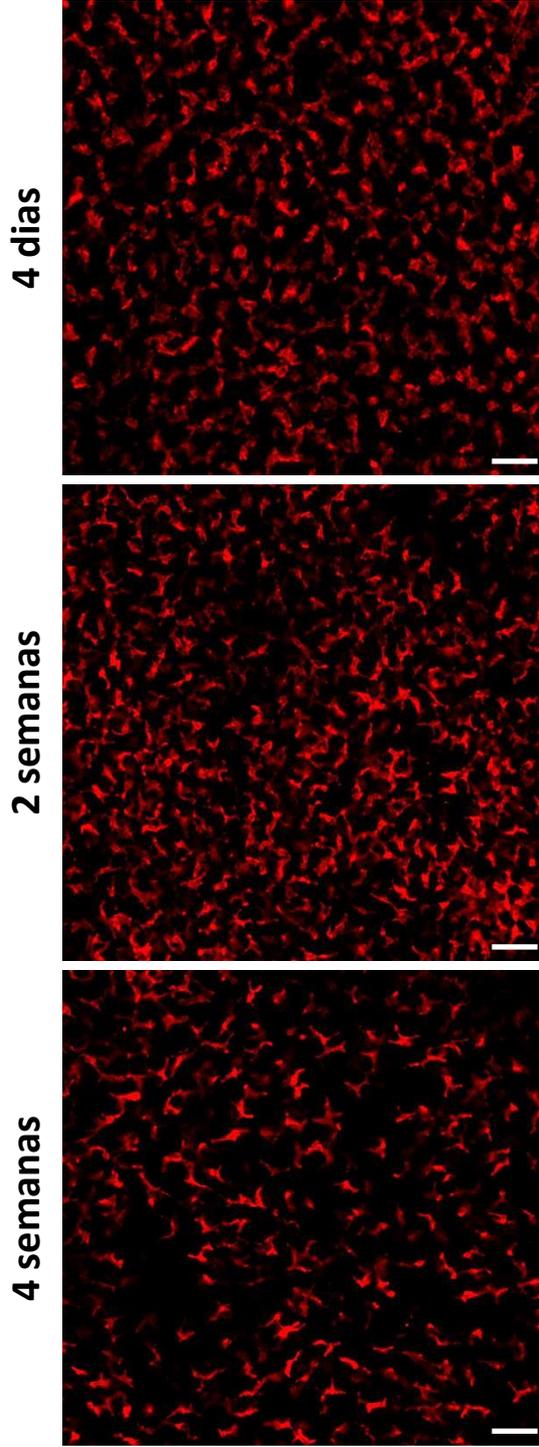
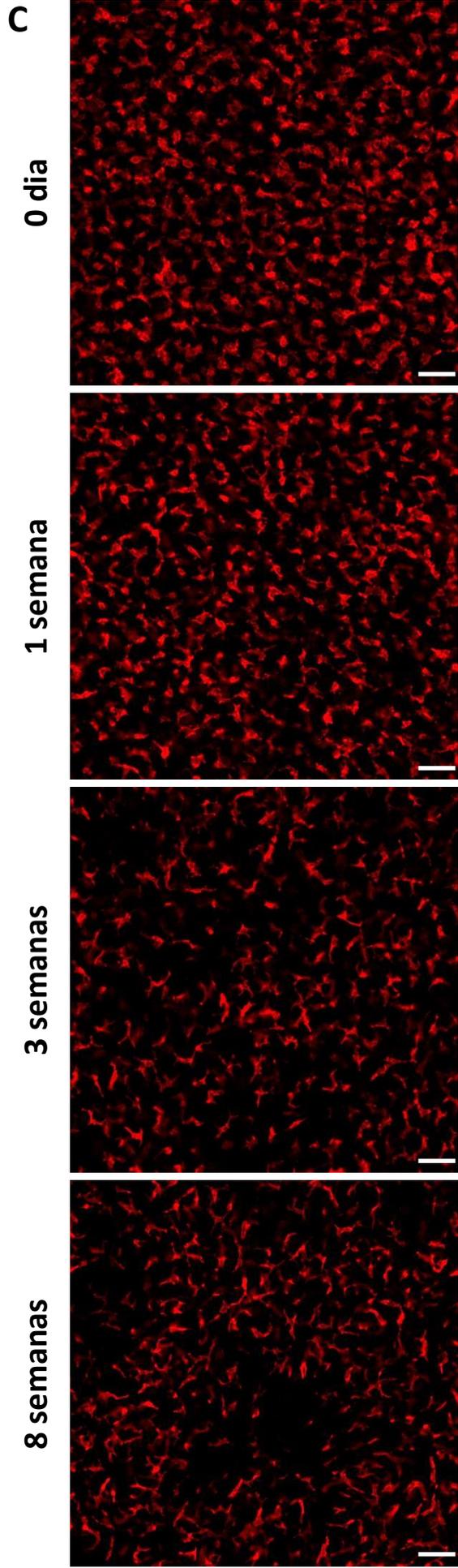


Figura 7. Distribuição das células CX3CR1⁺ e F4/80⁺ ao longo do fígado. Imagens transversais *ex vivo* do órgão, evidenciando as células CX3CR1⁺ (verde), F4/80⁺ (vermelho) e os vasos (azul). A barra de escala nas imagens da esquerda representa 320μm e na direita, 210μm.

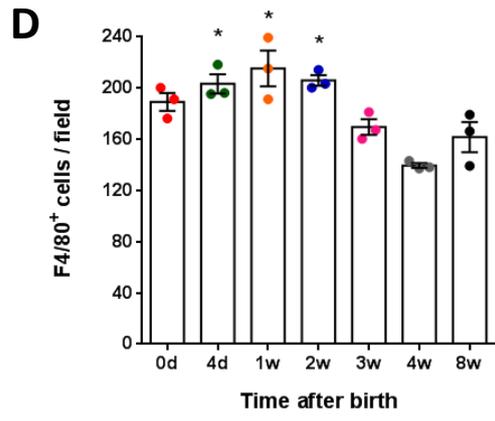


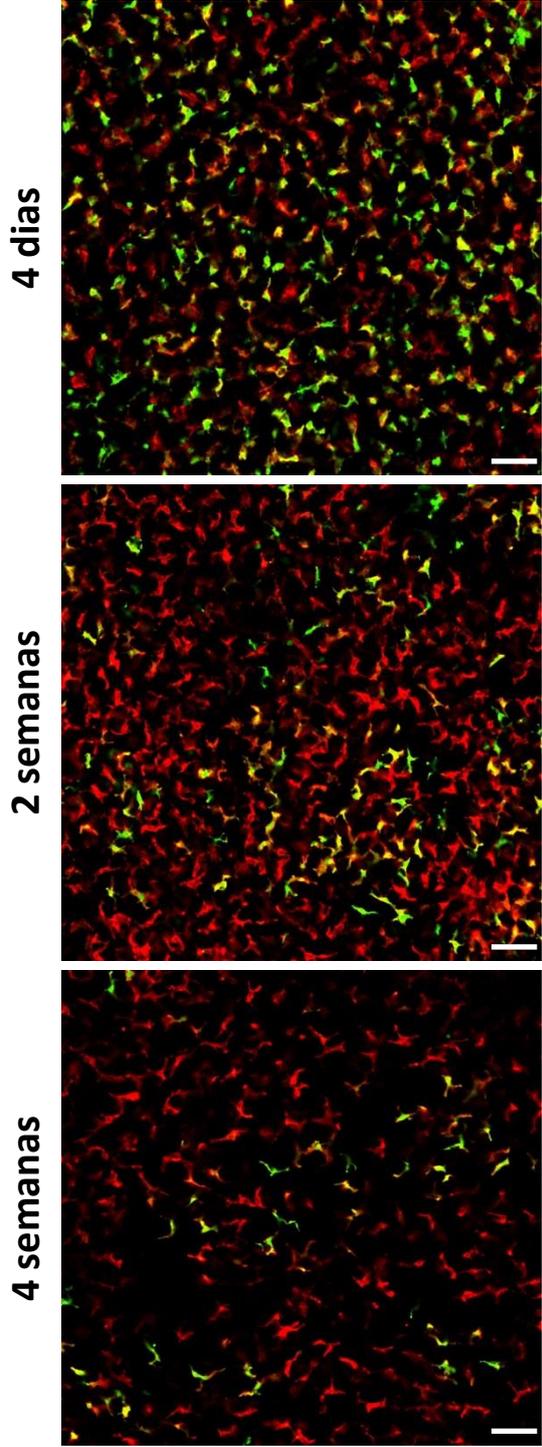
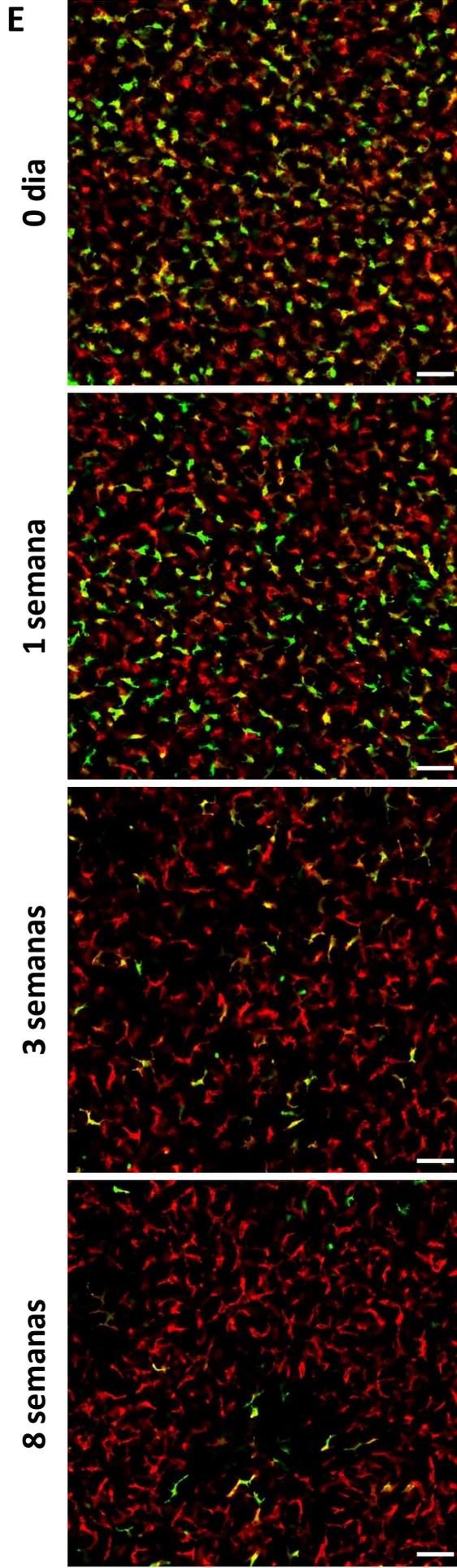
● CX3CR1





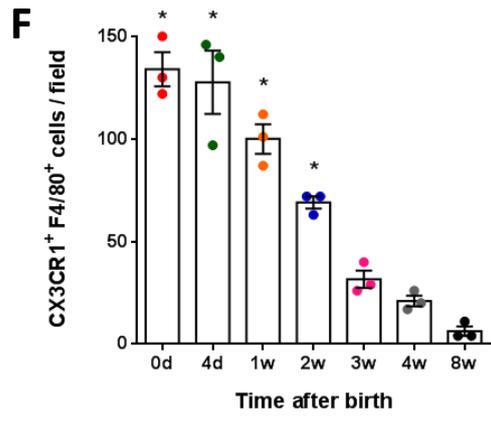
● F4/80





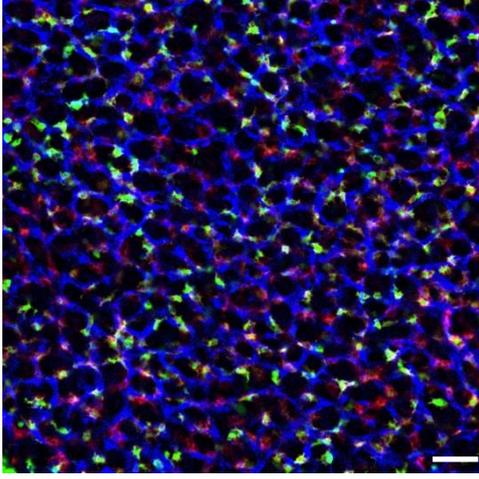
● CX3CR1

● F480

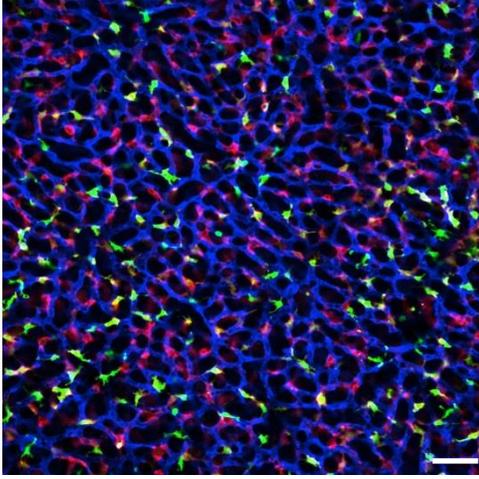


G

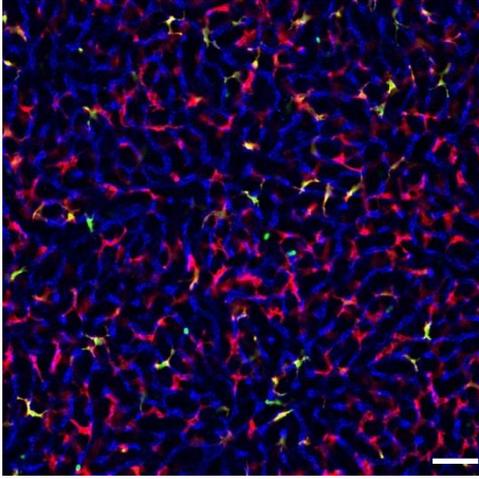
0 dia



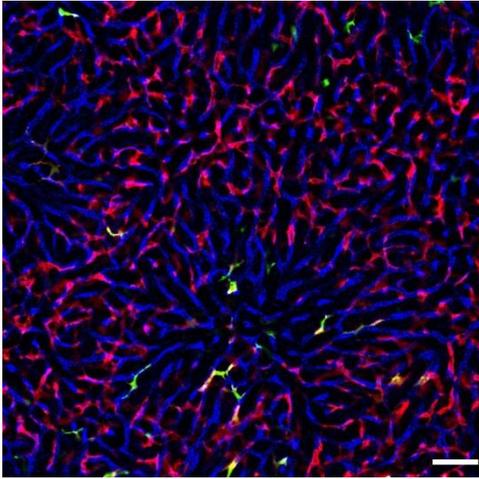
1 semana



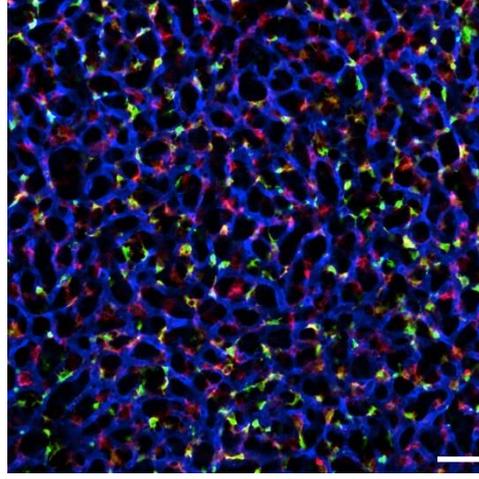
3 semanas



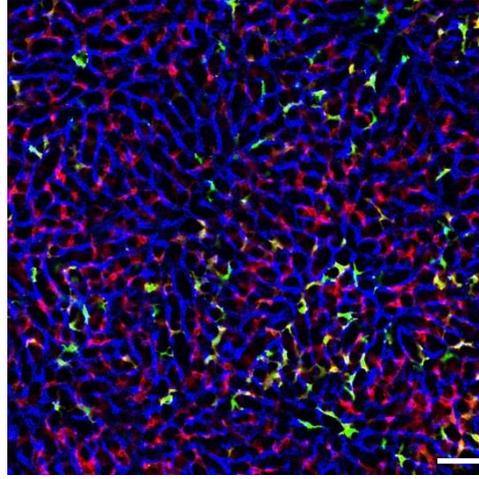
8 semanas



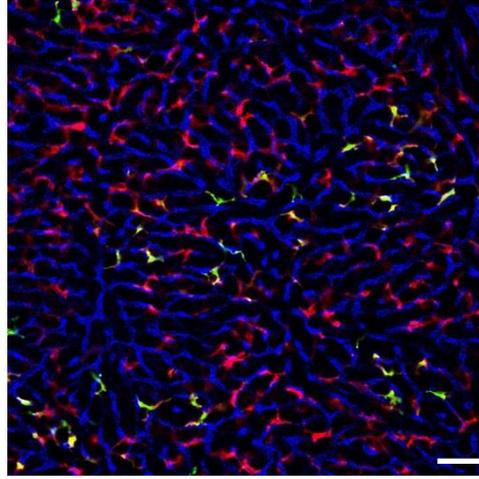
4 dias



2 semanas



4 semanas



● PECAM1 ● CX3CR1 ● F480

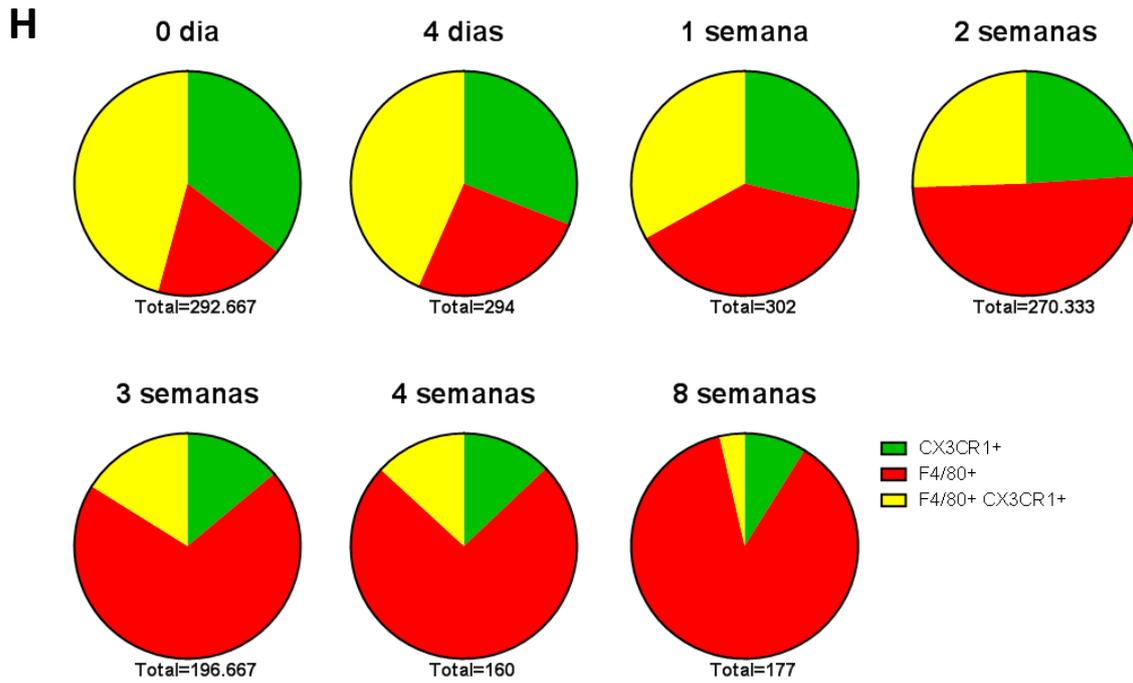


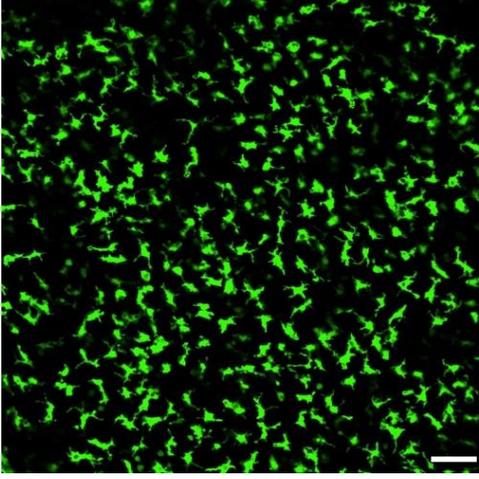
Figura 8. Células CX3CR1⁺ e F4/80⁺ no interior do fígado. (A,C,E,G) Microscopia *ex vivo* do órgão evidenciando as células CX3CR1⁺ (verde), F4/80⁺ (vermelho), duplo positivas (amarelas) e os vasos (azul). **(B,D,F,G)** Quantificação das células. Número de animais por grupo = 3. Campos contados por animal = 3. * indica significância estatística em relação ao 8 semanas ($p < 0,05$). A barra de escala representa 60 μ m.

4.7. A população subcapsular CX3CR1⁺ já está presente assim que o animal nasce

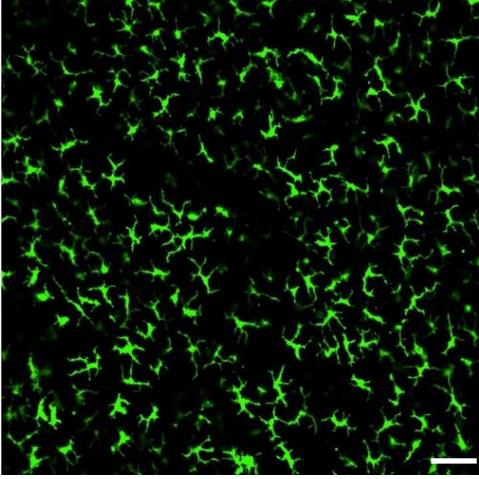
Sabendo das mudanças das populações CX3CR1⁺ e duplo positivas (CX3CR1⁺ F4/80⁺) no interior do fígado ao longo do desenvolvimento, decidimos estudar a presença dessas células no espaço subcapsular. Um vez que por imagem, é difícil excluir as células das camadas mais profundas do fígado, e que nos animais neonatos há uma grande população de células CX3CR1⁺ nessas camadas, temos a impressão de que as idades mais novas apresentam maior número de células (Figura 9A). Devido a limitação da técnica, não quantificamos as células, como foi feito para o compartimento interior, pois não conseguimos determinar quais células se encontram realmente no espaço subcapsular. Entretanto, concluímos que, apesar de morfologicamente muito diferentes das células de um adulto, tais células já se encontram abaixo da cápsula no dia do nascimento. As células F4/80⁺ e duplo positivas nessas imagens parecem estar em um plano mais abaixo, apresentando-se desfocadas (Figura 9B-C). A sobreposição com os vasos (Figura 9D) mostra que as células não ocupam o espaço intravascular. Mudanças na forma são observadas, com as células dos animais mais novos ameboides ou com curtos dendritos, passando para um formato dendrítico no adulto.

A

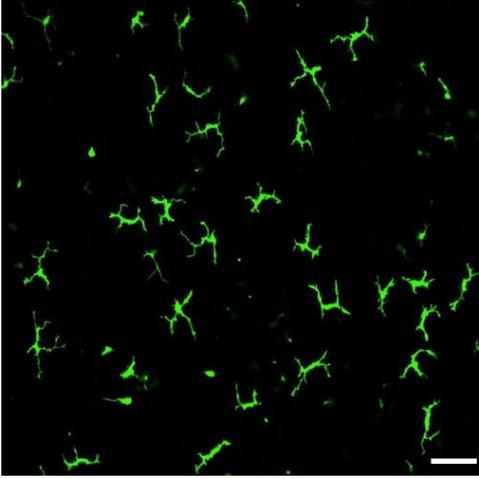
0 dia



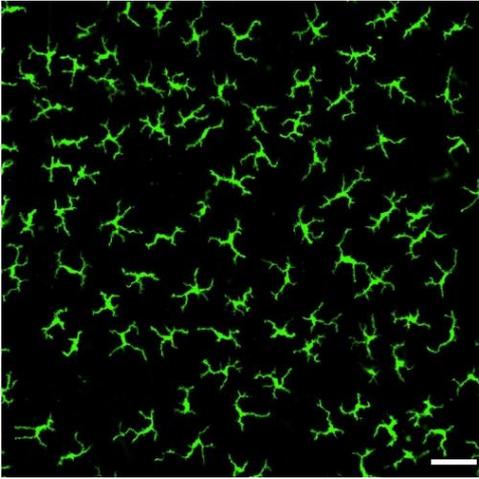
1 semana



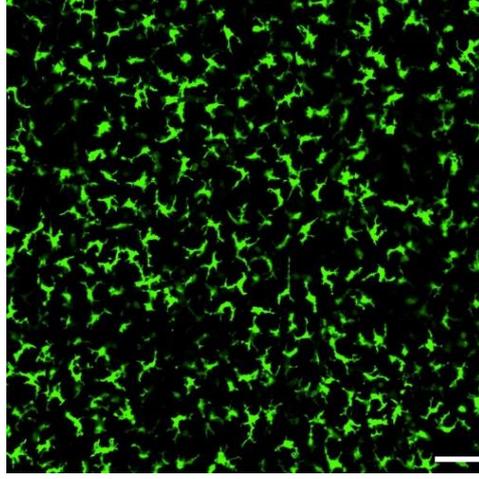
3 semanas



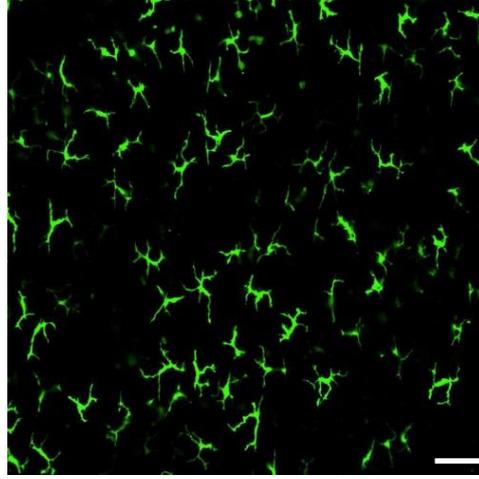
8 semanas



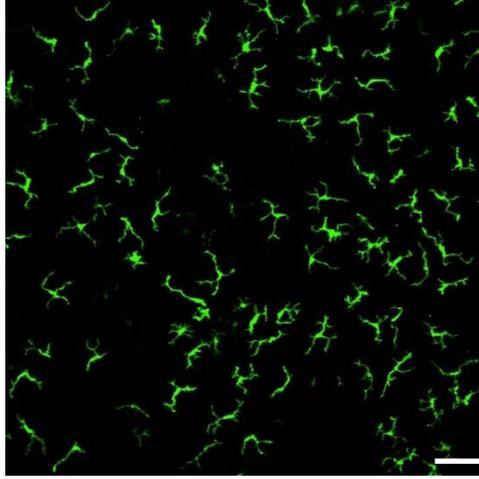
4 dias



2 semanas



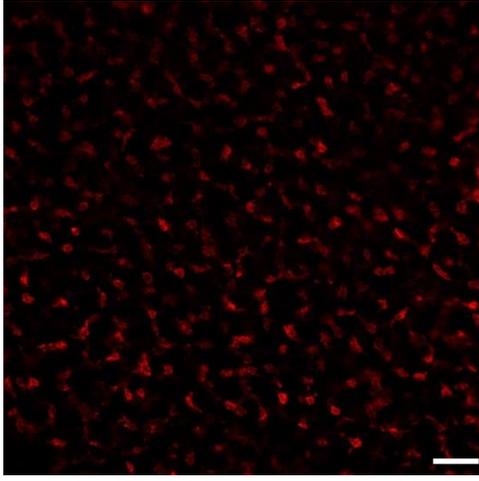
4 semanas



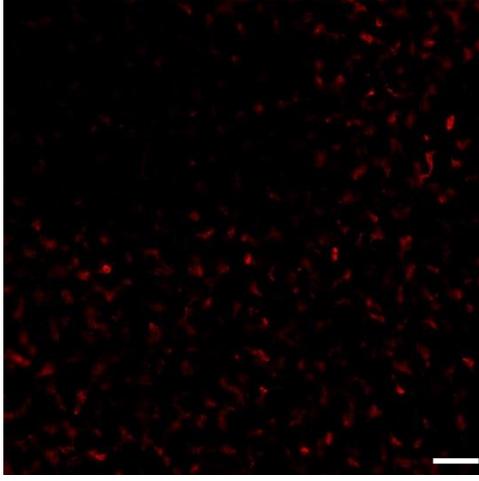
 CX3CR1

B

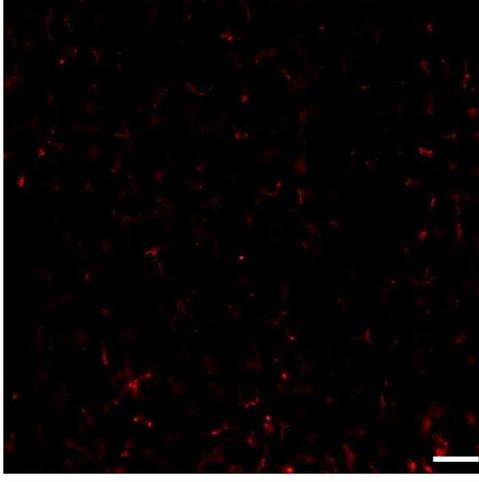
0 dia



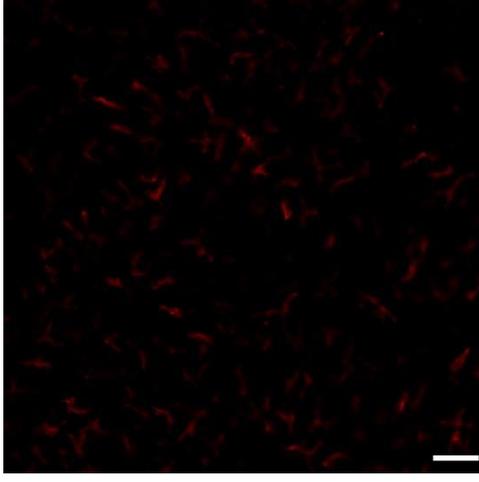
1 semana



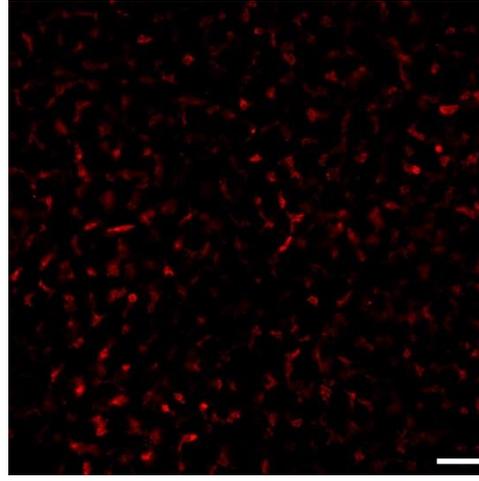
3 semanas



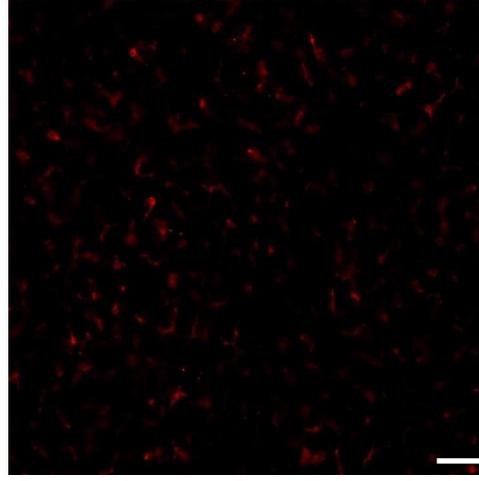
8 semanas



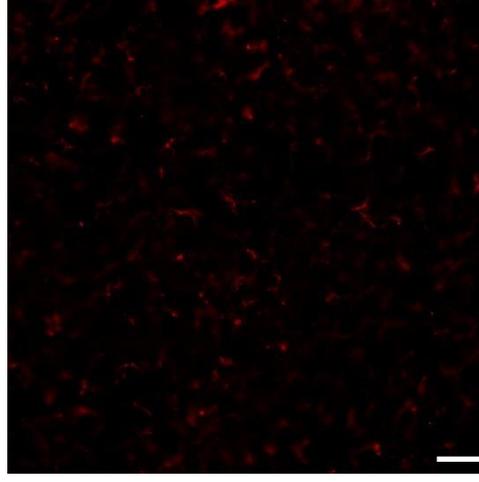
4 dias



2 semanas



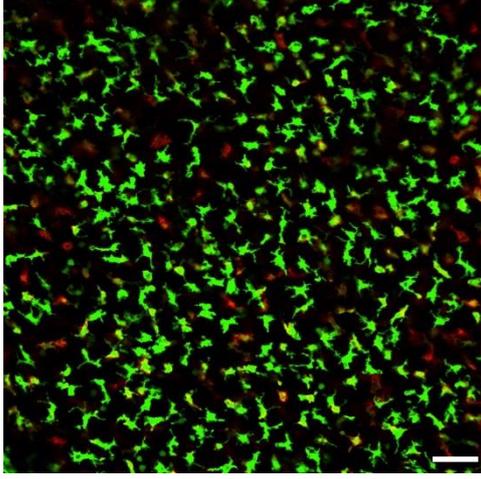
4 semanas



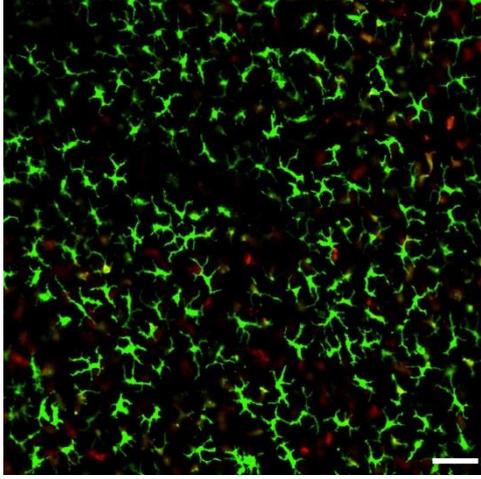
● F480

C

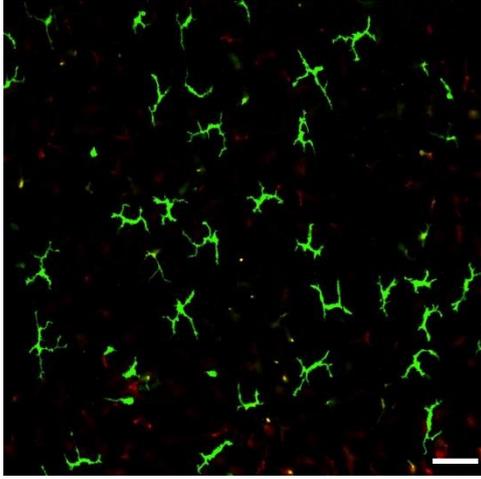
0 dia



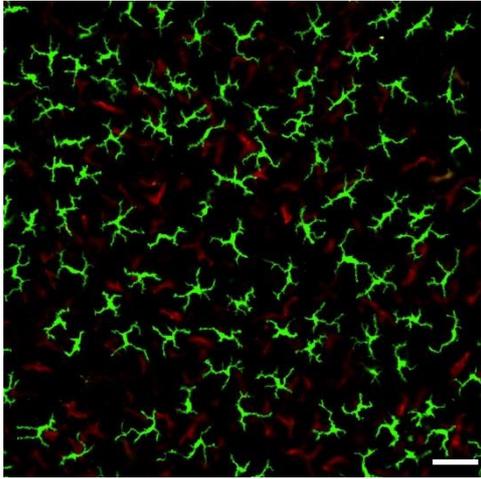
1 semana



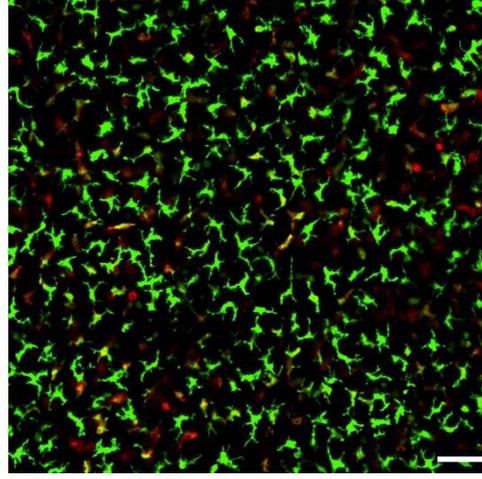
3 semanas



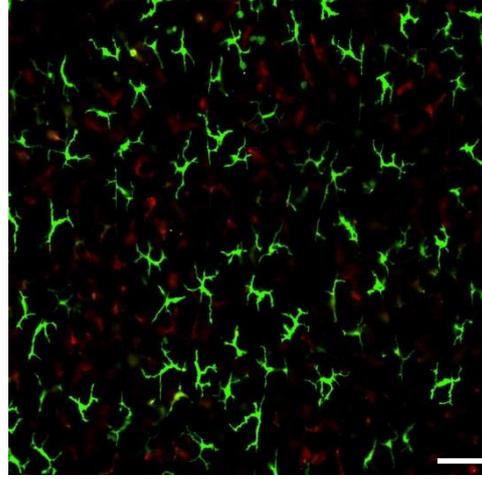
8 semanas



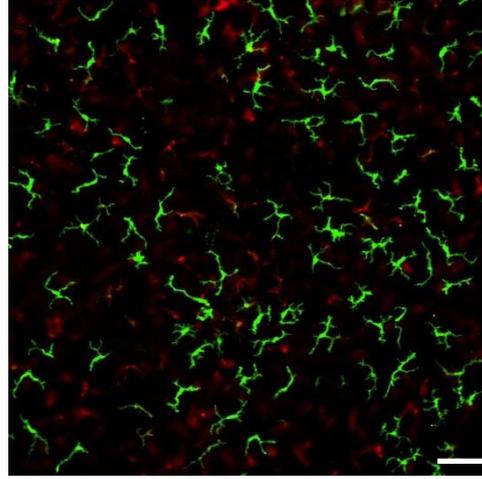
4 dias



2 semanas



4 semanas



● CX3CR1 ● F480

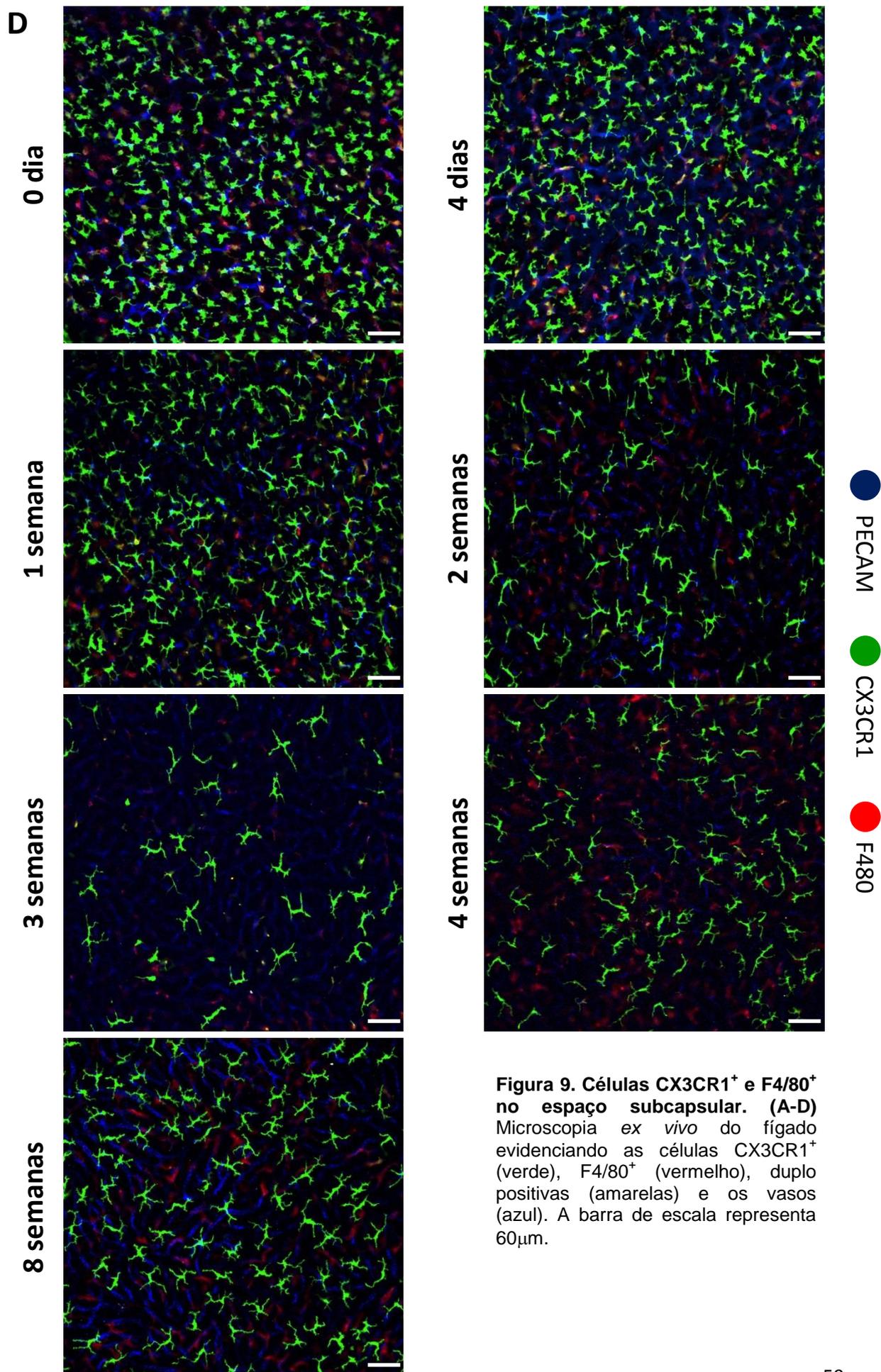


Figura 9. Células CX3CR1⁺ e F4/80⁺ no espaço subcapsular. (A-D) Microscopia *ex vivo* do fígado evidenciando as células CX3CR1⁺ (verde), F4/80⁺ (vermelho), duplo positivas (amarelas) e os vasos (azul). A barra de escala representa 60µm.

4.8. Algumas funções hepáticas se encontram reduzidas nos neonatos

Uma vez feita a caracterização imune e morfológica do fígado nas diferentes idades, buscamos então avaliar algumas funções hepáticas, que são potencialmente exercidas por hepatócitos. Como o fígado produz mais de 60 transaminases, escolhemos duas de maior importância clínica – utilizadas como indicativo de lesão hepática - e avaliamos sua produção. Tanto por qPCR (Figura 10A, C) quanto por ensaio de atividade (Figura 10B, D), os animais até a 2ª semana apresentaram níveis reduzidos de ALT e AST, sendo que após 3 semanas de vida, alcançam o adulto.

Para expandir funcionalmente nossos estudos sobre a capacidade depurativa/metabólica hepática durante as diferentes fases do desenvolvimento, procuramos um teste funcional. Um teste comum, simples e mais utilizado na clínica para se avaliar a função hepática é a depuração do corante verde de indocianina (De Gasperi et al. 2016). Esse corante se liga a proteínas plasmáticas, como a albumina, sendo eliminado exclusivamente pelos hepatócitos, juntamente com a bile, sem sofrer alteração. Assim, o *clearance* de ICG indica como está a função de depuração dos hepatócitos, de forma que quanto menor a quantidade do corante encontrada no sangue, melhor a função hepática. Considerando que o adulto apresenta uma função hepática normal (100%), os animais pelo menos até a 2ª semana de vida possuem um atraso na função de *clearance* deste corante, e assim como para o ALT, apresentam níveis normais apenas na 3ª semana (Figura 10E).

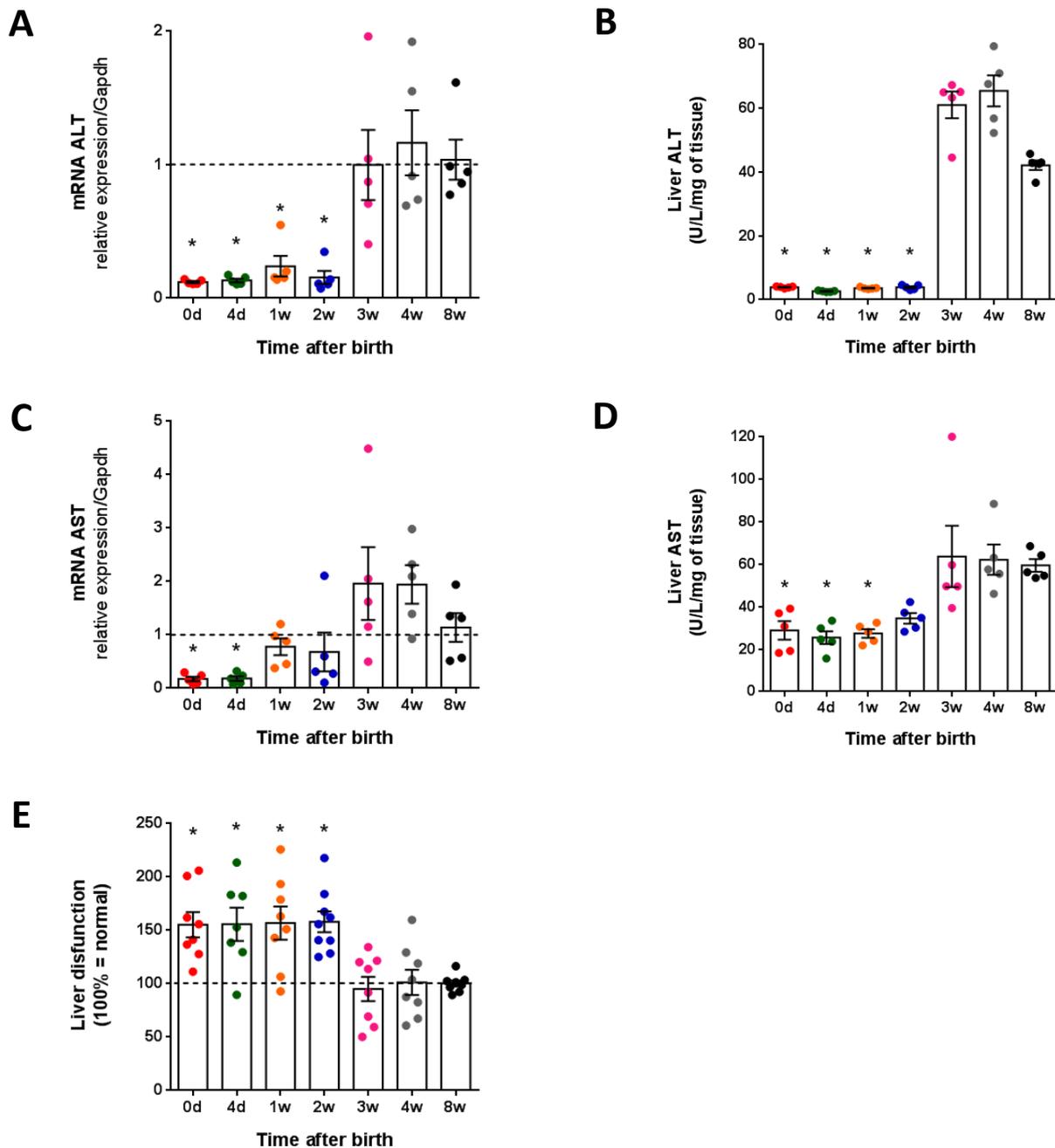


Figura 10. Funções hepáticas ao longo do desenvolvimento. (A) Avaliação da expressão gênica de ALT por qPCR. (B) Dosagem da atividade de ALT no fígado por ensaio bioquímico. (C) Avaliação da expressão gênica de AST por qPCR. (D) Dosagem da atividade de AST no fígado por ensaio bioquímico. (E) Dosagem do verde de indocianina no soro dos animais, 10 minutos após a injeção intravenosa do corante. Número de animais por grupo ≥ 5 . * indica significância estatística em relação ao 8 semanas ($p < 0,05$).

4.9. Um perfil histológico diferente também é observado em neonatos humanos

Para entendermos se nossos achados com animais de experimentação poderiam ser traduzidos para a clínica médica, coletamos amostras de fígado de necrópsias da Faculdade de Medicina da UFMG. De maneira surpreendentemente similar a camundongos, percebemos que neonatos humanos (à termo e até 17 dias pós-nascimento) possuem acúmulo de células no fígado (Figura 11A, B), uma situação intermediária entre o feto (semana gestacional 29) e o adulto. Tais células estão acumuladas em ilhas e possuem característica de células imunes, com o núcleo pequeno, bem corado e pouco citoplasma. Figuras celulares com característica de hepatócitos são observadas, mas sua organização em cordões não é tão evidente como no adulto.

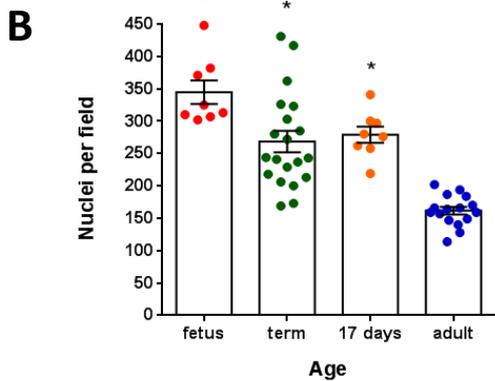
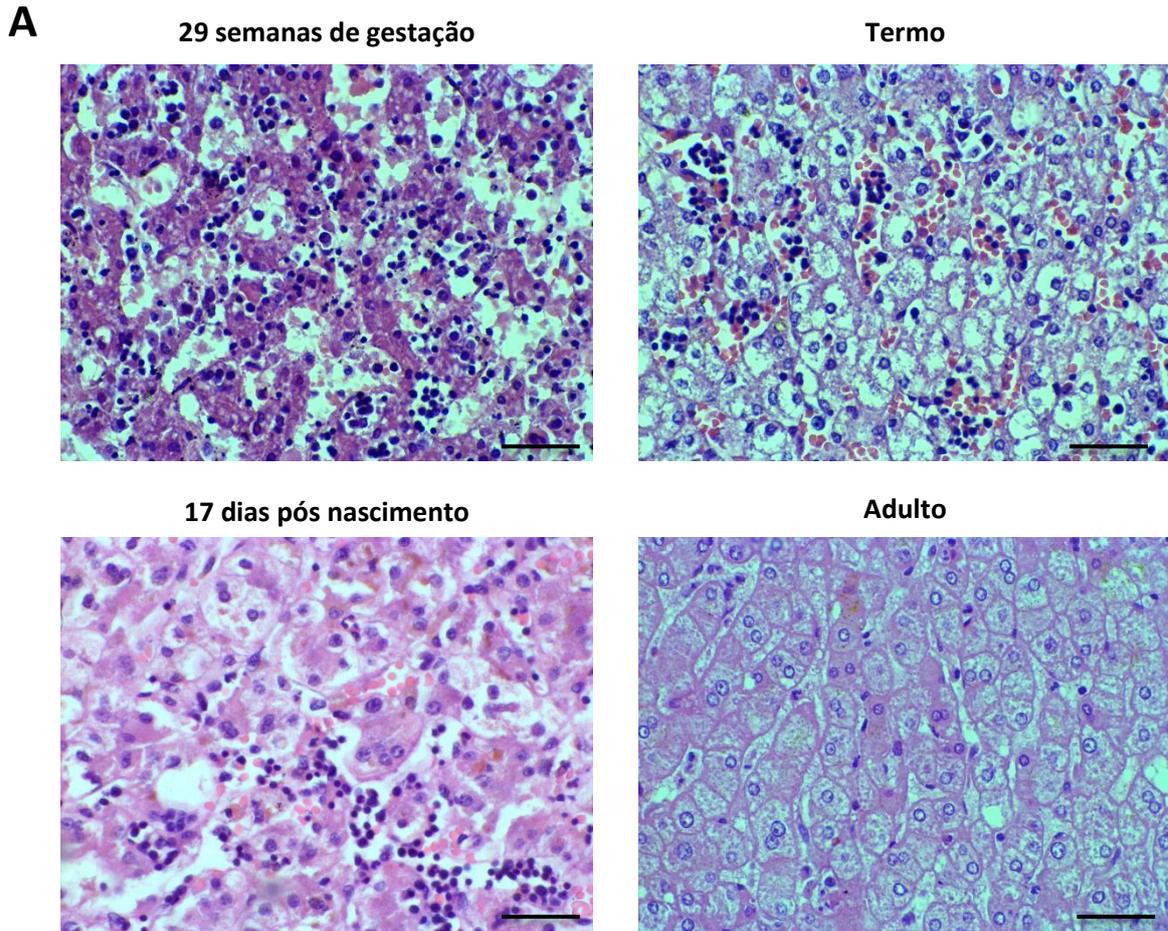


Figura 11. Organização histológica de fígados humanos. (A) Histologias coradas por H&E de fígados humanos de diferentes idades. **(B)** Quantificação do número de núcleos por campo. Feto e 17 dias: número de amostras = 1; campos contados por amostra = 8. Termo: número de amostras = 5; campos contados por amostra = 4. Adulto: número de amostras = 4; campos contados por amostra = 4. * indica significância estatística em relação ao adulto ($p < 0,05$). A barra de escala representa $30\mu\text{m}$.

5. DISCUSSÃO

Sendo o fígado um órgão vital para o funcionamento do organismo, realizando inúmeras funções essenciais, é de extrema importância entender seu desenvolvimento. O desenvolvimento embrionário hepático tem sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores. Porém, de maneira surpreendente, as particularidades do desenvolvimento hepático neonatal são muitas vezes negligenciadas. Assim, buscamos, por meio deste trabalho, caracterizar o fígado de camundongos em diferentes idades pós-nascimento. Nossos dados demonstraram que existe uma enorme diferença, tanto morfológica quanto imunológica e funcional, do fígado do neonato em comparação ao fígado do adulto.

Nosso estudo se iniciou com a visualização da arquitetura hepática, por diferentes técnicas histológicas e de imagens. Enquanto o fígado do adulto (8 semanas) é completamente organizado em cordões de hepatócitos entremeados por sinusoides e a maior parte das células imunes parece estar dentro dos vasos sanguíneos, os animais neonatos não possuem um padrão claro de organização, com ilhas de células imunes circundadas por um parênquima, composto por um agregado homogêneo sem uma clara compartimentalização, não sendo possível identificar com clareza o que são hepatócitos (Figura 1, 2). Sendo o fígado do neonato um órgão importante de reserva para atender às necessidades energéticas do organismo (Grijalva and Vakili 2013), era de se esperar que a população de células que acumulam glicogênio no fígado – os hepatócitos – fosse frequente e clara no órgão. Surpreendentemente, as células mais distinguíveis nos tempos iniciais (0 e 4 dias) foram células imunes, muito mais definidas do que hepatócitos. Nem por meio de técnicas de imunofluorescência específicas, conseguimos identificar de maneira definitiva tais tipos celulares (Figura 3). A presença de ilhas de células imunes, por sua vez, foi observada por todas as técnicas utilizadas, nos dias 0 e 4, e persistem, embora menos frequentes, até, pelo menos, a segunda semana. De acordo, a vasculatura nas idades iniciais apresenta uma estrutura ramificada, assemelhando-se a uma colméia, com espaços entre os vasos circulares, que poderiam acomodar as ilhas celulares; ao contrário do adulto,

em que os espaços alongados entre os vasos acomodam os cordões de hepatócitos (Figura 4).

O fígado é um órgão importante para hematopoiese durante um período considerável do desenvolvimento pré-natal, e tal função é assumida pela medula óssea no adulto (Mikkola and Orkin 2006). O período pós-nascimento, entretanto, é controverso e alguns trabalhos assumem que as funções hematopoiéticas hepáticas terminam nas fases tardias do desenvolvimento embrionário (Guo et al. 2009). Nossos dados histopatológicos fortemente sugerem a retenção de uma vasta população de células imunes no fígado durante as primeiras semanas da vida neonatal, de forma que, após o nascimento, o órgão ainda retém certo potencial hematopoiético ou serve como reservatório de células imunes.

Visando caracterizar essas populações imunes, realizamos uma imunofenotipagem em alta dimensão usando citometria de massa (Figura 5). Nossos dados indicaram profundas mudanças na composição imune do fígado ao longo do desenvolvimento. Nos dias 0 e 4, a maior parte das células imunes são da linhagem mieloide, monócitos estão aumentados em número em comparação ao adulto, há uma população indistinguível de monócitos e macrófagos e células precursoras hematopoiéticas permanecem no órgão. A partir da 3ª semana, o perfil celular se inverte, com células linfoides compondo a maior parte da população celular, sendo que a população indefinida (macrófagos/monócitos) e os precursores não são mais detectados, enquanto macrófagos e dendríticas aumentam gradativamente sua frequência. Podemos observar, que além de uma completa transição no perfil mieloide-linfoide, há uma sucessão cronológica entre a redução de precursores, células indefinidas e monócitos e o aumento de células maduras residentes – macrófagos e dendríticas.

As observações morfológicas e os dados de CyTOF sugerem que o fígado ainda exibe atividade hematopoiética até pelo menos, a primeira semana de vida, em acordo com alguns trabalhos (Wolber et al. 2002). De forma interessante, nos animais 0 dia, as populações de células B parecem exibir um certo grau de imaturidade, uma vez que todas foram fenotipadas pelo

CyTOF como CD45^{low} – a expressão de CD45 aumenta durante a maturação desse tipo celular (Kirberg and Brocker 1996) – e uma delas expressa, ainda em sua superfície a molécula CD117, um marcador de células precursoras (Rumfelt et al. 2006). A linfopoiese no fígado ocorre em tempos diferentes, sendo que, progenitores restritos a linhagem T são detectados no dia embrionário 12 e sua frequência cai ao longo da gestação – papel assumido pelo timo (Gale 1987) –, enquanto progenitores de células B são raros no início e aumentam no dia embrionário 17.5 (Kawamoto et al. 2000). Isso pode explicar a relativa ausência de células T no início da vida neonatal e a presença de células B com características imaturas. Há ainda, descrito, que colônias hematopoiéticas são comuns na primeira semana pós-natal e que cada colônia contém células de uma linhagem hematopoiética apenas, sendo eritroide, mielóide ou linfóide pré-B (Rossant et al. 1986). Assim, as ilhas de células observadas nos cortes histológicos poderiam corresponder a tais colônias, em completo acordo com a imunofenotipagem, que revela a presença de precursores mielóides e células B imaturas.

A imunofenotipagem por CyTOF fornece um corpo impressionante de dados; porém, células em suspensão perdem o contexto natural onde elas habitam na realidade *in vivo*. Baseado no perfil encontrado nas idades iniciais, buscamos visualizar *in situ* células mielóides no fígado de animais LysM-eGFP (Figura 6). Em completo acordo com a nossa análise de CyTOF, uma enorme população LysM⁺ também foi encontrada nestes animais, sendo nos tempos iniciais, células esféricas LysM^{hi} – provavelmente neutrófilos e monócitos. Nos tempos tardios, apenas algumas células LysM^{hi} arredondadas são encontradas, sendo a vasta maioria composta por células LysM^{low}, alongadas, em formato de estrela, correspondendo à população de macrófagos maduros (células de Kupffer).

Visando ainda, por imagem, estudar a correlação temporal entre precursores, monócitos, macrófagos e células dendríticas reveladas pelo CyTOF, bem como a localização espacial dessas células nos diferentes compartimentos hepáticos, utilizamos camundongos CX3CR1^{gfp/wt}. Como descrito previamente, o receptor de quimiocinas CX3CR1 é altamente expresso por precursores comuns de macrófagos e dendríticas, incluindo monócitos

(Geissmann et al. 2003; Auffray et al. 2009) e por uma população de dendríticas hepáticas subcapsulares (David et al. 2016). Por meio da marcação com anti-F4/80 e anti-CD31, conseguimos também visualizar células de Kupffer e vasos, respectivamente. Cortes transversais do órgão revelaram diferenças na compartimentalização das células CX3CR1⁺ ao longo do desenvolvimento (Figura 7). Nos animais mais novos, essas células se distribuem por todo o órgão, enquanto a partir da 3ª semana, se localizam especialmente abaixo da cápsula e ao redor dos grandes vasos. Quando olhamos para o interior do órgão, confirmamos que as células CX3CR1⁺ desaparecem com o tempo, enquanto as células F4/80⁺ permanecem quase inalteradas (Figura 8). Similarmente às células CX3CR1⁺, a frequência das células duplo positivas (CX3CR1⁺ F4/80⁺) significativamente reduz com o tempo e células expressando somente CX3CR1 ou F4/80 podem ser vistas.

Dados prévios do nosso grupo demonstraram que ao depletar fagócitos hepáticos por lipossomos de clodronato, um precursor duplo positivo é capaz de repovoar o fígado, e posteriormente se diferenciar em macrófagos ou dendríticas subcapsulares (David et al. 2016). Nossos dados de CyTOF e imagem sugerem que, assim como no repovoamento (após uma perturbação das populações residentes), durante eventos naturais de povoamento celular em neonatos em desenvolvimento, células precursoras com características monocíticas dão origem a células maduras residentes, que são realocadas nos diferentes compartimentos hepáticos.

Embasados na predominância de células imunes no fígado de neonatos, buscamos avaliar quais seriam as consequências metabólicas de tal aglomeração imunológica em um órgão classicamente considerado metabólico. Para isso, estudamos alguns parâmetros funcionais hepáticos, como a produção de transaminases. Em fígados de animais até 2 semanas de vida, não conseguimos detectar significativa atividade de ALT e AST – dado confirmado por análises mais sensíveis utilizando qPCR. De maneira interessante, níveis normais de expressão e atividade dessas enzimas foram alcançados apenas na 3ª semana (Figura 10). Na clínica, a elevação dos níveis séricos de ALT e AST é um indicativo de lesão hepática e, em muitos casos, uma ferramenta de diagnóstico para doenças do fígado (Diehl-Jones and Askin

2003; Giannini et al. 2005). Isso parte do princípio básico de que, uma vez que os hepatócitos produzem as transaminases, seus estoques intracelulares escapam das células durante eventos de necrose hepatocelular, sendo encontrados na corrente sanguínea e suas atividades detectadas no soro. Assim, é muito importante confirmar se os hepatócitos dos pacientes são capazes de sintetizar ALT ou AST, sendo que, se, por alguma razão, sintetizarem níveis baixos das enzimas, pacientes com falência hepática – mesmo com extensiva necrose de hepatócitos – apresentarão níveis basais ou baixos de ALT/AST séricas. Nossos dados indicam que – pelo menos em neonatos – a avaliação da lesão hepática pela quantificação das transaminases no soro deve ser feita com cautela, não indicando relação com o *status* da doença hepática.

Outro teste de função hepática utilizado, baseado na depuração de um corante da circulação (verde de indocianina), revelou uma ineficiência em neonatos – novamente até a 2ª semana – na função de *clearance*. As funções hepáticas atrasadas podem estar de acordo com a relativa redução na quantidade de hepatócitos encontrada nas idades iniciais. Ainda, o atraso na eliminação de substâncias pode estar relacionado a um sistema de transporte hepático (transportadores de membrana) imaturo (Balistreri 1983; Grijalva and Vakili 2013). Isso implica que os efeitos terapêuticos de drogas podem ser prolongados em neonatos, como resultado de uma eliminação ineficiente, e que tratamentos ou drogas que interfiram no metabolismo hepático podem ter efeitos diferentes em recém-nascidos.

Na tentativa de traduzir esses dados pra a clínica, buscamos amostras histológicas humanas. Assim como no camundongo, neonatos apresentam retenção de células imunes no parênquima hepático, formando ilhas de células muito similares aos camundongos. Uma vez que as modificações imunes são profundas nas fases iniciais da vida, o estado de maturação do fígado ao nascimento pode ter implicações enormes na população imunológica hepática. Sendo admitidas gestações de 25 até 40 semanas, neonatos podem nascer com capacidades metabólicas hepáticas e populações imunes distintas (Wisgrill et al. 2014). Mais estudos são necessários para caracterizar o fígado

humano pós-nascimento, sendo que nossa imunofenotipagem em alta dimensão pode ajudar a guiá-los.

A reunião dos nossos dados sugere que grandes mudanças funcionais e imunológicas devem ocorrer no fígado de um recém-nascido para que ele se torne o órgão conhecido como fígado no adulto. Nos primeiros momentos da vida, o fígado é especialmente um sítio imune/hematopoiético e essa função reduz com o tempo, à medida que funções metabólicas se tornam mais evidentes. Assim, estratégias de estudo de função e provavelmente terapias que visam lidar com respostas inflamatórias hepáticas podem ter implicações completamente diferentes em neonatos.

6. CONCLUSÕES

Com esse trabalho podemos concluir que:

- A arquitetura hepática muda ao longo do desenvolvimento pós-natal, no que diz respeito à organização do parênquima, das células imunes e da microvasculatura;
- O fígado adulto é especialmente um órgão linfoide, enquanto o fígado neonatal é majoritariamente composto por células mieloides;
- Células precursoras com características monocíticas podem dar origem a células maduras residentes;
- As funções hepáticas de depuração e produção de transaminases encontram-se reduzidas em neonatos;
- Neonatos humanos apresentam retenção de células imunes no parênquima hepático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. H.; Ju, C.; Ramaiah, S. K.; Uetrecht, J. and Jaeschke, H. (2010). **Mechanisms of immune-mediated liver injury**. *Toxicol Sci* 115(2): 307-321.
- Auffray, C.; Fogg, D. K.; Narni-Mancinelli, E.; Senechal, B.; Trouillet, C.; Saederup, N.; Leemput, J.; Bigot, K.; Campisi, L.; Abitbol, M.; Molina, T.; Charo, I.; Hume, D. A.; Cumano, A.; Lauvau, G. and Geissmann, F. (2009). **CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation**. *J Exp Med* 206(3): 595-606.
- Balistreri, W. F. (1983). **Immaturity of hepatic excretory function and the ontogeny of bile acid metabolism**. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2 Suppl 1: S207-214.
- Balmer, M. L.; Slack, E.; de Gottardi, A.; Lawson, M. A.; Hapfelmeier, S.; Miele, L.; Grieco, A.; Van Vlierberghe, H.; Fahrner, R.; Patuto, N.; Bernsmeier, C.; Ronchi, F.; Wyss, M.; Stroka, D.; Dickgreber, N.; Heim, M. H.; McCoy, K. D. and Macpherson, A. J. (2014). **The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota**. *Sci Transl Med* 6(237): 237ra266.
- Becher, B.; Schlitzer, A.; Chen, J.; Mair, F.; Sumatoh, H. R.; Teng, K. W.; Low, D.; Ruedl, C.; Riccardi-Castagnoli, P.; Poidinger, M.; Greter, M.; Ginhoux, F. and Newell, E. W. (2014). **High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system**. *Nat Immunol* 15(12): 1181-1189.
- Bort, R.; Signore, M.; Tremblay, K.; Martinez Barbera, J. P. and Zaret, K. S. (2006). **Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development**. *Dev Biol* 290(1): 44-56.
- Chiang, J. (2014). **Liver Physiology: Metabolism and Detoxification**.

- David, B. A.; Rezende, R. M.; Antunes, M. M.; Santos, M. M.; Freitas Lopes, M. A.; Diniz, A. B.; Sousa Pereira, R. V.; Marchesi, S. C.; Alvarenga, D. M.; Nakagaki, B. N.; Araujo, A. M.; Dos Reis, D. S.; Rocha, R. M.; Marques, P. E.; Lee, W. Y.; Deniset, J.; Liew, P. X.; Rubino, S.; Cox, L.; Pinho, V.; Cunha, T. M.; Fernandes, G. R.; Oliveira, A. G.; Teixeira, M. M.; Kubes, P. and Menezes, G. B. (2016). **Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice**. *Gastroenterology* 151(6): 1176-1191.
- David, B. A.; Rubino, S.; Moreira, T. G.; Freitas-Lopes, M. A.; Araujo, A. M.; Paul, N. E.; Rezende, R. M. and Menezes, G. B. (2017). **Isolation and high-dimensional phenotyping of gastrointestinal immune cells**. *Immunology* 151(1): 56-70.
- De Gasperi, A.; Mazza, E. and Prosperi, M. (2016). **Indocyanine green kinetics to assess liver function: Ready for a clinical dynamic assessment in major liver surgery?** *World J Hepatol* 8(7): 355-367.
- Diehl-Jones, W. L. and Askin, D. F. (2003). **The neonatal liver part II: Assessment and diagnosis of liver dysfunction**. *Neonatal Netw* 22(2): 7-15.
- Doherty, D. G. (2016). **Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review**. *J Autoimmun* 66: 60-75.
- Duncan, A. W. (2013). **Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver**. *Semin Cell Dev Biol* 24(4): 347-356.
- Freitas-Lopes, M. A.; Mafra, K.; David, B. A.; Carvalho-Gontijo, R. and Menezes, G. B. (2017). **Differential Location and Distribution of Hepatic Immune Cells**. *Cells* 6(4).
- Gale, R. P. (1987). **Development of the immune system in human fetal liver**. *Thymus* 10(1-2): 45-56.

- Geissmann, F.; Jung, S. and Littman, D. R. (2003). **Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.** *Immunity* 19(1): 71-82.
- Giannini, E. G.; Testa, R. and Savarino, V. (2005). **Liver enzyme alteration: a guide for clinicians.** *CMAJ* 172(3): 367-379.
- Ginhoux, F. and Guilliams, M. (2016). **Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis.** *Immunity* 44(3): 439-449.
- Gordillo, M.; Evans, T. and Gouon-Evans, V. (2015). **Orchestrating liver development.** *Development* 142(12): 2094-2108.
- Gregory, S. H.; Sagnimeni, A. J. and Wing, E. J. (1996). **Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils.** *J Immunol* 157(6): 2514-2520.
- Grijalva, J. and Vakili, K. (2013). **Neonatal liver physiology.** *Semin Pediatr Surg* 22(4): 185-189.
- Gruppuso, P. A. and Sanders, J. A. (2016). **Regulation of liver development: implications for liver biology across the lifespan.** *J Mol Endocrinol* 56(3): R115-125.
- Guo, Y.; Zhang, X.; Huang, J.; Zeng, Y.; Liu, W.; Geng, C.; Li, K. W.; Yang, D.; Wu, S.; Wei, H.; Han, Z.; Qian, X.; Jiang, Y. and He, F. (2009). **Relationships between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles.** *PLoS One* 4(10): e7641.
- Heymann, F. and Tacke, F. (2016). **Immunology in the liver--from homeostasis to disease.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(2): 88-110.
- Hickey, M. J. and Westhorpe, C. L. (2013). **Imaging inflammatory leukocyte recruitment in kidney, lung and liver--challenges to the multi-step paradigm.** *Immunol Cell Biol* 91(4): 281-289.
- Hoeffel, G. and Ginhoux, F. (2015). **Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages.** *Front Immunol* 6: 486.

- Jenne, C. N. and Kubes, P. (2013). **Immune surveillance by the liver.** *Nat Immunol* 14(10): 996-1006.
- Kawamoto, H.; Ikawa, T.; Ohmura, K.; Fujimoto, S. and Katsura, Y. (2000). **T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver.** *Immunity* 12(4): 441-450.
- Kirberg, J. and Brocker, T. (1996). **CD45 up-regulation during lymphocyte maturation.** *Int Immunol* 8(11): 1743-1749.
- Lee, J. S.; Ward, W. O.; Knapp, G.; Ren, H.; Vallanat, B.; Abbott, B.; Ho, K.; Karp, S. J. and Corton, J. C. (2012). **Transcriptional ontogeny of the developing liver.** *BMC Genomics* 13: 33.
- Marques, P. E.; Amaral, S. S.; Pires, D. A.; Nogueira, L. L.; Soriani, F. M.; Lima, B. H.; Lopes, G. A.; Russo, R. C.; Avila, T. V.; Melgaco, J. G.; Oliveira, A. G.; Pinto, M. A.; Lima, C. X.; De Paula, A. M.; Cara, D. C.; Leite, M. F.; Teixeira, M. M. and Menezes, G. B. (2012). **Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure.** *Hepatology* 56(5): 1971-1982.
- McDonald, B. and Kubes, P. (2016). **Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver.** *Gastroenterology* 151(6): 1087-1095.
- Mikkola, H. K. and Orkin, S. H. (2006). **The journey of developing hematopoietic stem cells.** *Development* 133(19): 3733-3744.
- Rossant, J.; Vijn, K. M.; Grossi, C. E. and Cooper, M. D. (1986). **Clonal origin of haematopoietic colonies in the postnatal mouse liver.** *Nature* 319(6053): 507-511.
- Ruebner, B. H.; Blankenberg, T. A.; Burrows, D. A.; SooHoo, W. and Lund, J. K. (1990). **Development and transformation of the ductal plate in the developing human liver.** *Pediatr Pathol* 10(1-2): 55-68.

- Rumfelt, L. L.; Zhou, Y.; Rowley, B. M.; Shinton, S. A. and Hardy, R. R. (2006). **Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors.** J Exp Med 203(3): 675-687.
- Si-Tayeb, K.; Lemaigre, F. P. and Duncan, S. A. (2010). **Organogenesis and development of the liver.** Dev Cell 18(2): 175-189.
- Sierro, F.; Evrard, M.; Rizzetto, S.; Melino, M.; Mitchell, A. J.; Florido, M.; Beattie, L.; Walters, S. B.; Tay, S. S.; Lu, B.; Holz, L. E.; Roediger, B.; Wong, Y. C.; Warren, A.; Ritchie, W.; McGuffog, C.; Weninger, W.; Le Couteur, D. G.; Ginhoux, F.; Britton, W. J.; Heath, W. R.; Saunders, B. M.; McCaughan, G. W.; Luciani, F.; MacDonald, K. P. A.; Ng, L. G.; Bowen, D. G. and Bertolino, P. (2017). **A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment.** Immunity 47(2): 374-388 e376.
- Swiers, G.; Rode, C.; Azzoni, E. and de Bruijn, M. F. (2013). **A short history of hemogenic endothelium.** Blood Cells Mol Dis 51(4): 206-212.
- Vollmar, B. and Menger, M. D. (2009). **The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair.** Physiol Rev 89(4): 1269-1339.
- Wisgrill, L.; Schuller, S.; Bammer, M.; Berger, A.; Pollak, A.; Radke, T. F.; Kogler, G.; Spittler, A.; Helmer, H.; Husslein, P. and Gortner, L. (2014). **Hematopoietic stem cells in neonates: any differences between very preterm and term neonates?** PLoS One 9(9): e106717.
- Wolber, F. M.; Leonard, E.; Michael, S.; Orschell-Traycoff, C. M.; Yoder, M. C. and Srour, E. F. (2002). **Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system.** Exp Hematol 30(9): 1010-1019.
- Wong, M. T.; Ong, D. E.; Lim, F. S.; Teng, K. W.; McGovern, N.; Narayanan, S.; Ho, W. Q.; Cerny, D.; Tan, H. K.; Anicete, R.; Tan, B. K.; Lim, T. K.; Chan, C. Y.; Cheow, P. C.; Lee, S. Y.; Takano, A.; Tan, E. H.; Tam, J. K.; Tan, E. Y.; Chan, J. K.; Fink, K.; Bertolotti, A.; Ginhoux, F.; Curotto de

Lafaille, M. A. and Newell, E. W. (2016). **A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures**. *Immunity* 45(2): 442-456.

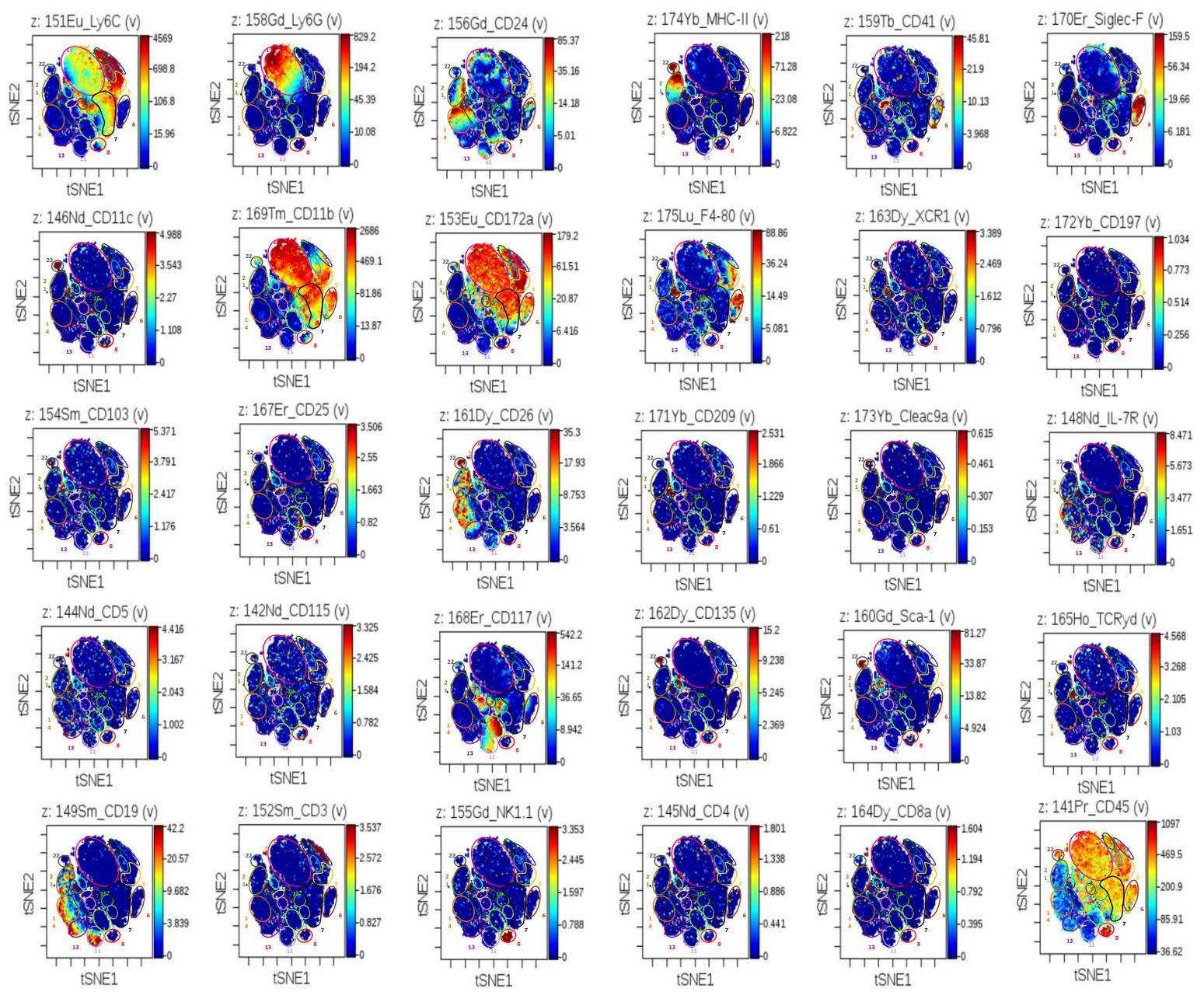
Yona, S.; Kim, K. W.; Wolf, Y.; Mildner, A.; Varol, D.; Breker, M.; Strauss-Ayali, D.; Viukov, S.; Guilliams, M.; Misharin, A.; Hume, D. A.; Perlman, H.; Malissen, B.; Zelzer, E. and Jung, S. (2013). **Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis**.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

ANEXO I

Anticorpo	Isótopo	Clone
Ly6C	151Eu	HK1.4
CD172a	153Eu	P82
CD103	154Sm	2E7
CD24	156Gd	M1/69
TCRgd	165Ho	GL3
F4-80	175Lu	BM8
IL-7R	148Nd	A7R34
CD3	152Sm	145-2C11
CD25	167Er	3C7
CD115	142Nd	AFS98
CD5	144Nd	53-7.3
CD4	145Nd	RM4-5
CD19	149Sm	6D5
NK1.1	155Gd	PK136
Ly6G	158Gd	1A8
CD41	159Tb	MWRReg30
Sca-1	160Gd	E13-161.7
CD8a	164Dy	53-6.7
CD117	168Er	2B8
CD11b	169Tm	M1/70
Siglec-F	170Er	E50-2440
CD197	172Yb	4B12
MHC-II	174Yb	M5/114.15.2
CD26	161Dy	BA5b
CD11c	146Nd	N418
CD135	162Dy	A2F10
XCR1	163Dy	-
CD209	171Yb	-
Cleac9-a	173Yb	-
CD45	141Pr	30-F11

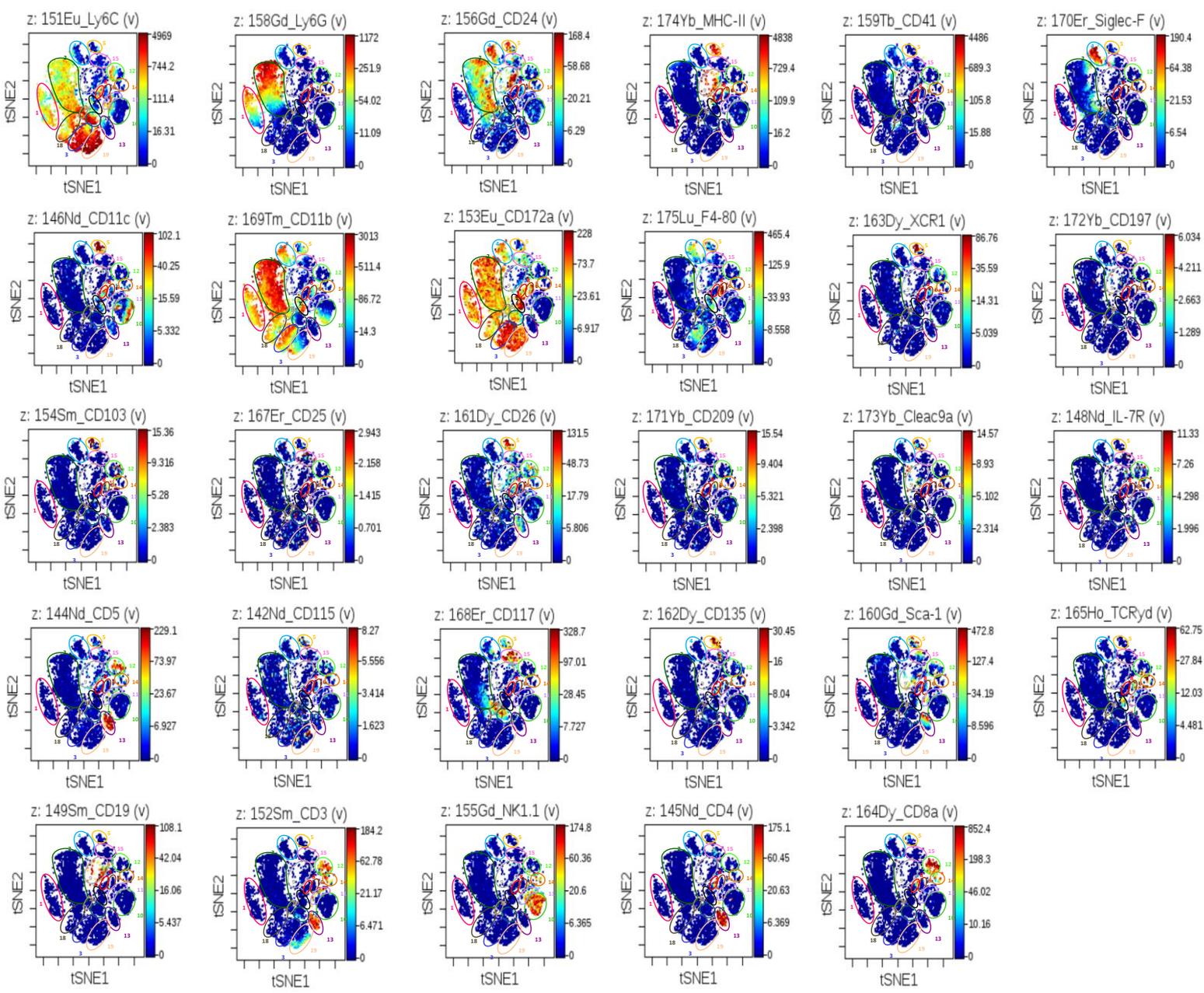
ANEXO II

O dia



	1	2	3
1	28,99	26,99	25,9
2	1,05	1,01	0,87
3	1,24	1,08	1
4	2,38	2,14	1,65
5	1,97	2,76	2,52
6	4,97	3,51	3,32
7	8,05	9,88	6,96
8	1,43	0,91	1,13
9	1,59	1,66	2,26
10	4,37	2	2,45
11	3,07	2,53	3,37
12	5,19	3,84	4,37
13	1,24	1,56	3,27
14	7,08	7,62	6,15
15	0,86	3,15	1,78
16	1,44	1,38	1,93
17	1,5	2,1	1,94
18	2,03	0,56	1,14
19	0,6	1,58	1,63
20	3	1,69	1,76
21	5,2	5	6,51
22	1,01	0,73	0,87

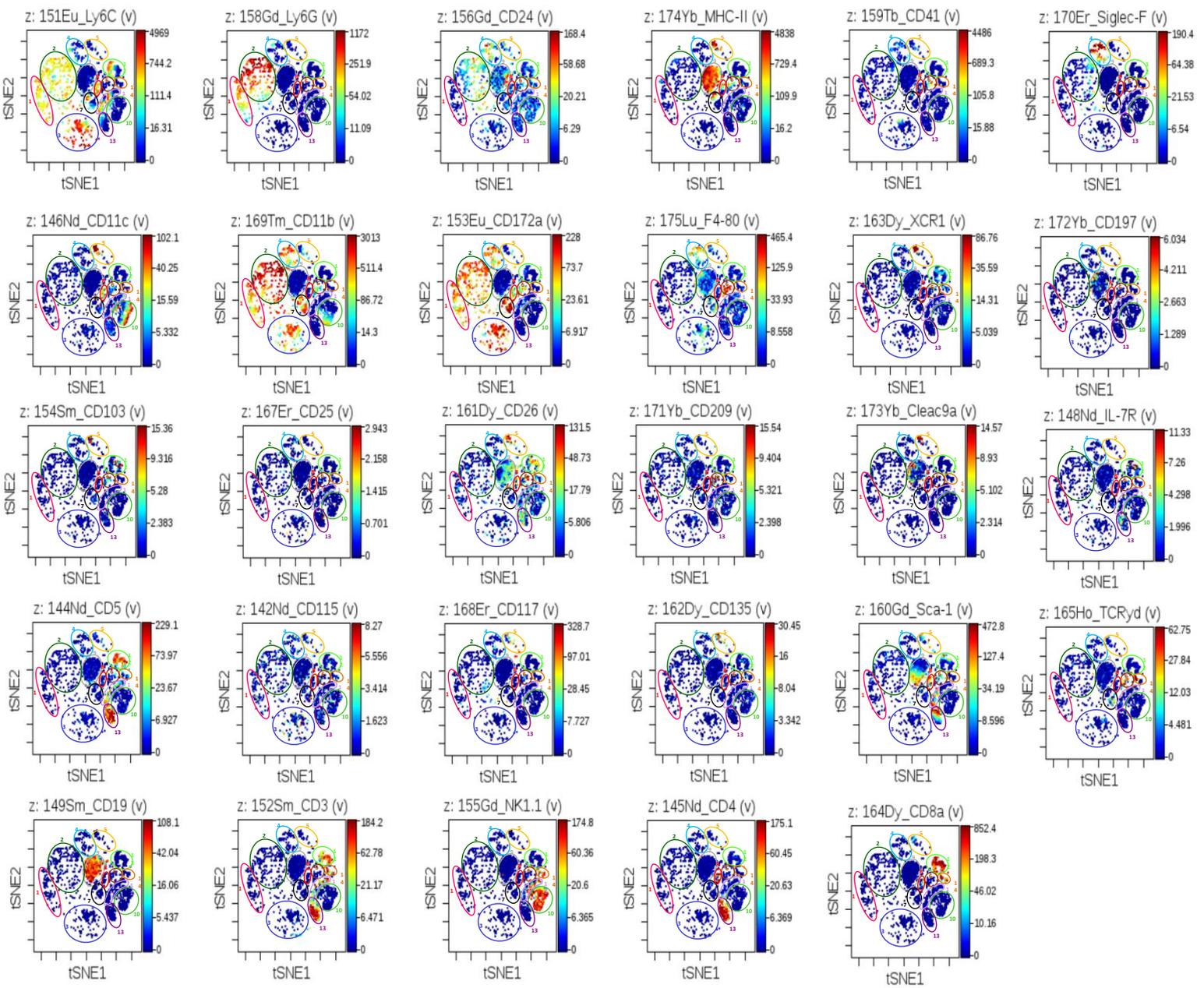
1. CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ → Granulócitos
2. CD45⁺ CD11b^{low} Ly6C^{hi} → Monócitos
3. CD45⁺ CD11b^{low} Ly6C^{hi} CD3⁺ → Células T
4. CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{hi} → Monócitos
5. CD45⁺ CD11b^{hi} Ly6C^{hi} F4/80^{hi} → Mon/Mφ
6. CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ SiglecF⁺ → Granulócitos
7. CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{int} → Monócitos
8. CD45⁺ CD3⁻ NK1.1⁺ → Células NK
9. CD45⁺ CD11b⁺ → ?
10. CD45⁺ CD11b^{low} Ly6C⁺ CD117⁺ → Precursores monocíticos
11. CD45^{low} CD11b⁻ CD117⁺ CD19⁺ → Células B
12. CD45^{low} CD11b⁻ CD117⁺ → Precursores
13. CD45^{low} CD11b⁻ CD19⁺ → Células B
14. CD45^{low} CD11b⁻ CD24⁺ CD26⁺ CD19⁺ → Células B
15. CD45^{low} CD11b⁻ CD24⁺ → ?
16. CD45⁺ CD11b⁻ → ?
17. CD45⁺ CD11b⁻ Ly6C⁺ CD117⁺ → Precursores monocíticos
18. CD45⁺ CD11b⁻ CD41⁺ CD117⁺ → Megacariócitos
19. CD45^{low} CD11b⁻ F4/80^{hi} CD209⁺ → Mφ/DCs
20. CD45⁺ CD11b⁻ CD117⁺ CD135⁺ Sca1⁺ → Precursores
21. CD45^{low} CD11b⁻ MHCII⁺ CD19⁺ → Células B
22. CD45⁺ CD11b^{low} CD11c⁺ MHCII⁺ CD26⁺ → Mφ/DCs



1 semana

	1	2	3
1	3,82	2,23	6,15
2	32,97	31,29	43,96
3	6,53	9,68	7,92
4	5,95	5,76	3,94
5	2,54	2,81	1,41
6	0,75	0,76	0,43
7	1,54	2,25	1,22
8	0,93	0,6	0,96
9	5,13	2,87	1,54
10	6,8	6,94	4,65
11	3,23	3,85	2,44
12	2,38	3,39	1,31
13	2,18	2,23	0,66
14	1,86	1,84	0,75
15	1,86	2,04	2,62
16	3,13	4,26	3,79
17	2,89	3,42	3,35
18	6,79	3,17	4,69
19	6,28	6,95	4,57

- 1. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24⁻ → Granulócitos
- 2. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24⁺ → Granulócitos
- 3. CD11b⁺ Ly6C^{hi} F4/80^{int} → Mon/MØs
- 4. CD11b⁺ F4/80⁺ SiglecF⁺ CD24⁺ → Granulócitos
- 5. CD11b^{low} CD11c^{hi} XCR1⁺ MHCII⁺ CD103⁺ CD26⁺ → MØs/DCs
- 6. CD11b⁺ F4/80^{hi} + MHCII^{int} → MØs/DCs
- 7. CD11b⁺ F4/80⁺ → MØs/DCs
- 8. CD11b⁻ CD11c⁺ CD26^{low} → MØs/DCs
- 9. CD19⁺ MHCII⁺ → Células B
- 10. CD3⁻ NK1.1⁺ → Células NK
- 11. CD3⁺ NK1.1⁺ → Células NKT
- 12. CD3⁺ CD8a⁺ → Células TCD8
- 13. CD3⁺ CD4⁺ → Células TCD4
- 14. CD3⁺ NK1.1⁺ CD8a⁺ → Células NKT
- 15. CD11b⁻ CD117⁺ → Precursores
- 16. CD11b^{int} Ly6C^{hi} CD117⁺ → Precursores monocíticos
- 17. CD11b⁻ Ly6C^{hi} CD117⁺ → Precursores monocíticos
- 18. CD11b⁺ Ly6C⁺ → Monócitos
- 19. CD11b^{int} Ly6C^{hi} → Monócitos

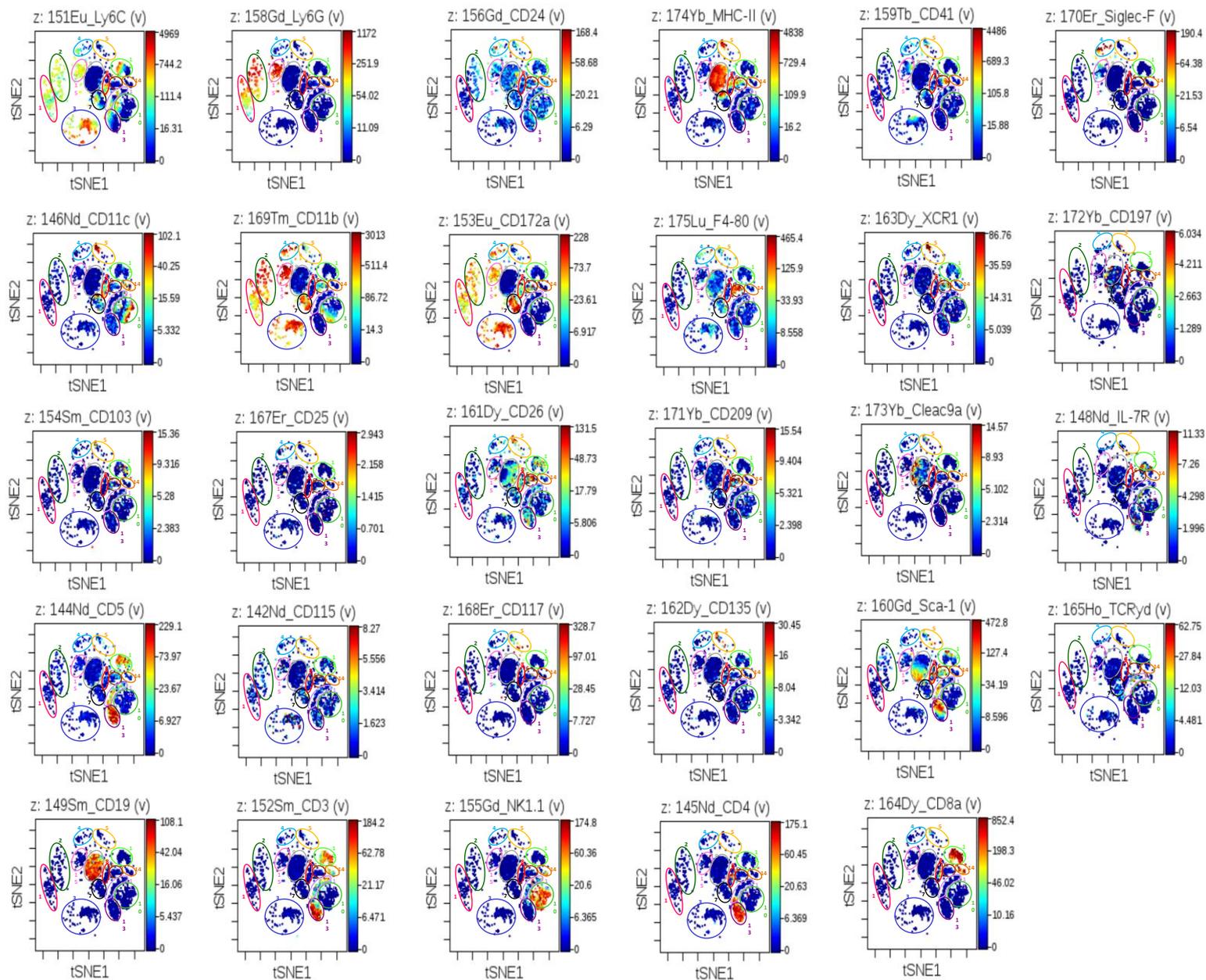


3 semanas

	1	2	3
1	3,97	2,55	4,02
2	7,32	8,59	10,18
3	6,92	6,63	6,6
4	2,73	2,77	2,7
5	1,71	2,03	1,81
6	1,46	6,29	4,25
7	4,53	3,38	3,69
8	2,39	2,66	2,95
9	21,07	17,38	19,96
10	13,4	11,16	9,15
11	6,86	8,16	7,25
12	8,87	7,28	7,88
13	9,15	9,51	9,74
14	3,57	3,18	3,16

1. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24⁻ → Granulócitos
2. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24^{int/low} → Granulócitos
3. CD11b⁺ Ly6C^{hi} F4/80^{low} → Monócitos
4. CD11b⁺ F4/80⁺ SiglecF⁺ CD24⁺ → Granulócitos
5. CD11b⁻ CD11c^{hi} XCR1⁺ MHCII⁺ CD26⁺ → Mø/s/DCs
6. CD11b⁺ MHCII⁺ F4/80^{hi} CD103^{low} CD26⁺ → Mø/s/DCs
7. CD11b⁺ F4/80⁺ → Mø/s/DCs
8. CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII^{low} CD26^{low} → Mø/s/DCs
9. CD19⁺ MHCII⁺ → Células B
10. CD3⁻ NK1.1⁺ → Células NK
11. CD3⁺ NK1.1⁺ → Células NKT
12. CD3⁺ CD8a⁺ → Células TCD8
13. CD3⁺ CD4⁺ → Células TCD4
14. CD3⁺ NK1.1⁺ CD8a⁺ → Células NKT

8 semanas



	1	2	3
1	2,42	1,9	3,15
2	1,43	1,23	2,07
3	8,26	5,15	6,52
4	1,39	1,56	1,44
5	0,89	0,69	0,72
6	3,86	6,11	6,25
7	9,62	4,95	7,19
8	2,59	2,69	3,1
9	33,11	34,77	38,67
10	7,38	5,57	5,31
11	5,72	9,02	5,8
12	6,16	8,22	7,27
13	8,8	11,9	7,6
14	0,96	1,04	1,21
15	3,39	1,98	2,61

1. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24⁻ → Granulócitos
2. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24^{low} → Granulócitos
3. CD11b⁺ Ly6C^{hi} F4/80^{low} → Monócito
4. CD11b⁺ F4/80⁺ SiglecF⁺ CD24⁺ → Granulócitos
5. CD11b^{low} CD11c^{hi} XCR1⁺ MHCII⁺ CD26⁺ F4/80^{low} → Mø/s/DCs
6. CD11b⁺ MHCII⁺ F4/80^{hi} XCR1^{int} CD26⁺ → Mø/s/DCs
7. CD11b⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ MHCII^{low} → Mø/s/DCs
8. CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ CD26⁺ → Mø/s/DCs
9. CD19⁺ MHCII⁺ → Células B
10. CD3⁻ NK1.1⁺ → Células NK
11. CD3⁺ NK1.1⁺ → Células NKT
12. CD3⁺ CD8a⁺ → Células TCD8
13. CD3⁺ CD4⁺ → Células TCD4
14. CD3⁺ NK1.1⁺ CD8a⁺ → Células NKT
15. CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺ CD24^{low} → Granulócitos