

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Morfologia

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

A dinâmica transitória do nicho de macrófagos hepáticos durante a lesão hepática aguda torna o organismo susceptível a infecções sistêmicas

Mateus Eustáquio de Moura Lopes

Belo Horizonte

2022

Mateus Eustáquio de Moura Lopes

A dinâmica transitória do nicho de macrófagos hepáticos durante a lesão hepática aguda torna o organismo susceptível a infecções sistêmicas

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

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte

2022

043

Lopes, Mateus Eustáquio de Moura.

A dinâmica transitória do nicho de macrófagos hepáticos durante a lesão hepática aguda torna o organismo susceptível a infecções sistêmicas [manuscrito] / Mateus Eustáquio de Moura Lopes. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

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

1. Biologia Celular. 2. Macrófagos do Fígado. 3. Doença Hepática Induzida por Substâncias e Drogas. 4. Inflamação. 5. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE MATEUS EUSTÁQUIO DE MOURA LOPES

245/2022_ENTRADA 1º/2018_ 2018697549

Às **nove horas** do dia **06 de abril de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**A DINÂMICA TRANSITÓRIA DO NICHOS DE MACRÓFAGOS HEPÁTICOS DURANTE A LESÃO HEPÁTICA AGUDA TORNA O ORGANISMO SUSCEPTÍVEL A INFECÇÕES SISTÊMICAS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato 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	APROVADO
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	APROVADO
Dr. Caio Fagundes	UFMG	APROVADO
Dr. Marcelo Torres Bozza	UFRJ	APROVADO
Dr. Heitor Paula Neto	UFRJ	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 06 de abril de 2022.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa

Dr. Caio Fagundes

Dr. Marcelo Torres Bozza

Dr. Heitor Paula Neto

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



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 07/04/2022, às 12:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 07/04/2022, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 07/04/2022, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heitor Affonso de Paula Neto, Usuário Externo**, em 11/04/2022, às 08:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Torres Bozza, Usuário Externo**, em 12/04/2022, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 12/04/2022, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1370009** e o código CRC **CF7886D5**.

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

Agradecimentos

Ao final de uma etapa é hora de reconhecer e agradecer àqueles que foram fundamentais para que tudo ocorresse da melhor maneira possível.

A Brenda, muito obrigado por todos os anos juntos, por compartilhar todas as alegrias e me ajudar a superar todas as dificuldades. Além de toda contribuição desde o início do projeto até sua finalização.

Aos meus pais: Maria e Márcio; aos meus irmãos: Ciro e Cássio, por todo apoio e por contribuírem para minha formação.

Ao professor Gustavo pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por toda orientação neste período, e pelo acolhimento no laboratório. A todos integrantes do Centro de Biologia Gastrointestinal pelos momentos de aprendizado.

Ao professor André pela colaboração e todas as discussões científicas durante o período.

Ao professor Ricardo pela colaboração e todas as discussões científicas durante o período. Também a todos integrantes do Laboratório de Biologia de Macrófagos e Monócitos pela colaboração.

A todos os técnicos responsáveis pela manutenção dos laboratórios e cuidados com os animais experimentais; em especial a Dra. Cristina por todo suporte direto.

Ao professor Andrew Luster e ao doutor Lucas Faustino por terem aberto as portas do Center for Immunology and Inflammatory Diseases do Massachusetts General Hospital, e pela orientação durante o período de doutorado no exterior.

Aos amigos espalhados pelo mundo por todos os ensinamentos, pelos momentos, e principalmente pela amizade.

As agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por fornecerem os recursos para a realização deste trabalho.

“How far can I go from the edge of what I know”
(Monolink, 2015)

Resumo

As células de Kupffer são o principal componente imune do fígado, apresentado um posicionamento estratégico no interior nos capilares sinusóides fenestrados, o que permite um íntimo contato tanto com o sangue circulante quanto com o parênquima hepático. Essas células desempenham importantes funções, incluindo o metabolismo de ferro, a remoção de restos celulares e a eliminação de produtos derivados da microbiota e patógenos da circulação. Além disso, em processos inflamatórios, são responsáveis por limitar a lesão hepática e promover a resolução da inflamação. Uma diversidade de agentes pode causar processos inflamatórios no fígado, sendo a intoxicação por acetaminofeno uma das principais causas da lesão hepática aguda, que pode, em último caso, evoluir para uma falência hepática e levar o indivíduo à morte. Nesse caso, a inflamação hepática gerada afeta diretamente as células de Kupffer. Como consequência, a remoção de moléculas e microrganismos circulantes pode ficar prejudicada, causando uma janela de susceptibilidade a infecções sistêmicas, que são, justamente, responsáveis por boa parte da mortalidade dos pacientes que apresentam esse quadro. Visto a gravidade do problema, procuramos, nesse trabalho, entender a dinâmica das células de Kupffer na lesão hepática aguda induzida por sobredose de acetaminofeno. Observamos que nas fases iniciais, 12 e 24 horas após indução da lesão, há uma redução massiva na população de células de Kupffer nas áreas de necrose, decorrente da apoptose dessas células, o que promove abertura de um importante nicho. Em sequência, monócitos pró-inflamatórios infiltram o tecido, posicionando-se nas áreas de ausência de células de Kupffer. Ainda nessa fase aguda, observamos que o fígado é incapaz de remover as bactérias da circulação, tanto pela redução na população das células de Kupffer quanto pelo prejuízo funcional das células remanescentes. Além disso, os monócitos que infiltram no tecido também podem contribuir para esse fenótipo, uma vez que apresentam algumas vias de sinalização importantes para controle de patógenos suprimidas. Seguindo a cinética da lesão, os monócitos passam de pró-inflamatórios para um perfil pró-resolutivo 72 horas após a sobredose de acetaminofeno. Nesse fase, também são encontrados aglomerados de células de Kupffer em proliferação próximo às áreas de lesão, sugerindo que tanto as células remanescentes em multiplicação quanto os

monócitos infiltrantes ocupam o nicho disponível. Esse período é acompanhado de uma recuperação da capacidade hepática de controle bacteriano, indicando que o retorno adequado do nicho das células de Kupffer é essencial para controle de quadros infecciosos durante a lesão hepática aguda. Assim, visando acelerar esse processo, empregamos a terapia celular com macrófagos derivados de medula óssea. Os macrófagos administrados alcançam o fígado, onde são responsáveis por promover a redução das áreas de necrose, a mudança no perfil dos monócitos já na fase aguda da lesão e aumento da capacidade hepática de remover bactérias da circulação. Em conjunto, nossos dados sugerem que a alteração no nicho ocupado pelas células de Kupffer pode explicar a susceptibilidade a infecções sistêmicas e que sua modulação através da terapia celular constitui uma abordagem terapêutica interessante para melhorar o quadro na lesão hepática aguda.

Palavras chaves: Células de Kupffer; Nicho de macrófagos; Lesão hepática aguda; Inflamação; Infecção sistêmica; Terapia celular.

Abstract

Kupffer cells are the primary liver resident immune cell responsible for metabolic and immune functions in the organ as they are strategically positioned inside the liver sinusoid with intimate contact with the blood. In the absence of these cells, the liver injury outcome is worsened. For instance, during acute liver injury promoted by acetaminophen overdose, they are responsible for limiting the damage and promoting the resolution of inflammation. In addition, acetaminophen overdose is responsible for the majority of acute liver failure cases that can evolve to fatal outcomes, which are usually driven by an uncontrolled inflammatory response that leads to organ dysfunction. The dysfunction also affects the Kupffer cells, for instance, there is a massive reduction in the Kupffer cell population along with impairment of their functioning during tissue damage. As a consequence, during acute liver injury, clearance of dangerous self/non-self-molecules and pathogens might be significantly impaired. This disruption in the tissue-resident macrophage's niche may lead to a window of susceptibility to systemic infections, which represents a significant cause of mortality in acute liver failure patients. Besides that, the knowledge about Kupffer cell niche disruption and susceptibility to systemic infections are not fully understood. Here, we sought to define the dynamic of tissue-resident macrophage niche using a mice model for acute liver injury induced by acetaminophen overdose. During the acute phase, a massive reduction of Kupffer cells occurs in the necrotic areas opening the niche for infiltration of other cells. The Kupffer cell death was followed by a significant infiltration of inflammatory monocytes in the same region, transiently occupying the niche at the peak of inflammation. Following the acute liver injury kinetics, as the injury starts to resolve, there is a transition in the monocyte subset from pro-inflammatory to a pro-resolutive phenotype. Moreover, the remaining Kupffer cells were observed forming replicating cell clusters closer to areas devoid of Kupffer cells. So, the niche is occupied by dual input of proliferating Kupffer cells and monocytes. However, mice were still susceptible to infections despite the monocytic infiltration and the remaining Kupffer cells in the liver. The systemic infections were not blocked in the acute stage due to inefficient internalization and the elimination of circulating bacteria by the professional phagocytes. That

stands out as a necessity to restore the niche in terms of functioning. Thus, cell therapy with bone marrow-derived macrophages (BMDM) was used as a relevant approach to occupy the niche opened after Kupffer cell demise with mature macrophages. BMDM rapidly reach the organ and are precisely positioned within necrotic areas, eliciting the reduction in necrotic areas and earlier transition to a resolutive environment. Likewise, the liver firewall function was restored after the cell therapy, as the BMDM-treated mice presented an improved bacterial removal from blood. Expanding our understanding of the dynamics of the Kupffer cell niche during liver inflammation is vital for the development of new therapeutic approaches such as cell therapy with bone marrow-derived macrophages. Therefore, we showed that the disruption in the Kupffer cell niche and its functioning during acute liver injury is a key element for secondary infections. We propose that the modulation of the macrophage niche is a promising therapeutic strategy for liver injuries that promote Kupffer Cell depletion.

Keywords: Kupffer cells; Macrophage niche; Acute liver injury; Inflammation; Systemic infection; Cell therapy.

Lista de Ilustrações

Ilustração 1. Organização do fígado, aporte sanguíneo e funções de cada componente.....	23
Ilustração 2. Diversidade de células imunes que compõem o nicho imune hepático.....	24
Ilustração 3. As células de Kupffer se encontram estrategicamente posicionadas sobre as LSECs, dentro dos capilares sinusoides.	26
Ilustração 4. O processo de biotransformação do APAP pelos hepatócitos.....	31

Lista de Figuras

Figura 1. A lesão hepática aguda induzida pela overdose de acetaminofeno promove extensa lesão tecidual com perda de parênquima e formação de extensas áreas de necrose.	47
Figura 2. A LHA gera uma inflamação predominantemente neutrofílica e com alterações significativas nas células mieloides mononucleares.	49
Figura 3. Definição dos aspectos morfológicos das células de Kupffer por MIV.	51
Figura 4. A lesão hepática aguda promove redução na população de células de Kupffer.....	54
Figura 5. A redução na população de células de Kupffer ocorre predominantemente por apoptose.....	56
Figura 6. As células de Kupffer remanescentes contribuem para reposição do nicho através de proliferação celular.	58
Figura 7. Os diferentes subtipos de monócitos recrutados posicionam-se estrategicamente nas áreas de necrose durante o curso da LHA.	60
Figura 8. A LHA induzida por sobredose de APAP promovem uma susceptibilidade a infecções.....	62
Figura 9. O fígado perde a capacidade de reter as bactérias circulantes na fase aguda da LHA.	65
Figura 10. As células de Kupffer são essenciais para a remoção de bactérias do sangue.	67
Figura 11. A capacidade fagocítica das células de Kupffer está prejudicada na fase aguda da overdose por APAP.	70
Figura 12. O perfil transcricional dos monócitos recrutados é tempo-dependente e diferente do perfil das células de Kupffer.	72
Figura 13. Os monócitos pró-inflamatórios apresentam uma expressão reduzida de vias que participam da fagocitose e eliminação patógenos comparados às células de Kupffer.....	75

Figura 14. Os monócitos pró-resolutivos apresentam um aumento na expressão de vias que participam da eliminação patógenos intracelulares em relação aos monócitos pró-inflamatórios.	76
Figura 15. Os monócitos pró-resolutivos apresentam uma reduzida na expressão da via de complemento e cascata de coagulação em comparação com as células Kupffer.....	77
Figura 16. A deficiência na capacidade hepática de remover bactérias circulantes não ocorre devido a problemas na opsonização.	79
Figura 17. Macrófagos derivados de medula óssea utilizados como terapia celular alcançam o fígado.	81
Figura 18. A terapia celular com MDMO recupera os níveis dos monócitos pró-resolutivos no fígado.	83
Figura 19. Os MDMO promovem a regeneração hepática e ocupam o nicho disponibilizado pela morte das células de Kupffer durante a LHA.....	85
Figura 20. Terapia celular com MDMO melhora a capacidade do fígado em remover bactérias da circulação.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de primers	43
--------------------------------------	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ϕ – Não ativado

A.A – Alternativamente ativado

actb – Actina beta

ACK – Solução de Cloreto de Amônio

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – *Analysis of Variance*

APAP – Acetaminofeno; Paracetamol

arg1 – Arginase 1

CCR2 – *C-C chemokine receptor type 2*

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEBIO – Centro de Bioterismo da UFMG

CEUA – Comitê de ética de uso animal da UFMG

chil3 – *chitinase-like 3*

CLL – Lipossomos clodronato

CSF-1 – *Colony stimulation factor 1*

CR1g – *Complement receptor immunoglobulin*

Ct - *Threshold cycle*

CX3CR1 – *C-X3-C motif chemokine receptor 1*

DAMPS – Padrões moleculares associados a dano

DAPI - *4,6-diamidino-2-phenylindole*

DILI – *Drug-induced liver injury*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Fc γ R – Receptores do tipo Fc γ

FDR – *False discovery rate*

FHA – Falência Hepática Aguda

FSC – *Forward scatter*

GFP – *Green Fluorescent Protein*

GSH – Glutathiona reduzida

HMGB1 – *High-motility group box 1*

ICG – *Indocyanine green*

KCs – Células de Kupffer

LAMP – *Lysosomal-associated membrane protein*

LDH – Desidrogenase láctica

LHA – Lesão hepática aguda

LPS – Lipopolissacarídeo

LSECs – Células endoteliais sinusoidais do fígado

Ly6C – *Lymphocyte antigen complex 6, locus C1*

Ly6G – *Lymphocyte antigen complex 6, locus G*

MARCO – *Macrophage receptor with collagenous structure*

M-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos

MDMO – Macrófago derivado de medula óssea

MERTK – *c-MER tyrosine kinase*

MIV – Microscopia intravital Confocal

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NAC – N-acetilcisteína

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NAPQI – N-acetil-para-benzoquinonaimina

NK – Célula *natural killer*

NLR – Receptor tipo NOD

NPCs – Células não-parenquimais

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógeno

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCA – Análise de componente principal

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PI – Iodeto de propídeo

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

PLC γ – Fosfolipase C γ

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões

retnla – resistin like alpha

RMA – *Robust multichip average*

RNA – Ácido ribonucleico

SD – Desvio padrão

SEM – Erro padrão da média

SSC – *Side scatter*

TGF- β – *Transforming growth factor beta*

Tim-4 – *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4*

TLR – *Toll-like receptor*

TNF – Fator de necrose tumoral

UFC – Unidades formadores de colônia

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

Sumário

1. Introdução	22
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo geral: Determinar a dinâmica do nicho hepático ocupado pelos macrófagos hepáticas e sua importância no controle de patógenos circulantes e durante a lesão hepática aguda induzida por sobredose de medicamento.....	34
2.2. Objetivos específicos:	34
2.2.1. Estabelecer o modelo de lesão hepática aguda por sobredose de acetaminofeno.	34
2.2.2. Avaliar a dinâmica populacional das células de Kupffer durante todo o processo inflamatório da LHA.....	34
2.2.3. Determinar a dinâmica, posicionamento e o perfil transcricional dos monócitos recrutados durante nossos modelos de LHA.....	34
2.2.4. Caracterizar a susceptibilidade a infecções durante a cinética da LHA.....	34
2.2.5. Avaliar o papel das células de Kupffer na remoção de bactérias circulantes durante a cinética da lesão.	34
2.2.6. Acelerar o processo de resolução da lesão, restabelecendo o controle de patógenos pelo fígado durante a LHA	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Animais	35
3.2. Modelo murino para lesão hepática aguda induzida por sobredose de acetaminofeno	35
3.3. Análise histológica do fígado	36
3.4. Atividade da enzima alanina aminotransferase	36
3.5. Ensaio de depuração do verde de indocianina	36
3.6. Isolamento das células não parenquimais hepáticas	37
3.7. Citometria de Fluxo	37
3.8. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	38
3.9. Osonização <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i>	38
3.10. Desafio bacteriano e ensaio de Unidades Formadoras de Colônia	39
3.11. Ensaio de remoção de bactérias circulantes do sangue	39
3.12. Monitoramento das bactérias no fígado em tempo real	39
3.13. Depleção farmacológica das Células de Kupffer	39
3.14. Microscopia Intravital Confocal	40
3.15. Ensaio de imunofluorescência	41
3.16. Derivação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea	41
3.17. Análise de expressão de mRNA por PCR em tempo real	42
3.18. Terapia celular com MDMO	43

3.19. Mineração de dados	43
3.20. Análise de dados e estatística	44
4. Resultados	45
4.1. A lesão hepática aguda induzida pela sobredose de APAP promove dano ao parênquima e disfunção hepática	45
4.2. A inflamação gerada pela LHA é predominantemente neutrofílica, com alterações significativas em outras populações de células mieloides mononucleares	45
4.3. A redução populacional das células de Kupffer abre um importante nicho hepático	50
4.4. A redução na população de KCs durante a fase aguda ocorre predominantemente por apoptose	55
4.5. O nicho disponibilizado pela morte das KCs durante a fase aguda é ocupado pela entrada de dois tipos celulares diferentes	56
4.6. A LHA provoca uma janela de susceptibilidade a infecções	61
4.7. A capacidade hepática de filtrar o sangue se encontra reduzida na fase aguda da LHA	63
4.8. As células de Kupffer são essenciais para o fígado exercer sua função imunológica primária	66
4.9. A fagocitose de bactérias pelas células de Kupffer é prejudicada durante a LHA	68
4.10. O perfil transcricional dos monócitos presentes nas áreas de necrose indica uma incapacidade de responder a patógenos circulantes	71
4.11. A deficiência na captura de bactérias não ocorre por falta de opsonização das bactérias circulantes por anticorpo ou moléculas do sistema do complemento	78
4.12. A terapia celular com macrófagos derivados de medula óssea melhora o quadro histopatológico e a capacidade hepática de filtrar o sangue	80
5. Discussão	88
6. Conclusão	100
7. Referências Bibliográficas	101
8. Anexos	118
8.1. Artigo submetido - Primeiro autor	118
8.2. Artigo publicado – Coautor	120
8.3. Doutorado Sanduíche no Exterior	121
8.4. Produções bibliográficas durante período de doutorado	124

1. Introdução

O fígado é um órgão complexo e importante na manutenção da homeostase do organismo. A estrutura hepática é formada pela repetição de unidades anatômicas hexagonais denominadas lóbulos hepáticos (Ilustração 1), sendo que cada um apresenta aproximadamente 0,5 mm de diâmetro em camundongos e 1 mm em humanos (Teutsch, 2005). Devido a sua localização, o fígado recebe sangue proveniente de duas fontes diferentes: ele recebe um grande volume sanguíneo através da veia porta, cerca de 80%, com pouco oxigênio e rico em nutrientes, provenientes do intestino; já pela artéria hepática, recebe, em menor volume, sangue oxigenado (Vollmar and Menger, 2009). Em adição, a estrutura lobular faz com que o sangue chegue no lóbulo hepático pela tríade portal e em seguida percorra os capilares sinusoides até alcançarem o centro do lóbulo e por fim, seja drenado pela veia centro-lobular após passar pelos capilares sinusoides. Nos capilares o sangue circula em baixa pressão e tensão de oxigênio e possibilitando, dessa forma, um contato íntimo e prolongado com os componentes células hepáticas (Ilustração 1). Em termos funcionais, o órgão desempenha funções metabólicas como a manutenção dos níveis séricos de glicose; o metabolismo e detoxificação de medicamentos; a síntese e transporte de colesterol; e também metabolismo de ferro (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019). Além disso, também desempenha funções imunológicas, sendo responsável pela produção de proteínas de fase aguda e do sistema do complemento; e pela remoção de moléculas e microrganismos derivados do intestino (Kubes and Jenne, 2018). Além de tudo, essa heterogeneidade funcional é dividida ao longo das diferentes zonas que constituem os lóbulos hepáticos e exercida pelo diversos componentes celulares (Ilustração 1) (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019; Jenne and Kubes, 2013).

O parênquima hepático é majoritariamente composto pelos hepatócitos, representando cerca de 60% de todas as células do fígado. Essas células se organizam em cordões margeados por capilares sinusoides, distribuídos ao longo das unidades lobulares hepáticas que compõem o órgão (Hoehme et al., 2010). Suas funções incluem a produção de diversas moléculas, entre elas, angiotensina, trombopoietina, albumina, bile, proteínas de fase aguda e do complemento. Além disso, possuem papel importante na detoxificação de

substâncias endógenas, como amônia e hormônios esteroides, e substâncias exógenas, como fármacos, toxinas e álcool (Ilustração 1) (Rossaint and Zarbock, 2013). Já os capilares sinusóides são compostos por células endoteliais sinusoidais (LSECs), tipo este que possui características particulares quando comparadas ao endotélio convencional. Elas são finas e não possuem lâmina basal, e apresentam, junto à célula adjacente, um espaço denominado fenestra, tornando, portanto, a unidade dos capilares fenestrada (Ilustração 1). Essa disposição e morfologia permitem um contato mais íntimo entre o conteúdo que está presente na circulação e os hepatócitos, assim, maximizando a funcionalidade dessas células (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019).

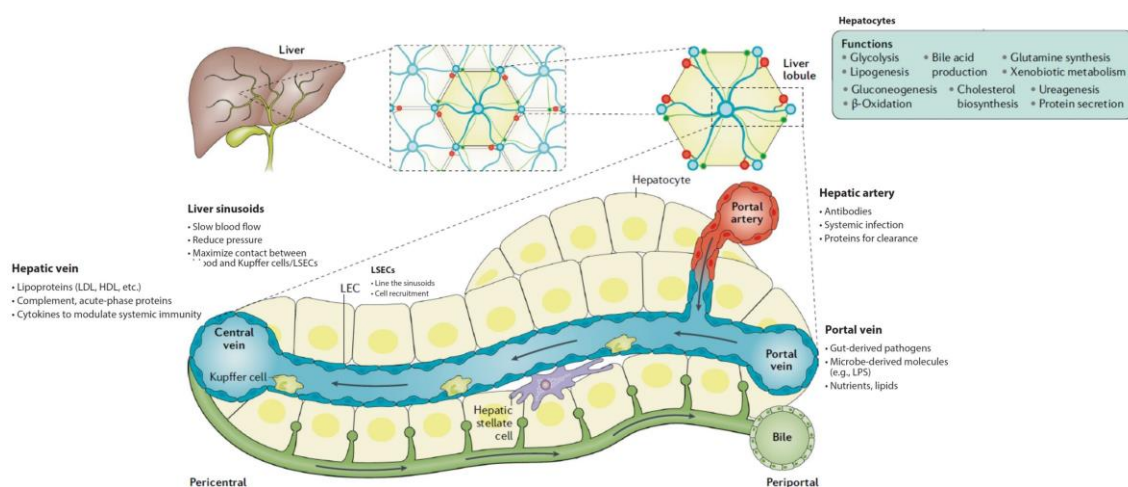


Ilustração 1. Organização do fígado, aporte sanguíneo e funções de cada componente. O fígado é formado pela repetição de unidades hexagonais denominadas lóbulos hepáticos que são compostos por cordões de hepatócitos delimitados pelos capilares sinusóides, formadas pelas LSECs (LEC), e subdividido em espaço periportal e espaço centro-lobular. O sangue chega pela região periportal, através da artéria hepática (artéria portal, *portal artery*) e da veia porta (*portal vein*) carregando uma diversidade de moléculas – específicas para cada origem-, em seguida, flui pelos sinusóides, em taxa lenta e baixa pressão, até chegar a veia centro-lobular (*central vein*) no espaço pericentral. Cada componente hepático realiza funções altamente especializadas, dessa forma, contribuem para heterogeneidade função do fígado. Adaptado de Itzkovitz S., *Nature Reviews*, 2019; e Kubes, P., *Annual Review of Immunology*, 2018

Além das células endoteliais, outras células não parenquimais compõem o órgão, sendo as células imunes a maior parte delas. O nicho imune hepático é composto por células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas e células *natural killer* e células do sistema imune adaptativo, que incluem linfócitos T e B (Ilustração 2) (Kubes and Jenne, 2018). O pleno funcionamento do órgão é crítico na defesa contra infecção por via sanguínea, com papel na detecção e remoção de patógenos (Jenne and Kubes, 2013). A

capacidade do fígado de detectar e responder aos organismos infecciosos e moléculas agressoras deve-se à sua anatomia, localização e às populações de células que residem no órgão, projetado especificamente para maximizar a vigilância imunológica, uma vez que é continuamente exposto a compostos, derivados tanto da circulação sistêmica quanto do intestino.

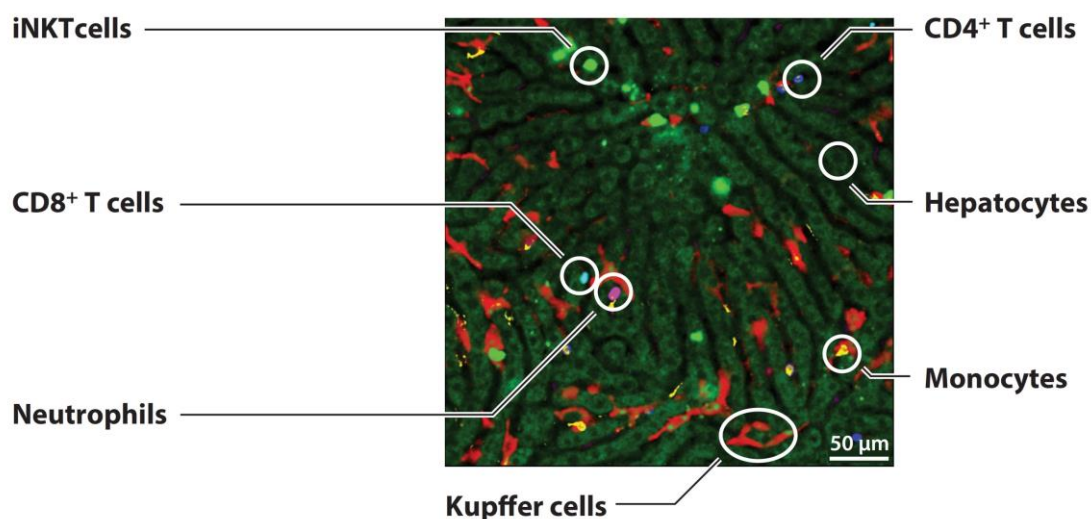


Ilustração 2. Diversidade de células imunes que compõem o nicho imune hepático. Imagem ilustrativa de microscopia intravital confocal do fígado de camundongos adultos, mostrando: os cordões de hepatócitos (autofluorescência em verde); células iNKT (verde, *iNKT cells*); células T CD8⁺ (azul claro, *CD8⁺ T cells*); células T CD4⁺ (azul escuro, *CD4⁺ T cells*); neutrófilos (roxo, *neutrophils*); monócitos (amarelo, *monocytes*); e células de Kupffer (vermelho, *Kupffer cells*). Adaptado de Kubes, P., *Annual Review of Immunology*, 2018.

Um componente essencial, tanto para as funções metabólicas quanto imunológicas hepáticas, consiste na população de macrófagos residentes presentes no órgão. Descritos pela primeira vez por Karl von Kupffer em 1876 como células estreladas integrantes do endotélio sinusoidal (Kupffer, 1876), receberam o nome de células de Kupffer após a descrição dos macrófagos por Élie Metchnikoff (Metschnikoff, 1891) e a identificação dessas células hepáticas como macrófagos por Browicz (Browicz, 1899). As células de Kupffer (KCs) representam o maior componente do nicho imune hepático (Bonnardel et al., 2019; Guilliams et al., 2022). O desenvolvimento dessas células se inicia durante a embriogênese através de progenitores eritro-mieloides presentes no saco vitelínico que migram para o fígado fetal, onde diferenciam-se em pré-macrófagos e macrófagos e passam por um processo de maturação até a primeira semana de vida, quando adquirem características de células de Kupffer. Elas se mantêm no órgão, desde o nascimento até a idade adulta, em virtude da

sua capacidade de auto renovação, sendo apenas uma pequena parcela derivada de monócitos da medula (Ginhoux and Williams, 2016; Liu et al., 2019; Mass et al., 2016). Em um indivíduo adulto, fatores teciduais, como fator estimulador de colônia 1 (CSF-1), TGF- β e desmosterol mantêm as características celulares das KCs e estimulam a manutenção do nicho (Bonnardel *et al.*, 2019; Sakai et al., 2019).

As células de Kupffer estão localizadas dentro dos sinusóides hepáticos, sobre as LSECs (Ilustração 3). Além disso, elas apresentam prolongamentos para o espaço de Dissé, possibilitando um íntimo contato com outras células, principalmente com os hepatócitos. Tal localização estratégica deixa as KCs diretamente expostas ao fluxo sanguíneo, permitindo a fagocitose de conteúdo direto da microcirculação hepática, e tornando-as responsáveis pela reciclagem de ferro, remoção de restos celulares e controle de microrganismos, metabólitos microbianos e partículas associadas à patógenos (Ilustração 3) (Krenkel and Tacke, 2017; Kubes and Jenne, 2018). Por meio da microscopia confocal intravital, foi reportado que as bactérias presentes no sangue, ao chegarem ao fígado, são rapidamente fagocitadas pelas KCs (David et al., 2016). Portanto, as KCs são as principais células responsáveis pela filtração do sangue e controle de patógenos circulantes. Essa função de filtro é constante ao longo do dia (Gonzalez et al., 2017), impedindo que grandes quantidades de lipopolissacarídeo (LPS), restos celulares e microrganismos da microbiota atinjam a circulação sistêmica, prevenindo a disseminação de patógenos em condições homeostáticas e de doença, evitando assim quadros inflamatórios sistêmicos (Balmer et al., 2014; Seki et al., 2000; Thomson and Knolle, 2010; Toth and Thomas, 1992).

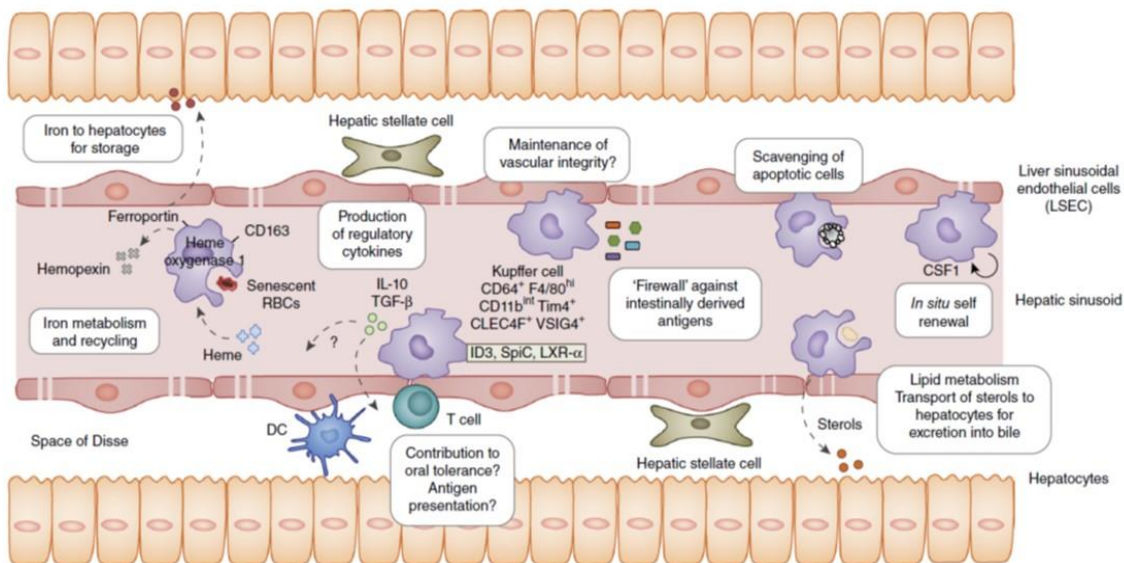


Ilustração 3. As células de Kupffer se encontram estrategicamente posicionadas sobre as LSECs, dentro dos capilares sinusoides. A localização das KCs permite um íntimo contato com o sangue e todo material circulante, fazendo com que desempenhem uma gama de funções tanto metabólicas quanto imunológicas. Adaptado de Mowat A., *Nature Medicine*, 2017.

O processo de fagocitose foi descrito pela primeira vez na década de 1880 por Élie Metchnikoff. O próprio pesquisador expandiu esses conhecimentos para as áreas de patologia comparada e imunologia celular e foi, em 1908, coroado com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, prêmio este dividido com Paul Ehrlich – considerado o pai da resposta imune humoral. Desta forma, foi estabelecido que os fagócitos constituem a primeira linha de defesa contra infecções agudas para uma diversidade de organismos. Anos depois, a rede de fagócitos foi definida como sistema retículo-endotelial, responsável pela função de filtro ou limpeza da circulação (Yona and Gordon, 2015). Na década de 70, a nomenclatura foi alterada para sistema de fagócitos mononucleares (van and Cohn, 1968; van Furth et al., 1972). Após a década de 90, um segundo termo foi cunhado, essas células foram designadas como fagócitos profissionais (Rabinovitch, 1995), grupo esse que compreende tanto os fagócitos mononucleares (macrófagos, monócitos e células dendríticas), quanto as células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) (Gordon, 2016). Atualmente, o enfoque tem sido a análise individualizada de cada tipo celular, devido a melhor descrição e classificação baseando-se na origem, posicionamento, fenótipo e função (Guilliams et al., 2014; Yona and Gordon, 2015).

Independentemente da nomenclatura adotada, os macrófagos residentes de cada tecido são os que apresentam a maior capacidade fagocítica durante a homeostase, em comparação as demais células imunes (Gonzalez *et al.*, 2017; Gordon, 2016). Para cumprir essa função no ambiente hepático, as células de Kupffer apresentam em sua superfície receptores responsáveis para internalização de partículas e microrganismos, entre eles o FcγR (receptores do tipo Fcγ), CR1g (receptor do complemento da superfamília das imunoglobulinas; *Complement receptor of the immunoglobulin superfamily*), utilizados, inclusive, como marcadores para identificação das KCs (Bleriot *et al.*, 2020; Guilliams *et al.*, 2022). Como dito anteriormente, os monócitos e neutrófilos também são relevantes para o grupo de fagócitos profissionais. Essas células são encontradas em movimento dentro dos capilares sinusoides, dando a ideia de estarem patrulhando o tecido e serem transitórias no fígado (Kubes and Jenne, 2018). Durante estado estacionário, a quantidade de neutrófilos circulantes é muito pequena. Porém durante insultos ao tecido hepático, principalmente nos processos inflamatórios de caráter agudo, eles são rapidamente recrutados ao tecido (Jenne and Kubes, 2013; McDonald *et al.*, 2010). Ao chegarem ao local, atuam de forma tempo dependente, sendo que inicialmente eles são responsáveis por amplificar a lesão hepática (Alvarenga *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2012), por outro lado, na fase resolutive, contribuem no processo de resolução da lesão (Mattos *et al.*, 2020).

Os monócitos também são encontrados em baixos números no tecido hepático durante a homeostase. Assim como os neutrófilos, o recrutamento dos monócitos ocorre durante processos inflamatórios teciduais e suas funções são tempo-dependentes (Shi and Pamer, 2011). Porém, ao contrário deles, as populações de monócitos tem maior plasticidade, podendo ser subdividas em conjuntos distintos com base em marcadores de superfície e em suas funções (Shi and Pamer, 2011). Nos estágios iniciais da inflamação hepática, gerados por diferentes insultos, são recrutados monócitos denominados pró-inflamatórios, caracterizados pela expressão dos marcadores Ly6C em altos níveis (Ly6C^{hi}), CD11b⁺, CCR2⁺, e baixa ou nenhuma expressão de CX3CR1 (CX3CR1^{-/lo}) (Dal-Secco *et al.*, 2015; Shi and Pamer, 2011; Triantafyllou *et al.*, 2018b). Os marcadores não são importantes somente para imunofenotipagem,

o CCR2, por exemplo, é essencial para saída dessas células da medula óssea e chegada ao tecido (Serbina and Pamer, 2006). Uma vez no tecido, os monócitos pró-inflamatórios, assim como os neutrófilos, promovem dano tecidual ao liberarem enzimas para degradação de matriz extracelular, e também citocinas inflamatórias (Dal-Secco *et al.*, 2015; Shan and Ju, 2020). Durante a fase resolutive, outro subtipo de monócito está presente de forma dominante no fígado, os chamados monócitos pró-resolutivos, caracterizados por Ly6C em baixa expressão (Ly6C^{lo}), CD11b⁺, CX3CR1⁺, e baixa ou nenhuma expressão de CCR2 (CCR2^{-/lo}) (Dal-Secco *et al.*, 2015; Shi and Pamer, 2011; Triantafyllou *et al.*, 2018b). O CX3CR1 é crucial tanto para a sobrevivência desses monócitos quanto pelo posicionamento deles no tecido (Auffray *et al.*, 2007; David *et al.*, 2016; Hanna *et al.*, 2011). Essas células são importantes no retorno à homeostase e são as grandes responsáveis pela produção de VEGF, TGF- β e IL-10, fatores que reduzem a inflamação e induzem a proliferação de componentes perdidos durante a inflamação (Dal-Secco *et al.*, 2015; Zigmond *et al.*, 2014). Um ponto ainda em discussão na literatura é se o recrutamento dos monócitos ocorre em 2 ondas, uma em cada fase da inflamação hepática (Shi and Pamer, 2011; Zigmond *et al.*, 2014) ou se há a conversão dos monócitos inflamatórios em monócitos pró-resolutivos no fígado (Dal-Secco *et al.*, 2015; David *et al.*, 2016; Kratochvil *et al.*, 2017).

Os processos inflamatórios hepáticos podem originar-se de diversas formas. Como falado anteriormente o fígado está estrategicamente posicionado na interface entre o trato gastrointestinal e a circulação sistêmica, recebendo, por tanto, via circulação uma variedade de moléculas ou organismos com potencial de causar injúrias ao tecido (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019). Assim, o órgão atua na captura, metabolização e eliminação dessas moléculas. Porém, em certas situações, esses processos estão suscetíveis a falhas o que pode promover lesões hepáticas (Asrani *et al.*, 2019). As lesões podem ocorrer em decorrência de processos infecciosos (Kubes and Jenne, 2018), ou podem ser lesões estéreis, quando não há um agente infeccioso – como por exemplo a lesão hepática causada pelo consumo excessivo de álcool (Kubes and Mehal, 2012). Outra forma de classificar as lesões é de acordo com sua progressão e duração, sendo divididas em injúrias agudas, com rápido desenvolvimento e

duração curta, e lesões crônicas, quando há um estabelecimento mais lento e uma duração longa (Asrani *et al.*, 2019).

O processo de lesão tecidual faz com que o microambiente hepático acumule mediadores, liberados por células ativadas, e partes de células mortas que, em conjunto, são capazes de modular o fenótipo das KCs. A plasticidade fenotípica das KCs faz com que elas possam atuar tanto promovendo quanto restringido a inflamação, além de contribuírem para o retorno à homeostase. (Shan and Ju, 2020). Entretanto, um acontecimento em comum em diversos processos inflamatórios hepáticos, sejam eles gerados por infecções virais (Borst *et al.*, 2017), protozoários (Beattie *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2018), ou infecções bacterianas (Bleriot *et al.*, 2021), é a redução significativa na população de KCs. Esse fenômeno não está restrito somente a quadros infecciosos, mas também ocorre na esteatose hepática não alcoólica (Devisscher *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2020) e na doença alcoólica hepática (Wang *et al.*, 2014). Em todos esses casos, a redução da população leva a uma abertura do nicho ocupado pelas KCs.

Os monócitos, após infiltrarem no tecido, podem ocupar esse nicho de forma transitória ou até mesmo se diferenciarem em macrófagos (Beattie *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2016). Ainda, dependendo do status do nicho, podem se diferenciar em KCs, adquirindo seu perfil transcricional e sua funcionalidade (David *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2016). Além dos monócitos, as próprias KCs remanescentes podem, por auto renovação, dar origem a novas KCs durante processos inflamatórios (Bleriot *et al.*, 2015), assim como ocorre no estado estacionário (Bonnardel *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019). Dessa forma, infere-se que pode haver uma contribuição por duas vias para reposição desse nicho ou uma competição para ocupação do mesmo (Guilliams and Scott, 2017), e que os fatores teciduais contribuem fortemente para determinar os rumos dessa ocupação (Bleriot *et al.*, 2020; Bonnardel *et al.*, 2019; Guilliams and Scott, 2017).

Entre as lesões hepáticas, as que manifestam-se de forma aguda são as de pior prognóstico, devido às limitações no diagnóstico, necessidade de tratamento rápido e escassez de terapias (Stravitz and Lee, 2019). As lesões hepáticas agudas (LHA) possuem uma variedade de causas, que vão desde infecções virais ou bacterianas, condições genéticas hereditárias – doença de

Wilson – e até mesmo induzida por consumo excessivo de medicamentos (Asrani *et al.*, 2019). Essa última, denominada lesão hepática induzida por medicamentos (DILI, do inglês *Drug induced liver injury*) compreende uma das principais causas e apresenta pior prognóstico (Fisher *et al.*, 2015), sendo o acetaminofeno (APAP, Paracetamol) um dos principais causadores e o mais estudado (Asrani *et al.*, 2019; Fisher *et al.*, 2015; Lee, 2017). O APAP, quando consumido, será internalizado pelos hepatócitos e biotransformado no retículo endoplasmático liso. Quando administrado em doses terapêuticas, até 4g por dia para um indivíduo adulto, a maior parte é convertida em glucuronídeos inativos pela enzima glucuronil transferase. O restante será: I) conjugado à grupos sulfato pela enzima sulfotransferase; II) metabolizado via citocromo P450 gerando um composto intermediário que será conjugado à glutathione para excreção (Ilustração 4) (Means and Ho, 2019).

Por outro lado, quando há uma sobredose, a principal via que é a de glucoronidação, fica saturada, e o excesso é deslocado para se metabolizado via citocromo P450. Em condições normais, o produto da reação, o N-acetil-p-amino-benzoquinonaimina (NAPQI), é conjugado à glutathione, e posteriormente eliminado (Means and Ho, 2019). Porém, em situações de sobredose ocorre o esgotamento dos estoques de glutathione dentro dos hepatócitos, o que leva ao acúmulo do composto intermediário NAPQI nos hepatócitos. Esse composto acumulado liga-se a grupamentos de cisteína de diversas proteínas (Ilustração 4), entre elas proteínas mitocondriais, gerando um estresse oxidativo no interior dessas células (Jaeschke and Ramachandran, 2020b), que leva, por fim, à necrose dos hepatócitos. A morte dos hepatócitos, que ocorre principalmente nas áreas centro-lobulares, onde o APAP é metabolizado (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019; Means and Ho, 2019), promove a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), o aumento dos níveis séricos das aminotransferases e a destruição da vasculatura hepática (Jaeschke and Ramachandran, 2020a; Yang *et al.*, 2017), levando, conseqüentemente, à perda

das funções hepáticas, como por exemplo a capacidade de depuração de moléculas exógenas (Alvarenga *et al.*, 2018).

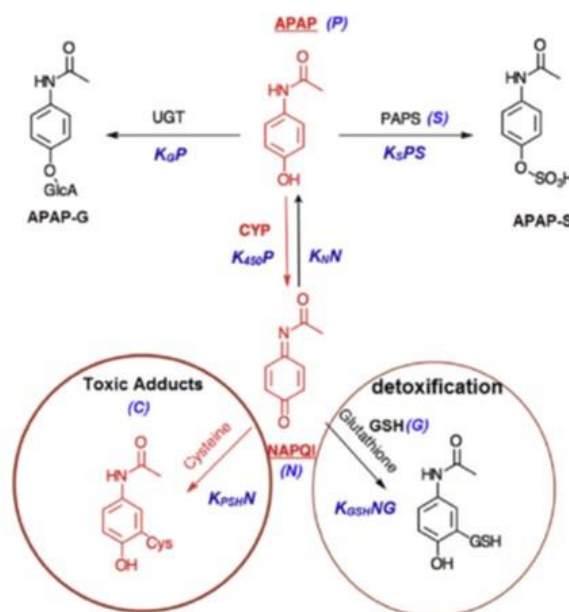


Ilustração 4. O processo de biotransformação do APAP pelos hepatócitos. Preferencialmente, em doses terapêuticas, o APAP passa pela reação de glucuronidação (UGT, APAP-G) e a de sulfatação (PAPS, APAP-S), outra pequena parte é metabolizada via citocromo P450 (CYP), formando o NAPQI, que será conjugado a glutathione (GSH, *glutathione*) e, por fim, detoxificado (*detoxification*). Porém, em sobredosagem, há um excesso de NAPQI que forma conjugados tóxicos (*toxic adducts*) ao se ligarem a grupos cisteína (*cysteine*) de proteínas celulares. Adaptado de Means, A., *Drug Metab. and Pharmaco.*, 2019.

A LHA induzida por sobredose de APAP é uma doença que necessita de diagnóstico precoce para que o tratamento seja eficaz. Quando o diagnóstico ocorre em um estágio inicial, a terapia com N-acetilcisteína (NAC) é eficiente – se aplicada nas primeiras 12 horas após sobredose. Por outro lado, em casos de diagnóstico tardio ou com diagnóstico inconclusivo/ausente, tal terapia apresenta menor eficácia (Lee, 2017). Nessas situações, de atraso na apresentação a uma unidade de terapia, ou de ineficiência do tratamento, o paciente pode evoluir para um caso de falência hepática aguda. Esse extremo gera a necessidade de um transplante hepático, uma terapia que, nas últimas décadas, elevou de 20% para aproximadamente 70% a taxa de sobrevivência dos pacientes – porém, ainda assim, a taxa de óbito é considerável, ocorrendo em 28% dos casos de FLH promovida por sobredose de APAP (Stravitz and Lee, 2019). Ainda, um problema recorrente, que agrava ainda mais o quadro dos pacientes com FHA, é o desenvolvimento de quadros infecciosos, o que impede

que os pacientes recebam o transplante hepático. Cerca de 40% dos óbitos são causados por infecção bacteriana – e nem mesmo tratamentos com antibióticos conseguem reduzir a incidência de infecções sistêmicas (Karvellas et al., 2014; Karvellas et al., 2009; Rolando et al., 1990; Rolando et al., 1996; Wyke et al., 1982).

Como abordado anteriormente, a morte necrótica dos hepatócitos durante a fase aguda da lesão promove a liberação de DAMPs que são chaves para o recrutamento de células imunes. Inicialmente há infiltrado de neutrófilos, que atuam no estabelecimento da lesão (Marques *et al.*, 2012; Marques et al., 2015b; Mattos *et al.*, 2020; McDonald *et al.*, 2010), e, em seguida, há recrutamento de monócitos pró-inflamatórios (Ly6C^{hi}CCR2⁺), que também atuam no processo lesivo (Mossanen et al., 2016). Esse recrutamento de diversos fagócitos na fase aguda da lesão é simultâneo à redução de células de Kupffer (Zigmond *et al.*, 2014), levando, assim, à perda do principal fagócito hepático responsável pela captura e eliminação de patógenos circulantes. Dessa forma, mesmo com um infiltrado de monócitos e neutrófilos, a capacidade hepática de controle bacteriano pode estar prejudicada, promovendo os quadros infecciosos que acometem os pacientes (Karvellas *et al.*, 2009).

Nos casos em que o paciente sobrevive à LHA, a lesão é auto-remissiva, ou seja, o ambiente inflamatório torna-se resolutivo. Nesse período há uma dominância de um perfil de monócitos pró-resolutivos (Ly6C^{lo}CXCR1⁺), que atuam no processo de retorno à homeostase (Zigmond *et al.*, 2014). Porém, para LHA induzida por sobredose de APAP, esse processo não está completamente estabelecido, - principalmente no que diz respeito à recuperação funcional das células de Kupffer e à origem das novas células que repõe o nicho. Essas células, independentemente de originarem-se de auto renovação (Zigmond *et al.*, 2014) ou diferenciação de monócitos (Bleriot *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2016), necessitam de um processo de educação tecidual e maturação até o retorno completo às suas características e funções na homeostase (David *et al.*, 2016; Sakai *et al.*, 2019; Scott *et al.*, 2016; Zigmond *et al.*, 2014). Assim, é de se esperar que, durante esse período de resolução da lesão, a homeostase hepática não tenha retornado e, conseqüentemente estendendo a janela de susceptibilidade a infecções.

Considerando a escassez de terapias disponíveis para tratamento da LHA, e a incidência de infecções sistêmicas nos pacientes, entender a relação e entender a dinâmica do nicho hepático ocupado pelas células de Kupffer durante a LHA é de extrema importância. Compreender o processo, desde o desaparecimento das células, na fase aguda, até o retorno populacional, a partir da fase resolutive, pode explicar a susceptibilidade a infecções e criar novas abordagens terapêuticas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral: Determinar a dinâmica do nicho hepático ocupado pelos macrófagos hepáticos e sua importância no controle de patógenos circulantes e durante a lesão hepática aguda induzida por overdose de medicamento

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Estabelecer o modelo de lesão hepática aguda por overdose de acetaminofeno.

2.2.2. Avaliar a dinâmica populacional das células de Kupffer durante todo o processo inflamatório da LHA.

2.2.3. Determinar a dinâmica, posicionamento e o perfil transcricional dos monócitos recrutados durante nossos modelos de LHA

2.2.4. Caracterizar a susceptibilidade a infecções durante a cinética da LHA.

2.2.5. Avaliar o papel das células de Kupffer na remoção de bactérias circulantes durante a cinética da lesão.

2.2.6. Acelerar o processo de resolução da lesão, restabelecendo o controle de patógenos pelo fígado durante a LHA

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J entre 8-10 semanas de idade provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/ICB). Também utilizamos camundongos fêmeas de 8-10 semanas com o genótipo CX3CR1^{+/gfp}CCR2^{+/rfp} obtidos a partir do cruzamento dos animais CX3CR1^{gfp/gfp} (B6.129P(Cg)-Cx3cr1^{tm1Litt}/J) com os animais CCR2^{rfp/rfp} (B6.129S4-Ccr2^{tm1lfc}/J), no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia – ICB/UFMG. Ademais, camundongos fêmeas da linhagem LysM^{+/cre}Rosa26^{+/tdTomato} de 4-6 semanas de idade também obtidos do Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia – ICB/UFMG, e gerados a partir do cruzamento entre as linhagens LysM^{cre/cre} (B6.129P2-Lys2^{tm1(cre)lfo}/J) e Rosa26^{tdTomato/tdTomato} (B6.Cg-Gt(Rosa)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}/J). Os animais foram acondicionados em microisoladores de polipropileno, (Alesco®, Monte Mor, SP, BR) no Biotério de Imunofarmacologia do ICB-UFMG, com água e ração *ad libitum* em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), durante todo período com exceções a serem mencionadas posteriormente. O protocolo de anestesia dos animais é uma mistura de dois anestésicos, combinação de Ketamina 10% (60mg/kg, Syntec, Tamboré, SP, BR) e Xilazina 2% (15 mg/kg, Syntec), com administração subcutânea. A eutanásia é realizada com uma sobredose de anestésico, seguida por deslocamento cervical. Os procedimentos éticos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UFMG, protocolos 377/2016 e 076/2020.

3.2. Modelo murino para lesão hepática aguda induzida por sobredose de acetaminofeno

Para indução da lesão os animais foram mantidos em jejum por um período de 15 horas antes do tratamento. Após esse tempo, receberam por via oral 600mg/kg de acetaminofeno (APAP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em salina 0,9% estéril, ao passo que os animais controles receberam pela mesma via um volume equivalente do veículo (Liu et al., 2006; Marques *et al.*, 2012). A sobrevivência dos animais após indução da lesão foi observada no intervalo de 6 horas em 6 horas até o décimo quinto dia. Para os demais ensaios, a cinética

da lesão foi avaliada nos seguintes tempos 12, 24, 48 e 72 horas, 7 e 15 dias após indução da lesão.

3.3. Análise histológica do fígado

Para análise histológica, os fragmentos hepáticos foram coletados e fixados em formaldeído 4%, em seguida desidratados em álcool e embebido em parafina. Em seguida, foram realizados cortes de 4µm de espessura utilizando um micrótomo e os cortes foram marcados utilizando hematoxilina e eosina (H&E). As imagens foram adquiridas usando as lentes objetivas de 4x no microscópio Nikon Ti A1R (Nikon, Shinagawa, Tokyo, Japan). A histopatologia hepática foi realizada por análise de duplo cego e gerado um escore histopatológico baseado na integridade do parênquima, quantidade e tamanho das áreas de necrose, e presença de infiltrado inflamatório (Kleiner, 2014).

3.4. Atividade da enzima alanina aminotransferase

A dosagem da atividade da enzima Alanina Aminotransferase (ALT) no soro foi utilizada para medir de forma indireta a lesão hepática. Para medir essa atividade, amostras de sangue são coletadas e centrifugadas a 1500g por 10 minutos para separar o soro do plasma, então o soro é coletado. Na sequência, a dosagem é feita através de uma cinética enzimática em microplaca de 96 poços (Corning, New York, NY, USA). Para tanto, as amostras de soro foram adicionadas junto com Tampão HEPES pH = 7,8. LDH, L-alanina, NaCl e azida sódica, compondo o substrato, e alfacetoglutarato, NADH e azida sódica, atuando como coenzimas, todos reagentes provenientes do kit (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Por fim, a placa contendo as amostras é mantida à 37°C por 50 segundos e, então, lida em espectrofotômetro (Versamax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) no comprimento de onda de 340nm a 37°C em intervalos de 1 minuto durante 4 minutos. O resultado é expresso pela média obtida de todas as leituras.

3.5. Ensaio de depuração do verde de indocianina

O ensaio de depuração do corante Verde de Indocianina (ICG) foi utilizado para avaliar a função hepática. O ensaio consiste em administração de ICG na concentração de 20mg/kg por via intravenosa, após 20 minutos o sangue é coletado e centrifugado à 1500g por 10 minutos para obtenção do soro. Após a

separação, o soro foi colocado em microplacas de 96 poços (Corning) e a concentração de ICG avaliada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 800nm (Versamax).

3.6. Isolamento das células não parenquimais hepáticas

Visando a obtenção de células não parenquimais hepáticas, os animais foram anestesiados por via subcutânea, seguido da coleta do sangue por exsanguinação via veia femoral e depois os animais foram sacrificados. Em seguida, o fígado foi processado e, então, digerido em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Billings, MT, USA) suplementado com colagenase VII (1mg/ml, Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37°C sob agitação de 80rpm. Após a incubação, as amostras foram filtradas, em cell strainer de 70µm para a remoção de tecido não digerido, e transferidas para outro tubo. Após serem filtradas, as amostras passam por um processo de centrifugações diferenciais para obtenção das células não parenquimais hepáticas: I) 400g por 5 minutos a 4°C seguido do descarte do sobrenadante e o material sedimentado resuspendido em meio de cultura; II) 60g por 3 minutos a 4°C seguido da coleta do sobrenadante e III) 400g por 5 minutos a 4°C seguido do descarte do sobrenadante, e as hemácias lisadas usando solução de cloreto de amônio (ACK) para obtenção de uma suspensão limpa e com somente células não parenquimais isoladas. Por fim, as células foram contadas utilizando azul de tripan ou cristal de violeta e 10^6 células usadas para citometria de fluxo.

3.7. Citometria de Fluxo

Após o isolamento das NPCs, 1×10^6 células de cada amostra foram incubadas com marcador de viabilidade celular, Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA), por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, incubação por 5 minutos a 4°C com Fc block Fc-γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2; BD Biosciences), e após esse tempo foi performada a marcação para moléculas de superfície por 30 minutos a 4°C utilizando os seguintes marcadores: anti-CD45 (clone 30-F11, BD Biosciences), anti-F4/80 (clone T45-2342, BD Biosciences), anti-CD11b (clone M1/70, BD Biosciences), anti-Ly6C (clone AL-21, BD Biosciences), anti-Ly6G (clone 1A8, BD Biosciences). Para avaliação do programa de morte celular, os seguintes marcadores foram utilizados Anexina V (Biolegend, San Diego, CA, USA) e

Iodeto de Propídio (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em tampão fosfato suplementado com HEPES (10mM), NaCl (150mM) e CaCl₂ (2,5mM) em pH=7,4 por 20 minutos (Crowley et al., 2016). A citometria de fluxo foi realizada usando o citômetro Accuri™ C6 (BD Biosciences) ou CytoFlex (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

3.8. Cultivo de *Escherichia coli*

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC®25922GFP) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Shirong Liu (Harvard Medical School-EUA). A bactéria foi modificada geneticamente para inserção de um plasmídeo com a Proteína Green Fluorescente – GFP, ligado a um promotor com gene de resistência à ampicilina. As bactérias foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (Sigma-Aldrich) com adição de ampicilina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) por 12 horas em agitação à 37°C. Após esse tempo, as bactérias foram lavadas em uma centrifugação à 1500g por 15 minutos. Por fim, a quantidade de bactérias foi determinada por densidade óptica (OD) em 600nm em espectrofotômetro (Versamax), sendo que uma OD igual a 1 corresponde a 8x10⁸ células/ml.

3.9. Oponização *in vitro* de *Escherichia coli*

Para realizar a oponização *in vitro*, inicialmente, as bactérias foram ajustadas para 1x10⁸ bactérias/ml, em seguida, adicionamos tampão contendo PBS com 1% de BSA e 0,05% de azida sódica. Na sequência, a suspensão foi centrifugada a 3000g por 10 min e esse passo repetido mais uma vez. Então, as bactérias foram resuspendidas em 1ml de Tampão PBS-BSA-Azida e divididas alíquotas em 50µl. Posteriormente, separadas em grupos a serem incubados com soro fresco e inativado provenientes dos animal controle e 24 horas após sobredose de APAP. O soro foi inativado a 56 °C por 30 min. As bactérias foram incubadas com soro na diluição de 1:50 por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente, centrifugadas a 3000g por 10 min e resuspendidas em 50µl. Por fim, quando especificado, utilizamos bactérias oponizadas *in vitro* para realização do ensaio de remoção de bactérias circulantes do sangue.

3.10. Desafio bacteriano e ensaio de Unidades Formadores de Colônia

Os camundongos receberam, por via intravenosa, uma suspensão bacteriana de 5×10^5 *E. coli* por 20g de peso do animal em 50 μ l. Os animais do grupo controle e 24 horas após indução da lesão foram submetidos para avaliação da taxa de sobrevivência e monitorados a cada 3 horas por um total de 30 horas. Para o ensaio de Unidades de Formadores de Colônia (UFC), 24 horas após o desafio, os animais foram anestesiados, em seguida o sangue e o fígado foram coletados, macerados, e por último, cultivados em meio ágar Luria-Bertani (Sigma-Aldrich) contendo ampicilina (100mg/ml, Sigma-Aldrich) por 24 horas à 37°C. Ao fim do tempo de cultivo as UFC foram quantificadas e normalizadas por volume de sangue em mililitros (ml) e por peso do fígado em gramas (g).

3.11. Ensaio de remoção de bactérias circulantes do sangue

A avaliação de remoção bacteriana pelo fígado foi realizada seguindo técnica já utilizada no laboratório (David *et al.*, 2016). Os camundongos receberam, por via intravenosa, uma suspensão bacteriana de 5×10^6 *E. coli* por 20g de peso do animal em 50 μ l. Após 5 minutos, os animais são anestesiados e o sangue coletado pela veia hepática e imediatamente diluído em PBS (1:100), por fim, a amostra foi analisada no citômetro de fluxo, BD Accuri™ C6. O resultado é baseado no número de eventos GFP por volume de sangue em microlitros (μ l).

3.12. Monitoramento das bactérias no fígado em tempo real

O monitoramento em tempo real do deslocamento bacteriano no fígado foi realizado através da microscopia intravital confocal (MIV), descrita em seção específica. Resumidamente, com o camundongo anestesiado e posicionado na plataforma do microscópio foi administrado por via intravenosa 5×10^7 *E. coli* por 20g de peso do animal em 50 μ l. A filmagem se inicia antes 10 segundos antes da injeção e os eventos individuais foram captados durante os primeiros 5 minutos. O monitoramento foi avaliado utilizando o programa NIS-Elements Advanced Research com o módulo NIS.ai (Nikon Instruments).

3.13. Depleção farmacológica das Células de Kupffer

As Células de Kupffer foram depletadas utilizando injeção intravenosa de lipossomos contendo Clodronato (5mg/ml) com doses de: 12,5mg/kg (50µl/20g), 31mg/kg (125µl/20g), 50mg/kg (200µl/20g) por animal, para obtermos um gradiente de depleção (Van Rooijen and Sanders, 1996). Os animais controles receberam os mesmos volumes de solução salina 0,9%. A depleção foi avaliada 48 horas após o tratamento por Citometria de Fluxo e Microscopia Intravital Confocal. Além disso, os animais são submetidos ao ensaio de remoção bacteriana da circulação.

3.14. Microscopia Intravital Confocal

A Microscopia Intravital Confocal (IVM) para visualização *in vivo* do fígado de camundongos foi realizada conforme descrito anteriormente (Marques et al., 2015a), utilizando microscópio Confocal Nikon Ti A1R equipado com detector espectral e estágio motorizado XYZ (Nikon). Antes do início dos procedimentos, 20 minutos, os camundongos receberam, exceto quando especificado, por via intravenosa anti-F4/80 (clone T45-2342, BD Biosciences) e anti-CD31 (clone 390, Biolegend). Em seguida, quando discriminado, após início da cirurgia os camundongos receberam por via intravenosa Sytox Green (250nmol/Kg, Sigma-Aldrich). Resumidamente, o processo cirúrgico consiste em uma incisão na linha média seguida de laparoscopia para exposição fígados que em seguida é apoiado em um suporte de acrílico compatível com o microscópio. Para gerar os vídeos, adquirimos imagens em intervalos de um frame a cada 10 segundos por 5 minutos em posição XYZ fixada. As imagens foram adquiridas usando objetiva de 20x e definição de pixel de 512x512, e as imagens foram colocadas em sequência para gerar um vídeo por animal. Para reconstrução em 3D, a aquisição em série Z foi realizada em uma objetiva de 20x, adquirindo um intervalo de 60µm entre parte superior e inferior, sendo uma imagem a cada 0,2 µm com definição de pixel de 512x512. Por fim, a aquisição de imagens é realizada em objetiva de 10x e 20x na definição de pixel 1024x1024 sendo 10 imagens de campos por animal. Todo processo foi feito utilizando o programa NIS-Elements Advanced Research com o módulo NIS.ai (Nikon).

3.15. Ensaio de imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, os animais dos grupos 12, 24 e 72 horas após sobredose de APAP e grupo controle foram anestesiados e sacrificados. Em seguida, fragmentos do fígado foram coletados fixados em paraformaldeído 4% por pelo menos 12 horas. Após esse tempo, os fragmentos foram desidratados em gradiente de Sucrose 10%-30% (massa/volume, PBS) e posteriormente incluídos em Tissue-Tek® OCT (Sakura, Torrance, CA, USA) para serem congelados a -20°C até serem processados. O processamento foi feito por cortes congelados em secções de 15µm de espessura. Após o processamento, esperamos os cortes atingirem a temperatura ambiente para serem permeabilizados com solução de PBS contendo Triton X-100 0,5% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de bloqueio, contendo 5% de soro normal de cabra diluído em PBS, por 60 min a temperatura ambiente. Na sequência, realizamos a imunomarcagem durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: rato anti-F4/80 (clone T45-2342, BD Biosciences), coelho anti-caspase 3 clivada (clone 5A1, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), coelho anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, UK), diluídos 1:100 em PBS contendo 0.05% Triton X-100. No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS, depois foram incubados novamente com a solução de bloqueio por 60 min. Após o bloqueio, os cortes foram incubados por 90 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo secundário cabra anti-coelho conjugado à Alexa Fluor 488 (policlonal, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluído 1:200. Seguidamente, a marcação nuclear foi realizada com uso de 4,6-diamidino-2-phenylindole staining (DAPI, Life Technologies). Por fim, as lâminas obtidas foram montadas em glicerol contendo Tris-HCl 0,1M na proporção (9:1) e seladas. A aquisição das imagens foi realizada utilizando microscópio Confocal Nikon Ti A1R e o programa NIS-Elements Advanced Research com o módulo NIS.ai (Nikon), na objetiva de 20x e com definição de 1024x1024.

3.16. Derivação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea

Os macrófagos foram obtidos a partir da diferenciação de precursores presentes na medula óssea dos animais. Para tanto, os precursores de medula óssea foram recolhidos do fêmur de animais C57BL/6J selvagens ou LysM-

Tomato, lavados colocados em placas de cultura. Os precursores foram cultivados em placas de cultura contendo meio DMEM-12 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2mM de L-glutamina (Gibco), 100µg de estreptomicina (Gibco), 100U/l de penicilina, 25mM de HEPES (Sigma-Aldrich), e 20% do sobrenadante de cultura de células L929 como descrito anteriormente (Gonçalves, 2015). Nos dias 3 e 5 após início do cultivo houve adição e substituição do meio de cultura, respectivamente. Ao final de 7 dias em cultura 4°C na estufa com 5% de CO₂, as células foram recolhidas e estimuladas, quando especificado, com IL-4 (20ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) durante o período noturno na estufa de células para gerar o perfil alternativamente ativado (Murray et al., 2014). Ao final, as os macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) sem ativação (ϕ) e alternativamente ativados (A.A) foram ajustados para concentração de 1×10^6 células/ml para análises posteriores.

3.17. Análise de expressão de mRNA por PCR em tempo real

A análise de expressão do RNA mensageiro (mRNA) utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi feita para avaliar o perfil de ativação das células. Para isso, o mRNA total foi extraído dos macrófagos derivados de medula óssea sem ativação (MDMO ϕ) e alternativamente ativado (MDMO A.A) utilizando o kit ReliaPrep RNA Miniprep System (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após extração, o mRNA total foi quantificado usando um aparelho Nanodrop Lite (Thermo Fisher), seguido da reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit iScript cDNA Synthesis (Biorad, Hercules, CA, EUA) no aparelho Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Por fim, a PCR em tempo real foi feita no Rotor-Gene Q (Qiagen) e os resultados analisados utilizando $2^{-\Delta\Delta CT}$ para determinar o aumento em relação ao gene constitutivo. A expressão de cada gene foi normalizada para a expressão de *actb* (β -actina) e comparadas aos MDMO A.A. Os genes avaliados e suas respectivas sequências estão na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers

Gene	Forward	Reverse
<i>actinb</i>	5'-AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA-3'	5'-TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT-3'
<i>chil3</i>	5'-AGAAGGGAGTTCAAACCTGGT-3'	5'-GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA-3'
<i>retnla</i>	5'-AATCCAGCTAACTATCCCTCCA -3'	5'-CAGTAGCAGRCATCCCAGCA-3'
<i>arg1</i>	5'-CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT-3'	5'-CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT-3'

3.18. Terapia celular com MDMO

A terapia celular com MDMO foi realizada durante a cinética de lesão hepática aguda induzida por APAP, exatamente 16 horas pós-indução, os camundongos receberam por via intravenosa uma suspensão de MDMO, 1×10^6 células ativadas ou não em 100 μ l, pelo plexo orbital. Os grupos, controle e APAP 24 horas, receberam o mesmo volume do veículo, PBS. A terapia foi analisada 8 horas após o tratamento, totalizando 24 horas após o começo do modelo de lesão. Nesse tempo ensaios de citometria de fluxo, histologia hepática, microscopia intravital confocal, e remoção bacteriana do sangue foram realizados conforme descritos previamente.

3.19. Mineração de dados

Os dados brutos de expressão gênica foram gerados por ensaio de microarranjos (*microarray*) e depositados no banco de dados público do National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) com o identificador GSE55606 (Zigmond *et al.*, 2014). Inicialmente, os dados de expressão de chips diferentes foram normalizados computando o RMA (*Robust Multichip Average*) (Irizarry *et al.*, 2003). Em seguida, a análise de expressão diferencial foi realizada usando modelos lineares, sempre contraste entre dois grupos usando pacote “limma” para programa R (Ritchie *et al.*, 2015). Os p-valores (p.values) foram corrigidos (p.adj) calculando o FDR (*False Discovery Rate*, ou Benjamini-Hochberg). Os resultados foram considerados significativos quando $p.adj < 0,05$.

Após obtenção do p.adj utilizamos o pacote “clusterProfiler” para programa R (Wu *et al.*, 2021) para fazer enriquecimento de vias através do banco

de dados Kegg Pathways (<http://www.kegg.jp/>) (Kanehisa, 2019; Kanehisa and Goto, 2000). As vias foram consideradas diferencialmente expressa quando $p_{adj} < 0,05$ (FDR). Em seguida, a análise de componente principal (PCA) foi feito com base no padrão global de expressão de genes das amostras, para identificar se o perfil de expressão foi capaz de separar os tipos celulares. Análise essa que foi feita usando pacote básico do R e o pacote “factoextra” (Kassmbara, 2020). Por fim, a visualização da expressão gênica de cada via enriquecida foi gerada usando pacote “pathview” do programa R.

3.20. Análise de dados e estatística

Os dados de microscopia foram analisados utilizando o software NIS-Elements Advanced Research (Nikon Instruments). Os vídeos foram formatados e gerados utilizando o software Sony Vegas Pro 16 (Sony, Tokyo, Japan). Os dados de Citometria de Fluxo foram analisados com o auxílio do software FlowJo v10 (BD Biosciences). Os dados dos ensaios bioquímicos foram analisados utilizando o programa SoftMax v5.4.1 (Molecular Devices). Todos os dados quantitativos dados passaram por análise de normalidade, os paramétricos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) ou desvio padrão da média (SD) para cada grupo. Para determinar diferenças entre dois grupos, utilizamos o teste *t*-Student. Nos ensaios de múltiplos grupos realizamos o teste one-Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey para determinar diferenças entre os grupos avaliados. Por outro lado, os dados não paramétricos foram apresentados como mediana, e o teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney, para análises entre duas variáveis, e o Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn, para análises entre três ou mais variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para Windows 10 (Microsoft). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. A lesão hepática aguda induzida pela sobredose de APAP promove dano ao parênquima e disfunção hepática

A lesão hepática aguda induzida por sobredose de APAP é bem estabelecida em modelo murino, possibilitando o estudo do início, progressão e resolução da inflamação hepática (Marques *et al.*, 2015b; Mattos *et al.*, 2020), e apresenta, parâmetros bem definidos para avaliação da eficácia do modelo (McGill and Jaeschke, 2019). Primeiramente, realizamos a indução da lesão pela administração de APAP (600mg/kg), por gavagem oral, 15 horas após o período de jejum, em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J (Figura 1A). Observamos uma taxa de mortalidade de 25 % no grupo experimental dentro das primeiras 24 horas (Figura 1B), uma taxa similar à observada em humanos (28%) em casos de sobredose por APAP (Stravitz and Lee, 2019), mostrando assim, a robustez e relevância clínica do modelo utilizado.

Em seguida, para melhor avaliarmos os aspectos hepáticos do nosso modelo, realizamos a análise histológica do órgão durante toda a cinética da LHA, uma vez que é uma inflamação tempo dependente. Observamos áreas de necrose ao redor das veias centro-lobulares nos tempos de 12 horas (setas vermelhas) e 24 horas (setas verdes) após indução da lesão – áreas essas que se conectam umas às outras, compreendendo uma grande região do parênquima (Figura 1C). Por outro lado, seguindo a cinética da lesão, no tempo de 72 horas pós-APAP observamos um aspecto resolutivo no tecido hepático (setas azuis), e nos tempos seguintes, 7 e 15 dias, um aspecto similar ao do grupo controle (Figura 1C). A seguir, esses aspectos histológicos foram analisados usando um escore histopatológico, baseado na integridade do parênquima, quantidade e tamanho das áreas de necrose, e presença de infiltrado inflamatório (Kleiner, 2014). Como resultado, observamos um escore elevado na lesão 12 e 24 horas pós-APAP – estabelecendo esses tempos como a fase aguda e o pico da lesão –, seguido da redução com 72 horas – fase resolutive – e do retorno aos níveis basais 7 e 15 dias (Figura 1D), indicando, assim, a autorresolução da inflamação hepática.

Outros aspectos, além dos histológicos, são importantes para determinação da lesão hepática, sendo eles ensaios indiretos que medem

biomarcadores no sangue indicativos de injúria no órgão. Na prática clínica dois testes são utilizados para esse fim (McGill and Jaeschke, 2019). Um deles é a dosagem de uma enzima intracelular hepática no soro, a alanina aminotransferase (ALT), indicando a presença de lesão hepática – em situações normais, essa enzima é encontrada apenas no interior os hepatócitos. Observamos um aumento de ALT sérico na fase aguda, 12 e 24 horas após a indução da lesão e, novamente, os níveis retornam ao basais na fase resolutiva, a partir de 72 horas, que se mantém até o final da cinética (Figura 1E). Outro teste baseia-se na avaliação da função hepática de depuração de moléculas. Utilizando a dosagem do verde de indocianina, um corante que, após administração, se liga a proteínas plasmáticas e é eliminado da circulação exclusivamente pelos hepatócitos, encontramos uma capacidade depurativa reduzida no fígado 24 horas pós-APAP, uma vez que maiores quantidade dessa substância foram detectadas no soro dos animais (Figura 1F). Mais uma vez, 72 horas pós-APAP, a capacidade de depuração do verde de indocianina retornou ao nível basal, mostrado pela redução nos níveis séricos do corante (Figura 1F).

Concluindo, assim, que em todos os parâmetros avaliados, nas 24 horas iniciais, ocorre o pico da lesão e, a partir de 72 horas, se inicia a remissão da mesma, com a estabilização da sobrevivência, aquisição de aspectos histológicos resolutivos, e retorno dos valores séricos de ALT e ICG ao nível basal.

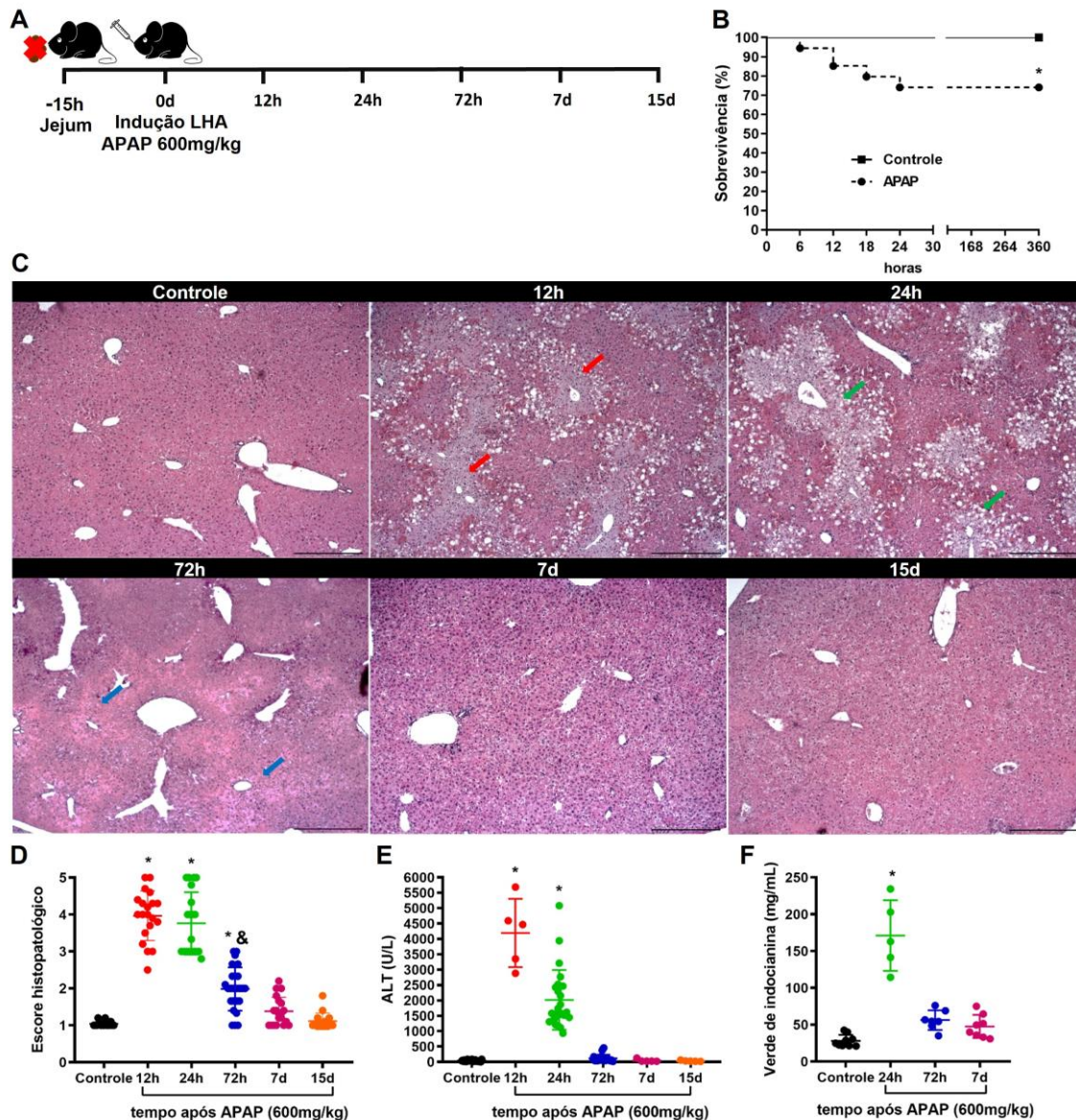


Figura 1. A lesão hepática aguda induzida pela overdose de acetaminofeno promove extensa lesão tecidual com perda de parênquima e formação de extensas áreas de necrose. (A) Esquema da indução de LHA por overdose de acetaminofeno (APAP; 600mg/kg) em camundongos C57BL/6J fêmeas com 8 a 10 semanas de idade. (B) Curva de sobrevivência (%) dos animais após indução de LHA por tempo em horas; $n \geq 9$ animais por grupo. (C) Imagens representativas de histologias hepáticas da cinética da LHA coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E); escala = 500 μ m. (D) Escore histopatológico das histologias H&E da cinética da LHA; $n \geq 9$ animais por grupo. (E) Avaliação da lesão hepática pela dosagem dos níveis de aspartato aminotransferase (ALT) no soro dos animais; $n = 5-15$ animais por grupo. (F) Disfunção hepática avaliada pela dosagem do verde de indocianina no soro dos animais; $n = 5-9$ animais por grupo. Dados representativos de 2 ou mais experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle; & indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo 24h após APAP, usando análise de Mantel-Cox para sobrevivência (B) e one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey para as demais análises (D-G). (* e & = $p < 0.05$).

4.2. A inflamação gerada pela LHA é predominantemente neutrofílica, com alterações significativas em outras populações de células mieloides mononucleares

Uma vez estabelecido o modelo de LHA, decidimos avaliar o perfil celular mielóide inato no processo inflamatório desencadeado pela sobredose de APAP, já que essas células são as principais células imunes envolvidas em processos inflamatórios agudos. Para tanto, realizamos ensaio de citometria de fluxo, com foco na fase aguda (24 horas iniciais), utilizando a estratégia de gate apresentada na Figura 2A. Em termos de porcentagem, observamos uma redução significativa na proporção da população de células de Kupffer e um aumento expressivo de neutrófilos nos tempos de 12 e 24 horas pós-APAP. Além disso, essa fase é marcada por um grande infiltrado de monócitos inflamatórios (Ly6C^{hi}CD11b⁺), enquanto há uma pequena redução na porcentagem de monócitos pró-resolutivos (Ly6C^{lo}CD11b⁺) (Figura 2B). Analisando também o número absoluto de células, o mesmo padrão é observado, confirmando que há uma redução populacional nas células de Kupffer, um massivo infiltrado de neutrófilos e alteração do perfil de monócitos para um perfil pró-inflamatório (Ly6C^{hi}CD11b⁺) (Figura 2C).

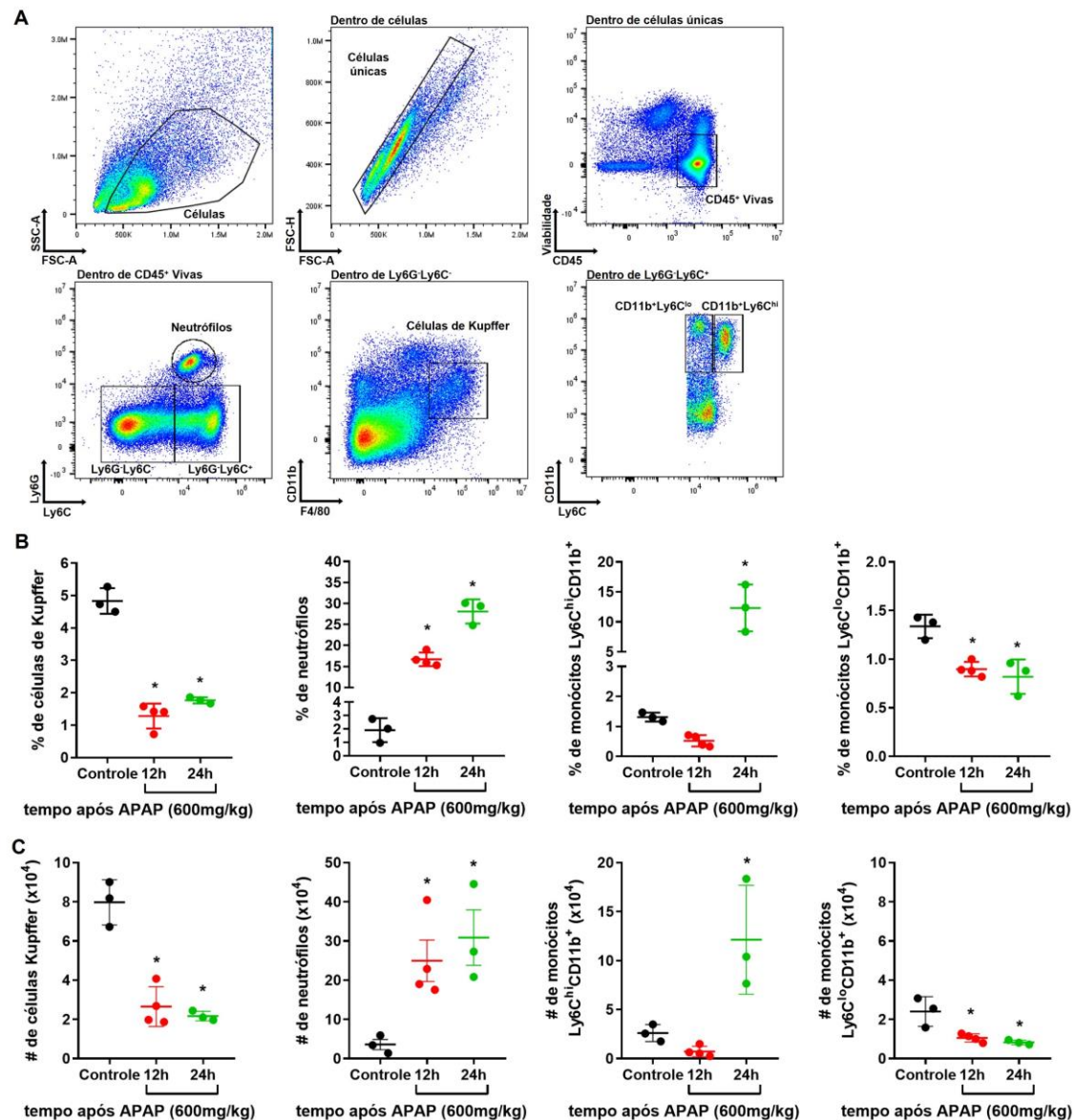


Figura 2. A LHA gera uma inflamação predominantemente neutrofílica e com alterações significativas nas células mieloides mononucleares. (A) Estratégia de gate utilizada para analisar as células mieloides no fígado dos animais durante a lesão hepática. (B) Porcentagem (%) das diferentes populações mielóides analisadas dentro das células CD45⁺ vivas durante a fase aguda da injúria hepática induzida pela overdose de acetaminofeno.; n = 3-5 animais por grupo. (C) Número absoluto das subpopulações de células mieloides vivas ajustado para o número total de células hepáticas não parenquimais durante a fase aguda da LHA; n = 3-5 animais por grupo. Dados representativos de 2 ou mais experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando análise one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey para as demais análises (* = p < 0.05).

4.3. A redução populacional das células de Kupffer abre um importante nicho hepático

Uma vez que observamos por citometria uma redução significativa na população de KCs durante a fase aguda do nosso modelo (Figura 2B e C), decidimos melhor avaliar a dinâmica do nicho de células de Kupffer durante a cinética da LHA. Para isso, inicialmente definimos os parâmetros morfológicos destas células através de MIV, administrando anticorpo anti-F4/80 de forma intravenosa (Figura 3A). A determinação desses parâmetros foi essencial para definir de forma precisa, quais células seria, de fato, células de Kupffer – para além da marcação apenas–, permitindo assim, uma análise mais acurada homogênea, exclusão de outras células F4/80⁺, como subtipos de monócitos e macrófagos presentes na cápsula que envolve o fígado (Sierro et al., 2017). Assim, foram definidos em duas dimensões os seguintes parâmetros: área das células, aproximadamente 300mm² (Figura 3B); comprimento celular, em média 50mm (Figura 3C); extensão dos prolongamentos celulares, em torno de 2mm (Figura 3E); e, por fim, a circularidade das células (definida por uma unidade arbitrária), próxima de 0,4 (quanto mais próximo do 0 menor será a circularidade) (Figura 3E).

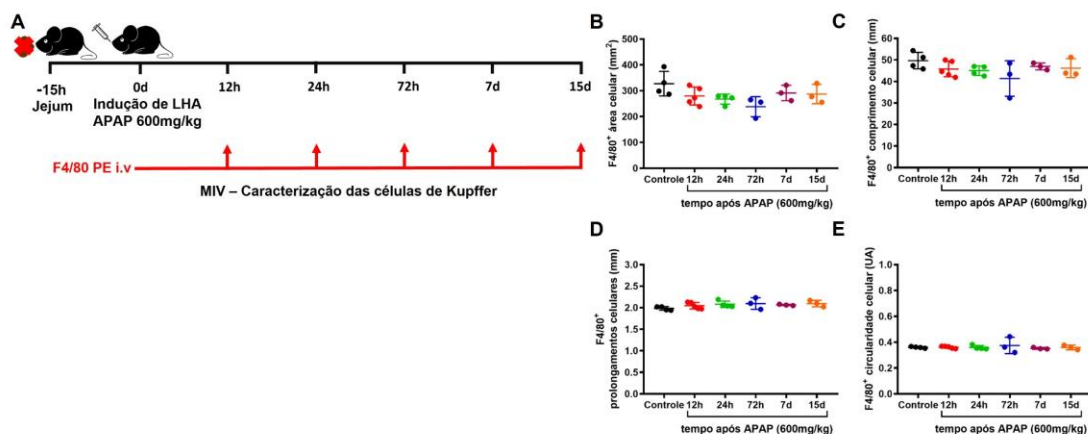


Figura 3. Definição dos aspectos morfológicos das células de Kupffer por MIV. (A) Esquema do modelo murino para overdose de acetaminofeno e marcação das células de Kupffer por injeção intravenosa de anti-F4/80 PE, 20 minutos antes da cirurgia e microscopia intravital. Os seguintes parâmetros das células de Kupffer foram definidos durante a cinética da LHA: área celular (B); comprimento celular (C); prolongamentos celulares (D); circularidade celular (E). $n \geq 3$ animais por grupo e 10 imagens por camundongo. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. Análise estatística realizada usando Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM.

Com os parâmetros morfológicos definidos, utilizamos novamente MIV para visualizar, no tecido, o posicionamento das células de Kupffer e caracterizar sua dinâmica populacional durante a LHA. Para esse fim, utilizamos anticorpos anti-CD31, para marcação da vasculatura hepática, anti-F4/80, para marcação das KCs (David *et al.*, 2016), o corante sytox green, para marcação do DNA extracelular presente nas áreas de necrose (Marques *et al.*, 2015b). Como resultado, o fígado em homeostase apresenta estrutura normal do parênquima, com distribuição homogênea de grânulos de ácido retinóico, excitados utilizando o laser de 405nm e representados pela autofluorescência hepática (azul) (Figura 4A). Além disso, não há presença de DNA extracelular (verde), mas há uma população de células de Kupffer (vermelho) regularmente distribuída dentro da vasculatura hepática (branco) (Figura 4A). Nos estágios iniciais da lesão, 12 e 24 horas pós-APAP, observamos a destruição do parênquima e da vasculatura hepática, com uma massiva deposição de DNA na área de necrose e nos capilares sinusoides remanescentes. Observamos o desaparecimento das células de Kupffer especificamente na área de necrose (Figura 4A). Continuando com a cinética da LHA, a partir de 72 horas, já havíamos observado a remissão da lesão e, por MIV, observamos o retorno da vasculatura e parênquima ao

estado de homeostase, sendo que somente a população de fagócitos não apresenta ainda a sua distribuição regular pelo fígado (Figura 4A). Nos tempos mais tardios, 7 e 15 dias, o fígado retorna completamente ao estado de homeostase em todos os parâmetros avaliados.

Na sequência, novamente utilizamos os padrões morfométricos estabelecidos para as células de Kupffer para quantificar a perda populacional durante a LHA. Observamos que, na fase aguda, a redução populacional é significativa (Figura 4B, painel esquerdo) e gira entorno de 50% de redução em relação ao controle (Figura 4B, painel direito). Como descrito anteriormente, o tempo de 72 horas é uma fase de transição, em que os parâmetros hepáticos estão retornando à normalidade. Isso também foi observado com relação ao número das KCs, que aumenta, aproximando dos valores de homeostase. O nível populacional dessas células retorna no tempo de 7 dias e se mantém no tempo seguinte, indicando completo retorno e estabilidade. Concluímos, assim que a perda populacional ocorre especificamente nas áreas de necrose presentes na fase aguda. Todavia, é transiente e acompanha a remissão da lesão.

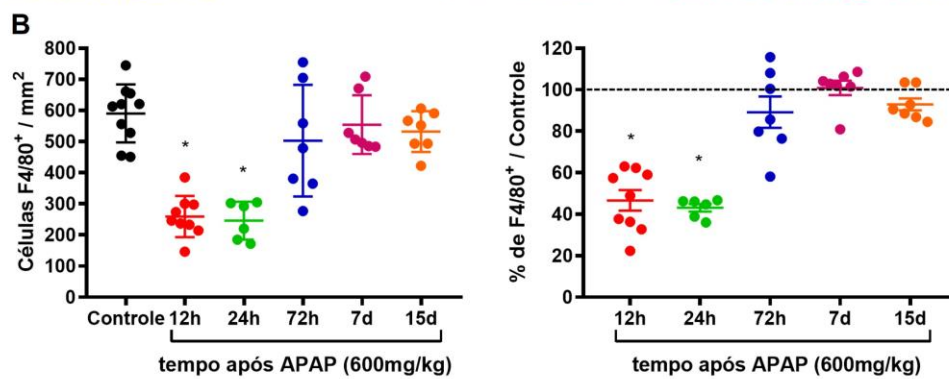
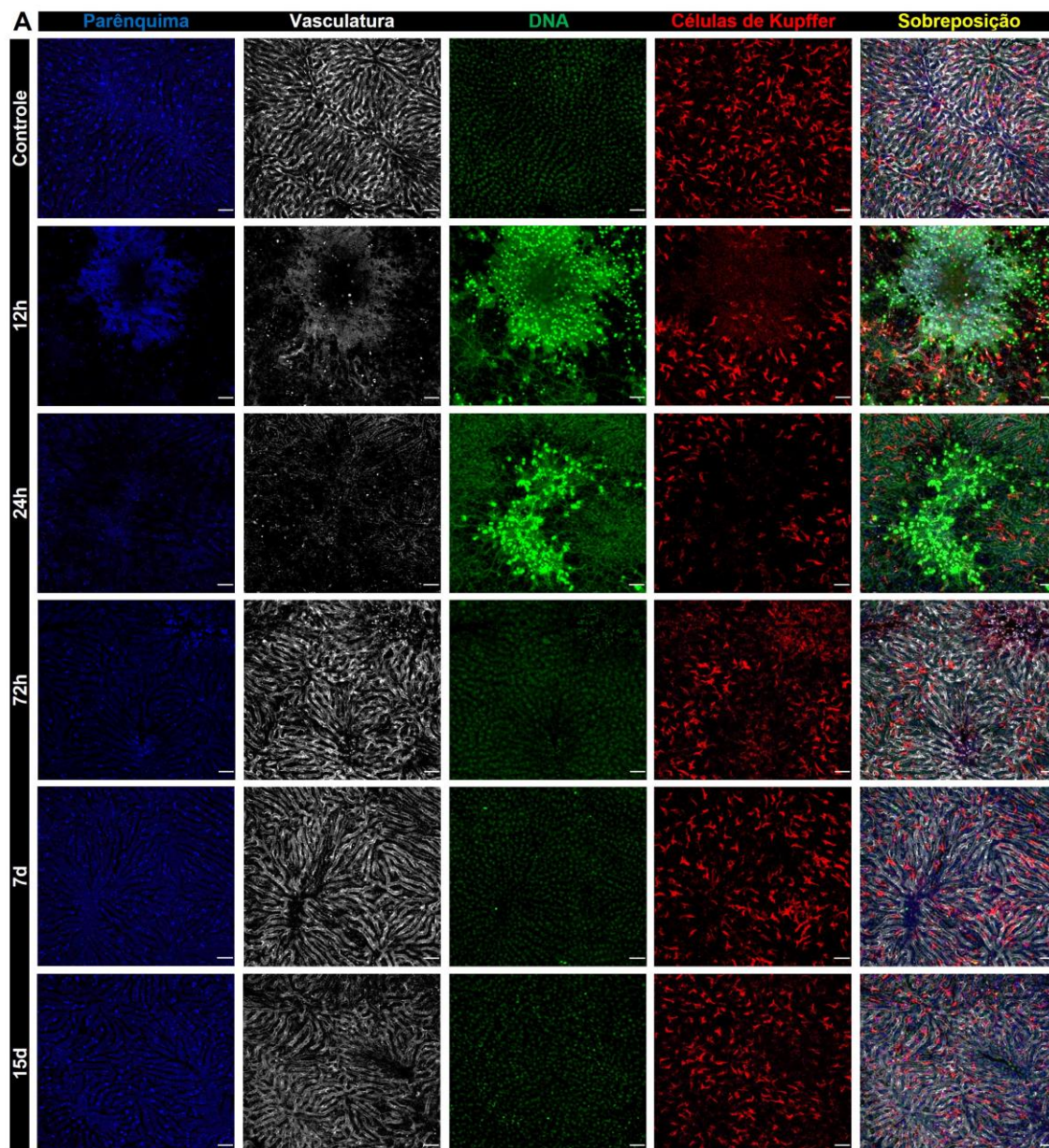


Figura 4. A lesão hepática aguda promove redução na população de células de Kupffer. (A) Imagens representativas de microscopia intravital (MIV) durante o processo de LHA para caracterizar a arquitetura hepática, lesão e células de Kupffer; Parênquima é representado pela autofluorescência hepática em azul; Vasculatura hepática, em branco, marcada por anticorpo anti-CD31 PE; Células de Kupffer marcadas, em vermelho, por anticorpo anti-F4/80 APC; DNA em verde, marcado por sytox green; escala= 50 μ m. (B) Quantificação das Células de Kupffer por área (B) e variação da população em relação ao Controle (100%) (C); n \geq 5 animais por grupo e 10 imagens por animal. Dados representativos de 3 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* = p < 0.05).

4.4. A redução na população de KCs durante a fase aguda ocorre predominantemente por apoptose

A redução na população dos macrófagos residentes durante um processo inflamatório tecidual é comum a diversos órgãos (Barth et al., 1995; Bleriot *et al.*, 2020; Ginhoux et al., 2017), incluindo o fígado (Bleriot *et al.*, 2015; Borst *et al.*, 2017; Remmerie et al., 2020). Essa redução também foi observada em nosso modelo, o que nos trouxe o questionamento de qual processo de morte celular estaria levando ao desaparecimento das células de Kupffer. Para tanto, decidimos avaliar, inicialmente por citometria de fluxo, utilizando os marcadores anexina V e iodeto de propídio (PI) (Figura 5A), qual o programa de morte celular predominante na fase aguda da lesão. No tempo de 12 horas após sobredose por APAP, a morte por apoptose foi predominante (Anexina V⁻PI⁻) em comparação com necroptose (Anexina V⁺PI⁺) – também conhecida como apoptose tardia –, e com morte por necrose (Anexina V⁻PI⁺) (Figura 5B). Já no tempo de 24 horas pós APAP, a porcentagem de células de Kupffer em apoptose continua significativamente elevada, ao passo que, os demais programas celulares reduzem aos níveis basais (Figura 5B). Em ambos os tempos, quando avaliamos KCs viáveis (Anexina V⁻PI⁻), observamos uma redução na porcentagem 12 e 24 horas pós-APAP.

Visto a predominância do programa apoptótico nas células de Kupffer no início da LHA, utilizamos a marcação por imunofluorescência, para Caspase-3 clivada, em cortes do fígado para confirmar que a via apoptótica está, de fato, ativa nessas células. Observamos em ambos os tempos, 12 e 24 horas, a marcação para Caspase-3 clivada (verde) colocalizada com a marcação para as células de Kupffer (vermelho) (Figura 5C). Quando, quantificamos essa marcação, notamos um aumento na porcentagem (painel esquerdo) e na quantidade (painel direito) de KCs com o programa apoptótico ativo (Figura 5D), confirmando que a perda populacional desse tipo celular ocorre predominantemente por apoptose.

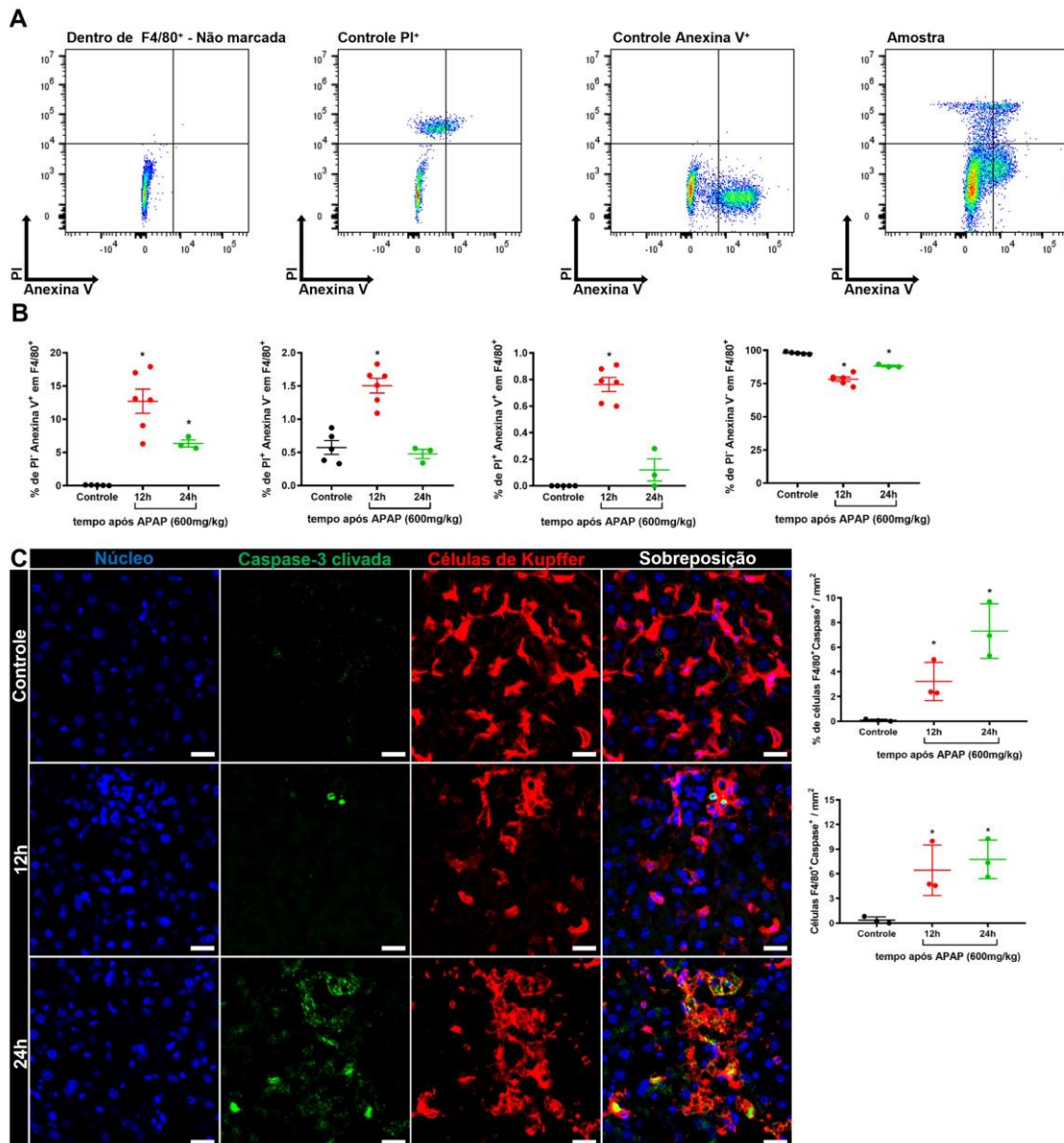


Figura 5. A redução na população de células de Kupffer ocorre predominantemente por apoptose.

(A) Estratégia de gate para Anexina V e Iodeto de Propídio (PI) dentro da população de células de Kupffer (F4/80⁺). (B) Ensaio de citometria de fluxo mostrando o tipo de morte celular das células de Kupffer durante o processo de ALI, dividindo entre as células em apoptose (Superior esquerdo, Anexina V⁺PI⁺), células em necrose (Superior direito, Anexina V⁻PI⁺), células em necroptose (Inferior esquerdo, Anexina V⁺PI⁺), e as células que se mantêm vivas (Inferior direito, Anexina V⁻PI⁻); $n \geq 3$ animais por grupo. (C) Imagens representativas de marcação por imunofluorescência mostrando o núcleo (DAPI, azul), caspase-3 clivada (verde), e células de Kupffer (Vermelho); escala = 20 μ m. (D) Porcentagem (%; painel esquerdo) e número absoluto (painel direito) de células de Kupffer positivas para caspase 3 clivada; $n \geq 3$ animais por grupo e 10 imagens por animais. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* = $p < 0.05$).

4.5. O nicho disponibilizado pela morte das KCs durante a fase aguda é ocupado pela entrada de dois tipos celulares diferentes

Como observamos anteriormente, a população de células de Kupffer, após sofrer redução durante a fase aguda da LHA, começa a se restabelecer na fase resolutiva e retorna por completo 7 e 15 dias após indução da lesão (Figura 4). Com isso, procuramos se o nicho aberto gerado na fase aguda é ocupado por novas células. Em nossos ensaios prévios de MIV, utilizados para avaliar a dinâmica dessas células na LHA, notamos a presença de aglomerados de células de Kupffer no grupo 72 horas pós-APAP (Figura 6A, quadrado verde). Esses aglomerados no fígado já foram descritos como KCs em multiplicação durante a resolução da inflamação hepática induzida por um quadro infeccioso, em que também há uma perda populacional (Bleriot *et al.*, 2015). Tendo conhecimento disso, buscamos avaliar a capacidade de proliferação das células de Kupffer por meio do ensaio de imunofluorescência. Observamos que os aglomerados de KCs na fase resolutiva apresentam, marcação para Ki67 (Figura 6B, quadrado verde) indicando que eles são formados por células em replicação. A quantificação das imagens revelou um aumento significativo do número e da porcentagem das KCs em multiplicação (Figura 6C), evidenciando que as células remanescentes contribuem para reposição do nicho aberto na fase aguda da LHA.

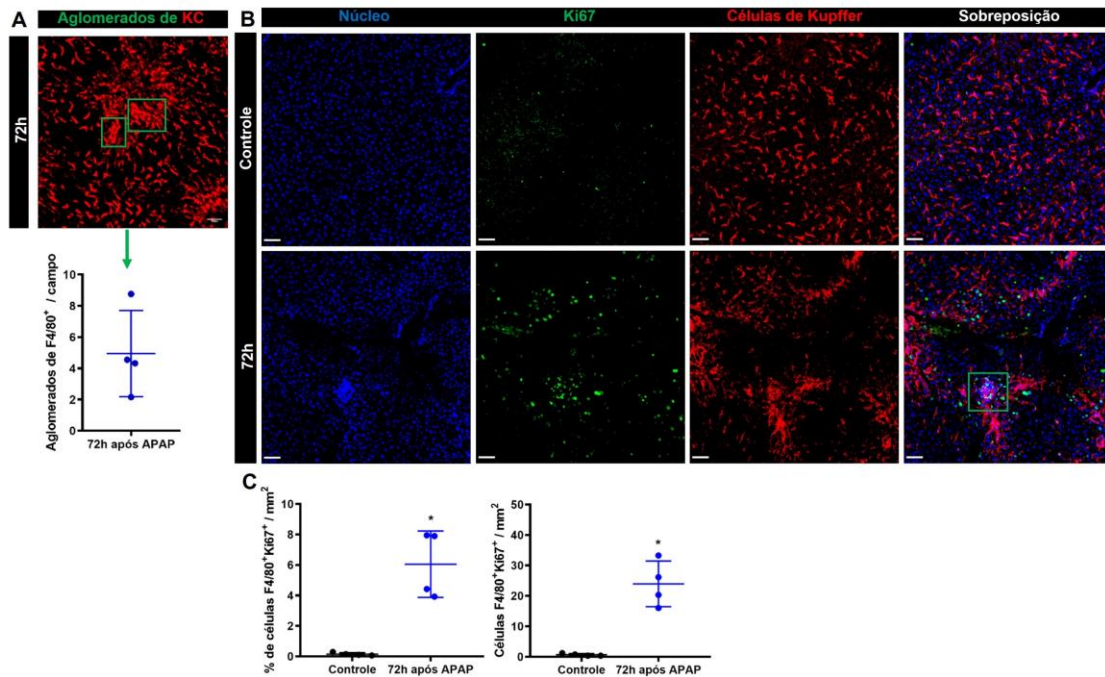


Figura 6. As células de Kupffer remanescentes contribuem para reposição do nicho através de proliferação celular. (A) Imagens representativas de MIV para ilustrar os aglomerados de células de Kupffer presentes na fase resolutiva – 72 hours após indução da lesão; escala = 50 μ m; n = 4 animais por grupo e 10 imagens por camundongo. (B) Avaliação da proliferação de células de Kupffer 72 horas após overdose de acetaminofeno por imunofluorescência mostrando o núcleo (DAPI, azul), Ki67 (verde), e células de Kupffer (vermelho); escala = 50 μ m. (C) Porcentagem (%; painel superior) e número (Painel inferior) de células de Kupffer ou aglomerado de células colocalizados com Ki67; n = 4 animais por grupo e 10 imagens por animal. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* = $p < 0.05$).

Por um lado, mostramos que as células remanescentes contribuem para ocupação do nicho, por outro, estudos mostraram que em outros modelos de lesão hepática os monócitos podem ocupar o nicho e se diferenciarem em macrófagos residentes (David *et al.*, 2016; Guilliams and Scott, 2017; Scott *et al.*, 2016). Como vimos, na caracterização prévia, por citometria de fluxo, do perfil celular mieloide no processo inflamatório desencadeado pela LHA, há um grande infiltrado de monócitos pró-inflamatórios na fase aguda da LHA (Figura 2B e C). Agora, para entender melhor a dinâmica dessas células no fígado, geramos camundongos fluorescentes para os dois principais marcadores de monócitos murinos, os receptores de quimiocinas CX3CR1 e CCR2, nos quais um dos alelos do gene em questão está substituído pelo gene que codifica,

respectivamente, as proteínas fluorescentes verde (GFP) e vermelha (RFP) - CX3CR1^{+/gfp}CCR2^{+/rfp}.

Primeiramente induzimos a lesão nos camundongos gerados (Figura 7A), e assim como nos camundongos selvagens, confirmamos que a lesão que se estabelece e é auto remissiva, pois os níveis de ALT sérico estão aumentados 24 horas e se normalizam 72 horas pós-APAP (Figura 7B). Partimos, então, para visualização das populações de interesse por MIV e encontramos, no tempo de 24 horas, 3 populações de monócitos na extensa área de necrose – definida pelo parênquima hepático alterado (em azul). A população CX3CR1⁻CCR2⁺ (em vermelho) possui um perfil pró-inflamatório, corresponde à população de monócitos Ly6C^{hi}CD11b⁺ mostrada previamente e é predominante em relação às demais. As células duplo positivas CX3CR1⁺CCR2⁺ (em amarelo) correspondem a monócitos de perfil transitório, que não identificamos na citometria de fluxo. A última população, representada pelas células CX3CR1⁺CCR2⁻ (em verde), correspondem aos monócitos pró-resolutivos Ly6C^{lo}CD11b⁺ detectados na citometria (Figura 7C e D). Na fase resolutiva, 72 horas pós-APAP, a lesão limita-se à região perivascular e o fígado apresenta redução na população pró-inflamatória CX3CR1⁻CCR2⁺ ao mesmo tempo em que mantém as populações CX3CR1⁺CCR2⁺ e CX3CR1⁺CCR2⁻, que são pró-resolutivas. Podemos concluir, assim, que a dinâmica dos fagócitos mononucleares no fígado é tempo-dependente, com o predomínio celular variando de acordo com o estágio da lesão. Além disso, observamos que os monócitos que infiltram no tecido, independente do fenótipo, ocupam especificamente as áreas de necrose, que são as regiões desprovidas de células de Kupffer.

Em conjunto, esses dados sugerem que o nicho aberto durante a fase aguda da LHA induzida por APAP, é ocupado transitoriamente tanto por monócitos circulantes (que pode posteriormente se diferenciar em macrófagos) quanto por novas KCs originadas da replicação das células remanescentes.

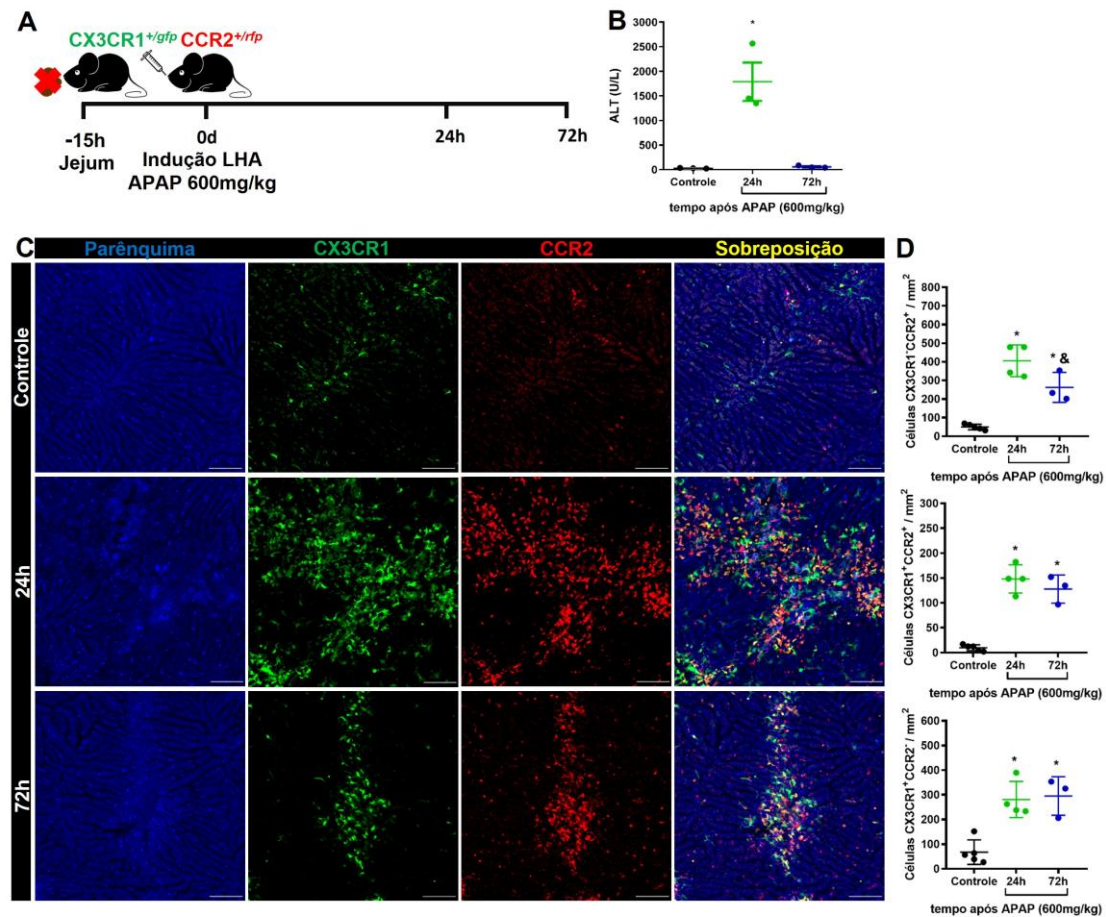


Figura 7. Os diferentes subtipos de monócitos recrutados posicionam-se estrategicamente nas áreas de necrose durante o curso da LHA. (A) Esquema da indução da LHA por overdose de acetaminofeno em camundongos fêmeas *CX3CR1^{+/-gfp} CCR2^{+/-rfp}* de 8-10 semanas. (B) Avaliação da lesão hepática pela dosagem dos níveis de aspartato aminotransferase (ALT) no soro dos animais; $n = 3$ animais por grupo. (C) Imagens representativas de MIV ao longo da LHA mostrando em o parênquima (azul, autofluorescência hepática), e as subpopulações de monócitos: *CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{-/-}* em verde, *CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}* em amarelo e *CX3CR1^{-/-}CCR2^{RFP/+}* em vermelho; escala = 100 μ m. (D) Quantificação das diferentes subpopulações de monócitos: *CX3CR1^{-/-}CCR2^{RFP/+}* (painel superior), *CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}* (painel do meio), *CX3CR1^{-/-}CCR2^{RFP/+}* (painel inferior); $n \geq 3$ animais por grupo e 10 imagens por animal. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle; & indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo 24h após APAP usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* e & = $p < 0.05$).

4.6. A LHA provoca uma janela de susceptibilidade a infecções

Até agora, na caracterização do nosso modelo de LHA induzida pela sobredose de acetaminofeno, encontramos dano ao parênquima, disfunção hepática e uma inflamação robusta, com alterações significativas em populações celulares mieloides importantes, como as células de Kupffer, que sofrem redução significativa em número. Ainda, sabendo que, do ponto de vista imunológico, o fígado é um órgão crucial de defesa contra infecção por via sanguínea, com as células KCs desempenhando importante papel, e que muitas vezes os pacientes com LHA desenvolvem um quadro de infecção sistêmica (Karvellas *et al.*, 2009; Rolando *et al.*, 1996), buscamos determinar se a LHA afeta a capacidade de controle de patógenos circulantes.

Para isso, induzimos novamente o modelo de LHA e, nos tempos pós-APAP determinados (12, 24 e 72 horas; 7 e 15 dias), submetemos os animais a um desafio intravenoso com *E. coli* expressando GPF (Figura 8A). Inicialmente, observamos a sobrevivência dos animais no momento mais crítico da LHA, 24 horas após indução da lesão. A infecção bacteriana resultou numa taxa de mortalidade de 40% nos animais que estavam no pico da LHA (Figura 8B). Inicialmente, escolhemos o ponto crítico da lesão (24h) para desafiar os camundongos com a bactéria e acompanhar a sobrevivência. Encontramos que a infecção bacteriana resultou numa taxa de mortalidade de 40% dos animais que estavam no pico da lesão em comparação com animais controle (Figura 8B), sugerindo uma piora na capacidade do organismo de lidar com infecções durante a LHA.

Nesta linha, o próximo passo foi, então, avaliar, um dia após a infecção, a presença de bactérias no fígado e sangue dos animais desafiados durante a cinética da lesão. Utilizando contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs), observamos uma elevada quantidade de UFCs no sangue e fígado de camundongos que receberam bactéria nos tempos de 12 e 24 horas após indução de lesão (Figura 8C). Surpreendentemente, os grupos de 72 horas e 7 dias pós-APAP, que já apresentavam retorno à normalidade, com relação aos níveis séricos de ALT, ICG e aspecto histopatológico, ainda apresentaram maiores números de UFCs no fígado comparados ao grupo controle (Figura 8C). Entretanto, nesses grupos, não houve detecção de bactérias no sangue. Já nos

animais que receberam APAP há 15 dias, a contagem de UFCs retornou ao nível basal no fígado e foi indetectável no sangue.

Esses dados nos indicam uma incapacidade hepática em controlar o crescimento bacteriano de forma mais pronunciada nos tempos agudos e que perdura de forma significativa até a fase resolutive. Mostrando que nos estágios em que os parâmetros hepáticos até aqui avaliados são considerados normais, o sistema imune hepático ainda não retornou a homeostase. Dessa forma, durante essa disfuncionalidade imune do órgão as bactérias podem evadir do fígado e ganharem a circulação sistêmica promovendo um quadro infeccioso disseminado.

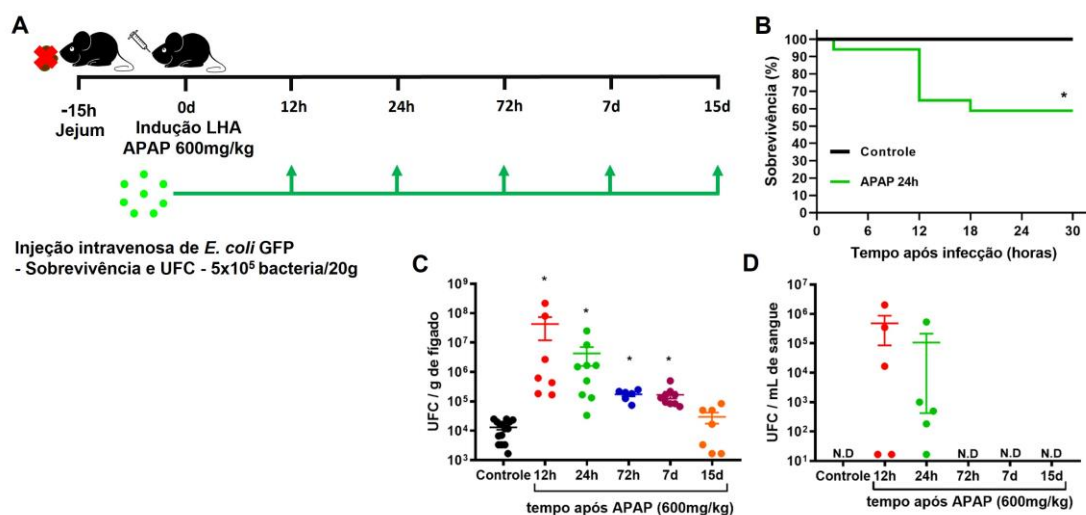


Figura 8. A LHA induzida por sobredose de APAP promovem uma susceptibilidade a infecções. (A) Esquema para desafio intravenoso com *E. coli* GFP durante a cinética da LHA em camundongos C57BL/6J fêmeas de 8-10 semanas de idade. (B) Curva de sobrevivência (%) dos animais controle e 24h após indução de LHA com desafio intravenoso de 5×10^5 bactérias/20g; $n \geq 5$ animais por grupo. Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de *E. coli* GFP no fígado (C) e no sangue (D) 24 horas após o desafio intravenoso com 5×10^5 bactérias/20g; $n \geq 3$ animais por grupo. Dados representativos de 3 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando análise de Mentel-Cox para sobrevivência (B) e teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações (C-D). (* = $p < 0.05$).

4.7. A capacidade hepática de filtrar o sangue se encontra reduzida na fase aguda da LHA

Conforme mostrado no resultado anterior, os animais que receberam o desafio bacteriano nos tempos iniciais da LHA (12 e 24 horas pós-APAP) apresentaram níveis de UFC elevados no sangue, um dia após a infecção. Assim, infere-se que a capacidade de eliminar patógenos circulantes estaria prejudicada durante esse período. Sabendo da importância do fígado nessa função de filtro, decidimos avaliar a capacidade do órgão em remover as bactérias da circulação durante a LHA. Novamente, os animais em diferentes tempos da cinética de LHA foram desafiados com *E. coli*, por via intravenosa e, após 5 minutos, investigamos a presença de bactérias no sangue, por citometria de fluxo, seguindo a estratégia de gate (Figura 9B). Se um maior número é encontrado, temos um indicativo de menor capacidade hepática de remoção de bactérias da circulação. Como resultado, notamos um aumento significativo na quantidade de *E. coli* GFP no sangue dos animais dos grupos de 12 e 24 horas pós-sobredose de APAP (Figura 9C). Níveis esses que retornam ao basal a partir de 72 horas da LHA e se mantêm até o final da cinética, com 15 dias (Figura 9C). Ao comparamos os níveis de bactérias circulantes dos grupos que sofreram LHA com o grupo controle, notamos um aumento de, em média, 5 vezes na quantidade de bactérias circulantes para os tempos iniciais de 12 e 24 horas (Figura 9C).

Uma vez que a quantificação de bactérias no sangue é uma medida indireta de inferir a capacidade hepática de filtro, decidimos, então, visualizar diretamente a dinâmica de *E. coli* no fígado, *in vivo* e em tempo real. Para isso, utilizamos a MIV, em que os animais, já posicionados na plataforma do microscópio recebem por via intravenosa o desafio com *E. coli* GFP, a dinâmica monitorada por 5 minutos desde a chegada ao órgão. Observamos que, no grupo controle, as bactérias que chegam ao órgão são prontamente removidas da circulação, como podemos observar pelo deslocamento mais curto e limitado (Figura 9D). Por outro lado, nos grupos de 12 e 24 horas pós-APAP, as bactérias apresentam um deslocamento mais livre e percorrem maiores distâncias (aproximadamente 400 μm) (Figura 9D), o que indica uma menor retenção pelo fígado, permitindo seu trânsito através do fígado e sua propagação para órgãos

remotos. Já na fase resolutiva e nos tempos tardios, o deslocamento bacteriano é similar ao dos animais controle (Figura 9D), indicando que as bactérias ficando retidas no órgão.

Em conjunto, os nossos dados mostraram, até agora, que a remoção de patógenos da circulação pelo fígado está prejudicada durante os estágios iniciais da LHA e que, mesmo com o retorno da capacidade hepática de filtro na fase resolutiva, o controle do crescimento bacteriano do órgão só retorna 15 dias após indução da lesão.

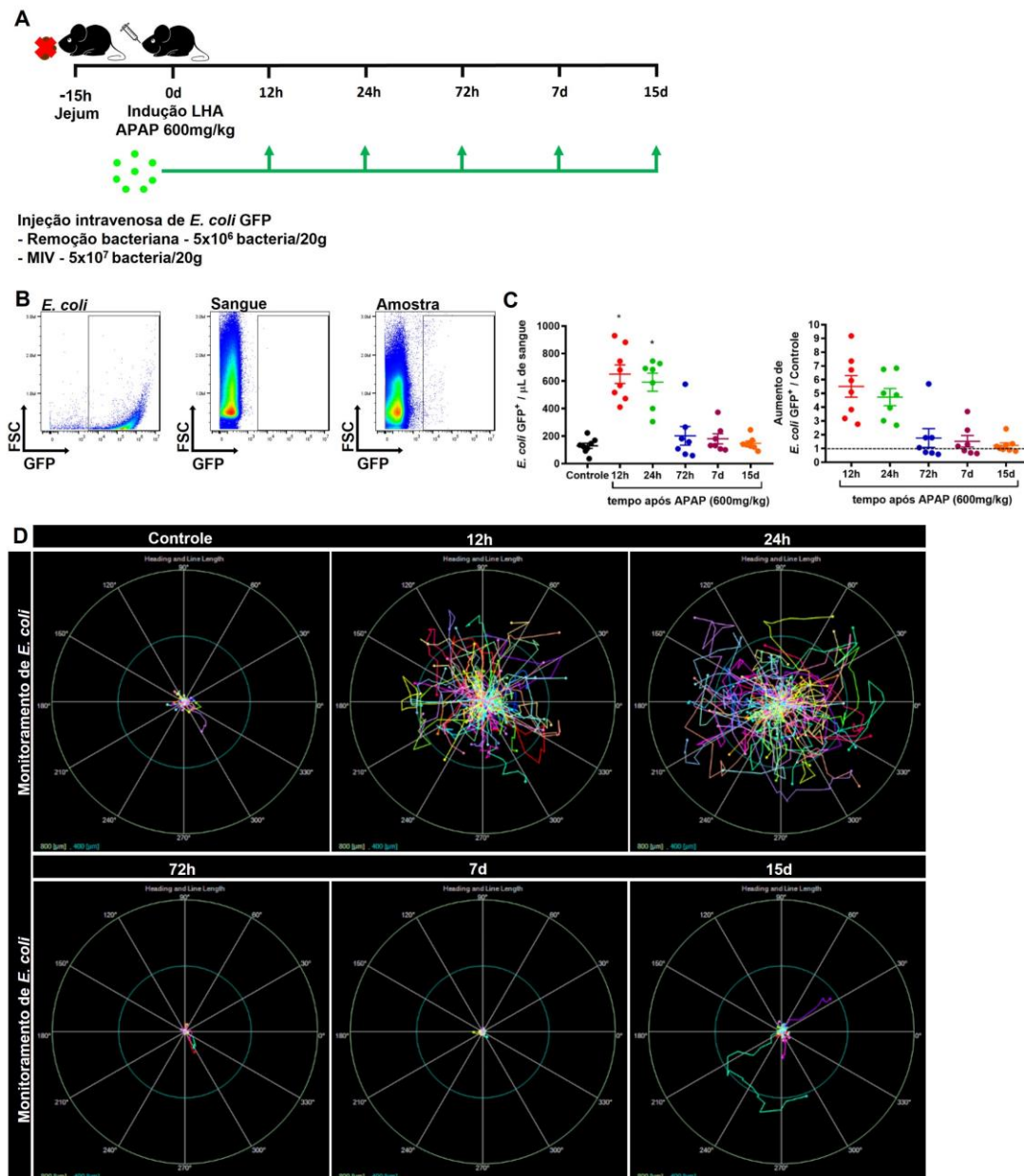


Figura 9. O fígado perde a capacidade de reter as bactérias circulantes na fase aguda da LHA. (A) Esquema para desafio intravenoso com *E. coli* GFP durante a cinética da LHA em camundongos C57BL/6J fêmeas de 8-10 semanas de idade. (B) Estratégia de gate utilizada para contar o número de *E. coli* GFP por 1 μ l de sangue. (C) Quantificação do número de bactérias presentes no sangue dos animais após o desafio intravenoso com 5×10^5 bactérias/20g (painel esquerdo) e determinação perda da capacidade hepática de remoção das bactérias do sangue (painel direito, aumento em relação ao controle = -----1) 5 minutos após desafio; n \geq 3 animais por grupo. (D) Monitoramento *in vivo* e em tempo real da dinâmica das bactérias no fígado durante os 5 primeiros após injeção intravenosa de 5×10^7 bactérias/20g; Imagens representativas do deslocamento bacteriano em cada grupo; escala interna = 400 μ m; escala externa = 800 μ m; n \geq 5 animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* = p < 0.05).

4.8. As células de Kupffer são essenciais para o fígado exercer sua função imunológica primária

Uma vez observado que durante a LHA os animais apresentam uma redução da população de células de Kupffer, ao mesmo tempo em que ocorre uma redução da capacidade do fígado de filtrar o sangue, decidimos avaliar diretamente a remoção de patógenos da circulação pelas KCs.

Para confirmar a função das células de Kupffer em reter as bactérias no fígado, realizamos a depleção das células de Kupffer utilizando lipossomos contendo clodronato (CLL) (Figura 10A). Primeiro, por MIV, obtivemos imagens dos animais controles e tratados e quantificamos as KCs, utilizando os parâmetros morfológicos já estabelecidos. Encontramos uma depleção dose-dependente, com depleção parcial quando são aplicados 50 μ l e 125 μ l da solução de CLL a 5mg/ml e uma depleção total após administração de 200 μ l (Figura 10B e C), que vai de acordo com o descrito pela literatura (David *et al.*, 2016; Van Rooijen and Sanders, 1996). Esses resultados foram também confirmados por citometria de fluxo (Figura 10D). Uma vez alcançada a depleção, em seguida, desafiamos os animais com *E. coli*, visando avaliar a capacidade do fígado de reter esses microrganismos na presença e ausência das células de Kupffer (Figura 10A). Como resultado, observamos que uma redução de 60% das KCs – obtida através da administração de 125 μ L CLL – promove um aumento da evasão de bactérias do fígado, sendo esse aumento mais pronunciado na ausência completa de células de Kupffer (Figura 10E).

Dessa forma, confirmamos que as KCs são as responsáveis pela remoção de patógenos da circulação e consequente retenção no fígado e consequente e que uma redução parcial da população – o que também é observado em nosso modelo de FHA – causa um prejuízo na capacidade hepática em atuar como filtro.

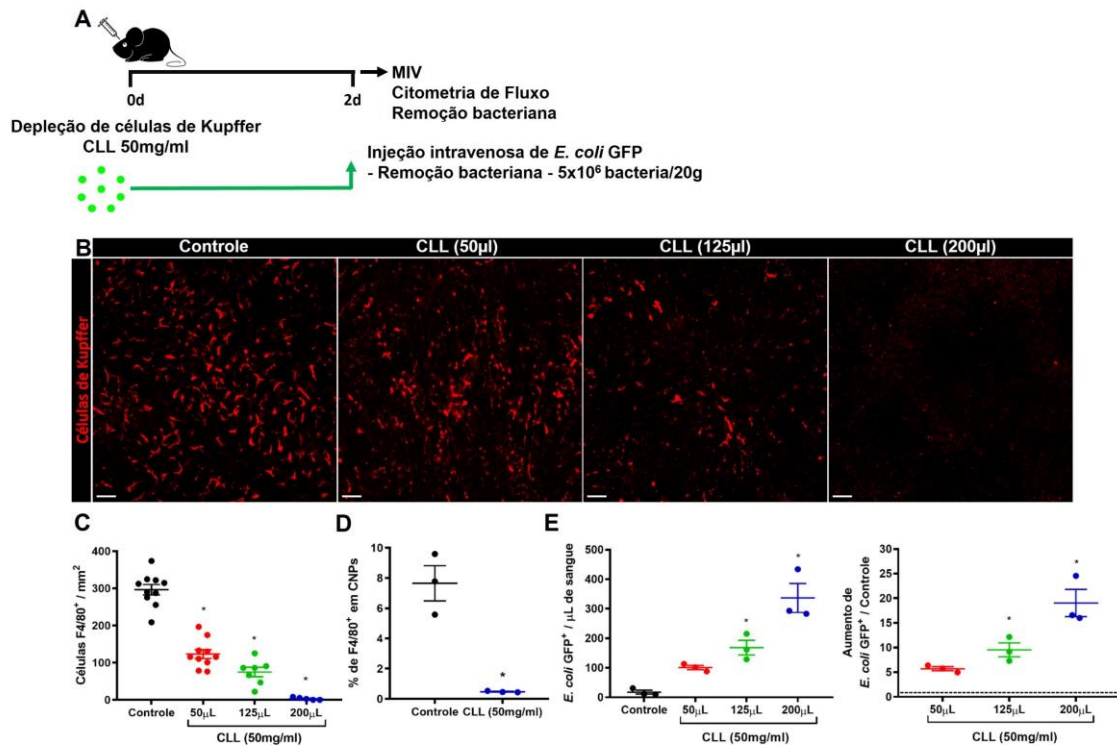


Figura 10. As células de Kupffer são essenciais para a remoção de bactérias do sangue. (A) Esquema resumido da depleção de células de Kupffer utilizando a administração intravenosa de Lipossomos Clodronato (CLL; 50mg/ml) em diferentes volumes e ensaios subsequentes 48 horas após tratamento. (B) Imagens representativas de MIV onde os animais receberam por via intravenosa anti-F4/80, para marcar as células de Kupffer (vermelho), 20 minutos antes da cirurgia; escala = 100µm. Quantificação das células de Kupffer por área de imagem (mm²); n ≥ 5 animais por grupo e 10 imagens por animal. (D) Porcentagem (%) de células F4/80⁺ nas células hepáticas não parenquimais; n = 3 animais por grupo. (E) Quantificação do número de bactérias presentes no sangue dos animais após o desafio intravenoso com 5×10^5 bactérias/20g (Painel esquerdo) e determinação perda da capacidade de remoção das bactérias do sangue pelo fígado (Painel direito, aumento em relação ao controle = -----1) 5 minutos após desafio; n ≥ 3 animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média ± SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* = p < 0.05).

4.9. A fagocitose de bactérias pelas células de Kupffer é prejudicada durante a LHA

Seguindo a linha de raciocínio, nosso próximo passo foi, então, avaliar a capacidade das células de Kupffer em fagocitar bactérias circulantes durante a cinética do nosso modelo experimental de LHA induzida por sobredose de acetaminofeno, que, como já mencionado, apresenta uma redução na população de KCs. Novamente, utilizamos os parâmetros morfológicos estabelecidos para definição das KCs (Figura 3), o que possibilitou avaliar a capacidade fagocítica de forma individualizada, célula a célula, em um sistema *in vivo* e em tempo real. Para isso, utilizamos novamente a marcação intravenosa para KCs e desafiamos os animais nos diferentes tempos pós-APAP com um inóculo de *E. coli*-GFP e avaliamos em tempo real, por MIV, sua captura pelas células de Kupffer durante 5 minutos (Figura 11A).

Inicialmente, o processo de fagocitose foi capturado a cada 10 segundos por 5 minutos, em seguida um filme do processo foi gerado para cada animal. Nos vídeos gerados, observamos que, nos animais controle, as KCs rapidamente capturam as bactérias que chegam ao órgão, uma vez capturadas, permanecem retidas pelas KCs até o final do tempo experimental. Por outro lado, nos tempos de 12 e 24 horas pós-APAP, percebemos que, além de uma menor quantidade de KCs, existem uma menor porcentagem de KCs que são capazes de imobilizar as bactérias. Seguindo a cinética da LHA (72 horas e 7 e 15 dias), a captura de *E. coli* pelas KCs assemelha-se à encontrada nos animais controle (Vídeo Suplementar 1). Com intuito de melhor avaliar as diferenças visualizadas, os vídeos, então, foram quantificados, utilizando diferentes análises. Primeiro, determinamos a porcentagem de células de Kupffer que capturaram bactérias, encontramos uma redução já ao final do primeiro minuto e que se mantém durante os 5 minutos após o inóculo bacteriano nos grupos de 12 e 24 pós-APAP em comparação com os demais grupos (Figura 11B). Quando analisamos o tempo final do vídeo, passado os 5 minutos, cerca de 50% das KCs capturam *E. coli* nos animais controle (Figura 11C).

Em uma segunda análise, observamos uma menor média de *E. coli* capturada por KCs consideradas funcionais durante os 5 minutos (Figura 11D) e ao final do monitoramento (Figura 11E). Mais uma vez, nos tempos tardios da

lesão, os números retornam à normalidade. Todos esses dados estão representados pelas imagens de cada grupo ao final da aquisição do vídeo (Figura 11F). Por fim, decidimos avaliar a internalização das bactérias pelas células de Kupffer, realizamos uma reconstrução em três dimensões (3D) a partir de imagens adquiridas em série Z, na qual também fica evidente, que nos tempos de 12 e 24 horas pós-APAP, uma menor quantidade de KCs colocalizadas com bactérias e um menor número de bactérias internalizadas por KC funcional (Vídeo Suplementar 2, e última coluna da Figura 11F).

Concluimos, assim, que nos tempos iniciais da LHA, a população de células de Kupffer apresenta tanto uma redução do número de células quanto na proporção de células funcionais, em adição a redução na capacidade de capturar bactérias pelas células remanescentes, o que pode explicar a susceptibilidade a infecções do nosso modelo.

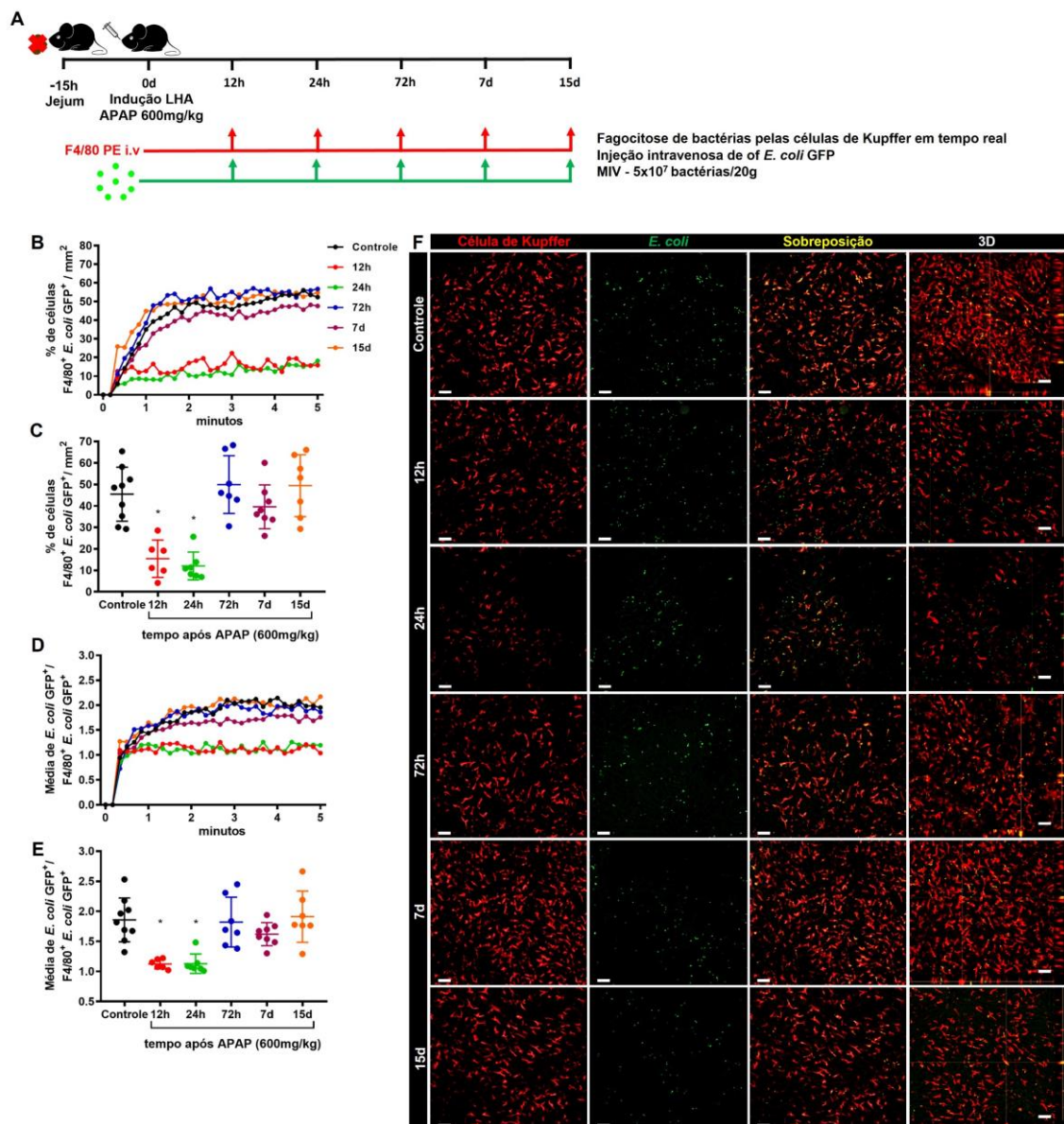


Figura 11. A capacidade fagocítica das células de Kupffer está prejudicada na fase aguda da overdose por APAP. (A) Esquema do desenho experimental utilizado para avaliar a capacidade fagocítica, em tempo real, das células de Kupffer durante a cinética da lesão hepática aguda. Porcentagem (%) de células de Kupffer fagocitando bactérias circulantes a cada 10 segundos por 5 minutos após desafio intravenoso com 5×10^7 bactérias/20g (B) e ao final dos 5 minutos (C); $n \geq 6$ animais por grupo. Quantificação de bactérias fagocitadas pelas células de Kupffer funcionais a cada 10 segundos por 5 minutos após desafio intravenoso com 5×10^7 bactérias/20g (D) e ao final dos 5 minutos (E); $n \geq 6$ animais por grupo. (F) Imagens representativas e da reconstrução 3D (última coluna) realizadas ao final do minuto 5 para cada grupo; Células de Kupffer (vermelho); *E. coli* GFP (verde); Sobreposição (amarelo); escala = $50 \mu\text{m}$. Dados representativos de 3 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* = $p < 0.05$).

4.10. O perfil transcricional dos monócitos presentes nas áreas de necrose indica uma incapacidade de responder a patógenos circulantes

Até agora, mostramos que durante a LHA, ocorre uma redução populacional das células de Kupffer, gerando uma abertura de nicho, ocupado tanto por monócitos circulantes quanto pelas KCs remanescentes em multiplicação. No mesmo período, encontramos uma janela de susceptibilidade a infecções nesses animais, o que nos levou a investigar o perfil transcricional dos monócitos recrutados ao longo da LHA, buscando possíveis diferenças que possam explicar o fenótipo observado.

Para esse fim, reanalisamos os dados de expressão gênica obtidos pela técnica de microarranjo no trabalho de Zigmond *et al.* depositados de forma pública no banco de dados do NCBI. Os dados de expressão existentes são para as células de Kupffer em estado estacionário (KC Controle), monócitos pró-inflamatórios (Ly6C^{hi} Mon) 24 horas após indução da lesão por APAP, monócitos pró-resolutivos (Ly6C^{lo} Mon) e células de Kupffer (KC 72h) 72 horas após indução da lesão (Zigmond *et al.*, 2014). Inicialmente avaliamos a variância do componente principal entre essas 4 populações, e observamos que os monócitos pró-inflamatórios tem um perfil transcricional mais distante das demais. Ao passo que os monócitos pró-resolutivos encontram-se com um perfil intermediário entre os monócitos inflamatórios e os dois grupos de células de Kupffer. Por último, notamos um perfil de expressão bem similar entre as KC Controle e KC 72h, com mínima variância entre elas (Figura 12). Esses dados confirmam a transição no perfil dos monócitos durante a cinética da LHA, sendo que os monócitos pró-resolutivos se assemelham mais ao perfil das KCs.

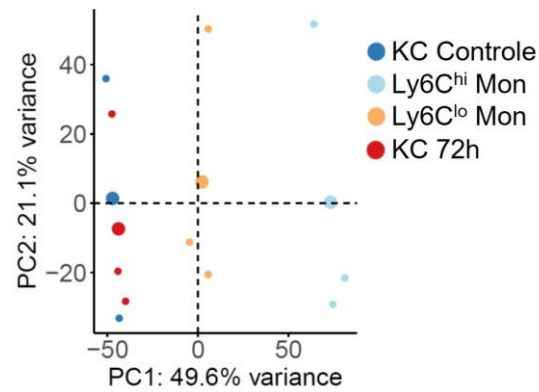


Figura 12. O perfil transcricional dos monócitos recrutados é tempo-dependente e diferente do perfil das células de Kupffer. Análise de variância do componente principal no padrão global de expressão das amostras. Através do perfil de expressão é possível separar as diferentes populações de fagócitos mononucleares presentes na cinética da lesão hepática aguda. KC Controle = células de Kupffer em homeostase; Ly6C^{hi} Mono = monócitos pró-inflamatórios (Ly6C^{hi}CD11b⁺CX3CR1⁺CCR2⁺); Ly6C^{lo} Mono = monócitos pró-resolutivos (Ly6C^{lo}CD11b⁺CX3CR1⁺CCR2^{-/lo}); KC 72h = células de Kupffer 72 horas pós-APAP.

Em seguida, na tentativa de explicar a maior susceptibilidade a infecções, investigamos as diferenças transcricionais entre essas populações em vias de sinalização relacionadas à fagocitose e eliminação de patógenos. O modo de comparação seguiu a cinética das populações na lesão hepática. Dessa forma, inicialmente comparamos o grupo Ly6C^{hi} Mon com as KC controle e observamos que as seguintes vias estavam diferencialmente expressas: I) complemento e cascata de coagulação (Figura 13A); II) fagocitose mediada por receptores do tipo Fcγ (Figura 13B); e III) lisossomo (Figura 13C). Explorando individualmente cada uma dessas vias notamos que, a fagocitose de patógenos tanto pela via alternativa do complemento quanto pela via clássica e pela via dependente de CR1g, está suprimida nos monócitos Ly6C^{hi} quando comparada com às KC controle (Figura 13A). Outra via de fagocitose que está suprimida é a via dependente dos receptores do tipo Fcγ (Figura 13B), que é uma via importante para a fagocitose de bactérias opsonizadas por anticorpos IgG. Além do aparente prejuízo na fagocitose de bactérias, os monócitos pró-inflamatórios apresentam uma menor expressão no RNA mensageiro de moléculas importantes para a formação adequada do lisossomo, como por exemplo a LAMP, e de hidrolases ácidas lisossomais, que são responsáveis pela eliminação os microrganismos fagocitados após junção do lisossomo ao fagossomo.

Figura 13. Os monócitos pró-inflamatórios apresentam uma expressão reduzida de vias que participam da fagocitose e eliminação patógenos comparados às células de Kupffer. As vias diferencialmente expressas entre o grupo Ly6C^{hi} Mon em comparação com o grupo KC Controle foram enriquecidas no Kegg Pathways: **(A)** complemento e cascata de coagulação; **(B)** fagocitose mediada pelos receptores do tipo Fcγ; e **(C)** lisossomo. Valores de expressão definidos por gradiente de cor: vermelho indica maior expressão; verde indica menor expressão (p.adj < 0.05).

Na sequência, comparamos os monócitos pró-resolutivos (Ly6C^{lo} Mon, da fase resolutiva) com os monócitos pró-inflamatórios (Ly6C^{hi} Mon, da fase aguda), sendo que as vias diferencialmente expressas relacionadas ao combate a infecções foram a do lisossomo (Figura 14A) e do fagossomo (Figura 14B). Essas vias são congruentes, e essenciais para uma eliminação adequada dos patógenos fagocitados após a fusão do fagossomo ao lisossomo. Dentro da via do lisossomo, observamos que o grupo Ly6C^{lo} Mon retoma a expressão das hidrolases ácidas lisossomais e de moléculas chaves para formação do lisossomo (Figura 14A). Ao analisarmos a via do fagossomo, notamos, nas células pró-resolutivas, um aumento de expressão dos receptores do tipo Fcγ e também de moléculas que atuam no processamento e apresentação de antígenos.

4.11. A deficiência na captura de bactérias não ocorre por falta de opsonização das bactérias circulantes por anticorpo ou moléculas do sistema do complemento

O processo de fagocitose de bactérias e outros microrganismos unicelulares presentes na circulação é em parte dependente da opsonização por anticorpos ou por componentes do sistema do complemento (Kaufmann and Dorhoi, 2016; Vandendriessche et al., 2021). sendo o fígado o principal responsável por produzir tais componentes (Thorgersen et al., 2019). Durante processos inflamatórios hepáticos, a produção dessas moléculas fica prejudicada (Thorgersen *et al.*, 2019) e durante a LHA induzida por sobredose de APAP, a quantidade de anticorpos (IgG e IgM) circulantes se encontra reduzida (dados ainda não publicados). Como nossa última análise revelou que a expressão tanto de genes de fagocitose relacionados à via do complemento quanto de genes relacionados a via dependente de anticorpo está alterada nos principais fagócitos presentes na cinética da LHA, nos questionamos se a deficiência na capacidade de captura de bactérias estaria relacionada a uma ausência de opsonização das bactérias circulantes.

Para responder a essa questão, realizamos a opsonização prévia das bactérias *in vitro* com soro de animais do grupo controle e do grupo 24 horas pós-APAP. A opsonização também foi realizada com soro inativado por calor, que remove a atividade do sistema do complemento, possibilitando a avaliação individual da atuação do complemento e dos anticorpos circulantes em um possível fenótipo. Então, realizamos o ensaio de remoção bacteriana da circulação para avaliar se há uma melhora na capacidade de filtração do sangue pelo fígado quando as bactérias já se encontram opsonizadas. Como mostrado anteriormente, o grupo 24 horas pós-APAP apresentou um aumento de bactérias no sangue em relação ao grupo controle. Entretanto, o processo de opsonização das bactérias com os diferentes soros (soro fresco de animais controle e animais no pico da LHA ou soro inativado) não resultou em nenhuma melhora na capacidade do fígado lesionado em remover as bactérias da circulação (Figura 16), indicando que o prejuízo na fagocitose não ocorre por falta de opsonização das bactérias circulantes.

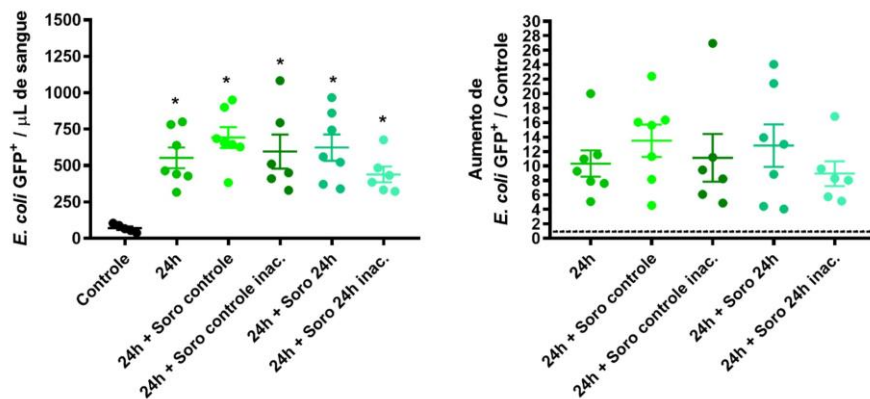


Figura 16. A deficiência na capacidade hepática de remover bactérias circulantes não ocorre devido a problemas na opsonização. Quantificação do número de bactérias presentes no sangue dos animais (painel esquerdo) após o desafio intravenoso com *E. coli* GFP, 5×10^5 bactérias/20g, e determinação da capacidade de remoção das bactérias do sangue pelo fígado (painel direito, porcentagem em relação ao grupo Controle) 5 minutos após desafio; $n \geq 5$ animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey (* = $p < 0.05$).

4.12. A terapia celular com macrófagos derivados de medula óssea melhora o quadro histopatológico e a capacidade hepática de filtrar o sangue

Tendo em vista que o nicho hepático aberto pela morte das células de Kupffer é ocupado por células que apresentam redução na capacidade fagocítica nas fases iniciais da LHA, o que cria um período de susceptibilidade para infecções sistêmicas, decidimos, então, realizar terapia celular com o objetivo de repor o nicho com células maduras. Para isso, realizamos o tratamento dos animais submetidos à lesão por APAP com macrófagos derivados de medula óssea em estado estacionário (MDMO ϕ) e alternativamente ativados (MDMO A.A). Primeiro, checamos se, de fato, o processo de ativação foi eficiente. As células tratadas com IL-4 têm um aumento na expressão do RNA mensageiro de *chil3*, *rentla*, e *arg1* - que são marcadores da ativação alternativa – em comparação as células MDMO ϕ (Figura 17A). Com a ativação celular confirmada, os animais receberam as células 16 horas pós-APAP (em um tempo em que a lesão já está estabelecida) e, 8 horas após o tratamento (completadas 24 horas após indução da lesão), os ensaios foram realizados. Primeiro, avaliamos se essas células realmente estão localizadas no fígado, para isso, utilizamos células derivadas de animais *LysM^{+cre}Rosa26^{+tdTomato}* (*LysM-tdTomato*) e, por citometria de fluxo, buscamos detectar sua presença no órgão (Figura 17C). Observamos que tanto os MDMO ϕ quanto os MDMO A.A são encontrados no fígado (Figura 17D). Em seguida, por meio do ensaio de ALT, avaliamos se o tratamento alterou a lesão hepática. Como não foi observada nenhuma alteração nos níveis séricos dessa enzima nos grupos que receberam a terapia celular (Figura 17E), concluímos, à princípio, que não há alteração no estabelecimento da injúria hepática.

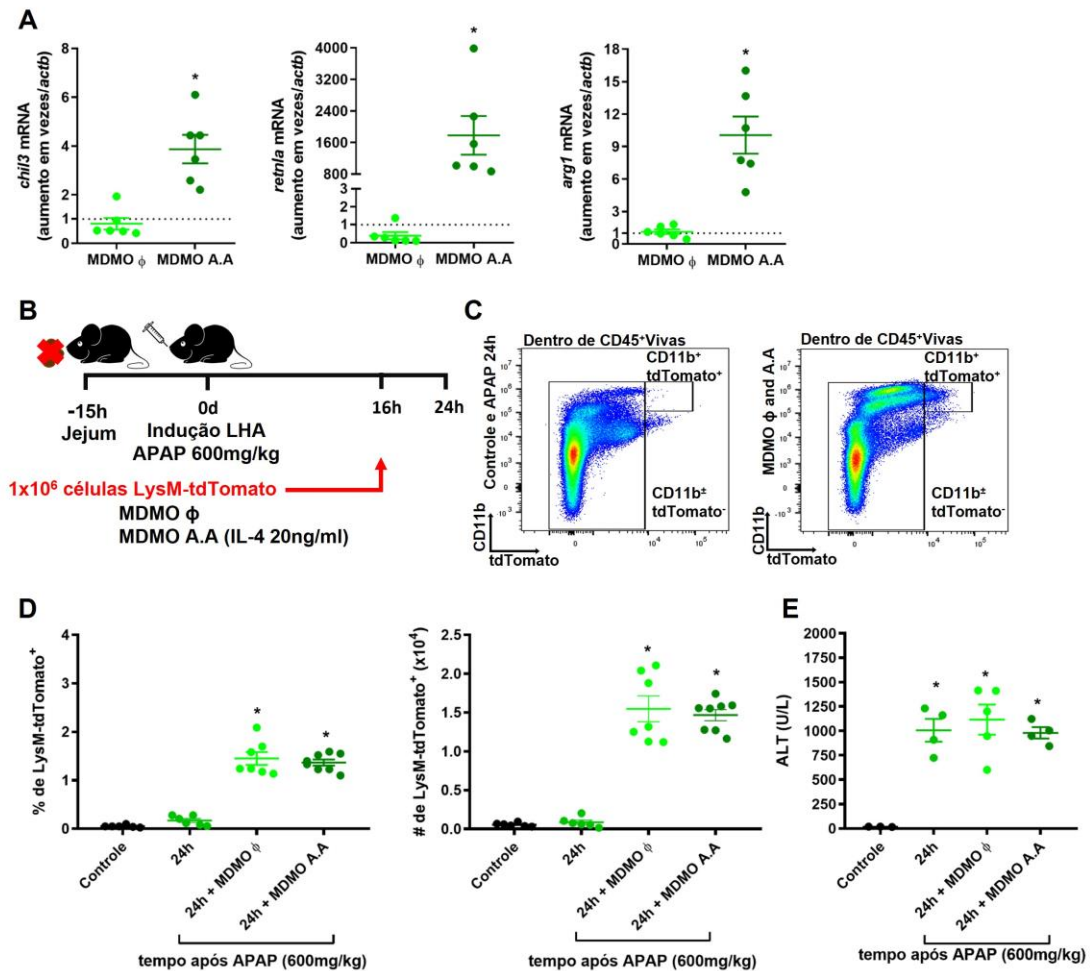


Figura 17. Macrófagos derivados de medula óssea utilizados como terapia celular alcançam o fígado.

(A) Expressão de mRNA nos MDMO para os genes marcadores da ativação alternativa de macrófagos *chi33* (YM1), *retnla* (FIZZ1), *arg1* (Arginase 1), medidos por PCR em tempo real e expresso pelo aumento em relação à *actb* (β -actina); $n \geq 5$ animais por grupo. (B) Esquema resumindo o protocolo para terapia celular com 1×10^6 MDMO não ativados (ϕ) e alternativamente ativados (A.A) nos animais durante a cinética da LHA no tempo de 16 horas. As células foram derivadas de animais fêmeas de 4-6 semanas de idade do genótipo LysM^{+/cre}Rosa26^{+/tdTomato}. (C) Estratégia de gate utilizada para detectar os MDMO (CD11b⁺tdTomato⁺) dentro das células CD45⁺ vivas no fígado dos animais 8 horas após tratamento - 24 horas após APAP. (D) Porcentagem (%) e número absoluto (#) de células LysM^{+/cre}Rosa26^{+/tdTomato}CD11b⁺ no fígado dos animais 24 horas após overdose por acetaminofeno; $n \geq 5$ animais por grupo. (E) Avaliação da lesão hepática pela dosagem dos níveis de aspartato aminotransferase (ALT) no soro dos animais; $n \geq 4$ animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey (* = $p < 0.05$).

Também por meio da citometria de fluxo, caracterizamos as populações de células mielóides na LHA após o tratamento com os MDMO. Encontramos que o tratamento não alterou a porcentagem (Figuras 18A) e o número (Figuras 18B) das KCs, 24 horas após a indução da lesão, dessa forma, não interferindo com a morte das células de Kupffer e a abertura do nicho. Investigamos, então, outras duas populações que se encontram elevadas na fase aguda e contribuem para o desenvolvimento da lesão, os neutrófilos e monócitos pró-inflamatórios (Ly6C^{hi}CD11b⁺). Novamente, o tratamento com MDMO não alterou a porcentagem (Figura 18A) ou o número (Figura 18B) dessas células no fígado. Todavia, observamos um aumento na porcentagem (Figura 18A) e no número (Figura 18B) de monócitos pró-resolutivos (Ly6C^{lo}CD11b⁺) nos animais tratados com MDMO ϕ e MDMO A.A em relação ao grupo 24 horas não-tratado, sendo que esse aumento restaurou os níveis dessas células a um patamar similar ao dos animais controles (Figura 18). Concluimos, assim, que a terapia celular pode favorecer o processo de resolução da lesão hepática aguda.

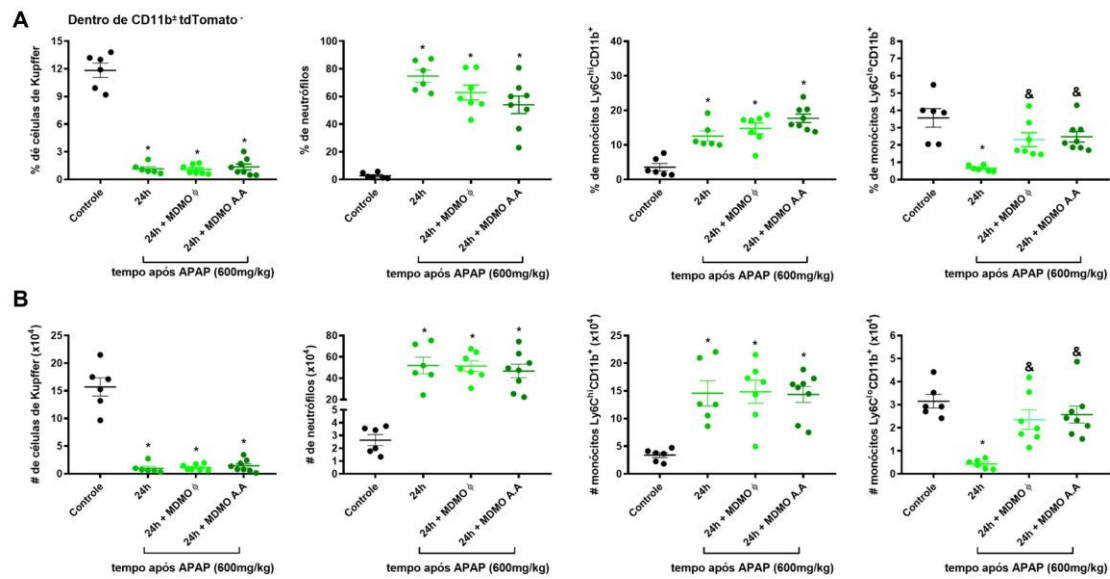


Figura 18. A terapia celular com MDMO recupera os níveis dos monócitos pró-resolutivos no fígado.

(A) Porcentagem (%) das diferentes populações mielóides analisadas dentro das células CD45⁺CD11b⁺tdTomato⁻ vivas durante a fase aguda da injúria hepática induzida pela overdose de acetaminofeno.; n ≥ 5 animais por grupo. (B) Número absoluto (#) das subpopulações de células mielóides vivas ajustado para o número total de células hepáticas não parenquimais durante a fase aguda da LHA; n ≥ 5 animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos. Os resultados estão apresentados como a média ± SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle; & indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo 24h após APAP usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* e & = p < 0.05).

Considerando o aumento dos monócitos pró-resolutivos na fase aguda após o tratamento com macrófagos derivados de medula, tanto sem ativação quanto alternativamente ativados, decidimos avaliar se a terapia celular melhora os aspectos histopatológicos do fígado durante a LHA. Macroscopicamente, observamos que o fígado dos animais tratados com MDMO φ e MDMO A.A apresenta uma condição mais similar ao fígado dos animais controle (Figura 19A). (Figura 19A). Microscopicamente, observamos menores áreas de necrose ao redor das veias centro-lobulares, que não se conectam com as demais áreas, como acontece no grupo 24 horas pós-APAP sem tratamento, o que evidencia um dano tecidual mais limitado nos animais que receberam a terapia celular (Figura 19B). O escore histopatológico reduzido dos grupos tratados confirma uma maior integridade do parênquima em comparação com o grupo sem tratamento, porém, se encontra aumentado comparado ao grupo controle, indicando que a lesão ainda está presente (Figura 19C).

Uma vez que utilizamos macrófagos derivados de animais LysM-tdTomato, fomos capazes de determinar precisamente o posicionamento dessas células no fígado durante a LHA. Para isso, os animais tratados com MDMO ϕ e MDMO A.A foram submetidos à MIV, com marcação para células de Kupffer (em roxo) e áreas de necrose (DNA extracelular em verde). Em ambos os grupos, as células não ativadas e alternativamente ativadas (em vermelho) encontram-se especificamente posicionadas nas áreas de necrose (Figura 19D), que correspondem às regiões em que o nicho das células de Kupffer está aberto.

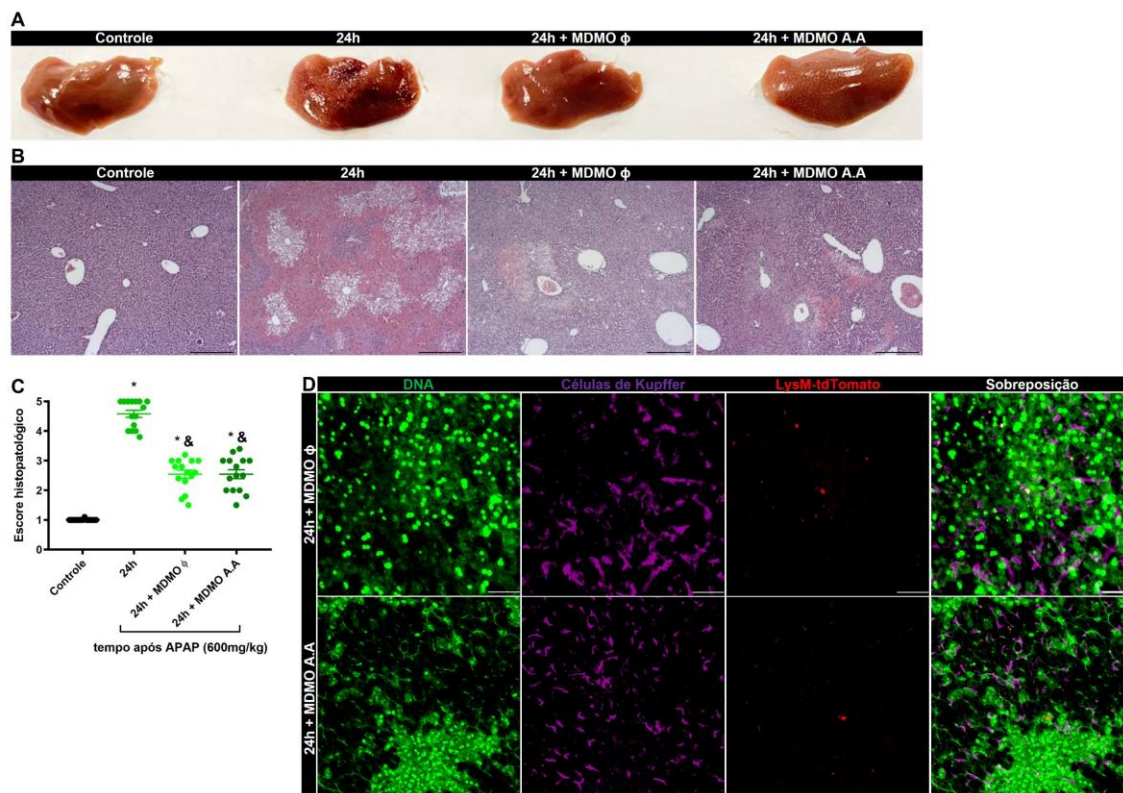


Figura 19. Os MDMO promovem a regeneração hepática e ocupam o nicho disponibilizado pela morte das células de Kupffer durante a LHA. (A) Imagens macroscópicas representativas do fígado dos animais tratados e não tratados com a terapia celular. (B) Imagens representativas de histologias hepáticas da cinética da LHA coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E); escala = 500 μ m. (C) Escore histopatológico das histologias H&E da cinética da LHA; $n \geq 3$ animais por grupo e 5 imagens por animal. (D) Imagens representativas de MIV dos animais tratados com MDMO ϕ e MDMO A.A mostrando a área de necrose (DNA, verde), células de Kupffer (roxo), células LysM-tdTomato e a sobreposição; escala = 20 μ m. Dados representativos de 2 experimentos (exceto a figura D, somente 1 experimento foi realizado). Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle; & indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo 24h após APAP usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* e & = $p < 0.05$).

Por fim, após explorarmos que a terapia celular com macrófagos derivados de medula óssea ocupa o nicho aberto durante a LHA e possivelmente acelera o processo resolutivo, decidimos avaliar se a terapia celular empregada é capaz de retomar a capacidade do fígado em controlar a circulação de patógenos. Assim, os animais tratados com MDMO ϕ e MDMO A.A, além dos grupos controle e 24 horas foram submetidos ao ensaio de avaliação de remoção bacteriana da circulação pelo fígado. Observamos que, ainda que os grupos tratados com as MDMO ϕ e MDMO A.A apresentem um número maior de bactérias no sangue em comparação ao grupo controle, esse número se encontra reduzido se comparado ao grupo 24 horas pós-APAP não-tratado (Figura 20, painel esquerdo). A terapia celular com os macrófagos diferenciados promoveu um aumento de cerca de 60% na capacidade hepática de remover bactérias circulantes durante a LHA induzida pela sobredose de APAP.

Em conjunto, esses dados nos fornecem evidências de que a terapia celular com macrófagos derivados de medula óssea promove a ocupação do nicho disponibilizado pela morte das KCs na LHA, causando um aumento dos monócitos pró-resolutivos, o que resulta em uma redução expressiva das áreas de necrose e uma melhora na capacidade do fígado em controlar a circulação de bactérias.

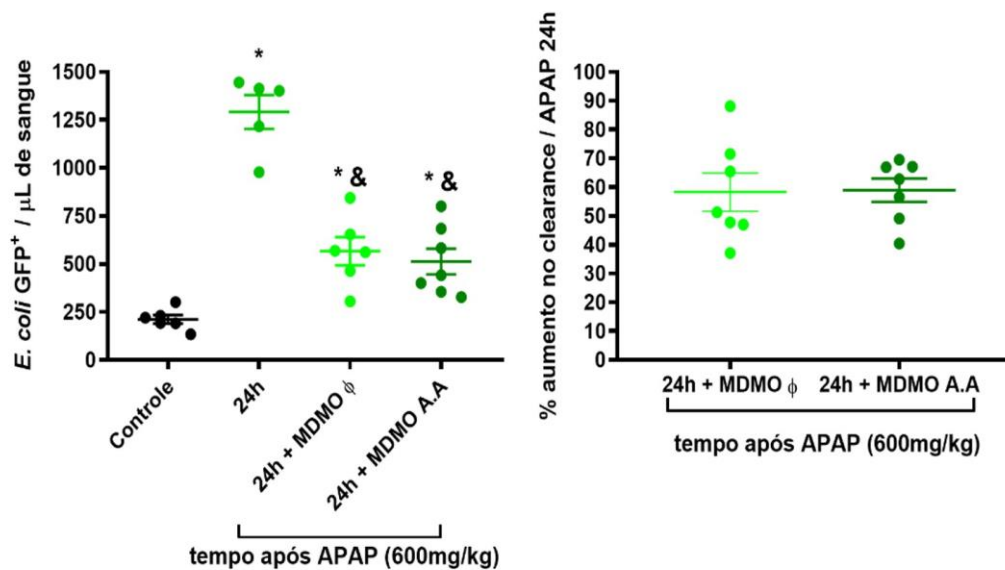


Figura 20. Terapia celular com MDMO melhora a capacidade do fígado em remover bactérias da circulação. (A) Quantificação do número de bactérias presentes no sangue dos animais após o desafio intravenoso com 5×10^5 bactérias/20g (Painel esquerdo) e determinação melhora da capacidade fígado em remover as bactérias do sangue (Painel direito, porcentagem em relação ao 24h) 5 minutos após desafio; $n \geq 5$ animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos. O resultados são apresentados como a média \pm SEM. * indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo controle; & indica diferença estatística entre o grupo indicado e o grupo 24h após APAP usando one-way Anova seguido do pós-teste de Tukey. (* e & = $p < 0.05$).

5. Discussão

A sobredose de APAP induz um complexo processo inflamatório agudo (Jaeschke and Ramachandran, 2020a). No presente trabalho demonstramos que durante essa inflamação hepática aguda, há uma perda na população das células de Kupffer nas áreas de necrose, o que resulta na abertura de um nicho hepático, seguido do recrutamento de neutrófilos e monócitos ao tecido. Os monócitos, que contribuem tanto para o desenvolvimento da lesão quanto para resolução (Dal-Secco *et al.*, 2015; Graubardt *et al.*, 2017), estão estrategicamente posicionados nas áreas de necrose, dessa forma, ocupam o espaço físico deixado pela morte das células de Kupffer, juntamente com às KCs remanescentes que se proliferam na fase resolutiva. Em adição a alteração no nicho hepático, a remoção de patógenos da circulação pelo fígado está prejudicada, devido à incapacidade desses fagócitos em realizarem a fagocitose e eliminação de bactérias presentes na circulação. Portanto, apesar do recrutamento celular para o local o nicho ainda encontrasse aberto visto que a disfuncionalidade dele persiste durante essa fase. Essa disfunção resulta em uma janela de susceptibilidade a infecções, explicando assim o porquê os pacientes com FHA causada por sobredose de APAP desenvolvem com frequência quadros infecciosos (Karvellas *et al.*, 2009; Rolando *et al.*, 1996; Stravitz and Lee, 2019). Dessa forma, mostramos no presente trabalho a da importância do pleno funcionamento do nicho das KCs para o controle de bactérias circulantes e, com isso em mente, realizamos a terapia celular com macrófagos derivados de medula óssea, para ocupar o nicho e, observamos que a terapia foi capaz de reduzir a necrose hepática e melhorar a capacidade do fígado em remover patógenos circulantes.

Inicialmente, em nosso trabalho, mostramos que a sobredose de APAP promove um extenso dano no parênquima hepático, que ocorre devido ao estresse oxidativo gerado nos hepatócitos promovendo a morte necrótica dessas células, e por fim, a formação de extensas áreas de necrose (Jaeschke and Ramachandran, 2020b; Marques *et al.*, 2012). Esse processo, também resulta na presença de histonas e o HMGB-1 no meio extracelular, moléculas essas responsáveis por promoverem a morte das células endoteliais (Yang *et al.*, 2017), causando assim, perda dos capilares sinusóides. Tais moléculas ao

serem encontradas no meio extracelular são denominadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), e o DNA, o HMGB-1 e as histonas, são responsáveis pela amplificação a inflamação hepática. O DNA no meio extracelular é reconhecido pelas seus sensores nas demais, que incluem os receptores do tipo toll 9 (TLR-9) e os receptores do tipo NOD 2 (NLRP3), dessa forma, iniciando uma cascata de sinalização para a produção de citocinas pró-inflamatórias (Araujo et al., 2018; Marques *et al.*, 2015b; Marques et al., 2021). Por outro lado, o HMGB-1 é reconhecido por outros receptores, dentre eles o TLR2 e TLR4. Ao ser reconhecidos pelas células de imune inato gerando uma cascata para produção de TNF e IL-6, conhecidamente citocinas pró-inflamatórias (Yang and Tonnesseen, 2019). O HMGB-1, por sua vez, é reconhecido por outros receptores nas células do sistema imune inato, como o TLR2 e TLR4, gerando uma cascata para produção de TNF e IL-6, conhecidamente citocinas pró-inflamatórias (Yang and Tonnesseen, 2019).

Em processos inflamatórios teciduais como esse, um fator, frequentemente observado, é o desaparecimento macrófagos residentes. Esse processo de perda na população de macrófagos residentes, por morte celular, tem sido discutido como uma forma de suicídio celular com a finalidade de limitar a resposta inflamatória e o dano tecidual (Di Paolo et al., 2013; Ginhoux *et al.*, 2017; Lai *et al.*, 2018). Uma gama de processos inflamatórios hepáticos são marcados pela redução populacional dessas células, incluindo infecções causadas por vírus (Borst *et al.*, 2017), bactérias (Bleriot *et al.*, 2015) ou por protozoários (Lai *et al.*, 2018). Além disso, em processos inflamatórios estéreis, por exemplo na esteatose hepática, ocorre uma perda significativa de KCs (Remmerie *et al.*, 2020).

No nosso trabalho, observamos o desaparecimento das células de Kupffer durante a LHA, o que também já havia sido descrito por outros trabalhos (Graubardt *et al.*, 2017; Mossanen *et al.*, 2016; Triantafyllou et al., 2018a; Zigmond *et al.*, 2014), entretanto, os trabalhos não investigaram qual programa de morte celular seria responsável pela perda populacional. Em adição, descrevemos, pela primeira vez, que a morte das KCs na LHA induzida por sobredose de APAP ocorre principalmente por apoptose, apesar de um percentual significativo morrer por necrose e necroptose. Além disso, também

mostramos que essa perda ocorre especificamente nas áreas de necrose, o que não tinha sido descrito. Quais fatores desencadeiam essa morte celular, por sua vez, ainda precisa ser elucidado, podendo incluir a presença massiva de DAMPs nessas áreas, visto que essas moléculas ativam vias de sinalização que culminam em morte celular (Yang and Tonnesseen, 2019). Assim, entender o processo de morte dessas células e as consequências desse fenômeno pode somar ao que já se tem descrito como papel das KCs durante a LHA. Estudos prévios, já demonstraram a importância das células de Kupffer para controle do início da inflamação, sendo que a ausência completa dessas células anterior ao início da LHA resulta em um fenótipo mais grave (David *et al.*, 2016; Holt *et al.*, 2008). Além disso, a perda das KCs acarreta atraso na regeneração hepática, uma vez que elas contribuem para resolução da lesão, atuando na remoção de restos celulares e estimulando a revascularização hepática por meio da liberação de VEGF e IL-10 (Krenkel and Tacke, 2017; Triantafyllou *et al.*, 2018a; You *et al.*, 2013). Dessa forma, o retorno da população de células de Kupffer é essencial para o retorno à homeostase hepática.

Outro fator comum a processos inflamatórios em que há perda da população de KCs é o recrutamento de monócitos para o tecido hepático (Kubes and Jenne, 2018), sendo que as populações recrutadas apresentam funções e perfis imunológicos tempo-dependentes (Dal-Secco *et al.*, 2015; Kratofil *et al.*, 2017). Inicialmente, há o recrutamento de monócitos inflamatórios, caracterizados pelos marcadores $Ly6C^{hi}CD11b^{+}CCR2^{+}CX3CR1^{-}$, que são dominantes nos estágios iniciais da lesão. Essas células, apesar de removerem restos celulares, elas produzem citocinas inflamatórias e quimiocinas, assim como proteases para degradar o tecido danificado e, dessa forma, amplificam a lesão (Mossanen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019; Zigmund *et al.*, 2014).

Após a fase aguda, seguindo a cinética da lesão, encontramos no fígado os monócitos intermediários, $CCR2^{+}CX3CR1^{+}$, que podem ser originados da transição dos monócitos inflamatórios para um perfil resolutivo devido ao ambiente em que se encontram e, dessa forma, podem atuar na resolução da lesões hepáticas estéreis (Dal-Secco *et al.*, 2015; Kratofil *et al.*, 2017). Ainda na fase resolutiva, notamos a predominância dos monócitos pró-resolutivos

(Ly6C^{lo}CD11b⁺CCR2⁻CX3CR1⁺), subtipo esse, que pode se originar da diferenciação dos subtipos anteriores (Graubardt *et al.*, 2017; Zigmond *et al.*, 2014). No ambiente hepático, eles são responsáveis pela produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, TGF- β e VEGF, que alteram a reposta inflamatória ativa para um quadro de resolução, reestabelecendo a homeostase (Mossanen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019; Zigmond *et al.*, 2014).

Todavia, processo de recrutamento de diferentes subtipos de monócitos já havia sido descrito para LHA induzida por sobredose de APAP (Mossanen *et al.*, 2016; Triantafyllou *et al.*, 2018a; Zigmond *et al.*, 2014), entretanto, nosso trabalho mostrou a posição estratégica dessas células nas regiões de necrose, exatamente nas áreas em que as KCs não estão presentes, o que promove a abertura de um importante nicho. Uma vez que o posicionamento das células imunes é essencial para execução de suas funções (Griffith *et al.*, 2014; Luster, 2019; Rua and McGavern, 2015), o posicionamento dos monócitos pode ser crucial para que eles desempenhem suas funções durante a LHA.

Na última década o conceito de nicho de macrófagos e sua dinâmica têm sido amplamente investigados. A abertura do nicho das KCs gera a necessidade de um repovoamento correto para que as novas células desempenhem as mesmas funções das células anteriores (Guilliams and Scott, 2017; Guilliams *et al.*, 2020). Em homeostase, a população de KCs se mantém por autorrenovação (Gomez Perdiguero *et al.*, 2015). Por outro lado, em processos inflamatórios, a origem dessas células vai depender da extensão da lesão, do tipo de inflamação e do agente causador da lesão (Guilliams and Scott, 2017). Para a LHA e FHA, ainda não se tem definido se as novas células se originam da diferenciação dos monócitos em KCs ou da replicação das células remanescentes. Nossos resultados indicam que o nicho disponível é transitoriamente ocupado pelos monócitos que são recrutados ao tecido, porém não elucidamos se esses monócitos são capazes de se diferenciar em macrófagos, dessa forma, contribuindo para a reposição definitiva do nicho. Apesar disso, considerando o posicionamento estratégico dos monócitos nas regiões em que há perda da população de KCs e sua capacidade de se diferenciar em macrófagos residentes em outros modelos de inflamação hepática (Bleriot *et al.*, 2015; David *et al.*, 2016; Remmerie *et al.*, 2020; Scott *et al.*, 2016), é possível que os monócitos, de

fato, contribuam para a reposição do nicho aberto durante a LHA. Contudo, já havia sido mostrado, por citometria de fluxo, que na fase resolutiva as células de Kupffer remanescentes são capazes de replicar (Zigmond *et al.*, 2014), em adição, nosso trabalho mostrou que essas células em replicação formam aglomerados de células próximos às áreas sem KCs, indicando que elas também contribuem para esse processo. Dessa forma, possivelmente, os dois tipos celulares estão envolvidos na reposição do nicho após a resolução da inflamação.

Como dito anteriormente, mais estudos são necessários para definir se há, de fato, uma contribuição dupla para reposição populacional do nicho hepático após a perda de KCs. Recentemente foi desenvolvida uma linhagem de camundongo que possibilita acompanhar os monócitos desde a saída da medula óssea até a chegada e posterior diferenciação no tecido para macrófagos residentes. O mapeamento de destino utilizando camundongos transgênicos para a proteína Ms4a3, em que células que expressam o gene para proteína vão apresentar fluorescência, permite identificar os monócitos e as células derivadas deles em diversos tecidos (Liu *et al.*, 2019). No nosso trabalho, para responder à questão em aberto, a respeito da origem das novas KCs, seria interessante utilizar esse animal. Após a resolução da lesão, os macrófagos residentes poderiam ser visualizados através da detecção de fluorescência, o que indicaria que as novas células derivam dos monócitos recrutados para o tecido e elucidaria a contribuição dela reposição do nicho hepático após a LHA induzida por sobredose de APAP.

Independente da lesão e origem, as novas células que ocupam o nicho vazio adquirem a funcionalidade de células de Kupffer maduras – podendo também adquirir sua identidade (Bleriot *et al.*, 2020; Bonnardel *et al.*, 2019; Sakai *et al.*, 2019). O retorno à homeostase hepática só ocorre quando há o repovoamento adequado do nicho gerado, com as células novamente funcionais. Entretanto, o tempo para esse processo de retorno é dependente do tipo e extensão do processo inflamatório que acomete o fígado, o que pode resultar em uma disfuncionalidade hepática prolongada. Contudo, o tempo desse processo de retorno é dependente do tipo e extensão do processo inflamatório que acomete. Nos modelos murinos em que há redução massiva, sobrando

poucas ou nenhuma célula residente, o retorno irá ocorrer de forma lenta e a partir da diferenciação dos monócitos que infiltraram no tecido. Nesse caso, as novas células demoram entre 30-35 dias para adquirirem as funções das células em homeostase, mesmo assim, as assinaturas transcricionais podem não ser idênticas as das células anteriores (Beattie *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2016). Um estudo do nosso grupo mostrou que, após a depleção completa das KCs, utilizando lipossomos clodronato, o nicho aberto demora até 60 dias para recuperar a capacidade de remoção bacteriana e de limitar da lesão induzida por sobredose de APAP (David *et al.*, 2016). As novas células precisam reconhecer o ambiente tecidual em que se encontram e adquirir características transcricionais e fenotípicas que as permitam exercer suas funções celulares, ou seja, necessitam de um tempo para maturidade completa (Guilliams and Scott, 2017; van de Laar *et al.*, 2016). Logo, a fase de retorno à homeostase em que o nicho de KCs ainda não se encontra reestabelecido, gera uma janela de imaturidade durante a LHA.

Seguindo essa linha de raciocínio, as alterações ocorridas no nicho das KCs durante a LHA induzida pela sobredose de APAP podem deixar o organismo susceptível a infecções. A sobredose de APAP é causa de mais da metade dos casos de falência hepática aguda (Stravitz and Lee, 2019) e cerca de 50% dos pacientes com FHA são acometidos por infecções, sendo a maior parte dos casos relacionados a bactérias gram-negativas (Kasravi *et al.*, 1996). Essas infecções sistêmicas podem ser desencadeadas na própria unidade de tratamento intensivo por intercorrência de pneumonia, infecções do trato urinário, ou infecções associadas à coleta de sangue do paciente (Stravitz and Lee, 2019). A própria LHA é capaz de promover quadros de infecção sistêmica, uma vez que a inflamação não se limita ao fígado, pois, os DAMPs liberados, ao ganharem a circulação, promovem inflamação em outros órgãos (Yang *et al.*, 2017). Na fase aguda, o HMGB-1 circulante promove a translocação bacteriana no intestino ao aumentar a permeabilidade intestinal (Yang *et al.*, 2014), o que pode gerar uma infecção sistêmica. Os quadros infecciosos podem se tornar severos e levar ao óbito (Rolando *et al.*, 1990; Rolando *et al.*, 1996; Vaquero *et al.*, 2003). No presente estudo mostramos que a morte pela sobredose de APAP ocorre até 24 horas pós-indução, sendo esse momento o pico da lesão hepática.

Os animais que sobrevivem até esse ponto, quando desafiados por via intravenosa com *E. coli*, apresentaram uma taxa de mortalidade de 40%. Considerando a incidência de quadros infecciosos durante a LHA, entender como a disfunção hepática resulta na susceptibilidade a infecções é de grande importância clínica.

As células de Kupffer são a principal população de macrófagos residentes de um organismo mamífero adulto, atuam como fagócitos profissionais no maior sistema retículo endotelial do corpo (Bilzer et al., 2006; Gordon, 2016) por se encontrarem estrategicamente posicionadas no interior dos sinusóides hepáticos, em íntimo contato com tudo que circula no sangue, incluindo microrganismos patogênicos (Krenkel and Tacke, 2017; Kubes and Jenne, 2018). Alguns processos lesivos levam a alterações dessa população celular em termos de quantidade, e função, prejudicando a função hepática de eliminação de bactérias circulantes (David et al., 2016). No nosso trabalho, mostramos que a LHA induzida por sobredose de APAP reduz drasticamente as células de Kupffer, com consequente perda da capacidade hepática de filtro. Além do menor número de KCs, há uma menor porcentagem células remanescentes com capacidade de capturar bactérias e uma menor quantidade de bactérias capturadas por célula funcional. Explicando assim, a livre circulação de bactérias no fígado, presença delas no sangue e a incapacidade de controle do crescimento bacteriano. Em síntese, a deficiência no nicho das células de Kupffer pode ser responsável pelos quadros de infecção sistêmica desenvolvidos pelos pacientes em FHA.

Ainda, levando em conta que, a opsonização de patógenos circulantes contribui para o processo de fagocitose (Kaufmann and Dorhoi, 2016; Vandendriessche et al., 2021), e que durante inflamação hepática, a produção dessas componentes do sistema complemento pelo fígado está reduzida (Thorgersen et al., 2019) e há uma menor quantidade de anticorpos (IgG e IgM) circulantes (dados ainda não publicados), buscamos determinar se a susceptibilidade a infecções seria devido a um possível deficiência na opsonização das bactérias. Nossos resultados descartaram essa hipótese, já que a opsonização prévia das bactérias não restaurou a capacidade de fagocitose, indicando que o problema está, de fato, nos fagócitos presentes no

fígado durante a LHA. Um fator que pode ser responsável pela deficiência no controle de bactérias circulantes é a incapacidade dos monócitos na realização dessa função na ausência de células de Kupffer.

O perfil transcricional dos monócitos que migram para o fígado durante a lesão mostra que diferentes vias de controle bacteriano estão reguladas negativamente nessas células em relação as células de Kupffer (Zigmond *et al.*, 2014). Uma via importante em que encontramos uma diferença significativa foi a via de sinalização do complemento, em que moléculas como C3b, iC3B e C3d são responsáveis por opsonizar patógenos circulantes, levando à sua fagocitose, ou eliminação, pela formação do complexo de ataque à membrana (Gros *et al.*, 2008; Laarman *et al.*, 2010). Ainda, observamos que importantes receptores dessa via, como, por exemplo, CR1g (receptor do complemento da superfamília das imunoglobulinas), característico das células de Kupffer e essencial no processo de fagocitose (He *et al.*, 2008). Através desse receptor, os macrófagos capturam bactérias opsonizadas por complemento e por ligação direta ao patógeno (Broadley *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2016), sendo que uma deficiência da expressão de CR1g está relacionada ao aumento da mortalidade de animais durante infecções bacterianas (He *et al.*, 2008). Como observado nesse e em outros trabalhos (Ikarashi *et al.*, 2013), os monócitos recrutados para o fígado durante a lesão hepática apresentam uma expressão reduzida de CR1g em comparação às células de Kupffer, o que pode explicar, em parte, sua provável ineficiência na remoção das bactérias circulantes.

Além da via de sinalização do complemento, outras vias diferencialmente expressas estão associadas à defesa contra patógenos circulantes. Quando comparamos os monócitos Ly6C^{hi} com as KCs, encontramos diferenças nos receptores do tipo Fcγ, que são responsáveis pelo reconhecimento de bactérias opsonizadas por imunoglobulinas (IgG) através da ligação à porção Fc dos anticorpos, dando assim início ao processo de fagocitose (Caron and Hall, 1998). Os monócitos Ly6C^{hi} apresentam menor expressão da FcγRIII – além de boa parte da via a jusante estar também menos expressa – e de genes chaves, como o PLCγ e PI3-K, que são determinantes para ativação da célula e ocorrência da fagocitose (Ben Mkaddem *et al.*, 2019; Celli *et al.*, 2001). Assim, uma possível

deficiência na fagocitose de patógenos opsonizados por IgG pode também explicar nosso fenótipo.

Por fim, outras vias em que foram encontradas diferenças importantes correspondem às vias do lisossomo e do fagossomo, seguintes à fagocitose. Esses compartimentos intracelulares quando fundidos criam um ambiente interno com grande potencial de eliminação de patógenos (Russell, 2011). Inicialmente há a internalização e formação de um vacúolo intracelular inicial, chamado fagossomo primário. Em seguida, ele se funde com vesículas endocíticas, dando origem ao fagossomo maduro. A partir desse estágio, ocorre a fusão com o lisossomo, criando o vacúolo microbicida - o fagolisossomo. O fagolisossomo é marcado pela acidificação de seu interior, com criação de um ambiente oxidativo e presença de diversas proteínas, como catepsinas e hidrolases – moléculas chaves para degradação dos microrganismos (Uribe-Querol and Rosales, 2017). Analisando em conjunto as vias do fagossomo e lisossomo, ou seja, a via de formação do fagolisossomo, nossos dados mostram que os monócitos pró-inflamatórios apresentam um fagossomo, primário e maduro, com menor capacidade de acidificação, devido à menor expressão V-ATPase, quando comparados aos monócitos pró-resolutivos. Em seguida, o processo de fusão do fagossomo ao lisossomo pode estar comprometido, já que os monócitos pró-inflamatórios apresentam uma menor expressão das proteínas de membrana associadas ao lisossomo (LAMP) – proteínas essas essenciais para formação do fagolisossomo (Huynh et al., 2007). Por fim, os monócitos pró-inflamatórios, também apresentam expressão reduzida das hidrolases ácidas dos lisossomos. Dessa forma, em linhas gerais, os fagócitos recrutados presentes na fase aguda da LHA apresentam uma deficiência tanto no processo de internalização quanto na eliminação dos patógenos circulantes, o que explica a susceptibilidade a infecções.

Além da fagocitose de bactérias, as células de Kupffer também são descritas como as principais responsáveis pela remoção de células mortas e restos celulares (Gonzalez *et al.*, 2017; Horst et al., 2019). Durante o processo da LHA, além dessas células, os monócitos também atuam nessa remoção (Wen et al., 2021). Sabendo que as vias de fagocitose que atuam na internalização de bactérias são compartilhadas com a internalização de debris celulares (Gordon,

2016; Westman et al., 2019), é possível que a inflamação hepática induzida por acetaminofeno possa sobrecarregar as KCs remanescentes, fazendo com que uma menor porcentagem de células seja capaz de remover os patógenos circulantes e que, mesmo as que são capazes capturem uma menor quantidade de bactérias. O mesmo também pode ocorrer para os monócitos recrutados ao tecido (Horst *et al.*, 2019). Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar se a predominância da eferocitose pode reduzir a capacidade desses fagócitos em remover e eliminar patógenos.

Ainda que os patógenos sejam devidamente fagocitados pelos fagócitos profissionais – como os macrófagos e, em menor eficiência, os monócitos –, os microrganismos são capazes de subverter os mecanismos antimicrobianos. Três estratégias são comumente utilizadas por bactérias para evadir a resposta da célula hospedeira: I) mecanismos de escape do fagossomo; II) inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo; III) capacidade de sobreviver dentro do fagolisossomo (Baxt et al., 2013; Kaufmann and Dorhoi, 2016; Thakur et al., 2019). Além dos mecanismos de evasão, os monócitos presentes nos estágios em que há uma inabilidade em responder a infecções apresentam alterações em todas as etapas de resposta aos patógenos intracelulares. Assim, além de uma menor capacidade de captura bacteriana nesses estágios, o que predispõe a uma infecção disseminada, essas células podem se tornar um local favorável à multiplicação e sobrevivência das bactérias capturadas. Logo, é essencial entender ainda mais afundo a susceptibilidade a infecções durante a LHA para recuperar a capacidade hepática em controlar patógenos circulantes.

No presente momento, terapias para LHA e FHA são escassas, devido ao difícil diagnóstico precoce e à rápida progressão da lesão (Lee, 2017; Stravitz and Lee, 2019). Em casos de overdose de acetaminofeno, quando há diagnóstico precoce, o tratamento com NAC é eficaz nas primeiras horas após a ingestão do excesso de medicamento. Entretanto, após estabelecimento da lesão, o tratamento mais eficaz e responsável por aumentar a sobrevivência dos pacientes de 20% para 70% nas últimas décadas tem sido o transplante hepático (Asrani *et al.*, 2019; Bernal, 2017). Porém, a demanda crescente, devido ao uso indiscriminado de paracetamol, produtos herbais e outros medicamentos, somado a um limitado número de doadores torna urgente a necessidade de

novas terapias para o tratamento da FHA (Bernal, 2017; Tavabie and Bernal, 2020). Além disso, os quadros infecciosos recorrentes apresentados pelos pacientes os impedem de receber transplante hepático e nem mesmo tratamento profilático de pacientes em FHA com antibióticos controla a infecção (Karvellas *et al.*, 2014; Stravitz and Lee, 2019). Assim, entender a dinâmica das células de Kupffer e monócitos durante a lesão hepática aguda é essencial para estabelecer alvos terapêuticos, focando no retorno à homeostase hepática e funcionalidade dos fagócitos.

Visando antecipar esse retorno à homeostase, uma estratégia interessante baseia-se no uso de terapias celulares. Recentemente, terapias celulares para o tratamento de diversas doenças hepáticas têm sido empregadas, por apresentarem resultados antifibróticos e pró-regenerativos (Starkey Lewis *et al.*, 2019). Dentre as células utilizadas estão os macrófagos, que, para doenças hepáticas, têm apresentado resultados eficazes e promissores (Moroni *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2011; van der Heide *et al.*, 2019). Nesse sentido, mostramos que os macrófagos derivados de medula óssea utilizados como terapia para LHA posicionam-se nas áreas de necrose, em que o nicho ocupado pelas células de Kupffer está aberto, o que pode auxiliar no desempenho de suas funções. Observamos uma redução nas áreas de necrose durante o pico da lesão no fígado dos animais tratados, o que ser explicado pelo fato de os MDMO ϕ e A.A apresentam *in vitro* uma elevada capacidade fagocítica, principalmente de debris celulares (Lewis *et al.*, 2020). Indo de encontro com essa ideia, um recente trabalho mostrou, para a fase resolutive da LHA induzida por APAP, que os MDMO A.A presentes no fígado são capazes de remover restos celulares circulantes, promovendo uma aceleração na resolução (Lewis *et al.*, 2020). Em nosso trabalho, mostramos que os efeitos da terapia com MDMO já são observados na fase aguda da lesão e ocorrem de forma independente do status de ativação celular.

Nesse linha, a eferocitose de restos celulares e células em processo de morte pelos MDMO podem alterar o microambiente hepático. Pois, a medida em que o material é processado no interior dos macrófagos eles vão adquirir um status pro-resolutivo com consequente produção de mediadores anti-inflamatórios, por exemplo IL-10 e TGF- β (Horst *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2020).

Além disso, observamos que os há um aumento nos monócitos Ly6C^{lo}CD11b⁺, caracterizados como pró-resolutivos (Dal-Secco *et al.*, 2015; Mossanen *et al.*, 2016), nos grupos que receberam MDMO em comparação ao grupo não tratado. Essa alteração pode ocorrer devido ao ambiente hepático mais pró-resolutivo, visto que já se tem descrito a alteração de perfil de monócitos pró-*in*famatório para pró-resolutivos quando há a mudança do microambiente hepático (Graubardt *et al.*, 2017; Mossanen *et al.*, 2016). Desse modo, o retorno da funcionalidade hepática pode ser recuperado mais rapidamente. Por fim, mostramos que a terapia com MDMO é capaz de aumentar a capacidade de remoção de bactérias circulantes. Assim, o fígado recupera uma de suas principais funções, o controle de patógenos circulantes, podendo assim, reduzir a susceptibilidade a infecções durante a LHA.

Outras propostas que visam acelerar o retorno do nicho de células mononucleares à homeostase também vêm apresentando resultados na prevenção e redução das lesões hepáticas. O processo de recuperação funcional dos macrófagos hepáticos após lesão e redução da população residente apresentou eficácia após tratamento com CSF-1, e também com administração de dexametasona, indutor da produção de CSF-1 (David *et al.*, 2016; Stutchfield *et al.*, 2015). Dessa forma, a terapia celular com macrófagos diferenciados ou a estimulação da diferenciação com CSF-1 e consequente retorno rápido à homeostase podem servir como um tratamento eficaz para doenças hepáticas agudas e no controle a infecções.

6. Conclusão

Em conclusão, a lesão hepática aguda induzida por sobredose de acetaminofeno abre um importante nicho hepático, disponibilizado pela morte das células de Kupffer, que é ocupado transitoriamente por monócitos infiltrantes. Essa transição é responsável pela susceptibilidade a infecções comumente encontrada em pacientes com LHA, uma vez que a população de KCs remanescentes perde sua capacidade de controle de patógenos circulantes e os monócitos recrutados ao tecido apresentam perfil transcricional que indica deficiência na fagocitose e eliminação desses patógenos. Dessa forma, uma modulação do nicho das células de Kupffer que vise a reposição adequada e adiantada pode contribuir para controle de quadros infecciosos durante a LHA, o que pode acontecer na terapia celular com MDMO. No nosso modelo, no pico da LHA, a terapia com MDMO foi capaz de reduzir as áreas de necrose e aumentar a capacidade hepática de remover bactérias da circulação, mostrando-se promissora para o tratamento de LHA e possivelmente outras lesões hepáticas em que há a perda de KCs.

7. Referências Bibliográficas

Alvarenga, D.M., Mattos, M.S., Lopes, M.E., Marchesi, S.C., Araujo, A.M., Nakagaki, B.N., Santos, M.M., David, B.A., De Souza, V.A., Carvalho, E., et al. (2018). Paradoxical Role of Matrix Metalloproteinases in Liver Injury and Regeneration after Sterile Acute Hepatic Failure. *Cells* 7. 10.3390/cells7120247.

Araujo, A.M., Antunes, M.M., Mattos, M.S., Diniz, A.B., Alvarenga, D.M., Nakagaki, B.N., Carvalho, E., Lacerda, V.A.S., Carvalho-Gontijo, R., Goulart, J., et al. (2018). Liver Immune Cells Release Type 1 Interferon Due to DNA Sensing and Amplify Liver Injury from Acetaminophen Overdose. *Cells* 7. 10.3390/cells7080088.

Asrani, S.K., Devarbhavi, H., Eaton, J., and Kamath, P.S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology* 70, 151-171. 10.1016/j.jhep.2018.09.014.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670. 10.1126/science.1142883.

Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., et al. (2014). The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Science translational medicine* 6, 237ra266. 10.1126/scitranslmed.3008618.

Barth, M.W., Hendrzak, J.A., Melnicoff, M.J., and Morahan, P.S. (1995). Review of the macrophage disappearance reaction. *Journal of leukocyte biology* 57, 361-367. 10.1002/jlb.57.3.361.

Baxt, L.A., Garza-Mayers, A.C., and Goldberg, M.B. (2013). Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* 340, 697-701. 10.1126/science.1235771.

Beattie, L., Sawtell, A., Mann, J., Frame, T.C.M., Teal, B., de Labastida Rivera, F., Brown, N., Walwyn-Brown, K., Moore, J.W.J., MacDonald, S., et al. (2016). Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *Journal of hepatology* 65, 758-768. 10.1016/j.jhep.2016.05.037.

Ben-Moshe, S., and Itzkovitz, S. (2019). Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 395-410. 10.1038/s41575-019-0134-x.

Ben Mkaddem, S., Benhamou, M., and Monteiro, R.C. (2019). Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. *Frontiers in immunology* 10, 811. 10.3389/fimmu.2019.00811.

Bernal, W. (2017). Acute Liver Failure: Review and Update. *Int Anesthesiol Clin* 55, 92-106. 10.1097/AIA.0000000000000141.

Bilzer, M., Roggel, F., and Gerbes, A.L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26, 1175-1186. 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x.

Bleriot, C., Barreby, E., Dunsmore, G., Ballaire, R., Chakarov, S., Ficht, X., De Simone, G., Andreatta, F., Fumagalli, V., Guo, W., et al. (2021). A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2021.08.006.

Bleriot, C., Chakarov, S., and Ginhoux, F. (2020). Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* 52, 957-970. 10.1016/j.immuni.2020.05.014.

Bleriot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., and Lecuit, M. (2015). Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* 42, 145-158. 10.1016/j.immuni.2014.12.020.

Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C.L., Martens, L., Vanneste, B., De Prijck, S., Nedospasov, S.A., Kremer, A., et al. (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* 51, 638-654 e639. 10.1016/j.immuni.2019.08.017.

Borst, K., Frenz, T., Spanier, J., Tegtmeyer, P.K., Chhatbar, C., Skerra, J., Ghita, L., Namineni, S., Lienenklaus, S., Koster, M., et al. (2017). Type I interferon receptor signaling delays Kupffer cell replenishment during acute fulminant viral hepatitis. *Journal of hepatology*. 10.1016/j.jhep.2017.11.029.

Broadley, S.P., Plaumann, A., Coletti, R., Lehmann, C., Wanisch, A., Seidlmeier, A., Esser, K., Luo, S., Ramer, P.C., Massberg, S., et al. (2016). Dual-Track Clearance of Circulating Bacteria Balances Rapid Restoration of Blood Sterility with Induction of Adaptive Immunity. *Cell host & microbe* 20, 36-48. 10.1016/j.chom.2016.05.023.

Browicz, T. (1899). Ueber intravasculare zellen in den blutcapillaren der leberacini. Separat aus dem anzeiger der akademie der wissenschaften in Krakau, 6-8.

Caron, E., and Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721. 10.1126/science.282.5394.1717.

Celli, J., Olivier, M., and Finlay, B.B. (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J* 20, 1245-1258. 10.1093/emboj/20.6.1245.

Crowley, L.C., Marfell, B.J., Scott, A.P., and Waterhouse, N.J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016. 10.1101/pdb.prot087288.

Dal-Secco, D., Wang, J., Zeng, Z., Kolaczowska, E., Wong, C.H., Petri, B., Ransohoff, R.M., Charo, I.F., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2015). A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+

monocytes at a site of sterile injury. *The Journal of experimental medicine* 212, 447-456. 10.1084/jem.20141539.

David, B.A., Rezende, R.M., Antunes, M.M., Santos, M.M., Freitas Lopes, M.A., Diniz, A.B., Sousa Pereira, R.V., Marchesi, S.C., Alvarenga, D.M., Nakagaki, B.N., et al. (2016). Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology* 151, 1176-1191. 10.1053/j.gastro.2016.08.024.

Devisscher, L., Scott, C.L., Lefere, S., Raevens, S., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Geerts, A., Guilliams, M., and Van Vlierberghe, H. (2017). Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cell Immunol* 322, 74-83. 10.1016/j.cellimm.2017.10.006.

Di Paolo, N.C., Doronin, K., Baldwin, L.K., Papayannopoulou, T., and Shayakhmetov, D.M. (2013). The transcription factor IRF3 triggers "defensive suicide" necrosis in response to viral and bacterial pathogens. *Cell reports* 3, 1840-1846. 10.1016/j.celrep.2013.05.025.

Fisher, K., Vuppalanchi, R., and Saxena, R. (2015). Drug-Induced Liver Injury. *Arch Pathol Lab Med* 139, 876-887. 10.5858/arpa.2014-0214-RA.

Ginhoux, F., Bleriot, C., and Lecuit, M. (2017). Dying for a Cause: Regulated Necrosis of Tissue-Resident Macrophages upon Infection. *Trends in immunology* 38, 693-695. 10.1016/j.it.2017.05.009.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 44, 439-449. S1074-7613(16)30063-2 [pii];10.1016/j.immuni.2016.02.024 [doi].

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551. 10.1038/nature13989.

- Gonçalves, R.M., D.M. (2015). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol* (111), 14.11.11. 10.1002/0471142735.im1401s111.
- Gonzalez, N., Quintana, J.A., Garcia-Silva, S., Mazariegos, M., Gonzalez, d.I.A., Nicolas-Avila, J.A., Walter, W., Adrover, J.M., Crainiciuc, G., Kuchroo, V.K., et al. (2017). Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *J.Exp.Med.* 214, 1281-1296. jem.20161375 [pii];10.1084/jem.20161375 [doi].
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463-475. 10.1016/j.immuni.2016.02.026.
- Graubardt, N., Vugman, M., Mouhadeb, O., Caliari, G., Pasmanik-Chor, M., Reuveni, D., Zigmond, E., Brazowski, E., David, E., Chappell-Maor, L., et al. (2017). Ly6C(hi) Monocytes and Their Macrophage Descendants Regulate Neutrophil Function and Clearance in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Frontiers in immunology* 8, 626. 10.3389/fimmu.2017.00626.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32, 659-702. 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
- Gros, P., Milder, F.J., and Janssen, B.J. (2008). Complement driven by conformational changes. *Nature reviews. Immunology* 8, 48-58. 10.1038/nri2231.
- Guilliams, M., Bonnardel, J., Haest, B., Vanderborght, B., Wagner, C., Remmerie, A., Bujko, A., Martens, L., Thone, T., Browaeys, R., et al. (2022). Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell* 185, 379-396 e338. 10.1016/j.cell.2021.12.018.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature reviews. Immunology* 14, 571-578. 10.1038/nri3712.

Guilliams, M., and Scott, C.L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature reviews. Immunology* 17, 451-460. 10.1038/nri.2017.42.

Guilliams, M., Thierry, G.R., Bonnardel, J., and Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52, 434-451. 10.1016/j.immuni.2020.02.015.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C-monocytes. *Nature immunology* 12, 778-785. 10.1038/ni.2063.

He, J.Q., Wiesmann, C., and van Lookeren Campagne, M. (2008). A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Mol Immunol* 45, 4041-4047. 10.1016/j.molimm.2008.07.011.

Hoehme, S., Brulport, M., Bauer, A., Bedawy, E., Schormann, W., Hermes, M., Puppe, V., Gebhardt, R., Zellmer, S., Schwarz, M., et al. (2010). Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10371-10376. 10.1073/pnas.0909374107.

Holt, M.P., Cheng, L., and Ju, C. (2008). Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *Journal of leukocyte biology* 84, 1410-1421. 10.1189/jlb.0308173.

Horst, A.K., Tiegs, G., and Diehl, L. (2019). Contribution of Macrophage Efferocytosis to Liver Homeostasis and Disease. *Frontiers in immunology* 10, 2670. 10.3389/fimmu.2019.02670.

Huynh, K.K., Eskelinen, E.L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 26, 313-324. 10.1038/sj.emboj.7601511.

Ikarashi, M., Nakashima, H., Kinoshita, M., Sato, A., Nakashima, M., Miyazaki, H., Nishiyama, K., Yamamoto, J., and Seki, S. (2013). Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *Journal of leukocyte biology* 94, 1325-1336. 10.1189/jlb.0313144.

Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264. 10.1093/biostatistics/4.2.249.

Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2020a). Mechanisms and pathophysiological significance of sterile inflammation during acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol* 138, 111240. 10.1016/j.fct.2020.111240.

Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2020b). The Role of Oxidant Stress in Acetaminophene-Induced Liver Injury. *Curr Opin Toxicol* 20-21, 9-14. 10.1016/j.cotox.2020.03.003.

Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nature immunology* 14, 996-1006. 10.1038/ni.2691.

Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci* 28, 1947-1951. 10.1002/pro.3715.

Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30. 10.1093/nar/28.1.27.

Karvellas, C.J., Cavazos, J., Battenhouse, H., Durkalski, V., Balko, J., Sanders, C., Lee, W.M., and Group, U.S.A.L.F.S. (2014). Effects of antimicrobial prophylaxis and blood stream infections in patients with acute liver failure: a retrospective cohort study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12, 1942-1949 e1941. 10.1016/j.cgh.2014.03.011.

Karvellas, C.J., Pink, F., McPhail, M., Cross, T., Auzinger, G., Bernal, W., Sizer, E., Kutsogiannis, D.J., Eltringham, I., and Wendon, J.A. (2009). Predictors of bacteraemia and mortality in patients with acute liver failure. *Intensive Care Med* 35, 1390-1396. 10.1007/s00134-009-1472-x.

Kasravi, F.B., Wang, L., Wang, X.D., Molin, G., Bengmark, S., and Jeppsson, B. (1996). Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology* 23, 97-103. 10.1002/hep.510230114.

Kassmbara, A.M., F. (2020). Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R Package Version 1.0.7.

Kaufmann, S.H.E., and Dorhoi, A. (2016). Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity* 44, 476-491. 10.1016/j.immuni.2016.02.014.

Kleiner, D.E. (2014). Liver histology in the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 4, 12-16. 10.1002/cld.371.

Kratofil, R.M., Kubes, P., and Deniset, J.F. (2017). Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37, 35-42. 10.1161/ATVBAHA.116.308198.

Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature reviews. Immunology* 17, 306-321. 10.1038/nri.2017.11.

Kubes, P., and Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol* 36, 247-277. 10.1146/annurev-immunol-051116-052415.

Kubes, P., and Mehal, W.Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 143, 1158-1172. 10.1053/j.gastro.2012.09.008.

Kupffer, K.v. (1876). Ueber Sternzellen der leber. *Archiv fur mikroskopische Anatomie*, 353-358.

Laarman, A., Milder, F., van Strijp, J., and Rooijackers, S. (2010). Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Med (Berl)* 88, 115-120. 10.1007/s00109-009-0572-y.

Lai, S.M., Sheng, J., Gupta, P., Renia, L., Duan, K., Zolezzi, F., Karjalainen, K., Newell, E.W., and Ruedl, C. (2018). Organ-Specific Fate, Recruitment, and Refilling Dynamics of Tissue-Resident Macrophages during Blood-Stage Malaria. *Cell reports* 25, 3099-3109 e3093. 10.1016/j.celrep.2018.11.059.

Lee, W.M. (2017). Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *Journal of hepatology* 67, 1324-1331. 10.1016/j.jhep.2017.07.005.

Lewis, P.S., Campana, L., Aleksieva, N., Cartwright, J.A., Mackinnon, A., O'Duibhir, E., Kendall, T., Vermeren, M., Thomson, A., Gadd, V., et al. (2020). Alternatively activated macrophages promote resolution of necrosis following acute liver injury. *Journal of hepatology*. 10.1016/j.jhep.2020.02.031.

Liu, Z., Gu, Y., Chakarov, S., Bleriot, C., Kwok, I., Chen, X., Shin, A., Huang, W., Dress, R.J., Dutertre, C.A., et al. (2019). Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. *Cell* 178, 1509-1525 e1519. 10.1016/j.cell.2019.08.009.

Liu, Z.X., Han, D., Gunawan, B., and Kaplowitz, N. (2006). Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43, 1220-1230. 10.1002/hep.21175.

Luster, A.D. (2019). Introduction: Global positioning by chemokines and other mediators. *Immunological reviews* 289, 5-8. 10.1111/imr.12763.

Marques, P.E., Amaral, S.S., Pires, D.A., Nogueira, L.L., Soriani, F.M., Lima, B.H., Lopes, G.A., Russo, R.C., Avila, T.V., Melgaco, J.G., et al. (2012). Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* 56, 1971-1982. 10.1002/hep.25801.

Marques, P.E., Antunes, M.M., David, B.A., Pereira, R.V., Teixeira, M.M., and Menezes, G.B. (2015a). Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nat Protoc* 10, 258-268. 10.1038/nprot.2015.006.

Marques, P.E., Oliveira, A.G., Pereira, R.V., David, B.A., Gomides, L.F., Saraiva, A.M., Pires, D.A., Novaes, J.T., Patricio, D.O., Cisalpino, D., et al. (2015b). Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology* 61, 348-360. 10.1002/hep.27216.

Marques, P.E., Vandendriessche, S., Oliveira, T.H., Crijns, H., Lopes, M.E., Blanter, M., Schuermans, S., Yu, K., Poosti, F., Vanheule, V.J., et al. (2021).

Inhibition of drug-induced liver injury in mice using a positively charged peptide that binds DNA. *Hepatology communications* 0. 10.1002/hep4.1759.

Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Gunther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Handler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., et al. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353. 10.1126/science.aaf4238.

Mattos, M.S., Lopes, M.E., de Araujo, A.M., Alvarenga, D.M., Nakagaki, B.N., Mafra, K., de Miranda, C.D.M., Diniz, A.B., Antunes, M.M., Lopes, M.A.F., et al. (2020). Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 10.1002/JLB.1MA0420-634R.

McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366. 10.1126/science.1195491.

McGill, M.R., and Jaeschke, H. (2019). Biomarkers of drug-induced liver injury. *Adv Pharmacol* 85, 221-239. 10.1016/bs.apha.2019.02.001.

Means, S.A., and Ho, H. (2019). A spatial-temporal model for zonal hepatotoxicity of acetaminophen. *Drug Metab Pharmacokinet* 34, 71-77. 10.1016/j.dmpk.2018.09.266.

Metschnikoff, E. (1891). Lecture on Phagocytosis and Immunity. *BMJ*. doi.org/10.1136/bmj.1.1570.213

Moroni, F., Dwyer, B.J., Graham, C., Pass, C., Bailey, L., Ritchie, L., Mitchell, D., Glover, A., Laurie, A., Doig, S., et al. (2019). Safety profile of autologous macrophage therapy for liver cirrhosis. *Nature medicine* 25, 1560-1565. 10.1038/s41591-019-0599-8.

Mossanen, J.C., Krenkel, O., Ergen, C., Govaere, O., Liepelt, A., Puengel, T., Heymann, F., Kalthoff, S., Lefebvre, E., Eulberg, D., et al. (2016). Chemokine (C-C motif) receptor 2-positive monocytes aggravate the early phase of

acetaminophen-induced acute liver injury. *Hepatology* 64, 1667-1682.
10.1002/hep.28682.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 41, 14-20. S1074-7613(14)00228-3 [pii];10.1016/j.immuni.2014.06.008 [doi].

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5, 85-87. 10.1016/s0962-8924(00)88955-2.

Remmerie, A., Martens, L., Thone, T., Castoldi, A., Seurinck, R., Pavie, B., Roels, J., Vanneste, B., De Prijck, S., Vanhockerhout, M., et al. (2020). Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity* 53, 641-657 e614. 10.1016/j.immuni.2020.08.004.

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47. 10.1093/nar/gkv007.

Rolando, N., Harvey, F., Brahm, J., Philpott-Howard, J., Alexander, G., Gimson, A., Casewell, M., Fagan, E., and Williams, R. (1990). Prospective study of bacterial infection in acute liver failure: an analysis of fifty patients. *Hepatology* 11, 49-53. 10.1002/hep.1840110110.

Rolando, N., Philpott-Howard, J., and Williams, R. (1996). Bacterial and fungal infection in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 16, 389-402. 10.1055/s-2007-1007252.

Rossaint, J., and Zarbock, A. (2013). Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J Innate Immun* 5, 348-357. 10.1159/000345943.

Rua, R., and McGavern, D.B. (2015). Elucidation of monocyte/macrophage dynamics and function by intravital imaging. *Journal of leukocyte biology* 98, 319-332. 10.1189/jlb.4RI0115-006RR.

Russell, D.G. (2011). Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunological reviews* 240, 252-268. 10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x.

Sakai, M., Troutman, T.D., Seidman, J.S., Ouyang, Z., Spann, N.J., Abe, Y., Ego, K.M., Bruni, C.M., Deng, Z., Schlachetzki, J.C.M., et al. (2019). Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity* 51, 655-670 e658. 10.1016/j.immuni.2019.09.002.

Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature communications* 7, 10321. 10.1038/ncomms10321.

Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., and Hiraide, H. (2000). The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunological reviews* 174, 35-46. 10.1034/j.1600-0528.2002.017404.x.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* 7, 311-317. 10.1038/ni1309.

Shan, Z., and Ju, C. (2020). Hepatic Macrophages in Liver Injury. *Frontiers in immunology* 11, 322. 10.3389/fimmu.2020.00322.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 11, 762-774. 10.1038/nri3070.

Sierro, F., Evrard, M., Rizzetto, S., Melino, M., Mitchell, A.J., Florido, M., Beattie, L., Walters, S.B., Tay, S.S., Lu, B., et al. (2017). A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity* 47, 374-388 e376. 10.1016/j.immuni.2017.07.018.

Starkey Lewis, P.J., Moroni, F., and Forbes, S.J. (2019). Macrophages as a Cell-Based Therapy for Liver Disease. *Semin Liver Dis* 39, 442-451. 10.1055/s-0039-1688502.

Stravitz, R.T., and Lee, W.M. (2019). Acute liver failure. *Lancet* 394, 869-881. 10.1016/S0140-6736(19)31894-X.

Stutchfield, B.M., Antoine, D.J., Mackinnon, A.C., Gow, D.J., Bain, C.C., Hawley, C.A., Hughes, M.J., Francis, B., Wojtacha, D., Man, T.Y., et al. (2015). CSF1 Restores Innate Immunity After Liver Injury in Mice and Serum Levels Indicate Outcomes of Patients With Acute Liver Failure. *Gastroenterology* 149, 1896-1909 e1814. 10.1053/j.gastro.2015.08.053.

Tavabie, O.D., and Bernal, W. (2020). How to manage: acute liver failure. *Frontline Gastroenterol* 11, 70-74. 10.1136/flgastro-2018-101105.

Teutsch, H.F. (2005). The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology* 42, 317-325. 10.1002/hep.20764.

Thakur, A., Mikkelsen, H., and Jungersen, G. (2019). Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *J Immunol Res* 2019, 1356540. 10.1155/2019/1356540.

Thomas, J.A., Pope, C., Wojtacha, D., Robson, A.J., Gordon-Walker, T.T., Hartland, S., Ramachandran, P., Van Deemter, M., Hume, D.A., Iredale, J.P., and Forbes, S.J. (2011). Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology* 53, 2003-2015. 10.1002/hep.24315.

Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology* 10, 753-766. 10.1038/nri2858.

Thorgersen, E.B., Barratt-Due, A., Haugaa, H., Harboe, M., Pischke, S.E., Nilsson, P.H., and Mollnes, T.E. (2019). The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. *Hepatology* 70, 725-736. 10.1002/hep.30508.

- Toth, C.A., and Thomas, P. (1992). Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology* 16, 255-266.
- Tran, S., Baba, I., Poupel, L., Dussaud, S., Moreau, M., Gelineau, A., Marcelin, G., Magreau-Davy, E., Ouhachi, M., Lesnik, P., et al. (2020). Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2020.06.003.
- Triantafyllou, E., Pop, O.T., Possamai, L.A., Wilhelm, A., Liaskou, E., Singanayagam, A., Bernsmeier, C., Khamri, W., Petts, G., Dargue, R., et al. (2018a). MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure. *Gut* 67, 333-347. 10.1136/gutjnl-2016-313615.
- Triantafyllou, E., Woollard, K.J., McPhail, M.J.W., Antoniadou, C.G., and Possamai, L.A. (2018b). The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. *Frontiers in immunology* 9, 2948. 10.3389/fimmu.2018.02948.
- Uribe-Querol, E., and Rosales, C. (2017). Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Frontiers in immunology* 8, 1368. 10.3389/fimmu.2017.01368.
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., and Guilliams, M. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44, 755-768. 10.1016/j.immuni.2016.02.017.
- van der Heide, D., Weiskirchen, R., and Bansal, R. (2019). Therapeutic Targeting of Hepatic Macrophages for the Treatment of Liver Diseases. *Frontiers in immunology* 10, 2852. 10.3389/fimmu.2019.02852.
- van, F.R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J.Exp.Med.* 128, 415-435.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new

classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46, 845-852.

Van Rooijen, N., and Sanders, A. (1996). Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology* 23, 1239-1243. 10.1053/jhep.1996.v23.pm0008621159.

Vandendriessche, S., Cambier, S., Proost, P., and Marques, P.E. (2021). Complement Receptors and Their Role in Leukocyte Recruitment and Phagocytosis. *Front Cell Dev Biol* 9, 624025. 10.3389/fcell.2021.624025.

Vaquero, J., Polson, J., Chung, C., Helenowski, I., Schiodt, F.V., Reisch, J., Lee, W.M., and Blei, A.T. (2003). Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology* 125, 755-764. 10.1016/s0016-5085(03)01051-5.

Vollmar, B., and Menger, M.D. (2009). The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 89, 1269-1339. 10.1152/physrev.00027.2008
89/4/1269 [pii].

Wang, M., You, Q., Lor, K., Chen, F., Gao, B., and Ju, C. (2014). Chronic alcohol ingestion modulates hepatic macrophage populations and functions in mice. *Journal of leukocyte biology* 96, 657-665. 10.1189/jlb.6A0114-004RR.

Wen, Y., Lambrecht, J., Ju, C., and Tacke, F. (2021). Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell Mol Immunol* 18, 45-56. 10.1038/s41423-020-00558-8.

Westman, J., Grinstein, S., and Marques, P.E. (2019). Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. *Frontiers in immunology* 10, 3030. 10.3389/fimmu.2019.03030.

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

interpreting omics data. *Innovation (N Y)* 2, 100141.

10.1016/j.xinn.2021.100141.

Wyke, R.J., Canalese, J.C., Gimson, A.E., and Williams, R. (1982).

Bacteraemia in patients with fulminant hepatic failure. *Liver* 2, 45-52.

10.1111/j.1600-0676.1982.tb00177.x.

Yang, R., and Tonnesseen, T.I. (2019). DAMPs and sterile inflammation in drug hepatotoxicity. *Hepatol Int* 13, 42-50. 10.1007/s12072-018-9911-9.

Yang, R., Zou, X., Tenhunen, J., and Tonnessen, T.I. (2017). HMGB1 and Extracellular Histones Significantly Contribute to Systemic Inflammation and Multiple Organ Failure in Acute Liver Failure. *Mediators Inflamm* 2017, 5928078. 10.1155/2017/5928078.

Yang, R., Zou, X., Tenhunen, J., Zhu, S., Kajander, H., Koskinen, M.L., and Tonnessen, T.I. (2014). HMGB1 neutralization is associated with bacterial translocation during acetaminophen hepatotoxicity. *BMC Gastroenterol* 14, 66. 10.1186/1471-230X-14-66.

Yang, W., Zhao, X., Tao, Y., Wu, Y., He, F., and Tang, L. (2019). Proteomic analysis reveals a protective role of specific macrophage subsets in liver repair. *Scientific reports* 9, 2953. 10.1038/s41598-019-39007-6.

Yona, S., and Gordon, S. (2015). From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System - The Unaccounted Years. *Front Immunol.* 6, 328. 10.3389/fimmu.2015.00328 [doi].

You, Q., Holt, M., Yin, H., Li, G., Hu, C.J., and Ju, C. (2013). Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. *Biochem Pharmacol* 86, 836-843. 10.1016/j.bcp.2013.07.006.

Zeng, Z., Surewaard, B.G., Wong, C.H., Geoghegan, J.A., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2016). CRIg Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria. *Cell host & microbe* 20, 99-106. 10.1016/j.chom.2016.06.002.

Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *Journal of immunology* 193, 344-353.
10.4049/jimmunol.1400574.

8. Anexos

8.1. Artigo submetido - Primeiro autor

Your manuscript submission - 892114

Frontiers in Immunology Editorial Office <immunology.editorial.office@frontiersin.org>

Ter, 08/03/2022 12:27

Para: Mateus Lopes <mateuslopes_12@hotmail.com>

Dear Dr Lopes

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Susceptibility to infections during acute liver injury depends on transient disruption of liver macrophage niche" to be considered for publication in Frontiers in Immunology, section Inflammation.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Kind regards,

Your Frontiers in Immunology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team

www.frontiersin.org

12 Moorgate,

EC2R 6DA, London, UK

Office T 44 203 5144 082

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us);

Frontiers in Immunology is the official journal of the IUIS

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Susceptibility to infections during acute liver injury depends on transient disruption of liver macrophage niche

Manuscript ID: 892114

Authors: Mateus Eustáquio Lopes, Matheus Silvério Mattos, Brenda Naemi Nakagaki, Gabriel Henrique Campolina-Silva, Raquel de Oliveira Meira, Pierre Henrique De Menezes Paixão, André Oliveira, Ricardo Goncalves and Gustavo Batista Menezes

Journal: Frontiers in Immunology, section Inflammation

Article type: Original Research

Submitted on: 08 Mar 2022

Research Topic: Rising Stars in Inflammation 2021

Susceptibility to infections during acute liver injury depends on transient disruption of liver macrophage niche

Mateus E. Lopes^{1*}, Matheus S. Mattos^{1,2}, Brenda N. Nakagaki¹, Gabriel H. Campolina-Silva^{3,4}, Raquel d. Meira⁵, Pierre Henrique D. Paixão⁵, André Oliveira⁶, Ricardo Goncalves⁵, Gustavo B. Menezes^{1*}

¹Center for Gastrointestinal Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil, ²Laboratory of Molecular Immunology, Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical Research, KU \square Leuven, Belgium, ³Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil, ⁴Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Canada, ⁵Macrophage and Monocyte Biology Laboratory, Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil, ⁶Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Immunology

Specialty Section:
Inflammation

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
892114

Received on:
08 Mar 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org


8.2. Artigo publicado – Coautor

DOI: 10.1002/JLB.1MA0420-634R



ARTICLE

Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation

Matheus Silvério Mattos¹ | Mateus Eustáquio Lopes¹ | Alan Moreira de Araujo¹ |
 Débora Moreira Alvarenga¹ | Brenda Naemi Nakagaki¹ | Kassiana Mafra¹ |
 Camila Dutra Moreira de Miranda¹ | Ariane Barros Diniz¹ | Máisa Mota Antunes¹ |
 Maria Alice Freitas Lopes¹ | Rafael Machado Rezende² | Gustavo Batista Menezes¹ 

¹Center for Gastrointestinal Biology, Morphology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence

Gustavo B. Menezes, Center for Gastrointestinal Biology, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627–Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270–901, Brazil. Email: menezesgb@ufmg.br

Abstract

Neutrophils were classically described as powerful effectors of acute inflammation, and their main purpose was assumed to be restricted to pathogen killing through production of oxidants. As consequence, neutrophils also may lead to significant collateral damage to the healthy tissues, and after performing these tasks, these leukocytes are supposed to die within tissues. However, there is a growing body of evidence showing that neutrophils also play a pivotal role in the resolution phases of inflammation, because they can modulate tissue environment due to secretion of different kind of cytokines. Drug-induced liver injury (DILI) is a worldwide concern being one of the most prevalent causes of liver transplantation, and is well established that there is an intense neutrophil recruitment into necrotic liver during DILI. However, information if such abundant granulocyte infiltration is also linked to the tissue repairing phase of hepatic injury is still largely elusive. Here, we investigated the dynamics of neutrophil trafficking within blood, bone marrow, and liver during hepatic inflammation, and how changes in their gene expression profile could drive the resolution events during acetaminophen (APAP)-induced liver injury. We found that neutrophils remained viable during longer periods following liver damage, because they avidly patrolled necrotic areas and up-regulated pro-resolutive genes, including *Tgfb*, *Il1r2*, and *Fpr2*. Adoptive transference of "resolutive neutrophils" harvested from livers at 72 h after injury to mice at the initial phases of injury (6 h after APAP) significantly rescued organ injury. Thus, we provide novel insights on the role of neutrophils not only in the injury amplification, but also in the resolution phases of inflammation.

KEYWORDS

hepatology, immunology, in vivo imaging, liver necrosis, neutrophil, resolution of inflammation, sterile injury, tissue repair

1 | INTRODUCTION

Neutrophils are polymorphonuclear leukocytes, classically seen as the blunt tool of acute inflammation. In fact, neutrophils are typically one of the first cells to extravasate into tissues in response to

Abbreviations: ALT, Alanine aminotransferase; APAP, Acetaminophen; CLL, Clodronate liposomes; DAMPs, Damage-associated molecular patterns; DILI, Drug-induced liver injury; ICG, Indocyanine Green; KC, Kupffer cell; NAC, N-acetyl cysteine; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinone imine; NPCs, Nonparenchymal cells; NSAID, Nonsteroidal anti-inflammatory drug; RT-PCR, Real-time PCR.

Received: 24 January 2020 | Revised: 13 April 2020 | Accepted: 17 April 2020

J Leukoc Biol. 2020;1–15.

www.jleukbio.org

©2020 Society for Leukocyte Biology | 1

8.3. Doutorado Sanduíche no Exterior

Durante o período do doutorado, foi realizado um período de 6 meses no exterior, de Outubro de 2020 a Março de 2021. A pesquisa foi conduzida no Center for Immunology and Inflammatory Diseases, da Division of Rheumatology, Allergy and Immunology, no Massachusetts General Hospital/Havard Medical School, sob orientação do M.D Ph.D Andrew Luster e Ph.D Lucas Faustino. No período, foram desenvolvidas pesquisas sobre o posicionamento de células imunes no pulmão através de sinalização por quimiocinas durante resposta imune a alérgenos. Também, em linha semelhante, no período houve a contribuição para um artigo em que foi mostrado que as vias de sinalização por quimiocinas são essenciais para o posicionamento e fenótipo de Linfócitos T CD8⁺ no baço durante infecção viral.



MASSACHUSETTS
GENERAL HOSPITAL



HARVARD
MEDICAL SCHOOL

**Division of Rheumatology, Allergy & Immunology
Center for Immunology & Inflammatory Diseases**

149 Thirteenth Street, Room 8304
Charlestown, MA 02129
Tel: 617.726.5710
Fax: 617.726.5651
E-mail: aluster@mg.harvard.edu

Andrew D. Luster, MD, PhD

*Chief, Division of Rheumatology, Allergy & Immunology
Director, Center for Immunology & Inflammatory Diseases
E. Alexandria & Michael N. Altman Chair in Immunology
Massachusetts General Hospital
Persis, Cyrus and Marlow B. Harrison Professor of Medicine
Harvard Medical School*

April 15, 2021

To whom it may concern:

This letter is to confirm that Mateus Lopes joined my laboratory in the Center for Immunology and Inflammatory Diseases (CIID) at Massachusetts General Hospital in October 2020 for a six month research internship. Mateus worked under the direct supervision of Dr. Lucas Faustino on a project focusing on defining the cell sources of the chemokines CCL8 and CXCL16 in the lung in response to environmental allergens.

Mateus has a background in immunology and expertise in fluorescence microscopy that was essential for the establishment of a protocol to identify the expression of chemokines in the lung by confocal microscopy. In addition, using flow cytometry cell sorting and RT-qPCR he characterized the specific immune cell populations in the lung that express the chemokines CCL8 and CXCL16 and their receptors CCR8 and CXCR6, respectively, at baseline and in allergic inflammation. His experience in fluorescence microscopy also led him to collaborate with other research fellows in my laboratory and contribute to a study currently submitted to a peer-reviewed scientific journal.

Mateus participated in CIID conferences, including a weekly Immunology Journal Club and a monthly “work-in-progress” floor meeting during which postdoctoral fellows present their current research. He also attended my weekly lab meetings and one-on-one meetings twice a month where we reviewed his data and discussed his progress. Mateus was an absolute pleasure to have in my laboratory and he did an excellent job presenting his findings during lab meetings.

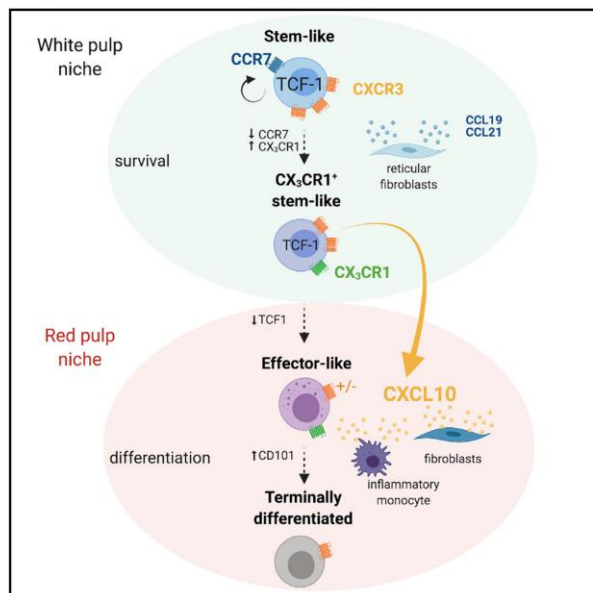
Sincerely,

Andrew D. Luster, M.D., Ph.D.

Immunity

CXCL10 chemokine regulates heterogeneity of the CD8⁺ T cell response and viral set point during chronic infection

Graphical abstract



Authors

Aleksandra J. Ozga, Melvyn T. Chow, Mateus E. Lopes, ..., Jeffrey Lian, Thorsten R. Mempel, Andrew D. Luster

Correspondence

aluster@mgh.harvard.edu

In brief

The chemokine CXCL10 limits formation of memory CD8⁺ T cells during acute infection, but its role in CD8⁺ T cell differentiation during chronic infection is unknown. Ozga et al. reveal that CXCL10 expression in the splenic red pulp of chronically infected mice promotes exposure of virus-specific stem-like CD8⁺ T cells to differentiation signals and limits access to pro-survival signals.

Highlights

- Inflammatory monocytes and fibroblasts of the splenic red pulp produce CXCL10
- CXCL10 limits exposure of stem-like CD8⁺ T cells to pro-survival signals
- CXCL10 promotes access of virus-specific CD8⁺ T cells to differentiation signals
- *Cxcl10*^{-/-} mice chronically infected with LCMV have a lower viral set point

8.4. Produções bibliográficas durante período de doutorado

SANTOS, L. M.; MONTUORI, A. C.; **LOPES, M. E.** Importance of the Microbiome and the Metabolome in Cancer. In: Joel Faintuch; Salomao Faintuch. (Org.). Microbiome, Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications. 1ed.Londres: Elsevier, 2018, v. 1, p. 365-367.

ALVARENGA, DÉBORA; MATTOS, MATHEUS; **LOPES, MATEUS**; MARCHESI, SARAH; ARAÚJO, ALAN; NAKAGAKI, BRENDA; SANTOS, MÔNICA; DAVID, BRUNA; DE SOUZA, VIVIANE; CARVALHO, ÉRIKA; SOUSA PEREIRA, RAFAELA; MARQUES, PEDRO; MAFRA, KASSIANA; DE CASTRO OLIVEIRA, HORTÊNCIA; DE MIRANDA, CAMILA; DINIZ, ARIANE; DE OLIVEIRA, THIAGO; TEIXEIRA, MAURO; REZENDE, RAFAEL; ANTUNES, MAÍSA; MENEZES, GUSTAVO. Paradoxical Role of Matrix Metalloproteinases in Liver Injury and Regeneration after Sterile Acute Hepatic Failure. *Cells*, v. 7, p. 247, 2018.

NAKAGAKI, BRENDA NAEMI MAFRA, KASSIANA DE CARVALHO, ÉRIKA; **LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO** CARVALHO-GONTIJO, RAQUEL DE CASTRO OLIVEIRA, HORTÊNCIA MACIEL HENRIQUE CAMPOLINA-SILVA, GABRIEL DE MIRANDA, CAMILA DUTRA MOREIRA ANTUNES, MAÍSA MOTA SILVA, ANA CAROLINA CARVALHO DINIZ, ARIANE BARROS ALVARENGA, DÉBORA MOREIRA FREITAS LOPES, MARIA ALICE DE SOUZA LACERDA, VIVIANE APARECIDA MATTOS, MATHEUS SILVÉRIO ARAÚJO, ALAN MOREIRA VIDIGAL, PAULA VIEIRA TEIXEIRA LIMA, CRISTIANO XAVIER MAHECHA, GERMÁN A.B. MADEIRA, MILA FERNANDES MOREIRA FERNANDES, GABRIEL ROCHA NOGUEIRA, RAQUEL FERRAZ MOREIRA, THAIS GARCIAS DAVID, BRUNA ARAÚJO REZENDE, RAFAEL MACHADO , *et al.* ; Immune and Metabolic Shifts During Neonatal Development Reprogram Liver Identity and Function. *JOURNAL OF HEPATOLOGY*, v. 69, p. 1294-1307, 2018.

MACHADO, MARINA GOMES; TAVARES, LUCIANA PÁDUA; SOUZA, GEOVANNA V. SANTOS; QUEIROZ JUNIOR, CELSO M.; ASCENÇÃO, FERNANDO ROQUE; **LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO**; GARCIA, CRISTIANA COUTO; MENEZES, GUSTAVO BATISTA; PERRETTI, MAURO; RUSSO, REMO CASTRO; TEIXEIRA, MAURO MARTINS; SOUSA, LIRLÂNDIA PIRES. The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. *FASEB JOURNAL*, v. -, p. -, 2019

REZENDE, RAFAEL MACHADO; **LOPES, M. E.**; MENEZES, GUSTAVO BATISTA; WEINER, H. L. Visualizing Lymph Node Structure and Cellular Localization using Ex-Vivo Confocal Microscopy. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, p. -, 2019.

DINIZ, ARIANE BARROS ANTUNES, MAÍSA MOTA LACERDA, VIVIANE APARECIDA DE SOUZA NAKAGAKI, BRENDA NAEMI FREITAS LOPES, MARIA ALICE CASTRO-OLIVEIRA, HORTÊNCIA MACIEL DE MATTOS, MATHEUS SILVÉRIO MAFRA, KASSIANA DE MIRANDA, CAMILA DUTRA MOREIRA DE OLIVEIRA COSTA, KAREN MARQUES **LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO** ALVARENGA, DÉBORA MOREIRA CARVALHO-GONTIJO, RAQUEL MARCHESI, SARAH COZZER LACERDA, DEBORA ROMUALDO DE ARAÚJO, ALAN MOREIRA DE CARVALHO, ÉRIKA DAVID, BRUNA ARAÚJO SANTOS, MÔNICA MORAIS LIMA, CRISTIANO XAVIER SILVA GOMES, JULIANA ASSIS MINTO FONTES CAL, TEREZA CRISTINA DE SOUZA, BRUNA ROQUE COUTO, CLÁUDIA ALVES FARIA, LUCIANA COSTA , *et al.* ; Imaging and immunometabolic phenotyping uncover changes in the hepatic immune response in the early phases of NAFLD. *JHEP Reports*, v. 2, p. 100117, 2020.

MATTOS, MATHEUS SILVÉRIO; **LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO**; ARAUJO, ALAN MOREIRA; ALVARENGA, DÉBORA MOREIRA; NAKAGAKI, BRENDA NAEMI; MAFRA, KASSIANA; MIRANDA, CAMILA DUTRA MOREIRA; DINIZ, ARIANE BARROS; ANTUNES, MAÍSA MOTA; LOPES, MARIA ALICE FREITAS; REZENDE, RAFAEL MACHADO; MENEZES, GUSTAVO BATISTA. Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, v. -, p. -, 2020.

CARNEIRO, MATHEUS BATISTA; **LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO**; HOHMAN, LEAH S.; ROMANO, AUDREY; DAVID, BRUNA ARAUJO; KRATOFIL, RACHEL; KUBES, PAUL; WORKENTINE, MATTHEW L.; CAMPOS, ALEXANDRE C.; VIEIRA, LEDA QUERCIA; PETERS, NATHAN C. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early Leishmania Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host & Microbe*, v. 27, p. 1-17, 2020.

MARQUES, PEDRO E.; VANDENDRIESSCHE, SOFIE; OLIVEIRA, THIAGO H.C.; CRIJNS, HELENA; **LOPES, MATEUS E.**; BLANTER, MARFA; SCHUERMANS, SARA; YU, KAREN; POOSTI, FARIBA; VANHEULE, VINCENT; JANSSENS, RIK; BOFF, DAIANE; KUNGL, ANDREAS J.; MENEZES, GUSTAVO B.; TEIXEIRA, MAURO M.; PROOST, PAUL. Inhibition of Drug-Induced Liver Injury in Mice Using a Positively Charged Peptide That Binds. *Hepatology Communications*, v. -, p. hep4.1759, 2021.

OZGA, ALEKSANDRA J.; CHOW, MELVYN T. **LOPES, MATEUS E.** SERVIS, RACHEL L. DI PILATO, MAURO; DEHIO, PHILIPPE; LIAN, JEFFREY; MEMPEL, THORSTEN R; LUSTER, ANDREW D. CXCL10 chemokine regulates heterogeneity of the CD8+ T cell response and viral set point during chronic infection. IMMUNITY, v. 55, p. 1-16, 2021.

LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO; DOS SANTOS, LILIANE MARTINS; SACKS, DAVID; VIEIRA, LEDA QUERCIA; CARNEIRO, MATHEUS B. Resistance Against Leishmania major Infection Depends on Microbiota-Guided Macrophage Activation. Frontiers in Immunology, v. 12, p. 730437, 2021.

ANTUNES, MAÍSA MOTA; DINIZ, ARIANE BARROS; CASTRO-OLIVEIRA, HORTÊNCIA MACIEL; MENDES, GABRIEL ALVIM MACHADO; FREITAS-LOPES, MARIA ALICE; DE OLIVEIRA COSTA, KAREN MARQUES; BICALHO, KASSIANA MAFRA; NAKAGAKI, BRENDA NAEMI LANZA; MATTOS, MATHEUS SILVÉRIO; DE MIRANDA, CAMILA DUTRA MOREIRA; **LOPES, MATEUS EUSTÁQUIO;** MELÃO, ALESSANDRA CORTE REIS; CARVALHO-GONTIJO, RAQUEL; RADHAKRISHNAN, SRIDHAR; RICCI, MATTHEW; REZENDE, RAFAEL MACHADO; MENEZES, GUSTAVO BATISTA. Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections. NUTRITION, v. 81, p. 110938, 2021.