

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

**Um rápido estabelecimento da resposta imune prepara neonatos
para a vida pós útero.**

Érika de Carvalho

Belo Horizonte

2018

Érika de Carvalho

**Um rápido estabelecimento da resposta imune prepara neonatos
para a vida pós-útero.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Mila Fernandes Moreira Madeira

Belo Horizonte

2018

Esse trabalho foi realizado no Centro de Biologia Gastrointestinal (CGB) localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Também foi utilizado o Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro do Departamento de Microbiologia, localizado no ICB-UFMG. Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e com as instituições parceiras BD Bioscience , Maxillo Facial Tips e Nikon.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir chegar tão longe, tanto quanto eu nunca verdadeiramente acreditei que fosse possível;

À minha família, principalmente a minha mãe e meu pai que me apoiaram em mais essa etapa. Ao meu irmão Eleazar por todas as vezes que participou das minhas idas e vindas fora de hora ao laboratório, minha prima Thaisse e sua família por todo suporte nesta caminhada;

Ao meu querido Nilton, por nunca me deixar desistir e por ter sempre uma palavra de incentivo. Por seu companheirismo e cuidado incondicional. A minha amada Ana, por seu carinho e por cuidar de mim com tanto carinho e dedicação. A Benvinda e ao João: o apoio de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador Gustavo Menezes (carinhosamente chamado por mim de Queridão), por acreditar em mim, mesmo sem me conhecer e me mostrar que fazer ciência não é uma carreira, mas sim um desejo da alma. Por seu empenho incansável em nos fazer querer ir mais longe, pelos ensinamentos, às vezes duros, mas necessários; pelos abraços e mensagens que recarregaram as forças e aliviaram a alma em momentos de desespero...

À minha co-orientadora Mila Fernandes por todo apoio e carinho a mim dispensados neste curto espaço de convivência. Seu profissionalismo, dedicação e cuidado com o meu trabalho nunca serão esquecidos.

A todos os meus amigos do CGB: aos que por aqui passaram e que hoje brilham em diferentes partes do Brasil e do mundo; àqueles que comigo dividiram grande parte do meu percurso e aos recém-chegados. Muito obrigada por todos os ensinamentos científicos, mas principalmente os ensinamentos para vida, esses sim, não serei capaz de esquecer. Obrigada pelas risadas, pela paciência, pelo cuidado e pelo suporte emocional em um dos momentos mais delicados da minha caminhada. Vocês me fizeram melhor.

A todos os professores com os quais tive o privilégio de aprender e de ser avaliada. A todos os funcionários técnico-administrativos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular. Sem o trabalho e empenho de vocês essa jornada não seria possível.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Infecções sistêmicas e a susceptibilidade de neonatos.....	13
1.2 O fígado.....	14
1.3 As células de Kupffer.....	15
2 JUSTIFICATIVA	18
3 HIPÓTESE	19
4 OBJETIVOS	
4.1. Objetivo Geral.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	
5.1. Animais experimentais	19
5.2. Micro-organismo	
5.2.1. Cultivo bacteriano para desafio.....	21
5.3. Clearance sanguíneo – Citometria de Fluxo	
5.3.1. Modelo de bacteremia – Infecção única.....	23
5.3.2. Estratégia de análise.....	24
5.4. Microscopia confocal	
5.4.1. Imagens de fígado <i>ex-vivo</i>	25
5.4.2. Imagens de fígado <i>in vivo</i>	25
5.5. Quantificação bacteriana	
5.5.1. Padronização do tempo de exposição e inóculo bacteriano: cinética	26
5.5.2. Quantificação bacteriana em tecidos	27
5.5.3. Participação das células de Kupffer no clearance sanguíneo – depleção por injeção de clodronato (CLL)	27
5.6. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)	
5.6.1. Extração de RNA.....	29
5.6.2. Síntese de cDNA.....	29

5.6.3. PCR quantitativo (qPCR)	
5.6.3.1. Controle endógeno	29
5.6.3.2. Genes relacionados ao processo de captura e eliminação	30
5.6.3.3. Determinação da expressão gênica.....	31
5.7. Análises Estatísticas.....	32
6 RESULTADOS	
6.1 Neonatos apresentam menor capacidade de <i>clearance</i> de bactérias do sangue em relação aos camundongos adultos.....	33
6.2. Camundongos neonatos apresentam menor sobrevivência quando são desafiados com inóculo bacteriano.....	34
6.3. O fígado está envolvido na retenção de bactérias em neonatos e adultos.....	35
6.4. Desaparecimento de bactérias do sangue está associado a um aumento da bacteremia hepática, especialmente em neonatos	37
6.5. A ausência de fagócitos favorece a manutenção de bactérias circulantes.....	39
6.6. Uma menor taxa de aderência de bactérias em macrófagos hepáticos de camundongos neonatos favorece a movimentação dos micro-organismos pelos sinusóides.....	42
6.7. Diferenças na expressão de genes relacionados com a captura e eliminação de bactérias durante a homeostase e frente à infecção bacteriana.....	44
7 DISCUSSÃO.....	48
8 CONCLUSÃO.....	54
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

APCs – Células apresentadoras de antígenos

UFC – Unidades formadoras de colônias (CFU)

CLL – Lipossomo de clodronato (dichloromethylene 1,1 - bisphosphonate ou Cl₂MBP)

DAMP – Padrão molecular associado a dano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

i.v – Intravenosa

IFN - Interferon

KCs – Células de Kupffer

LB - Luria-Bertani

LPS – Lipopolissacarídeo

NK – Células Natural Killer

OD – Densidade óptica

MAMP – Padrão molecular associado a micro-organismos

PBS – Salina tamponada com fosfato

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

qPCR- Reação em cadeia pela polimerase (teste quantitativo)

RPM – Rotação por minuto

SR – *Scavenger receptor*

TLR – Receptor do tipo toll

TNF – Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estratégia de análise de testes de citometria de fluxo.....	24
Figura 2	Avaliação da capacidade de <i>clearance</i> por citometria de fluxo	33
Figura 3	Percentual de sobrevivência após inóculo bacteriano.....	34
Figura 4	Captura de bactérias pelo fígado – imagens <i>ex-vivo</i>	35
Figura 5	A) Placas de CFU animais 0 dia e 8 semanas	37
	B) Quantificação de bactérias viáveis no fígado.....	38
Figura 6	A) Participação de macrófagos hepáticos na captura de bactérias em animais recém-nascidos.....	39
	B) Percentual de sobrevivência após clodronato: animais 4 dia.	40
	C) Quantificação bacteriana sangue e fígado camundongos controle após clodronato.....	41
	D) Quantificação bacteriana sangue e fígado camundongos desafio após clodronato.....	41
	E) Quantificação de bactérias viáveis após clodronato.....	41
Figura 7	A) Cinética de captura de bactérias pelas KCs <i>in vivo</i>	42
	B) <i>Tracking</i> – captura de bactérias pelas KCs <i>in-vivo</i>	43
Figura 8	Expressão de genes relacionados a resposta imune a micro-organismos em camundongos controle durante o desenvolvimento	45
Figura 9	Quantificação da expressão gênica.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidades aproximadas de <i>E.coli</i> que os camundongos de diferentes idades receberam de acordo com o peso corporal.....	23
Tabela 2	Peso total (médio) do fígado dos animais dos diferentes grupos analisados	27
Tabela 3	<i>Primers</i> (iniciadores) utilizados nos testes de qPCR.....	30

Resumo

O fígado exerce um importante papel na homeostase sistêmica por estar envolvido na eliminação de micro-organismos da corrente sanguínea. Isso é feito especialmente pela captura contínua de bactérias pelos macrófagos residentes hepáticos (células de Kupffer - KCs). Neste contexto, bactérias que escapam do sistema gastrointestinal, bem como as que são disseminadas pela corrente sanguínea durante as infecções sistêmicas, são normalmente impedidas de colonizarem o organismo. De fato, doenças hepáticas podem predispor o paciente a disseminações sistêmicas de infecções advindas de diferentes partes do corpo. Apesar disso, os mecanismos envolvidos na captura e eliminação bacteriana pelo sistema fagocítico hepático, e a cronologia da maturação da resposta imunológica durante o desenvolvimento pós-natal são relativamente conhecidos. O objetivo desse trabalho foi caracterizar - utilizando uma combinação entre imagem *in vivo*, citometria de fluxo e análise gênica - a dinâmica do *clearance* sistêmico bacteriano durante as diferentes fases do desenvolvimento murino, bem como os mecanismos celulares utilizados pelas células de Kupffer na captura e eliminação de bactérias durante este período. Nossos resultados demonstraram um acúmulo hepático bacteriano após uma dose única endovenosa de *Escherichia coli*, que se estabelece rapidamente após inoculação (10-20 segundos). A maioria das *E. coli* visualizadas no fígado estavam em contato íntimo com KCs. A eliminação eficaz de bactérias do fígado e do sangue foi correlacionada a uma resistência à infecção, com elevadas taxas de sobrevivência em camundongos adultos. Entretanto, animais recém-nascidos apresentaram uma reduzida taxa de captura de bactérias circulantes, culminando em elevadas contagens de bactérias viáveis no fígado e aumento da mortalidade pós-infecção. O imageamento por microscopia intravital confocal revelou que KCs de neonatos (até 1 semana pós-nascimento) possuem uma capacidade reduzida de captura de bactérias circulantes, que pode ser explicada pela baixa expressão de genes envolvidos com a fagocitose bacteriana. Ainda, camundongos recém-nascidos apresentaram uma menor taxa de ativação gênica pós infecção em relação a adultos. Porém, animais com 1 semana de vida já apresentaram taxas similares a adultos tanto de captura quanto de eliminação bacteriana, sugerindo que embora inicialmente deficiente, a resposta imunológica a bactérias rapidamente se estabelece em neonatos. Em conjunto, nossos dados fornecem um novo panorama acerca da inter-relação bactéria/hospedeiro em diferentes fases do desenvolvimento, sugerindo que uma relativa

imaturidade imune hepática pós-natal pode explicar a elevada mortalidade durante a infecções bacterianas em recém-nascidos.

Abstract

The liver plays an importance role in systemic homeostasis because it is involved in the elimination of microorganisms from the bloodstream. This is done especially by the continuous capture of bacteria by resident liver macrophages (Kupffer cells - KCs). In this context, bacteria that escape from the gastrointestinal system, as well as those that are disseminated through the bloodstream during systemic infections, are usually prevented from colonizing. In fact, liver diseases may predispose the patient to systemic spread of infections from different parts of the body. Nevertheless, the mechanisms involved in bacterial capture and elimination by the hepatic phagocytic system, and the chronology of maturation of the immune response during postnatal development are not relatively well known. The aim of this work was to characterize - using a combination of in vivo imaging, flow cytometry and gene analysis - the dynamics of bacterial systemic clearance during the different stages of murine development, as well as the cellular mechanisms used by Kupffer cells in capturing and eliminating of bacteria during this period. Our results demonstrated bacterial accumulation in the liver, following a single intravenous dose of *Escherichia coli*, which settles rapidly after inoculation (10-20 seconds). The majority of *E. coli* visualized in the liver were in intimate contact with KCs. Moreover, the effective elimination of liver and blood bacteria was correlated with a resistance to infection with high survival rates in adult mice. However, newborns had a low rate of capture of circulating bacteria, culminating in high counts of viable bacteria in the liver and increased post-infection mortality. Imaging by confocal intravital microscopy has revealed that KCs of neonates (up to 1 week post-birth) have a reduced capacity for capturing circulating bacteria, which can be explained by the reduced expression of genes involved in phagocytosis and bacterial death. Still, newborns had a lower rate of post-infection gene activation in relation to adults. Although it could be observed that animals at 1 week old had similar rates to adults for both capture and bacterial elimination, suggesting that despite initially deficient, the immune response to bacteria rapidly establishes in neonates. Taken together, our data provide a new picture of the bacterial / host interrelationship at different stages of development, suggesting that a relative postnatal hepatic immaturity may explain the high mortality during bacterial infections in newborns.

1. Introdução

1.1 – Infecções sistêmicas e a susceptibilidade de neonatos

A sepse é um problema de saúde pública que leva milhões de pessoas a óbito ao redor do mundo e que permanece sem solução eficaz (Mayr et al., 2014). Durante uma infecção generalizada micro-organismos são difundidos por todos os órgãos pela corrente sanguínea levando à sobrecarga dos sistemas e potencialmente a lesões teciduais. Isso ocorre devido à liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, que leva à disfunção e falência de órgãos, além da redução na circulação hemodinâmica, podendo levar à morte (Adkins et al., 2004; Strnad et al., 2017; Wu et al., 2018).

Segundo o ILAS (Instituto Latino Americano de Sepse), na Declaração Mundial da Sepse redigida pela GSA (*Global Sepsis Alliance*), entre 20 e 30 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidos por esta condição infecciosa. As perspectivas são alarmantes: observa-se o aumento drástico das taxas anuais entre 8-13%, sendo que as taxas de mortalidade hospitalares são altas, entre 30 e 60%. Os casos mais frequentes são em crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos, mas a doença pode afetar qualquer faixa etária (Fleischmann et al., 2016).

Levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre os anos 2000 e 2015 indica que entre as 6 milhões de pessoas que vão à óbito devido ao quadro de sepse, 1 milhão são neonatos (quatro primeiras semanas de vida) (Zaidi et al., 2011). Até os primeiros 27 dias de vida, a sepse é a terceira maior causa de letalidade entre este grupo, ficando atrás apenas dos nascimentos prematuros e de complicações durante o parto. Essa taxa de letalidade varia de 5 a 60%, mesmo nos indivíduos que são submetidos a tratamento com antimicrobianos (Panigrahi et al., 2017; Aku et al., 2018).

A alta susceptibilidade neonatal a infecções, em seres humanos, pode estar relacionada à incapacidade do sistema imune inato, uma vez que durante os primeiros anos de vida, é ele o responsável por auxiliar na manutenção da homeostase do indivíduo, atuando na defesa contra patógenos (Mayr et al., 2014; Tacke e Zimmermann, 2014). E essa capacidade inicial está associada ao grau de maturidade das células imunes (Beattie et al., 2016). Neonatos não

possuem sistema imune totalmente desenvolvido dependendo, nos primeiros dias de vida, de uma resposta imune inata (Mayr et al., 2014).

Levantamento realizado nos Estados Unidos, pelo Instituto Nacional de Saúde e Desenvolvimento Infantil (NICHD) demonstrou que a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) está entre os micro-organismos comumente envolvidos em quadros de sepse neonatal em seres humanos, assim como *Streptococcus* do grupo B (Stoll et al., 2011; Aku et al., 2018). Outro estudo realizado no Reino Unido indica que *E.coli* é a quarta espécie bacteriana mais frequentemente encontrada em casos de sepse (Balmer et al., 2014), e está entre os grupos de micro-organismos que mais afetam neonatos que nasceram de parto pré-termo (Aku et al., 2018) podendo levá-los a óbito por meningite (*E.coli* sorotipo k1) (Prosser et al., 2013).

Presente na microbiota gastrointestinal tanto de seres humanos como de camundongos, a *E.coli* já foi detectada no intestino de neonatos de camundongos horas após o nascimento (Tacke e Zimmermann, 2014). Quando em homeostase com o hospedeiro, não causa nenhum dano, uma vez que a exposição é frequente. Porém, durante uma disbiose, ou perda da homeostase, podem ocorrer quadros patológicos que podem ser desde uma simples diarreia até infecções generalizadas (Trung et al., 2016).

1.2 – O fígado

O fígado, segundo maior órgão e a maior glândula do corpo humano, é responsável por inúmeras funções no organismo como, por exemplo, detoxificação, funções metabólicas, funções endócrinas e exócrinas, sendo essas funções exercidas pelos hepatócitos, unidades estruturais que formam o parênquima hepático (Fausto e Campbell, 2003; Vollmar e Menger, 2009). O fígado é responsável ainda por auxiliar na manutenção da homeostase do organismo pelo seu papel imunológico. É um órgão importante e um componente crítico na defesa contra infecção por via sanguínea (Balmer et al., 2014; Yan e Li, 2014; Strnad et al., 2017; Wu et al., 2018), devida à sua localização anatômica, organização estrutural e composição celular (Racanelli e Rehmann, 2006; Macpherson et al., 2016). Em um quadro infeccioso, aproximadamente 60% das bactérias presentes na circulação sanguínea ficam retidas no fígado (Yan e Li, 2014).

O fígado está estrategicamente localizado na cavidade abdominal sendo um órgão altamente vascularizado. Recebe influxo sanguíneo direto do coração pela artéria hepática e sangue drenado de órgãos como intestino, baço e pâncreas pela veia porta, responsável por irrigar este órgão com a maior quantidade de sangue – entre 75 e 80% do volume total (Vollmar e Menger, 2009). O sangue circula pelos sinusoides hepáticos (formado por cordões de hepatócitos paralelos) que recebem 30% do volume total de sangue por minuto (Tarasenko e McGuire, 2017). Essa estrutura forma uma barreira muito importante para os demais órgãos, funcionando como uma rede protetora (Llorente e Schnabl, 2016; Strnad et al., 2017). É descrito que o fígado está envolvido em uma resposta mais imediata (Akamatsu et al., 2003; Broadley et al., 2016), capturando tanto bactérias opsonizadas como bactérias "livres" por meio de receptores denominados *Scavenger receptors* - SR (Yan e Li, 2014; Broadley et al., 2016) expressos pelas KCs.

Entre as células imunes residentes no fígado estão as Células de Kupffer (macrófagos), linfócitos T, células *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT) (Lee et al., 2010; Strnad et al., 2017). Essas células localizam-se nos sinusoides hepáticos, o que favorece o seu contato com partículas dispersas na circulação. (Szabo et al., 2010; Jenne e Kubes, 2013). Essas Possuem capacidade de detectar metabólitos microbianos que podem levar a um desequilíbrio hepático favorecendo o aparecimento de doenças no fígado como, por exemplo, fibrose e câncer (Macpherson et al., 2016).

Além disso, em alguns casos de disbiose ou em processos que levem a ruptura da barreira epitelial intestinal, micro-organismos podem alcançar a corrente sanguínea devida a translocação de bactérias ou componentes bacterianos (e.g. LPS – Lipopolissacarídeos presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativa) (Szabo et al., 2010; Jenne e Kubes, 2013) da região intestinal para o fígado pela da veia porta (Krenkel e Tacke, 2017; Nakagaki et al., 2018). Pode ocorrer também em casos mais graves como, por exemplo, nos quadros de bacteremia e sepse. Alguns estudos demonstraram que o número de casos de sepse tem aumentado em pessoas com doenças relacionadas ao fígado (Balmer et al., 2014; Mayr et al., 2014; Yan e Li, 2014; Broadley et al., 2016; Strnad et al., 2017; Wu et al., 2018). Este dado demonstra a importância que esse órgão possui na homeostase sistêmica, como órgão envolvido na captura e eliminação dos micro-organismos da corrente sanguínea.

1.3 – As células de Kupffer

As células de Kupffer (KCs), são consideradas macrófagos profissionais capazes de realizar o *clearance* bacteriano sistêmico com grande eficiência pela expressão de receptores que permitem o reconhecimento e a capturar micro-organismos circulantes nos sinusoides, devolvendo a esterilidade original do sangue (Broadley et al., 2016; Krenkel e Tacke, 2017; Strnad et al., 2017) . Além disso, realiza inúmeras funções essenciais ao organismo como secreção de quimiocinas necessárias no processo pró-inflamatório (Racanelli e Rehermann, 2006). As KCs representam entre 80-90% de todos os macrófagos teciduais existentes no corpo (Srivastava e Gimson, 2013), (Tarasenko e McGuire, 2017). A localização das KCs no lúmen dos sinusoides favorece o contato com os micro-organismos que por ventura estejam circulando no sangue (Macpherson et al., 2016), além de serem capazes de interagir com células imunes circulantes , como, por exemplo linfócitos T e células *Natural Killer* (NK) (Krenkel e Tacke, 2017).

Apesar disso, poucos detalhes do mecanismo utilizado pelas KCs durante o reconhecimento, captura e fagocitose bacteriana são conhecidos (Llorente e Schnabl, 2016). Sabe-se que elas são capazes de perceber alterações relacionadas com a presença de micro-organismos, uma vez que expressam receptores denominados PRRs — receptores de reconhecimentos de padrões, que reconhecem MAMPs- padrões moleculares associados a micro-organismos, como, por exemplo, o LPS. Esses MAMPs são estruturas moleculares conservadas nos micro-organismos que são identificadas por receptores existentes nas células imunes (Thaiss et al., 2016). Ao ocorrer a associação entre MAMPs e PRRs presentes nas células imunes, há a ativação de uma sinalização intracelular, como por exemplo, a ativação de inflamassomas, que culminam com a liberação de interleucinas como IL 1 β e IL 18 necessárias à ativação de mecanismos celulares que auxiliam na eliminação de micro-organismos (Macpherson et al., 2016; Thaiss et al., 2016; Krenkel e Tacke, 2017; Torow e Hornef, 2017).

A importância das KCs, quanto ao seu papel imunológico, no que concerne ao *clearance* bacteriano fica evidenciada em experimentos que demonstram que, ao serem depletadas (Akamatsu et al., 2003; Vollmar e Menger, 2009), há um aumento considerável de bactérias na circulação (Ebe et al., 1999; Lee et al., 2010). Devido a essa importância crucial

na manutenção da homeostase, as KCs devem ser profundamente estudadas visando a compreensão dos mecanismos de atuação durante as respostas contra infecções, podendo ser alvo de novas possibilidades terapêuticas (Tacke e Zimmermann, 2014; Beattie et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Observada a importância que o fígado possui na manutenção da homeostase corporal, pela sua atuação como órgão imunológico e, tendo em vista os dados clínicos que demonstram uma alta susceptibilidade de neonatos humanos a infecções, nosso objetivo foi entender como ocorre o *clearance* bacteriano da circulação sistêmica durante as diferentes fases do desenvolvimento murino, bem como os mecanismos celulares utilizados pelas células de Kupffer, na captura e eliminação de bactérias. Entender a capacidade fagocítica durante o desenvolvimento pós-natal é de extrema importância, sendo até então negligenciada - não existindo trabalhos que demonstrem a comparação quanto ao processo de fagocitose entre adultos e neonatos (Prosser et al, 2013).

Entender a cronologia dessa susceptibilidade torna-se importante na busca do conhecimento de mecanismos que possam auxiliar no desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas, e, assim, propor novas intervenções em quadros de infecções neonatais.

3. HIPÓTESE

Neonatos apresentam defasagem temporal, em relação ao animal adulto, no processo de *clearance* e eliminação de bactérias da circulação sistêmica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar o *clearance* bacteriano da circulação sistêmica em diferentes estágios de desenvolvimento murino, comprovar a participação hepática neste processo e compreender se o mecanismo de captura de bactérias pelas células imunes do fígado sofre alteração nos diferentes estágios do desenvolvimento, desde o dia do nascimento até a idade adulta.

4.2. Objetivos específicos

1. Estimar o número de bactérias presentes na circulação sistêmica de animais desafiados com inóculo bacteriano;
2. Validar a participação do fígado na retenção bacteriana;
3. Avaliar a eliminação bacteriana por macrófagos residentes no fígado por quantificação bacteriana;
4. Avaliar genes relacionados ao processo de captura e eliminação bacteriana nas diferentes idades estudadas;
5. Demonstrar em modelo *in vivo* o processo de captura bacteriana por macrófagos residentes hepáticos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais experimentais

Foram utilizados neste trabalho camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 *wild-type* (WT), das seguintes idades: 0 e 4 dias, além de 1, 2, 3, 4 e 8 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/ICB). Os camundongos até a terceira semana de vida foram mantidos em microisoladores junto à matriz progenitora até o momento dos testes. Os demais grupos foram acondicionados em microisoladores contendo cinco animais por grupo. Todos os grupos permaneceram em condições controladas de temperatura (25°C) umidade e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), com água e ração *ad libitum* durante todo o acondicionamento e período experimental. O protocolo de anestesia dos camundongos foi realizado utilizando combinação de Cetamina 10% (160 mg/kg) e Xilazina 2% (30 mg/kg) administrada via intravenosa (i.v). A eutanásia foi realizada por sobredose de anestésico, seguida por deslocamento cervical.

Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA / UFMG), protocolo nº 315/2017. Camundongos que apresentaram qualquer sinal de sofrimento durante este estudo foram prontamente eutanasiados. O descarte das carcaças e dejetos de animais utilizados durante a execução deste trabalho está de acordo com o PGRSS (Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde) do ICB, da UFMG.

5.2. Micro-organismo

Para a infecção sistêmica foi utilizada a amostra de *Escherichia coli* e-GFP (ATCC 25922GFP).

A quantificação bacteriana foi determinada utilizando-se a leitura da absorbância em densidade óptica de 600 nm em espectrofotômetro (VersaMax, Califórnia, USA). A utilização de uma amostra bacteriana modificada geneticamente (que recebeu a inserção do plasmídeo - *Enhanced Green Fluorescent Protein* – e-GFP) permite a visualização da mesma tanto pela técnica de citometria de fluxo, quanto por microscopia confocal. Quando excitada por um laser de comprimento de onda igual a 488 nm, emite um feixe de luz com comprimento de onda de emissão máxima de 516 nm, tornando possível a sua visualização pela fluorescência na cor verde.

Além disso, *E coli* e-GFP possui o gene de resistência à ampicilina, que confere especificidade à técnica de quantificação bacteriana, uma vez que favorece o crescimento apenas da amostra utilizada, em meio suplementado com este antibacteriano, evitando possível crescimento de outros micro-organismos que não o de interesse.

5.2.1 Cultivo bacteriano para desafio

Uma pequena quantidade de bactérias presentes na alíquota conservada em meio de criopreservação é repassada para tubo de 50 mL contendo meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB *Broth* - Acumedia / Neogen, lote 108289), acrescido de ampicilina (100µg/mL). A cultura foi mantida sob agitação (100 rpm/min) à temperatura de 37°C durante 12 horas. Após esse período o tubo foi colocado em gelo para interromper a proliferação e conservar a suspensão bacteriana. A quantificação de bactérias presentes no inóculo foi realizada pela leitura do comprimento de onda (absorção/emissão de luz) em espectrofotômetro, na densidade óptica de 600 nm. Para a verificação do número de bactérias presente no inóculo utilizamos uma calculadora virtual denominada “*E.coli* Cell culture concentration from OD600 calculator” específica para quantificação de *E.coli* em suspensão, disponível no site <https://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp>. A OD detectado pelo espectrofotômetro é inserido na calculadora que, utilizando cálculo de regra de três simples,

determina o número de células por mL de meio de cultura. Consideram que, na OD 600 nm = 1, existe 8×10^8 células/mL.

A quantidade de bactéria injetada via i.v. em cada animal foi calculada levando-se em consideração o peso de cada animal (especificado adiante). Importante ressaltar que todos os meios de cultura utilizados, seja líquido ou ágar, foram acrescidos de ampicilina na concentração de 100µg/mL, para evitar a perda do plasmídeo contendo o gene para e-GFP. Todo material utilizado, incluindo os meios de cultura foram devidamente autoclavados e / ou são produtos estéreis.

Os procedimentos que envolveram cultivo e manipulação bacteriana foram realizados no Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro (LIMHO), que possui toda a infraestrutura para manipulação de micro-organismos incluindo, capela de fluxo laminar, estufas, agitadores, local próprio para descarte e descontaminação de materiais potencialmente infectantes, bem como identificações adequadas para prevenir contaminação da equipe ou de terceiros.

5.3. Clearance Sanguíneo - Citometria de fluxo

5.3.1 - Modelo de bacteremia – Infecção única

Para investigar o processo de *clearance* bacteriano durante as diferentes etapas do desenvolvimento murino, foram definidos 7 grupos experimentais: 0 dia – o dia exato do nascimento do animal, 4 dias, 1,2,3 e 4 semanas, e 8 semanas (camundongos adultos).

A infecção foi induzida por injeção i.v. da bactéria. Cada grupo recebeu o inóculo bacteriano baseado na padronização pelo peso total do camundongo, sendo o padrão de 5×10^6 células / 20 gramas de peso (tabela 1), favorecendo assim que neonatos não fossem submetidos a uma sobredose. Camundongos adultos pesando aproximadamente 20 gramas receberam diferentes quantidades de bactérias, (entre 10^9 e 10^6), e após 5 minutos foram eutanasiados e as amostras de sangue avaliadas por citometria de fluxo.

Nas idades determinadas, no período da manhã, os camundongos controle receberam via i.v. injeção de salina 0,9% (veículo) e os camundongos dos grupos experimentais foram submetidos à injeção de *E.coli* e-GFP, em suspensão de salina 0,9%. Após 5 minutos, os animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue foram obtidas pela secção da veia cava. Retirou-se 10 microlitros de amostra de sangue total, o qual foi diluído em PBS 1X (diluição 1:40) seguida pela análise de citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 Software). Após a obtenção das amostras, os camundongos foram eutanasiados por sobredose de anestésico seguida de deslocamento cervical.

Idade	Peso (aproximado) em gramas	Inóculo bacteriano (aproximado) GFP <i>E.coli</i>
0 dia	1	$2,5 \times 10^5$
4 dias	2	5×10^5
1 semana	4	1×10^6
2 semanas	6	$1,5 \times 10^6$
3 semanas	9	$2,25 \times 10^6$
4 semanas	12	3×10^6
8 semanas (Adultos)	20	5×10^6

Tabela 1 – Quantidades aproximadas de *E.coli* que os camundongos de diferentes idades receberam de acordo com o peso corporal.

5.3.2 - Estratégia de análise

A estratégia de análise foi definida com base no percentual de eventos GFP positivos. Para isso construímos um gráfico de FL1 (*E.coli* GFP) por FL4 (canal vazio) no qual selecionamos a população positiva em um *gate*. A população selecionada representa o número de bactérias presentes na circulação dos camundongos desafiados, 5 minutos após ter sido administrado com o inóculo bacteriano. Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa FlowJo.

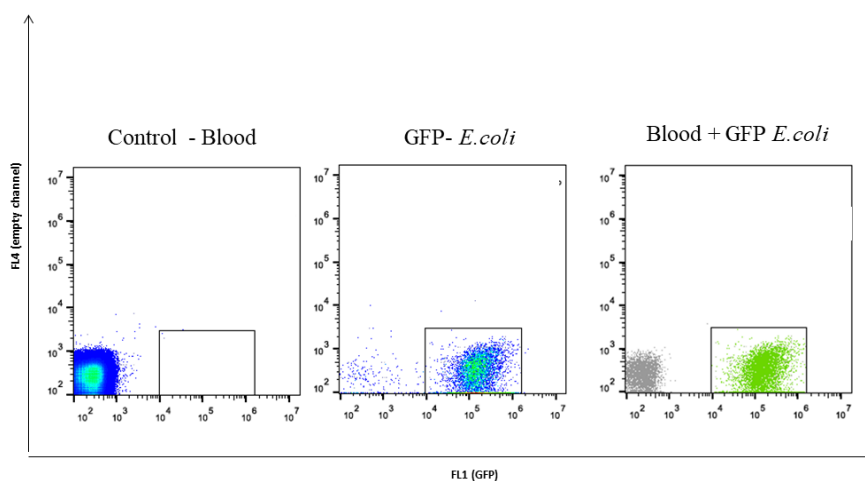


Figura 1 – Estratégia de análise de *gates*. Citometria de fluxo: À esquerda da imagem está o perfil da amostra de sangue de um animal controle (recebeu apenas veículo). No centro da imagem encontra-se o perfil da suspensão bacteriana e-GFP *E.coli* em salina 0,9%. À direita da imagem está o perfil da amostra de sangue de animal que recebeu e-GFP *E.coli*: as amostras são facilmente identificáveis pelo seu deslocamento ao longo do eixo x.

5.4. Microscopia confocal

5.4.1 Imagens de fígado *ex-vivo*:

Juntamente com o inóculo bacteriano administrado em cada grupo do experimento de citometria de fluxo, foi administrado ainda o anticorpo anti-F4/80 conjugado a APC (APC anti-mouse F4/80 clone BM8 cat.: 123116, lote:B212349 – Biolegend- San Diego, CA). Este se liga especificamente aos receptores F4/80 presente em KCs. Após a retirada do sangue do animal para análise por citometria de fluxo, o lóbulo esquerdo do fígado dos camundongos foi retirado e exposto em uma plataforma de acrílico que permite a incisão do *laser* sobre o tecido. Utilizando o microscópio Nikon Ti A1 obtivemos imagens que nos permitem ver a presença de bactérias nas amostras de fígado analisadas.

5.4.2 Imagens fígado *in-vivo*:

A microscopia intravital confocal é uma técnica bastante valiosa no que se refere à observação *in vivo* que nos permite observar a interação das bactérias com as KCs.

Após anestesia, os camundongos receberam i.v. o anticorpo anti-F4/80 conjugado a APC (APC anti-mouse F4/80 clone BM8 cat.: 123116, lote:B212349 – Biolegend- San Diego- CA). Foram então submetidos à laparotomia, e o lóbulo hepático foi posicionado em plataforma de acrílico para aquisição de imagens (Marques et al, 2015). Após posicionamento, os camundongos receberam a suspensão de 5×10^7 células / 20 g i.v. O fígado permaneceu exposto durante 10 minutos para aquisição de vídeos.

5.5 Quantificação Bacteriana

5.5.1 Padronização do tempo de exposição e inóculo bacteriano: cinética

O tempo de interação e quantidade de bactérias a serem inoculadas durante a execução dessa técnica foram definidos considerando a taxa de sobrevivência e a capacidade de eliminação bacteriana, por células hepáticas, de camundongos adultos, 24 horas após terem sido submetidos ao desafio.

Foi estipulado o inóculo em 5×10^6 células/20 gramas de peso dos camundongos (mesma quantidade utilizada para os testes de citometria). Os camundongos foram submetidos à injeção i.v. de *E.coli* e foram avaliados em diferentes intervalos de tempo (30 e 60 minutos, 6,12 e 24 horas). Após este período, os animais foram anestesiados e amostras de sangue e fígado foram retiradas e processadas seguindo a técnica de cultivo Drop Plate: realizou-se diluições seriadas e plaqueamento em meio Agar Luria-Bertani (LB Agar - Acumedia / Neogen – lote: 109004) acrescido de ampicilina (100 µg/mL).

As amostras foram incubadas à 37°C durante aproximadamente 18 horas. As colônias presentes nas placas após este período foram contadas e os dados obtidos foram utilizados para calcular a quantidade de colônias existentes por grama (fígado) /mL (sangue) de tecido analisado, seguindo as fórmulas abaixo:

Amostras de sangue :

UFC/mL = (nº de colônias – média das triplicatas) x diluição onde cresceram colônias contáveis (ex- 10^4) / 0,02 (volume de cada gota plaqueada = 20 microlitros = 0,02 mL).

Amostras de fígado:

UFC/g = (nº de colônias – média das triplicatas) x diluição onde cresceram colônias (ex- 10^4) / 0,002 g de tecido plaqueado.

A proporção utilizada de tecido foi padronização para a seguinte proporção: 1mg de tecido / 10 microlitros de solução, tendo sido plaqueados 20 microlitros em triplicata em nosso protocolo.

Idade	Peso médio (fígado)
-------	---------------------

	(gramas)
0 dia	0,05
4 dias	0,1
1 semana	0,16
2 semanas	0,23
3 semanas	0,33
4 semanas	0,57
8 semanas (Adulto)	1,12

Tabela 2 – Peso total (médio) do fígado dos animais dos diferentes grupos analisados.

A quantidade de células viáveis reduziu consideravelmente após 24 horas de exposição, porém, obtivemos uma taxa de 50% de sobrevivência dos camundongos. Portanto, para podermos avaliar melhor essa interação entre bactérias e células hepáticas, tornou-se necessário reduzir a proporção de bactérias inoculadas, seguindo a premissa de nº de bactérias/20 gramas de peso. Reduzimos o inóculo em 1 log, e portanto utilizamos 5×10^5 células/20 gramas de peso do camundongo. Com essa nova padronização, 100% dos camundongos sobreviveram.

5.5.2 Quantificação bacteriana em tecidos

Salvaguardados pelos testes de padronização descritos acima, utilizamos o inóculo de 5×10^5 células/20 gramas de peso do camundongo para os testes de UFC. Após 24 horas do momento da inoculação, os camundongos foram eutanasiados e as amostras de sangue e fígado foram processadas, como já descritas anteriormente na padronização.

5.5.3 Participação das células de Kupffer no clearance sanguíneo – Depleção por injeção de Clodronato (CLL).

Os animais desafio, na idade determinada para teste receberam injeção de clodronato (200 µL/20g) i.v, seguindo orientações do fabricante. Após 48 receberam a injeção do inóculo bacteriano (5×10^5 células/20 gramas de peso do camundongo) e permaneceram em

contato com ele durante 24 horas. Foram eutanasiados e obtidas amostras de sangue e fígado para processamento para quantificação bacteriana.

5.6 Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)

5.6.1 Extração de RNA

Para análise de expressão gênica relacionados com receptores de captura e eliminação bacteriana de células imunes hepáticas utilizamos amostras de fígado de camundongos saudáveis e do grupo que foram submetidos à inoculação i.v. de *E.coli* e que permaneceram em contato com essa bactéria pelo período igual a 24 horas. O RNA total foi obtido de aproximadamente 20 mg de tecido.

A extração de RNA total foi realizada seguindo protocolo descrito pelo fabricante do kit ReliaPrep™ RNA TissueMiniprep System® (Promega- Madison- USA). A concentração de RNA (quantificação) foi obtida utilizando a técnica de espectofotometria, pela proporção entre as absorvâncias 260 e 280 nm (Nano Drop® ND-1000, EUA). As amostras foram conservadas a temperatura de -80°C até o momento do uso.

5.6.2 Síntese de cDNA

Para sintetizarmos cDNA pela transcrição reversa de RNA utilizamos o Kit iScript™ cDNA Synthesis (BioRad, CA, USA), e seguimos as instruções conforme o fabricante. 1,25 µg (1250 ng) de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA. A reação foi submetida a etapas de aquecimento e resfriamento na seguinte ordem: 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C e 1 minutos a 95°C . O cDNA produzido foi armazenado a -20°C.

5.6.3 PCR quantitativo (qPCR)

5.6.3.1 Controle endógeno

Como padrão normalizador utilizado em análises das variações da expressão dos genes testados utilizamos um controle endógeno que permite a validação dos resultados obtidos por qPCR. Dentre os genes testados (*Rpl4*, *Gapdh*, *18s*, *Actb*, *Hprt* e *Sdha*), o *Gapdh* mostrou-se o melhor normalizador, tanto para os genes avaliados nas amostras de fígado total, hepatócitos e células não-parenquimais. Utilizamos o *Gapdh* como controle endógeno, por se

tratar de um gene constitutivo, ou seja, expresso por praticamente todas as células e , por ter demonstrado ser o melhor normalizador. O programa utilizado para realizar os testes para a escolha do normalizador foi o Normfinder (Andersen et al., 2004).

5.6.3.2 Genes relacionados ao processo de captura e eliminação bacteriana

A tabela a baixo refere-se às sequências dos *primers* (iniciadores) para os genes relacionados aos processos de captura de micro-organismos selecionados para este estudo. As sequências para os *primers* foram obtidos no *Primer Bank*, plataforma desenvolvida pela Harvard Medical School (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>):

Gene	Iniciadores	Sequência	Temperatura de anelamento	Tamanho dos fragmentos (bases)
<i>CRlg (Vsig4)</i>	Foward (5'→3')	AGCTCAAGCTTGCCACCATGG AGATCTCATCAGGCTTGC	64°C	39
	Reverse (5'→3')	GCCCCGGGATCCCCGGCAGGCA GGAATAGACATTGTTG	65,2 °C	36
<i>CD163</i>	Foward (5'→3')	ATGGGTGGACACAGAATGGTT	51,7 °C	21
	Reverse (5'→3')	CAGGAGCGTTAGTGACAGCA G	52,8 °C	21
<i>Tlr2</i>	Foward (5'→3')	GCAAACGCTGTTCTGCTCAG	52,2 °C	20
	Reverse (5'→3')	AGGCGTCTCCCTCTATTGTAT T	50,2 °C	22
<i>Tlr4</i>	Foward (5'→3')	ATGGCATGGCTTACACCACC	53,1 °C	20
	Reverse (5'→3')	GAGGCCAATTTTGTCTCCACA	50,6 °C	21
<i>Itgam (CR3/CD11b)</i>	Foward (5'→3')	ATGGACGCTGATGGCAATACC	49,9 °C	21
	Reverse (5'→3')	TCCCCATTACGTCTCCCA	50,7 °C	21
<i>Gapdh (housekeeping)</i>	Foward (5'→3')	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	52,6 °C	21
	Reverse (5'→3')	TGTAGACCATGTAGTTGAGGT CA	50,1 °C	23

Tabela 3 – Iniciadores utilizados nos testes de qPCR. Foram analisadas amostras de 5 animais de cada grupo (0 e 4 dias, 1,2,3,4 e 8 semanas = total de 35 amostras), todas em duplicata. Para cada um destes grupos, foram avaliadas as expressões dos 5 genes acima mencionados além do gene constitutivo.

5.6.3.3 Determinação da expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada utilizando-se 5 µL de SYBR® Green qPCR SuperMix (BioRad), 1 µL 5mM de cada iniciador e 1 µL de cDNA diluído 1:20 (volume final da reação igual a 10 µL). As reações foram realizadas utilizando o equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen). O protocolo utilizado comporta as seguintes fases: desnaturação inicial (ativação da polimerase) em 95°C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento (extensão) a 60°C por 30 segundos. Em cada placa havia um controle negativo, constituído por 5 µL de SYBR® Green qPCR SuperMix (BioRad), 2 µL de água para PCR e 1 µL 5 µM de cada iniciador.

Utilizando a eficiência de amplificação e baseado no valor de Ct (threshold cycle) obtidos nas reações, adquirimos a quantidade relativa dos produtos de PCR para cada grupo analisado. Esses Cts foram normalizados subtraindo-se deste o valor do Ct do gene de referência (*Gapdh* – housekeeping), para cada amostra. O valor encontrado denomina-se ΔCt e é utilizado para calcular o $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt amostra - ΔCt do calibrador). Nesse estudo, o calibrador utilizado foi amostra de fígado de animais adultos, comparados com os demais grupos. A relação da expressão gênica entre as amostras e o calibrador foi calculado aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Prism 6.0. As amplificações foram seguidas de curva de dissociação (curva de *melting*). Essa comparação garante a especificidade das reações, uma vez que garante que os dados obtidos foram livres de formação de produtos inespecíficos, comprovando assim a especificidade das reações. O dado de *heatmap* foi realizado utilizando-se o programa MeV (Chu et al., 2008). Os resultados foram analisados no Prisma 6.0.

5.7 Análises Estatísticas

Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPrism 6 (GraphPad, LaJolla, CA).

Os dados que apresentam distribuição não paramétrica (D'Agostino & Pearson *omnibus normality test*) foram analisados utilizando os testes One-WayANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e múltipla comparação pelo teste de Dunn's. Os dados de quantificação bacteriana dos camundongos que foram submetidos à depleção foram analisados utilizando testes T com pós-test Mann-Whitney.

Os que apresentaram distribuição normal (paramétrica) foram analisados utilizando os testes One-WayANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e múltipla comparação pelo teste de Dunnett. Todos os grupos foram comparados com o grupo adulto.

Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$. Análise dos dados de citometria foram analisados utilizando o programa FlowJo.

Imagens obtidas pela técnica de microscopia confocal foram analisadas no software Volocity (PerkinElmer Ink).

6. Resultados

6.1 Neonatos apresentam menor capacidade de *clearance* de bactérias do sangue em relação aos camundongos adultos.

Utilizando o mesmo parâmetro de tempo x resposta entre todos os grupos analisados, após a inoculação bacteriana, observamos que, camundongos neonatos apresentam uma maior dificuldade em remover *E.coli* da circulação sistêmica (Fig.1A). Ao compararmos a quantidade de bactérias presentes na circulação sanguínea dos camundongos, 5 minutos após o desafio, observamos que camundongos neonatos, principalmente os animais 0 dia pós-nascimento, apresentam maior quantidade de bactéria circulante do que os animais adultos. Diferenças estatísticas foram detectadas apenas entre estes dois grupos (0 dia e adulto). Observamos ainda, que ao longo do desenvolvimento murino, representado aqui pela idade e pelo ganho de peso dos animais, a quantidade de bactérias presentes na circulação sanguínea reduz, indicando que a capacidade de *clearance* sanguíneo é aprimorada ao longo do tempo (Fig. 1B).

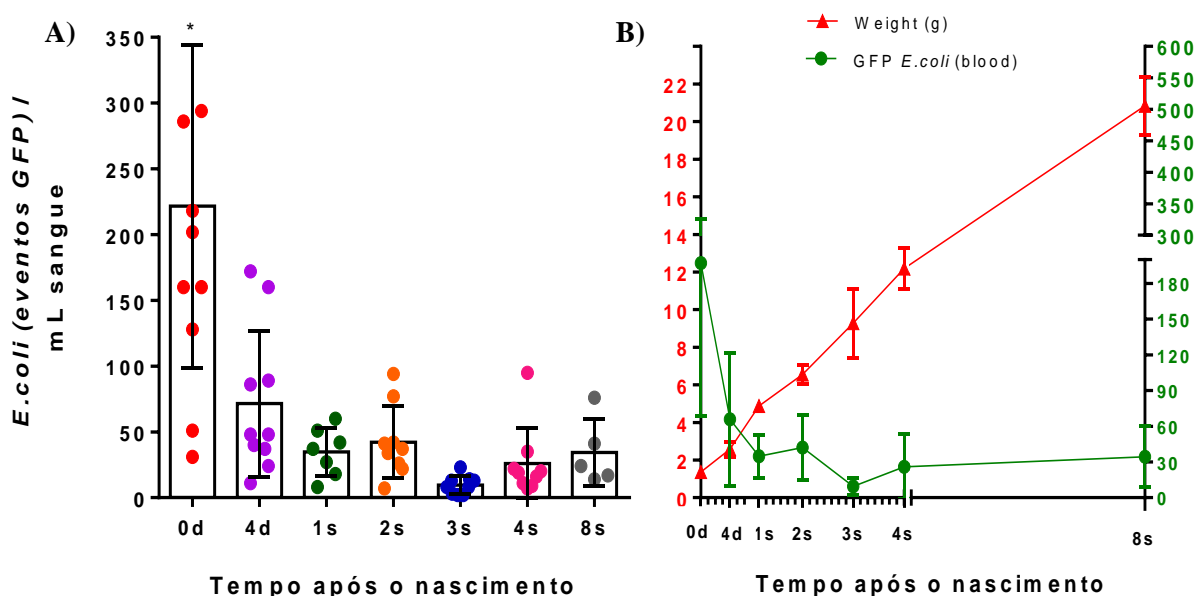


FIGURA 2 – Avaliação da capacidade de *clearance* bacteriano da circulação sistêmica por citometria de fluxo. A) número de *E.coli* (eventos GFP) no sangue de animais em diferentes fases de desenvolvimento 5 minutos após o desafio. $p < 0,05$ OneWay ANOVA. **B)** Comparação entre a quantidade de bactérias presentes na circulação sistêmica dos animais em relação ao peso. $N=7$ (d=dias/ s=semanas).

6.2 Camundongos neonatos apresentam menor sobrevivência quando são desafiados com inóculo bacteriano.

Visto que neonatos apresentam um menor o *clearance* sanguíneo após uma infecção sistêmica, hipotetizamos que estes animais poderiam apresentar maiores taxas de mortalidade. Verificamos que, exceto o grupo 0 dia, apresentaram taxa de sobrevivência de 100% após 24 horas da inoculação intravenosa de 5×10^5 células /20g . No grupo 0 dia, foi observada alta mortalidade já nas primeiras 6 horas após o inóculo, sendo mais acentuada após 18 horas de inoculação (Fig.3). Esse dado demonstra uma maior susceptibilidade de neonatos 0 dia a infecção por *E.coli*.

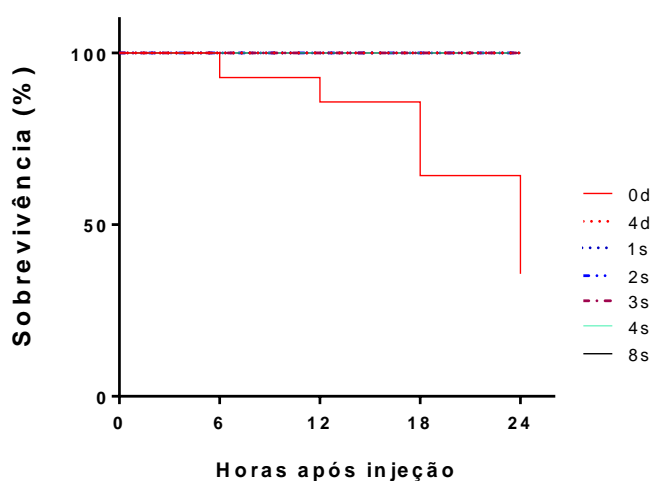


FIGURA 3 – Percentual de sobrevivência dos grupos analisados após inóculo bacteriano: após inóculo de 5×10^5 células /20g os camundongos foram observados durante 24 horas. Neonatos 0 dia apresentaram baixa taxa de sobrevivência quando comparados com os outros grupos analisados, que apresentaram taxa de sobrevivência de 100%.

6.3 O fígado está envolvido na retenção de bactérias em neonatos e adultos.

Para verificarmos em maior detalhe se as KCs estariam envolvidas no processo de *clearance* bacteriano nas diferentes idades, realizamos uma série de experimentos utilizando microscopia confocal. Inicialmente, demonstramos por imagens *ex-vivo*, que o fígado de fato está relacionado ao processo de captura de bactérias circulantes. As imagens corroboram os resultados de quantificação bacteriana, mostrando a presença das bactérias no fígado, em todas as idades testadas. Na figura 4 pode-se verificar em vermelho as células de Kupffer adsorvendo *E.coli* (em verde: expressão de proteína verde fluorescente; Fig.4A e Fig.4B).

A) Controle

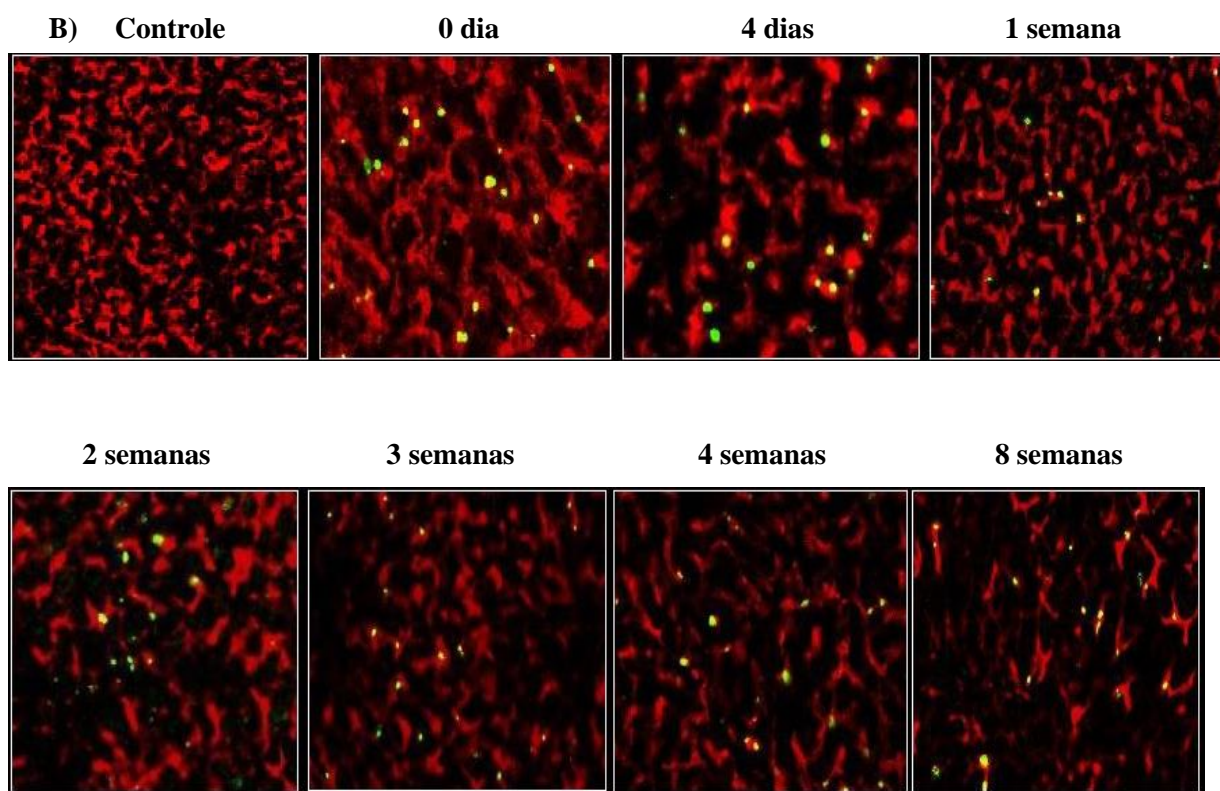
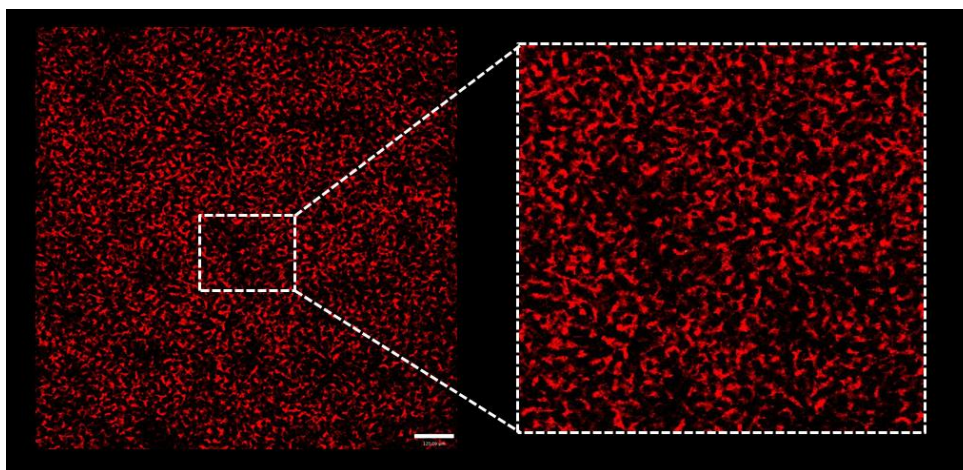


FIGURA 4 – Participação do fígado no processo de captura de bactérias da circulação sistêmica: obtenção de imagens por microscopia confocal *ex-vivo*. Em vermelho visualizamos macrófagos residentes do fígado (células de Kupffer) marcadas com anti-F4/80 (F4/80 APC⁺) e em verde, *Escherichia coli* modificadas geneticamente apresentando expressão da *Green Fluorescent Protein* (*e-GFP*). **A)** Imagem do fígado de um animal controle (sem bactérias) Barra de escala da imagem original = 120 μ m. Imagens obtidas utilizando objetiva de aumento 10x. **B)** Quadro comparativo – imagens de fígado de animais dos diferentes grupos que receberam o desafio bacteriano. Zoom digital.

6.4 Desaparecimento de bactérias do sangue está associado a um aumento da bacteremia hepática, especialmente em neonatos.

Uma vez que os dados anteriormente descritos demonstram que: i) neonatos apresentam retardo no *clearance* bacteriano sanguíneo ii) que o processo de captura desses micro-organismos pelo fígado de animais 0 dia é mais lento do que em animais adultos, buscamos compreender o envolvimento de fagócitos hepáticos na eliminação das bactérias retidas no fígado durante as diferentes fases do desenvolvimento neonatal.

Utilizando a técnica de quantificação bacteriana por contagem de UFC, em placa, observamos que 24 horas após receberem o inóculo bacteriano todos os camundongos desafiados já não apresentavam bactérias viáveis circulantes no sangue (Fig.5A). Porém, o número de bactérias viáveis no fígado (Fig. 5B) é significativamente maior nos camundongos 0 dia em comparação com camundongos adultos. Observamos ainda que a capacidade de eliminação é aprimorada ao longo do desenvolvimento dos animais, uma vez que o número de bactérias viáveis no fígado reduz ao longo do tempo (Fig. 5C).

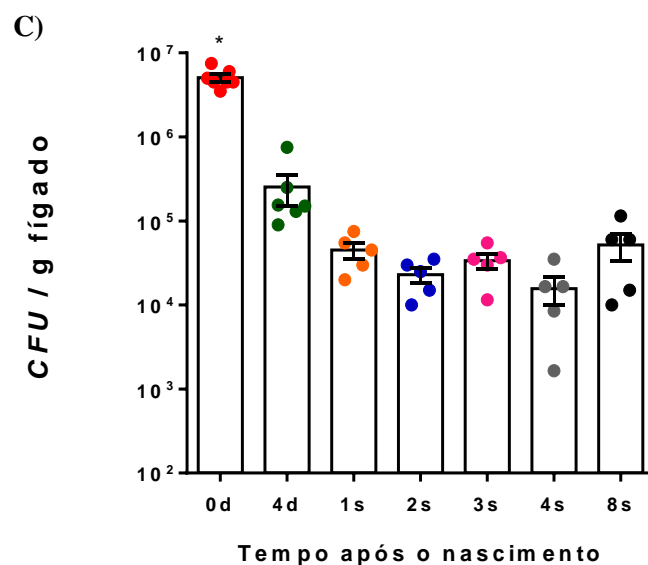
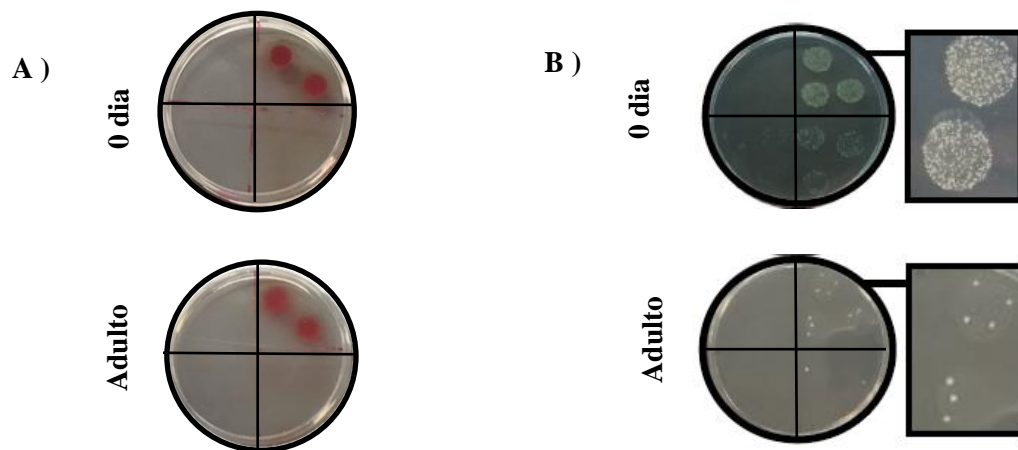
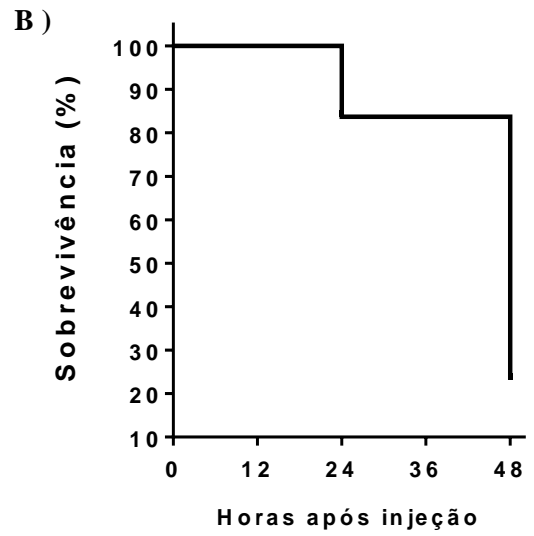
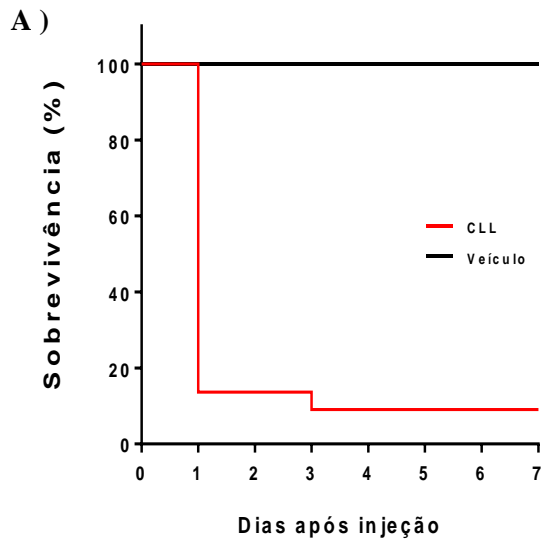


FIGURA 5 – Avaliação da eliminação de bactérias e quantificação de bactérias viáveis no fígado após 24 horas da infecção com *E.coli*. **A)** Quantificação bacteriana no sangue - Amostras de sangue plaqueadas de camundongos neonatos e adultos, não apresentam bactérias viáveis após 24 horas da inoculação. **B)** Quantificação bacteriana no fígado – animais 0 dia apresentam número maior de bactérias viáveis no fígado do que animais adultos após 24 horas da inoculação. N=5 **C) Viabilidade celular no fígado-** camundongos 0 dia apresentam maior quantidade de bactérias viáveis no fígado. A quantidade vai reduzindo ao longo do desenvolvimento. $p < 0,05$ OneWay ANOVA.

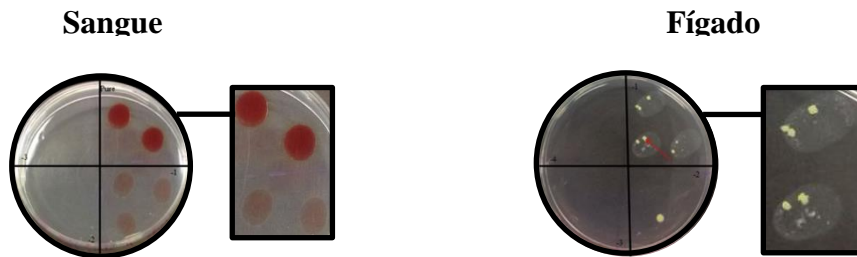
6.5 A ausência de fagócitos favorece a manutenção de bactérias circulantes.

Para buscarmos compreender melhor qual a real contribuição dos fagócitos no processo de *clearance* e eliminação de bactérias da circulação sistêmica, estudamos os efeitos da ausência de macrófagos na progressão da infecção bacteriana. Para isso, os animais receberam via i.v., dose única de clodronato (lipossomos de clodronato – CLL; quantidade ajustada pelo peso de cada camundongo).

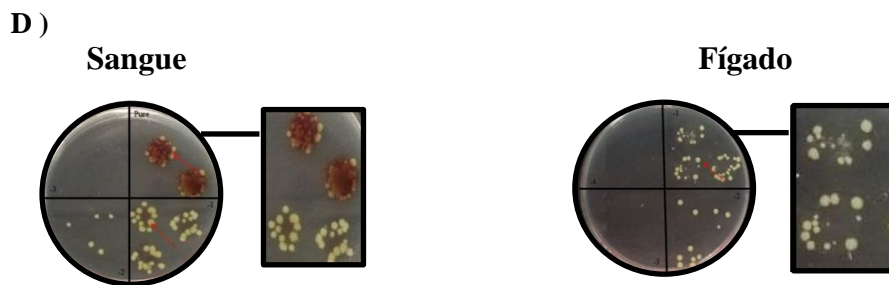
Neonatos 0 dia tiveram uma baixa taxa de sobrevivência (aproximadamente 10%, Fig. 6A) após a injeção de clodronato, impossibilitando a avaliação da capacidade de captura e eliminação de bactérias. Porém, camundongos com 4 dias após o nascimento apresentaram maior taxa de sobrevivência após a injeção de CLL (aproximadamente 20%, Fig. 6B). Ao compararmos o grupo de camundongos que não foram submetidos ao processo de depleção com o grupo depletado observamos que há uma regressão no quadro imunológico até então observado: a capacidade de retirada de bactérias da circulação fica comprometida, sendo que animais depletados passam a apresentar bactérias viáveis no sangue 24 horas após ter recebido inóculo bacteriano, (Fig. 6D e 6E) bem como apresentam uma maior quantidade de bactérias viáveis no fígado em relação ao grupo controle (Fig. 6D e 6E)



C) 4 dias controle + *E.coli*



D) 4 dias após CLL + *E.coli*



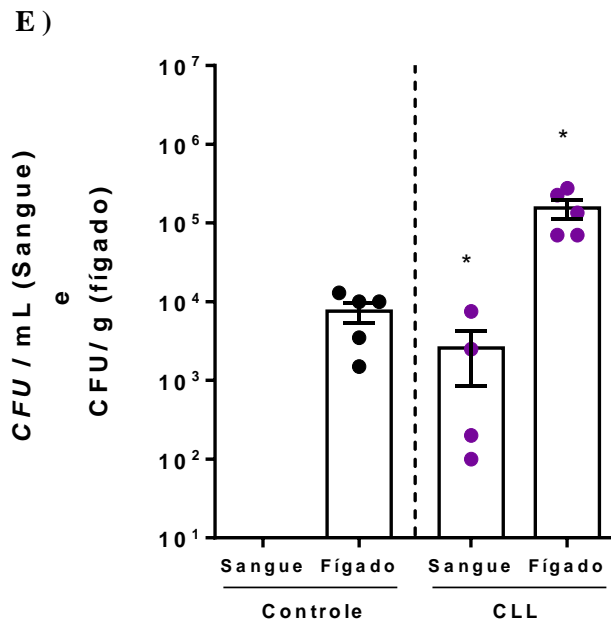
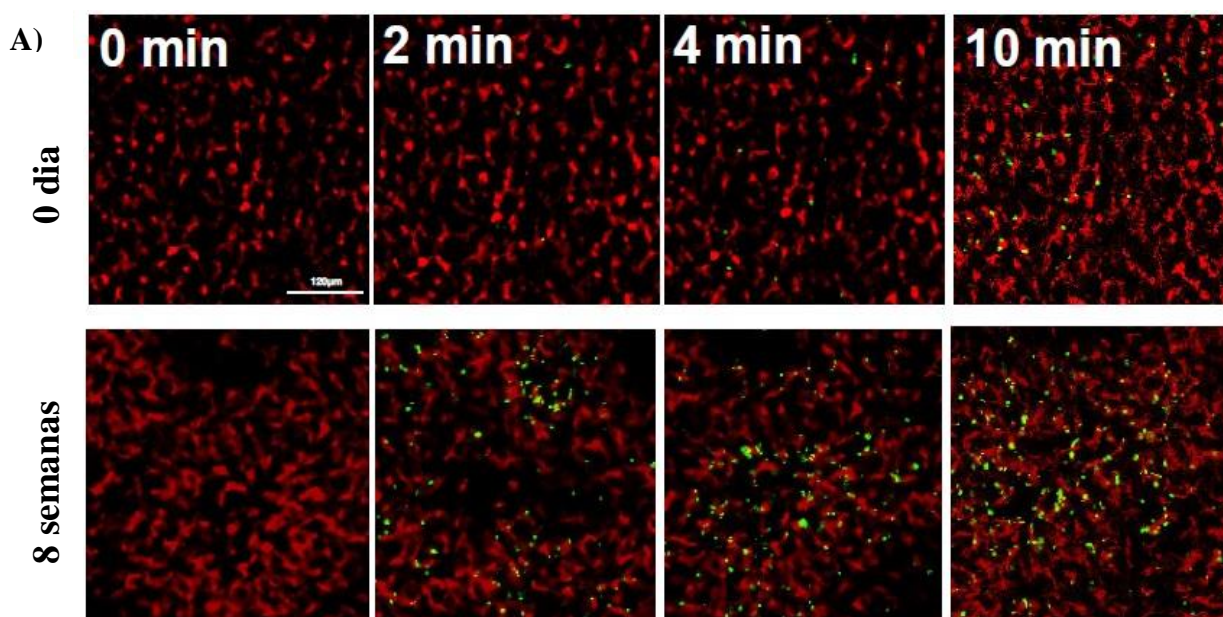


FIGURA 6 A) Participação de macrófagos hepáticos na captura de bactérias em camundongos recém-nascidos. Após a injeção de lipossoma de clodronato foi observada a sobrevivência de aproximadamente 10 % dos camundongos após as primeiras 24 horas, quando comparados ao grupo controle (veículo) **B) Percentual de sobrevivência de camundongos 4 dias submetidos a depleção de fagócitos:** 20% dos animais sobreviveram a depleção. N= 5. **C) UFC Sangue e Fígado animais controle** - Animais 4 dias : 48 horas após injeção do veículo e 24 horas após inóculo bacteriano. Amostras de sangue não apresentam bactérias viáveis Amostras de fígado apresentam bactérias viáveis. **D) UFC Sangue e Fígado animais desafio** - Animais 4 dias : 48 horas após injeção de clodronato e 24 horas após inóculo bacteriano. Tanto amostras de sangue, quanto amostras de fígado apresentam bactérias viáveis. **E) Número de bactérias viáveis presentes em tecidos de animais 4 dias** – comparação entre animais controle (sem CLL) e animais que tiveram os fagócitos depletados (injeção CLL). N= 4 (Mann Whitney $p < 0,05$).

6.6 Uma menor taxa de aderência de bactérias em macrófagos hepáticos de animais neonatos favorece a movimentação dos micro-organismos pelos sinusoides.

Visto que as bactérias chegam até o fígado através da circulação (Fig.7A), verificamos se o tempo de resposta em relação à captura/retenção desses micro-organismos pelas KC's seria diferente entre os grupos analisados. Para tanto, obtivemos vídeos *in vivo*, com duração de 10 minutos, de animais de diferentes grupos. A análise utilizando a ferramenta de *tracking*, nos permitiu acompanhar a movimentação das bactérias neste órgão.

A análise de *tracking* demonstrou que, nos dias 0 e 4, as bactérias não aderem rapidamente, permanecendo livres, movimentando-se pelos sinusoides hepáticos, atingindo grandes distâncias percorridas dentro do órgão. À partir de 1 semana de vida, a aderência das bactérias ocorre de forma efetiva, com movimentação bacteriana baixa ou quase nula dentro do fígado (Fig.7B).



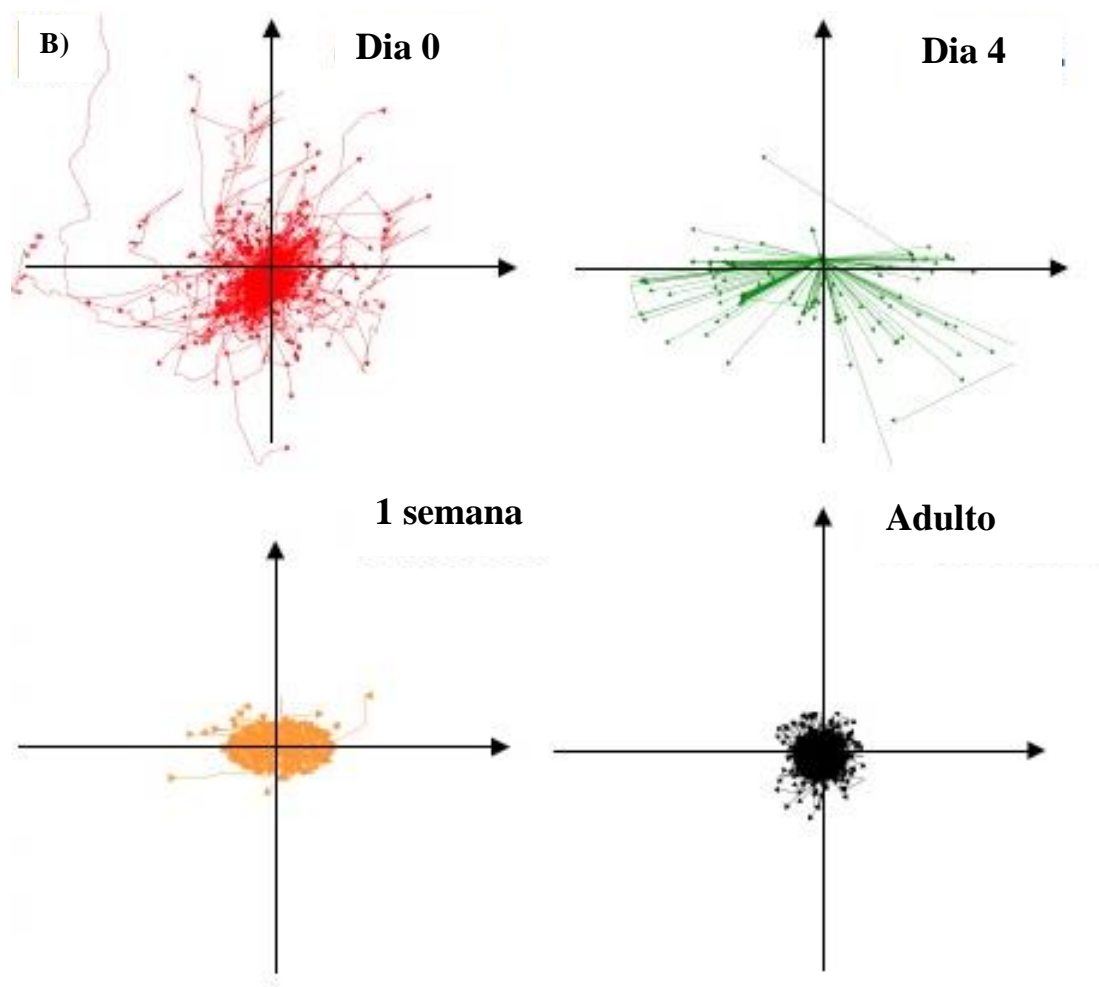


FIGURA 7 A) – Cinética de captura de bactérias pelas KCs *in vivo*: Animais com idade de 0 dias e 8 semanas. Imagens representativas dos tempos 0,2,4 e 10 minutos obtidas após desafio bacteriano. Em vermelho visualizamos as KCs, marcadas com anti-F4/80 APC e em verde, bactérias *Escherichia coli* modificadas geneticamente apresentando expressão da *Green Fluorescent Protein* (GFP). Barra de escala 120 μ m N=3 **B) Tracking - captura de bactérias pelas KCs *in vivo*:** Representação gráfica da capacidade de movimentação bacteriana no fígado de animais de diferentes idades obtidas pela análise de vídeo. As setas indicam a trajetória realizada pelas bactérias.

6.7 Diferenças na expressão de genes relacionados com a captura e eliminação de bactérias durante a homeostase e frente à infecção bacteriana.

Até o momento observamos que camundongos 0 dia apresentam defasagem temporal no processo de captura e eliminação bacteriana, em relação aos camundongos adultos. Com a perspectiva de compreender o mecanismo que leva a essa aparente dificuldade encontrada pelos fagócitos hepáticos propusemos o estudo de genes relacionados aos processos de captura e fagocitose de partículas pelas KCs.

Nossos resultados demonstram que na homeostase o grupo 0 dia, em relação ao animais adultos apresentam baixa expressão de genes como *CRIg* e *CD163*, sendo que a intensidade de expressão aumenta de acordo com o desenvolvimento do animal . Observamos ainda que há certa flutuação na expressão de *Tlr2*, *Tlr4* e *Itgam (CD11b/CR3)*, sendo hora menos expresso, hora mais expresso (Fig. 8).

Ao submetermos os camundongos ao desafio bacteriano observamos que não houve alterações significativas nas expressões dos genes *CRIg* e *CD163* em animais 0 dia (Fig. 9A). Já os camundongos adultos, que já expressavam estes genes na homeostase, apresentaram maior expressão durante o quadro infeccioso quando comparados aos animais 0 dia. Quando analisamos estes mesmos parâmetros nos animais 4 dias podemos inferir que este grupo já é capaz de realizar o *upregulation* dos genes *CRIg* e *CD163*, alcançando níveis de expressão similares aos dos animais adultos.

Alterações consideráveis na expressão de genes relacionados a receptores de membrana de fagócitos associados ao reconhecimento e adesão de partículas foram observados em animais 0 dia na homeostase: *Tlr2*, *Tlr4* e *Itgam (CD11b/CR3)* são expressos em animais 0 dia e ao longo do desenvolvimento há uma flutuação na expressão nos diferentes grupos. Ao serem desafiados com o inóculo observamos uma *upregulation* destes genes nas idades iniciais do desenvolvimento (0 dia, 4 dias e 1 semana), sendo que esse perfil não foi observado em adultos. Os valores retornam aos níveis basais após duas semanas de idade (Fig. 9B).

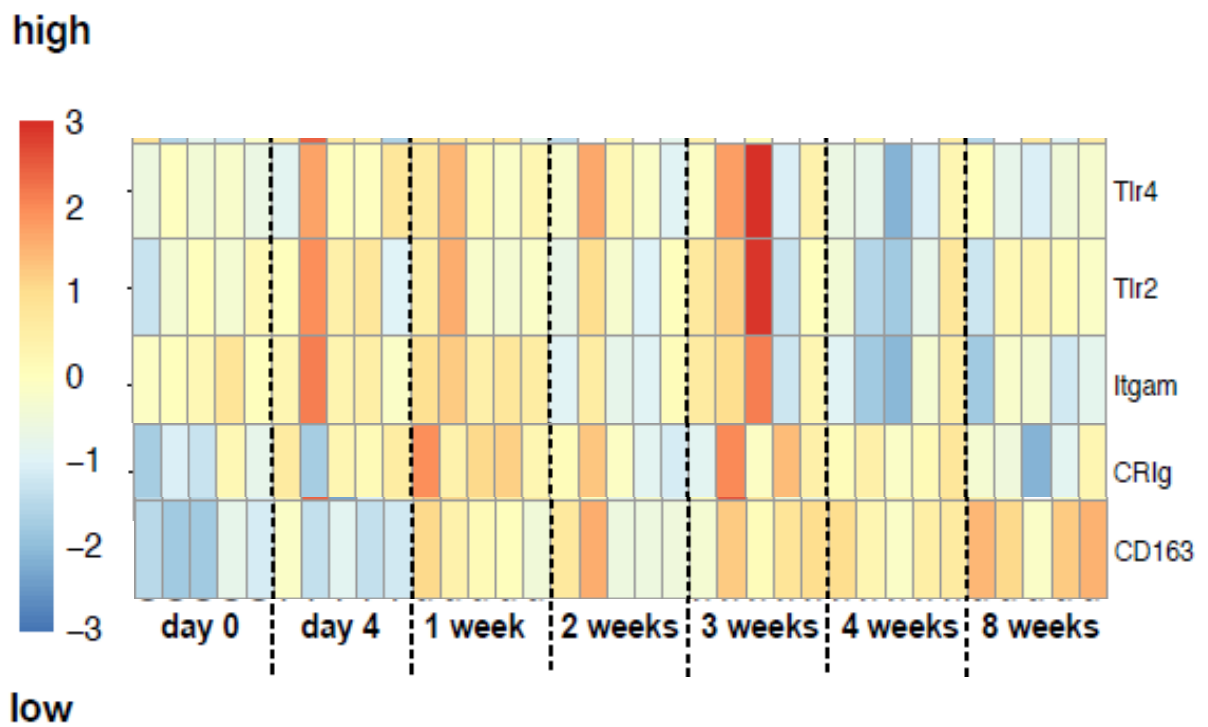


Figura 8 Expressão de genes relacionados a resposta imune a micro-organismos em camundongos controle durante o desenvolvimento. Avaliação da expressão de genes relacionados ao processo de captura de micro-organismos nos diferentes grupos no quadro de homeostase. Na escala à esquerda está representada a intensidade da expressão gênica: tons mais azulados significam baixa expressão enquanto que tons mais vermelhos indicam maior expressão gênica. N= 3

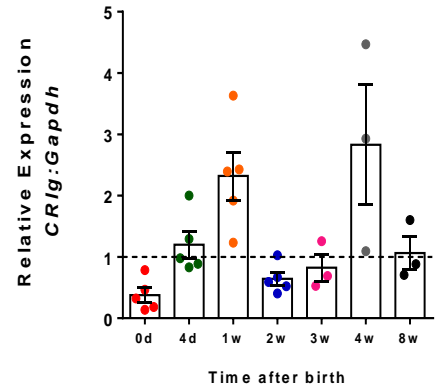
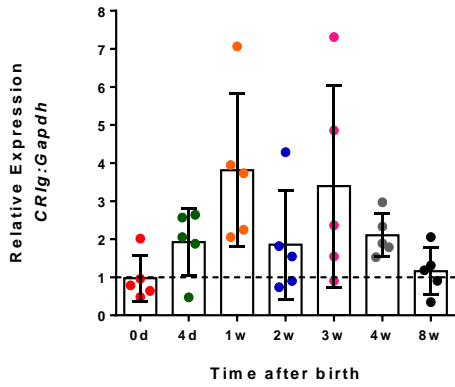
A)

Grupo controle

Grupo Desafio - inóculo

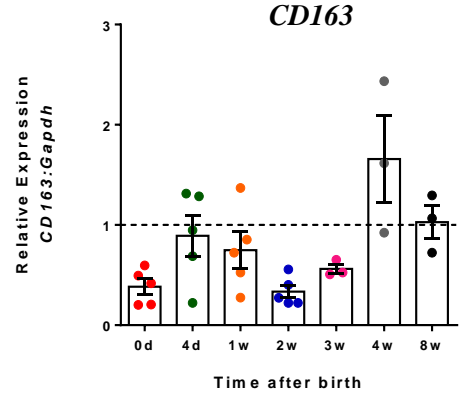
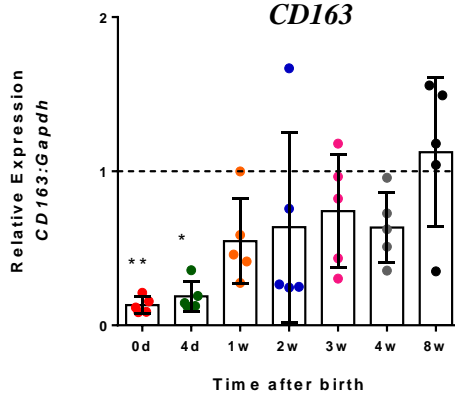
CRIg

CRIg



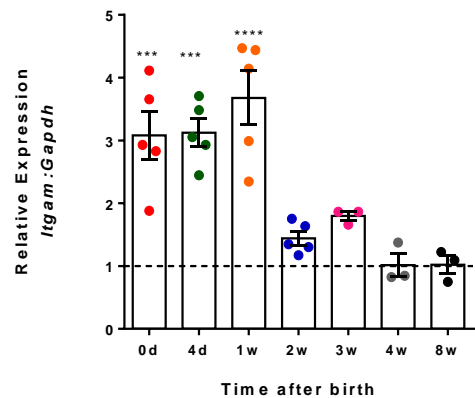
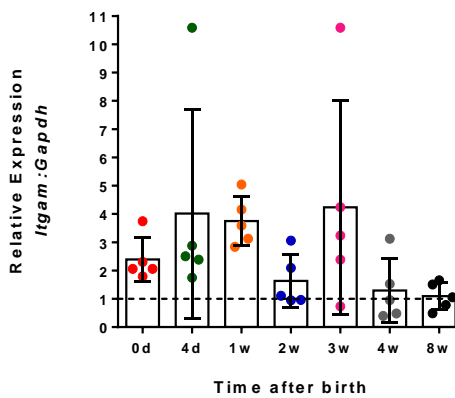
CD163

CD163



Itgam (CD11b)

Itgam (CD11b)



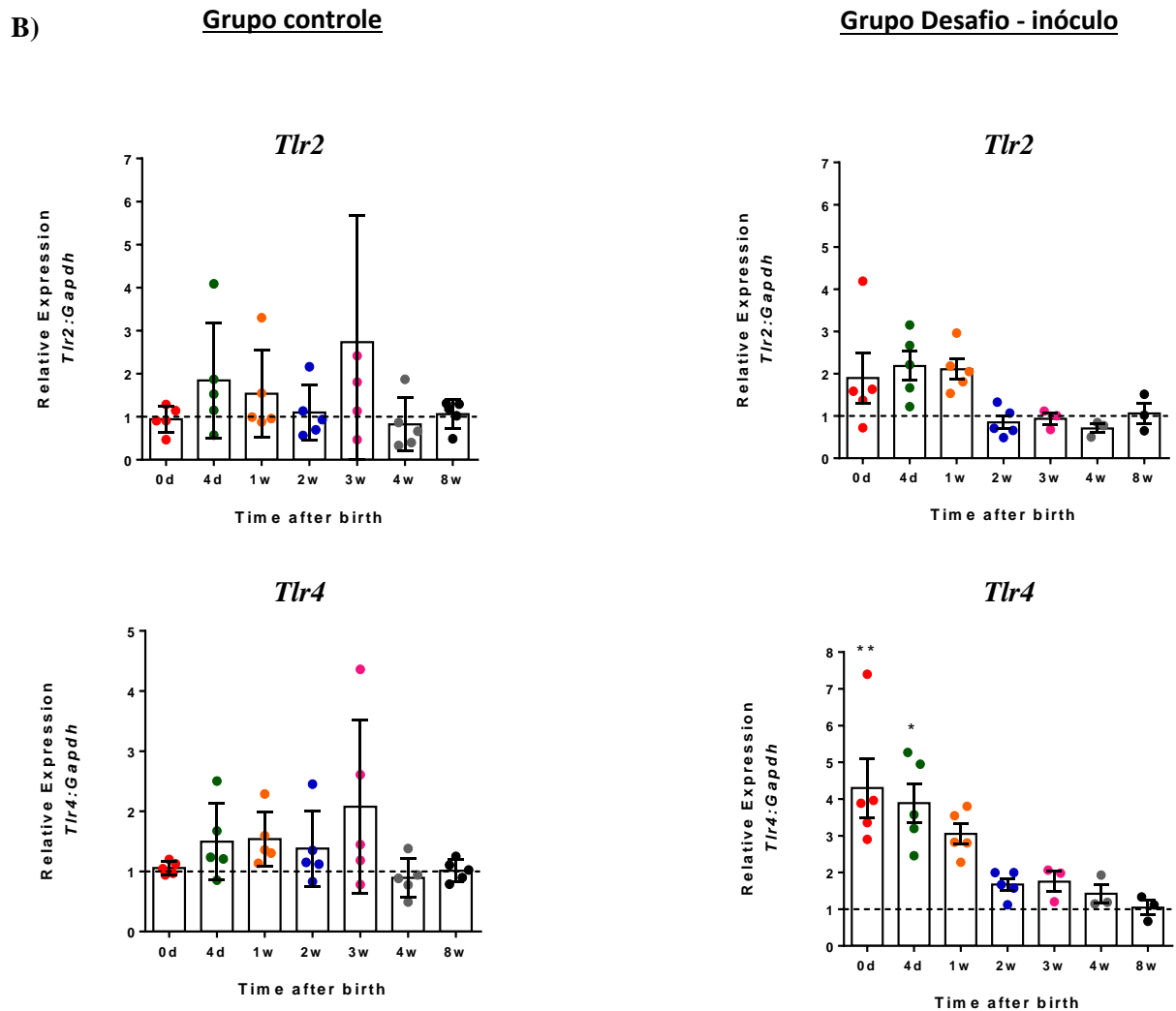


Figura 9 Análise gênica. A) Animais 0 dia apresentam *downregulation* dos genes CR1g e CD163. Não houve alteração na expressão após o desafio bacteriano. Há upregulation do gene *Itgam* (CR3/CD11b). A coluna da direita representa a quantificação dos dados do *Heatmap* (animais controle- homeostase). **B)** Os genes *Tlr 2* e *Tlr4* (*CD11b*) apresentaram alta expressão nos grupos de animais 0 , 4 dias e 1 semana após o desafio com inóculo bacteriano. A linha tracejada faz referência a média dos valores encontrados para os animais adultos. N= 3 p < 0,05 OneWay ANOVA.

7. Discussão

No presente trabalho foi avaliada a capacidade de *clearance* e de eliminação de uma amostra bacteriana da circulação sistêmica em diferentes estágios do desenvolvimento, bem como a atuação do fígado nestes processos. Embora tenhamos observado que exista uma susceptibilidade nos primeiros dias de vida, foi possível comprovar, por diferentes técnicas, que camundongos recém-nascidos apresentam padrões de resposta à infecção bacteriana por *Escherichia coli* muito similares aos de camundongos adultos. Utilizando microscopia intravital confocal nós demonstramos pela primeira vez as particularidades da interação entre os macrófagos hepáticos e as bactérias em camundongos neonatos. Surpreendentemente, nossos dados demonstraram uma ineficiência no reconhecimento e na captura de micro-organismos pelas KCs em camundongos 0 dia, que pode estar relacionada a baixa expressão de genes relativos ao reconhecimento e captura de micro-organismos. Esse dado pode explicar, por exemplo, as baixas taxas de sobrevivência apresentadas por recém-nascidos devido a quadros infecciosos.

Quando comparamos nossos achados com outro trabalho realizado por nosso grupo, onde avaliou-se a ativação de vias metabólicas nos mesmos períodos temporais analisados neste trabalho, observou-se que, as funções metabólicas só começam a assemelhar-se com a resposta apresentada por camundongos adultos à partir da terceira e quarta semana após o nascimento (dados não publicados – Nakagaki & Mafra et.al) . Já a resposta imune possui um rápido estabelecimento logo nas primeiras semanas, como demonstrado nesse trabalho.

Ainda que a resposta imune se estabeleça rapidamente em camundongos neonatos, existe um período inicial de susceptibilidade à infecções. Os resultados do presente trabalho mostram que camundongos entre 0 e 4 dias após o nascimento demonstram possuir deficiência quanto à captura e eliminação de bactérias.

Esse achado corrobora dados observados na clínica médica: assim como em camundongos, recém-nascidos humanos também são mais susceptíveis a infecções. Um levantamento realizado entre os anos de 2000 a 2013 estimou que, entre as 6,3 milhões de crianças que morreram antes de completarem 5 anos, 51,8 % delas foram a óbito devido a infecções e 44% encontravam-se no período neonatal (até 1 mês de vida) (Liu et al., 2015). Em camundongos, segundo o presente trabalho, este período de susceptibilidade corresponde

aos primeiros quatro dias de vida, sendo que neste período, a taxa de sobrevivência de animais 24 horas após serem submetidos à infecção bacteriana sistêmica está abaixo de 50% . Eles apresentam uma resposta mais lenta tanto na remoção de bactérias da circulação sanguínea, quanto de eliminação por células imunes hepáticas. Ao longo do tempo, estes parâmetros vão sendo aprimorados, sendo que a partir da primeira semana após o nascimento, os camundongos já começam apresentar uma resposta imune caracterizada aqui pela captura e eliminação de bactérias, que foi equiparada com a resposta observada nos animais adultos (Fig. 2 A e 5C).

Observamos ainda que o processo para o retorno a homeostase após infecção bacteriana ocorre em duas etapas: uma de remoção das bactérias presentes na circulação e uma fase de eliminação dessas pelo fígado. O primeiro processo já ocorre, de maneira eficaz, 30 minutos após os camundongos terem sido submetidos ao desafio bacteriano (dado não apresentado), e isso ocorre com todos os grupos estudados, desde o camundongo 0 dia até o adulto. Trabalho realizado por Yan et al (2014) descreve que 60% das bactérias circulantes ficam retidas no fígado logo nos 10 primeiros minutos após a inoculação . Porém, nossos dados demonstram que 24 horas após o inóculo, apesar de já não haver bactérias viáveis circulantes, há uma grande quantidade destes micro-organismos viáveis no fígado. Quando comparamos todos os grupos estudados com os camundongos adultos, animais 0 dia apresentam um número superior destas bactérias no fígado. Isso demonstra que eles apresentam uma capacidade reduzida de eliminação e essa capacidade vai sendo desenvolvida ao longo do tempo.

O mecanismo que leva a essa rápida melhora na função imune no modelo murino ainda é elusivo, mas nossos dados sugerem que esteja relacionado ao processo de maturação e de diferenciação celular. A alta taxa de mortalidade em recém-nascidos pode estar relacionada ao fato dos órgãos e células não estarem completamente formados e maduros logo após o parto. O fígado, por exemplo, pode levar até dois anos após o nascimento para ser considerado um órgão maduro e preparado para atuar em sua totalidade (Beath, 2003).

Dados obtidos por nosso grupo (dados não publicados – Nakagaki e Mafra et.al.) demonstraram que, as quantidades de células imunes no fígado de camundongos neonatos e de camundongos adultos são extremamente diferentes, sendo que tal perfil sofre modificações ao longo do tempo. Camundongos 0 dia apresentam alto percentual de precursores de células imunes no fígado (Lin^{-low} , $CD117^{+}$ = 11,4%), granulócitos ($Ly6G^{+}$ ou $SinglecF^{+}$ = 37%), monócitos ($Ly6C^{+}$ = 11,3%) e monócitos/ macrófagos (células em processo de diferenciação -

F4/80^{hi} Ly6C^{hi} = 2,42%), quando comparados aos camundongos adultos, que apresentam percentuais inferiores (0% de precursores imunes, 8% de granulócitos, 6,6% de monócitos, 0% de monócitos/macrófagos em processo de diferenciação). Além disso os neonatos apresentam ainda baixos percentuais de linfócitos T (CD3⁺ = 1%), Células NKT (CD3⁺ NK1.1⁺ = 0%), Células NK (CD3-NK1.1⁺ = 1,16%), linfócitos B (CD19⁺ = 17,5%), macrófagos e células dendríticas diferenciadas (F4/80⁺ ou CD11C⁺ = 2,14%) também em relação ao grupo de animais adultos (16% de linfócitos T, 7,92% de células NKT, 6,1% de células NK, 35% de linfócitos B , 16% de macrófagos e células dendríticas diferenciadas).

Dados descritos na literatura relatam que a primeira resposta imune apresentada por neonatos é a do tipo inata, onde receptores de membrana reconhecem padrões moleculares conservados presentes na superfície bacteriana (Chaplin, 2010; Mayr et al., 2014; Tacke e Zimmermann, 2014). Observamos que em neonatos 0 dia há um baixo percentual de macrófagos diferenciados (F4/80⁺) e uma maior de células em processo de diferenciação (F4/80^{hi} Ly6C^{hi}). Os dados obtidos neste trabalho, quando comparados aos dados relatados acima, nos indicam que, talvez a resposta imune no neonato, em relação à resposta imune inata, não atue de forma eficaz, uma vez que os macrófagos profissionais diferenciados ainda não estão presentes em grande quantidade e que os macrófagos que estão presentes neste órgão, possivelmente ainda estão passando pelo processo de diferenciação celular.

Devido a esse processo de diferenciação as células presentes ainda não estariam atuando em toda a sua capacidade de reconhecimento, captura e eliminação de patógenos e partículas. Vimos ainda que, ao longo do desenvolvimento murino, esse percentual altera-se. Os nossos dados demonstram que, assim como ocorre alteração no perfil celular imune, ocorre também uma melhora quanto à resposta ao estímulo infeccioso.

Essa informação pode ser corroborada pela baixa quantidade de células relacionadas classicamente à resposta imune adaptativa, como os linfócitos T e B presentes no sangue periférico (Prosser et al., 2013) e no fígado. (dados não publicados - Nakagaki e Mafra et.al.). Porém ao longo do desenvolvimento, a frequência destas células aumenta no fígado. Assim, o primeiro contato intrauterinamente com produtos da microbiota poderia aumentar a resistência neonatal a infecções (Renz et al., 2017).

Com os dados apresentados nesse trabalho podemos inferir que o sistema imunológico e fagocítico aprimoram-se ao longo do desenvolvimento. A maturação completa do sistema imune ocorre gradualmente após o nascimento, como já demonstrado (Zhao et al., 2008).

Trabalhos prévios relatam a importância dos macrófagos do fígado no processo de captura de partículas bacterianas presentes no sangue, bem como das bactérias que sofrem translocação do intestino para a circulação sistêmica (Racanelli e Rehermann, 2006; Broadley et al., 2016; David et al., 2016; Llorente e Schnabl, 2016; Tarasenko e McGuire, 2017). Por este motivo, buscamos compreender se, na ausência destes fagócitos, a resposta observada até o momento se mantém ou sofre alteração após um quadro infeccioso. Para isso, depletamos os fagócitos utilizando clodronato em lipossomos.

Sabe-se que esta droga, quando livre no citoplasma, não é capaz de permear a membrana celular. Entretanto, a sua inserção em lipossomos favorece que essa seja direcionada a células que possuam capacidade de realizar endocitose de partículas. Esses lipossomos fundem-se ao lisossoma, e por ação de fosfolipases, ocorre a degradação da bicamada, liberando a droga no interior da célula, culminando em apoptose (Van Rooijen e Sanders, 1994) (Frith et al., 2001). A depleção dos macrófagos possibilita estudar a sua atuação funcional, ou seja, a sua participação ou não no processo de captura e eliminação bacteriana da corrente sanguínea.

Como resultado observamos que houve uma reversão do quadro imunológico já adquirido no quarto dia: os animais sem os fagócitos apresentaram bactérias viáveis no sangue e também maior título de bactérias no fígado (Fig. 6 D e 6E). Esses dados demonstram a grande importância que os macrófagos hepáticos possuem no processo de sobrevivência e homeostase após um quadro infeccioso (Koo et al., 1999; Broadley et al., 2016). Além disso, buscamos verificar se as KCs nas diferentes idades atuam de forma diferente durante o processo de captura de bactérias. Para isso realizamos, pela primeira vez, imagens *in vivo* em camundongos neonatos, onde foi possível visualizar o processo de captura de bactérias no fígado. Para nossa surpresa, observamos que, enquanto animais adultos possuem um processo quase que instantâneo na adesão das bactérias aos macrófagos hepáticos, camundongos 0 dia apresentam fraca adesão. As bactérias conseguem mover-se livremente pelos sinusoides hepáticos por um tempo maior. Isso demonstra uma baixa eficácia na captura pelas KCs em camundongos neonatos (Fig. 7A e 7B).

Visto que a ausência dos fagócitos favorece a ampliação da janela de susceptibilidade à infecção em camundongos neonatos, verificamos a expressão de genes relacionados ao reconhecimento e eliminação de micro-organismos em células imunes hepáticas de camundongos saudáveis (homeostase) e dos grupos submetidos ao desafio bacteriano. A

presença de bactérias na circulação sanguínea desencadeia uma resposta inflamatória e, por consequência, um aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α), IL-1 β (Interleucina 1 β) e expressão de diferentes genes (Kaibori *et al.*, 2015).

Nossos dados demonstram que alguns genes não apresentam variação quanto à expressão após os camundongos terem sido desafiados. Neonatos 0 dia apresentam baixa expressão de genes relacionados a reconhecimento de micro-organismos, porém, genes referentes a receptores do tipo *Toll* estão consideravelmente expressos após o desafio bacteriano. Consideramos que, essa susceptibilidade demonstrada por animais 0 dia pode estar relacionado a uma ineficiência no reconhecimento e captura de bactérias devido a baixa expressão de genes correlatos.

Os receptores CR1g (receptor da família das imunoglobulinas), juntamente com Itgam (CD11b/CR3) são capazes de reconhecer partículas opsonizadas por moléculas do sistema complemento (Broadley *et al.*, 2016). Os genes do tipo *Toll* (TLRs), estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares bacterianos. É relatado que estes receptores estão envolvidos em um processo de captura mais rápida, uma vez que capturam bactérias não opsonizadas (Broadley *et al.*, 2016). O Genes *CD163* está relacionado a reconhecimento de bactérias no processo de resposta imune inata (*Scavenger receptor*).

Nesse trabalho vimos que camundongos neonatos apresentam naturalmente uma menor expressão dos genes *CR1g* e *CD163* em relação aos animais adultos, não havendo alterações significativas na expressão destes genes em um quadro infeccioso. Já os animais adultos apresentaram *upregulation* em relação aos mesmos genes quando desafiados com bactérias. Esses dados demonstram que a incapacidade de realizar a eliminação de bactérias não está relacionada apenas a expressão dos genes estudados, mas também à incapacidade de realizar *upregulation* destes para uma resposta imune eficaz em neonatos 0 dia.

Os receptores do tipo *Toll* são encontrados em macrófagos e células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais e neutrófilos. Sua expressão é muito característica da resposta imune inata (Deng *et al.*, 2013). Ao reconhecerem estruturas presentes na célula bacteriana (e.g. LPS, Peptidoglicanos, LTA -ácido lipoteicoico -, entre outros), os receptores do tipo *Toll* são ativados e iniciam uma resposta inflamatória pela indução da produção mediadores pró-inflamatórias (Takeuchi *et al.*, 1999; Chaplin, 2010). Nesse trabalho observamos que camundongos neonatos 0 dia, em homeostase, já possuem níveis basais de expressão de genes que codificam para TLR2 e TLR4 e, após o desafio bacteriano, a expressão destes genes aumenta consideravelmente quando comparado

aos camundongos adultos. Nossos dados referentes à de TLRs corroboram dados descrito na literatura sobre a participação de receptores da resposta inata nos primeiros anos de vida (Mayr et al., 2014).

Baseado nos dados obtidos nesse trabalho e nos já descritos em trabalhos anteriores sugerimos que a resposta imune ineficiente nas primeiras semanas pós-nascimento pode ser devido ao fato de neonatos ainda não terem tido um contato prolongado com agentes infecciosos mesmo que seja admitido que na vida uterina partículas microbianas e micro-organismos possam alcançar o feto (Tamburini et al., 2016). Além disso, a interação do sistema imune com micro-organismos pode auxiliar no estabelecimento de uma resposta imune eficaz em adultos (Torow e Hornef, 2017).

Em conjunto nossos dados demonstram que a deficiência durante o reconhecimento e captura de bactérias da circulação sanguínea por macrófagos em animais neonatos pode explicar a relativa susceptibilidade de recém-nascidos a infecções. Nesse trabalho mostramos claramente a interação entre macrófagos hepáticos e *Escherichia coli*. Mais estudos são necessários para verificar se o mesmo padrão de resposta ocorre com outros grupos bacterianos

8. Conclusão

Concluo, portanto que, apesar da existência de uma incapacidade inicial apresentada por neonatos no processo de *clearance* e eliminação de bactérias, ocorre também um rápido estabelecimento desta resposta imune, sendo eficaz já nas primeiras semanas de vida. Essa resposta vai sendo aprimorada ao longo de todo o desenvolvimento do animal. Isso se deve tanto pela maturação do órgão e das células imunes (sistema imune inato e adaptativo), que parece ser favorecida pelo contato com micro-organismos presentes na vida pós-nascimento.

9. Referências bibliográficas

ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 553-64, 07 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229474> >.

AKAMATSU, Y. et al. Effect of elimination of donor Kupffer cells and/or recipient macrophages on acute rejection in liver transplantation. **Hepatogastroenterology**, v. 50, n. 52, p. 1105-10, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0172-6390. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12845991> >.

AKU, F. Y. et al. Bacteriological profile and antibiotic susceptibility pattern of common isolates of neonatal sepsis, Ho Municipality, Ghana-2016. **Matern Health Neonatol Perinatol**, v. 4, p. 2, 2018. ISSN 2054-958X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29403648> >.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5245-50, Aug 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289330> >.

BALMER, M. L. et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 237, p. 237ra66, May 2014. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848256> >.

BEATH, S. V. Hepatic function and physiology in the newborn. **Semin Neonatol**, v. 8, n. 5, p. 337-46, Oct 2003. ISSN 1084-2756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001122> >.

BEATTIE, L. et al. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. **J Hepatol**, v. 65, n. 4, p. 758-68, Oct 2016. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262757> >.

BROADLEY, S. P. et al. Dual-Track Clearance of Circulating Bacteria Balances Rapid Restoration of Blood Sterility with Induction of Adaptive Immunity. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 1, p. 36-48, Jul 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27345696> >.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, Feb 2010. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176265> >.

CHU, V. T. et al. MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. **Genome Biol**, v. 9, n. 7, p. R118, 2008. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652698> >.

DAVID, B. A. et al. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. **Gastroenterology**, v. 151, n. 6, p. 1176-1191, Dec 2016. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27569723> >.

DENG, M. et al. Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis. **J Immunol**, v. 190, n. 10, p. 5152-60, May 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562812> >.

EBE, Y. et al. The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. **Pathol Int**, v. 49, n. 6, p. 519-32, Jun 1999. ISSN 1320-5463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469395> >.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **Mech Dev**, v. 120, n. 1, p. 117-30, Jan 2003. ISSN 0925-4773. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490302> >.

FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 193, n. 3, p. 259-72, Feb 2016. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414292> >.

FRITH, J. C. et al. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 9, p. 2201-10, Sep 2001. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592386> >.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890489> >.

ITO, J. et al. Inducible and neuronal nitric oxide synthases exert contrasting effects during rat intestinal recovery following fasting. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 242, n. 7, p. 762-772, 04 2017. ISSN 1535-3699. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195513> >.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 996-1006, Oct 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048121> >.

KAIBORI, M. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Liver Injury: Liver Protective Effects on Primary Rat Hepatocytes. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 14, n. 2, p. 77-83, 2015. ISSN 2212-4055. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27026409> >.

KOO, D. J.; CHAUDRY, I. H.; WANG, P. Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. **J Surg Res**, v. 83, n. 2, p. 151-7, May 1999. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329110> >.

KRENKEL, O.; TACKE, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 5, p. 306-321, May 2017. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28317925> >.

LEE, W. Y. et al. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. **Nat Immunol**, v. 11, n. 4, p. 295-302, Apr 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228796> >.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 430-40, Jan 2015. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25280870> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LLORENTE, C.; SCHNABL, B. Fast-Track Clearance of Bacteria from the Liver. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 1, p. 1-2, Jul 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27414492> >.

MACPHERSON, A. J.; HEIKENWALDER, M.; GANAL-VONARBURG, S. C. The Liver at the Nexus of Host-Microbial Interactions. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 5, p. 561-571, Nov 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27832587> >.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4-11, Jan 2014. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335434> >.

NAKAGAKI, B. N. et al. Tissue macrophages as mediators of a healthy relationship with gut commensal microbiota. **Cell Immunol**, Feb 2018. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422270> >.

PANIGRAHI, P. et al. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 407-412, 08 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28813414> >.

PROSSER, A. et al. Phagocytosis of neonatal pathogens by peripheral blood neutrophils and monocytes from newborn preterm and term infants. **Pediatr Res**, v. 74, n. 5, p. 503-10, Nov 2013. ISSN 1530-0447. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999070> >.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S54-62, Feb 2006. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447271> >.

RENZ, H. et al. The neonatal window of opportunity-early priming for life. **J Allergy Clin Immunol**, Dec 2017. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29247715> >.

SRIVASTAVA, B.; GIMSON, A. Hepatic changes in systemic infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 27, n. 4, p. 485-95, Aug 2013. ISSN 1532-1916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24090937> >.

STOLL, B. J. et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 817-26, May 2011. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518717> >.

STRNAD, P. et al. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 1, p. 55-66, Jan 2017. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27924081> >.

SZABO, G. et al. Gut-liver axis and sensing microbes. **Dig Dis**, v. 28, n. 6, p. 737-44, 2010. ISSN 1421-9875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525758> >.

TACKE, F.; ZIMMERMANN, H. W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **J Hepatol**, v. 60, n. 5, p. 1090-6, May 2014. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412603> >.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-51, Oct 1999. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549626> >.

TAMBURINI, S. et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes. **Nat Med**, v. 22, n. 7, p. 713-22, Jul 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27387886> >.

TARASENKO, T. N.; MCGUIRE, P. J. The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM). **Mol Genet Metab**, v. 121, n. 4, p. 283-288, Aug 2017. ISSN 1096-7206. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28666653> >.

THAISS, C. A. et al. The microbiome and innate immunity. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65-74, 07 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27383981> >.

TOROW, N.; HORNEF, M. W. The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. **J Immunol**, v. 198, n. 2, p. 557-563, 01 2017. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28069750> >.

TRUNG, N. V. et al. Colonization of Enteroaggregative Escherichia coli and Shiga toxin-producing Escherichia coli in chickens and humans in southern Vietnam. **BMC Microbiol**, v. 16, p. 208, 09 2016. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612880> >.

VAN ROOIJEN, N.; SANDERS, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. **J Immunol Methods**, v. 174, n. 1-2, p. 83-93, Sep 1994. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083541> >.

VATANEN, T. et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1551, Jun 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27259157> >.

VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1269-339, Oct 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789382> >.

WU, G. J. et al. Liver nitrosation and inflammation in septic rats were suppressed by propofol via downregulating TLR4/NF-κB-mediated iNOS and IL-6 gene expressions. **Life Sci**, v. 195, p. 25-32, Feb 2018. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29307523> >.

YAN, J.; LI, S. The role of the liver in sepsis. **Int Rev Immunol**, v. 33, n. 6, p. 498-510, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1563-5244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611785> >.

ZAIDI, A. K. et al. Effect of case management on neonatal mortality due to sepsis and pneumonia. **BMC Public Health**, v. 11 Suppl 3, p. S13, Apr 2011. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501430> >.

ZHAO, J. et al. Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 21, p. 7528-33, May 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18490660> >.