

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

Maria Alice de Freitas Lopes

**CARACTERIZAÇÃO DOS GRANULÓCITOS HEPÁTICOS
NO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO FÍGADO**

Belo Horizonte
2021

Maria Alice de Freitas Lopes

CARACTERIZAÇÃO DOS GRANULÓCITOS HEPÁTICOS NO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO FÍGADO

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte
2021

043 Lopes, Maria Alice de Freitas.

 Caracterização dos granulócitos hepáticos no desenvolvimento pós-natal do fígado [manuscrito] / Maria Alice de Freitas Lopes. – 2021.

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

 Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

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

 1. Biologia Celular. 2. Fígado. 3. Granulócitos. 4. Recém-Nascido. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

MARIA ALICE DE FREITAS LOPES

348/2021
entrada
1º/2019
2019690432

Às **treze horas** do dia **30 de agosto de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DOS GRANULÓCITOS HEPÁTICOS NO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO FÍGADO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	Aprovada
Dra. Mônica Morais Santos	Universidade Federal de Viçosa	Aprovada
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de agosto de 2021.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Drª. Mônica Morais Santos _____

Drª. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda _____

J. C. Almeida

Este trabalho foi realizado no Centro de Biologia Gastrointestinal (CGB), localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes. Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e com as instituições parceiras BD Biosciences, Maxillo Facial Tips, Biolab e Nikon.

“ O que faz andar a estrada? É o sonho. Enquanto a gente sonhar, a estrada permanecerá viva. É para isso que servem os caminhos, para nos fazerem parentes do futuro.”

Mia Couto

RESUMO

O fígado é um órgão vital para o organismo, exercendo funções metabólicas, imunes, de síntese, secreção e armazenamento. Está interposto entre o sistema gastrointestinal e a circulação sistêmica, sendo o destino de nutrientes e produtos microbianos do intestino. Durante o desenvolvimento embrionário, configura-se um sítio hematopoiético com diferentes células progenitoras hepáticas e um grande número de células imunes em diferentes estágios de maturação. O fígado neonatal é, majoritariamente, composto por células mieloides, enquanto o fígado adulto é, especialmente, um órgão linfoide. Portanto, os perfis imune e também metabólicos do fígado neonatal são muito diferentes dos do fígado de um indivíduo adulto. Muito se sabe sobre o desenvolvimento embrionário hepático, mas estudos sobre os mecanismos que governam as mudanças estruturais e imunes no fígado nos diferentes estágios após o nascimento fazem-se necessários. Vimos neste trabalho que, ao nascimento, os granulócitos são os principais tipos celulares presentes no fígado (~35%), sendo a população celular majoritária nas primeiras semanas de vida. Embora já sejam descritos o perfil e a função dessas células no fígado do adulto, pouco se sabe sobre as possíveis diversidade e influência dos granulócitos no desenvolvimento pós-natal do fígado, uma vez que este passa por muitas modificações imunes, metabólicas, de expressão gênica e morfológicas frente aos desafios ao longo da vida. Assim, este trabalho objetiva caracterizar a dinâmica dos granulócitos hepáticos e estudar a possível influência do sistema imune no desenvolvimento pós-natal do fígado e na regulação dos processos que o estruturam até a fase adulta.

Palavras-chave: fígado; neonato; imunologia hepática; granulócitos; neutrófilos; células hepáticas.

ABSTRACT

The liver is a vital organ for the body, performing metabolic, immune, synthesis, secretion and storage functions. It is interposed between the gastrointestinal system and the systemic circulation, and it is the destination of nutrients and microbial products from the intestine. During embryonic development, the liver is a hematopoietic site with different liver progenitor cells and a large number of immune cells at different stages of maturation. The neonatal liver is mostly composed of myeloid cells, while the adult liver is especially a lymphoid organ; hence, the immune and metabolic profiles of the neonatal liver are very different from those of an adult liver. Much is known about embryonic liver development, although studies on the mechanisms that govern structural and immune changes in the liver at different stages after birth are still needed. We found that granulocytes are the main cell types in the liver (~35%), being the majority cell population in the first weeks of life. Although the role of these cells in the adult liver have already been described, little is known about the possible diversity and influence of granulocytes in the postnatal development of the liver, as it undergoes immune, metabolic, gene expression and morphological modifications along life challenges. Therefore, this work aims to characterize the dynamics of hepatic granulocytes and study the possible influence of the immune system on the hepatic postnatal development and on the regulation of the processes that structure the liver into adulthood.

Keywords: liver; neonate; hepatic immunology; granulocytes; neutrophils; liver cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1: ESTRUTURA TRIDIMENCIONAL DO LÓBULO HEPÁTICO	14
--------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - As células Ly6G ⁺ do fígado ao nascimento apresentam, exclusivamente, marcadores de granulócitos.....	26
FIGURA 2 - Morfologia das células Ly6G ⁺ hepáticas em camundongos adultos e recém-nascidos	28
FIGURA 3 - Frequência de neutrófilos no fígado em diferentes idades e a sua visualização <i>in vivo</i>	31
FIGURA 4 - Neutrófilos visualizados no interior dos sinusoides hepáticos <i>in vivo</i>	35
FIGURA 5 - Neutrófilos visualizados no fígado de embrião de camundongo ao microscópio .	39
FIGURA 6 - O comportamento dos neutrófilos frente a uma lesão estéril induzida por queimadura no fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal hepático	41
FIGURA 7 - Produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos de animais em diferentes fases da vida após o nascimento.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK – Tampão de lise cloreto de amônio (*Ammonium-Chloride lysing buffer*)

ANOVA – Análise de variância

APC – Alofococianina (*Allophycocyanin*)

APCs – Células apresentadora de antígeno

BSA – Albumina bovina sérica

CEBIO – Centro de Bioterismo

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CYTOF - Citometria por tempo de vôo

DCs – Células dendríticas

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FACS – Citometria de fluxo

I.V. - Intravenosa

KCs – Células de Kupffer

MFI – Intensidade mediana de fluorescência

MIV – Microscopia intravital

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina

NK – *Natural killer*

NPCs – Células não-parenquimais

PBS – Salina tamponada com fosfato

PE - Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

PMA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

ROS – Espécies reativas de oxigênio

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. JUSTIFICATIVA.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. METODOLOGIA	20
3.1 Animais experimentais.....	20
3.2 Desenho experimental.....	20
3.3 Microscopia confocal intravital.....	20
3.4 Modelo de quimiotaxia <i>in vivo</i>	21
3.5 Eutanásia e obtenção de amostras.....	21
3.6 Isolamento de células não-parenquimais hepáticas.....	21
3.7 Isolamento de células por <i>beads</i> magnéticas.....	22
3.8 Citometria de fluxo.....	23
3.9 CellROX™.....	23
3.10 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Os granulócitos são a população celular predominante no fígado de neonatos.....	25
4.2 As células Ly6G ⁺ hepáticas ao nascimento mostra uma morfologia celular de neutrófilos.....	27
4.3 Os granulócitos correspondem à 40% da composição imune celular do fígado de neonatos e há uma variação de seu percentual ao longo do tempo.....	30
4.4 Mesmo com mudanças na estrutura do fígado até a idade adulta, os neutrófilos permanecem localizados no ambiente intravascular.....	34
4.5 As células Ly6G ⁺ se encontram armazenadas no fígado do embrião de	

camundongo	38
4.6 A motilidade dos neutrófilos no fígado aumenta durante o desenvolvimento pós-natal 40	
4.7 Há um transiente aumento na capacidade de produção de ROS por neutrófilos hepáticos	44
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. Introdução

1.1 A biologia do fígado

O fígado está localizado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma, e está diretamente ligado à circulação sistêmica através das artérias e veias hepáticas e do sistema do trato gastrointestinal, mais especificamente ao intestino, através da veia porta. O fígado é responsável por desempenhar funções metabólicas, detoxificantes e de síntese e secreção de várias substâncias vitais para o organismo. Os hepatócitos constituem até 80% do total da massa hepática, organizadas em lâminas celulares unidas por junções intercelulares que circundam os capilares sinusoides, e são as células que realizam as funções de metabolismo de nutrientes, armazenamento de vitaminas, ferro e glicogênio, síntese de enzimas, proteínas, colesterol, fatores de coagulação sanguínea, albumina, bile e vitamina A (Reynolds, 1977) (Rossaint e Zarbock, 2013).

O fígado é, microscopicamente, dividido em lóbulos, os quais se configuram diversos compartimentos poliédricos constituídos pelos cordões de hepatócitos, capilares sinusoides e a veia centrolobular. Localizado na periferia dos lóbulos encontra-se o espaço porta, composto por ramos da veia porta, da artéria hepática e do ducto biliar. É pelo espaço porta que o fluxo sanguíneo entra no fígado, percorre o tecido por meio dos sinusoides e flui em direção à veia centrolobular e vasos subsequentes, deixando o órgão por meio da veia hepática.

A localização do fígado pode ser considerada estratégica na cavidade abdominal, uma vez que é um órgão altamente vascularizado e que 30% do volume sanguíneo corpóreo passa pelo fígado a cada minuto (Tarasenko e Mcguire, 2017). O fígado recebe influxo sanguíneo proveniente do coração pela artéria hepática e sangue drenado de órgãos como intestino, baço e pâncreas pela veia porta, sendo a maior parte da sua circulação (entre 75 e 80% do volume total) proveniente da veia porta (Vollmar e Menger, 2009). Assim, por receber um aporte bastante significativo de sangue da veia porta, há o constante contato com produtos bacterianos e microrganismos advindos da circulação intestinal. Para manter a homeostase, sua estrutura e as suas funções, o fígado apresenta uma barreira imune e estrutural que atua como um importante filtro (Balmer *et al.*, 2014) (Kubes e Jenne, 2018). Desta forma, não apenas as macro e microestruturas estão envolvidas nas funções hepáticas desse esquema hemodinâmico, mas o microambiente celular hepático também participa de importantes funções metabólicas e imunológicas, desde os primeiros estágios de vida (Eckert *et al.*, 2015).

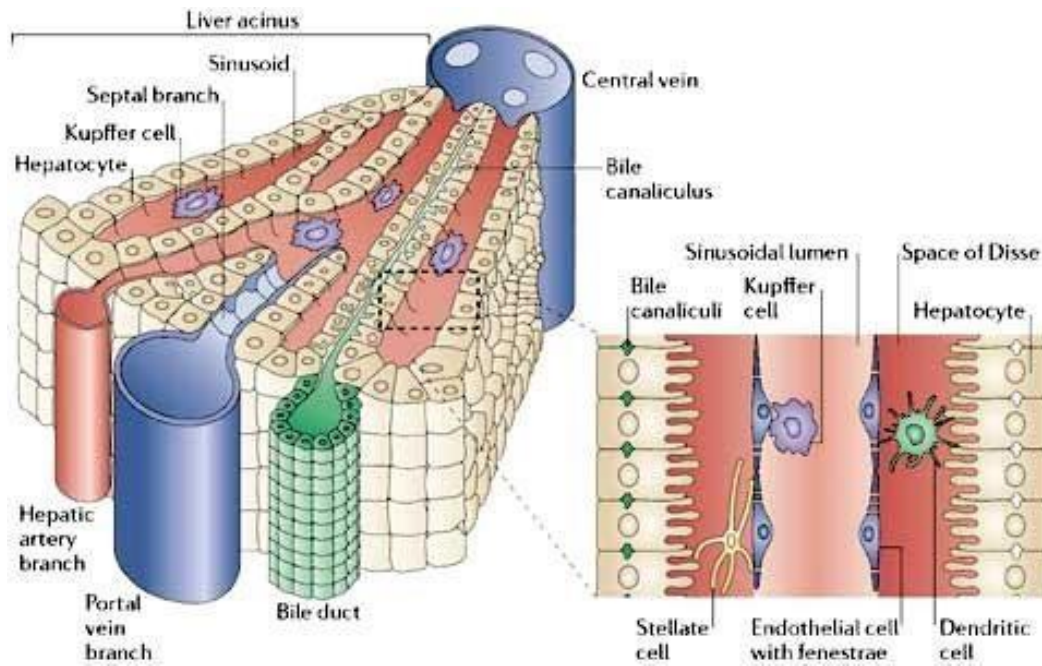


Ilustração 1: estrutura tridimensional do lóbulo hepático.

1.2 O sistema imune hepático

Os hepatócitos são os principais constituintes funcionais dos lóbulos hepáticos e realizam a maioria das funções secretoras e de síntese do órgão. Outros grupos de células têm papéis importantes na manutenção do órgão: as células imunes hepáticas. O fígado abriga diferentes populações de células imunes que são estabelecidas durante o período embrionário de vida, e são uma das maiores populações de células imunes do corpo. Subconjuntos destas células, fagócitos residentes e outros leucócitos podem ser encontrados dentro do fígado em condições homeostáticas no indivíduo adulto, mas o papel dos leucócitos hepáticos e dos fagócitos residentes ainda é desconhecido em outros contextos biológicos, incluindo as diferentes fases da vida do indivíduo, em que o fígado ainda está em desenvolvimento.

O fígado possui um elaborado sistema imune, composto por macrófagos residentes, leucócitos, células *Natural Killer*, *T Natural Killer*, linfócitos T, células dendríticas e componentes do complemento. Os macrófagos hepáticos, conhecidos como células de Kupffer (KCs), são originados no saco vitelínico durante a embriogênese e, no fígado, localizam-se dentro dos sinusoides, em contato com a circulação (Kinoshita *et al.*, 2010). As KCs formam a primeira linha

de defesa contra partículas, microrganismos e produtos microbianos que passam pelo trato gastrointestinal através da circulação portal.

Outra população de células residentes no fígado são as células dendríticas (DCs). As DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs), capazes de induzir respostas imunes e tolerogênicas em órgãos linfoides e não-linfoides. As DCs hepáticas estão localizadas abaixo da cápsula fibrosa (Glisson) em fígados humanos (fígados murinos não possuem cápsula fibrosa) e ao redor de grandes vasos (David *et al.*, 2016). Ao contrário das KCs, as DCs são pouco distribuídas no parênquima hepático. Estas células desempenham papel na captura, processamento e apresentação de antígenos, interagindo com as células T, sendo a chave para iniciar as respostas imunes.

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e são essenciais para controlar infecções e inflamações estéreis (Wang *et al.*, 2017). Essas células se originam a partir de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, um processo chamado “granulopoiese”, e são encontradas circulando nos sinusoides hepáticos. Durante a inflamação no fígado, os neutrófilos são recrutados para os locais das lesões. Esses granulócitos desempenham um papel importante migrando dos vasos sanguíneos para o foco da inflamação, um processo conduzido por quimiocinas (Ramaiah e Jaeschke, 2007). Uma vez atraídos, os neutrófilos se acumulam na microvasculatura hepática, antes do processo de transmigração.

Os eosinófilos são granulócitos que, predominantemente, migram do sangue para os tecidos como consequência de eventos correlatos que envolvam vias de adesão e quimioatraentes (Weller e Spencer, 2017). A regulação do recrutamento de eosinófilos para o fígado lesionado e a localização destas células, bem como as consequências do infiltrado eosinofílico no fígado dependem da condição de determinado contexto inflamatório (Zimmermann *et al.*, 2008).

O fígado também possui populações de células *Natural Killer* (NK), células T *Natural Killer* (NKT) e outros linfócitos, como células T e B. As células NK e NKT podem proliferar sob certas condições experimentais ou patológicas. Sob condições saudáveis, o fígado humano contém um número significativo de linfócitos T CD4 e T CD8 nos tratos portais e espalhados pelo parênquima (Lalor *et al.*, 2002), os quais, em condições inflamatórias, têm seu número aumentado no fígado. Os linfócitos B realizam a produção de anticorpos, apresentação de antígenos, secreção de múltiplas citocinas e regulação das respostas imunes.

1.3 O desenvolvimento do fígado embrionário

O processo de embriogênese hepática é conservado em humanos e camundongos. No camundongo, a gestação dura, em média, de 19 a 21 dias, e o fígado começa a se formar no dia E9.0 (dia embrionário 9.0), a partir do endoderma do domínio ventral do intestino adjacente ao mesoderma cardíaco e o septo transversal, que se torna mais espesso para formar o divertículo hepático (Gordillo *et al.*, 2015). O fígado cresce significativamente entre E12.5 e E13.5 (Lorenz *et al.*, 2018). Subsequentemente, o divertículo se expande e o endoderma passa de uma monocamada de células cubóides para uma multicamada de células pseudoestratificadas, os chamados “hepatoblastos”, que proliferam e invadem o septo transversal, formando o primórdio do fígado (Bort *et al.*, 2006). Hepatoblastos são células precursoras bipotenciais e, por volta do dia E13.5, os mais próximos à veia porta se diferenciam em colangiócitos, e os mais distantes se diferenciam em hepatócitos, as principais células constituintes do parênquima hepático. Esse processo de maturação continua ainda pelo período após o nascimento. No dia E9.5, o fígado inicia seu papel hematopoiético, sendo o principal sítio de hematopoiese fetal (Lee *et al.*, 2012), um processo bem conhecido e descrito (Ginhoux e Guilliams, 2016).

Assim como o desenvolvimento morfológico do fígado embrionário, a regulação gênica na origem e diferenciação das células que o compõem ocorre em vias de sinalização também já conhecidas. A via canônica de Wnt- β -catenina é um mecanismo de sinalização complexo e evolutivamente conservado, que regula o desenvolvimento hepatobiliar, a maturação, o zoneamento e o destino celular durante a embriogênese, bem como a homeostase hepática (Perugorria *et al.*, 2019) (Ben-Moshe e Itzkovitz, 2019). No adulto, essa via permanece inativa dentro de células diferenciadas dos tecidos, embora regule a homeostase de células-tronco, por exemplo, no intestino e na pele (Kretschmar e Clevers, 2017). No fígado saudável e maduro, a via Wnt- β -catenina é praticamente inativa, mas pode ser reativada durante a renovação celular e/ou processos regenerativos, bem como em certas condições patológicas, doenças, condições pré-malignas e câncer (Nusse e Clevers, 2017).

1.4 O fígado no período neonatal

A organização morfológica do fígado após o nascimento é acompanhada por grandes

mudanças nas populações de células imunes hepáticas em camundongos e humanos. Várias vias metabólicas têm um cronograma de desenvolvimento mais lento em relação ao fígado adulto/maduro, alcançando um perfil de expressão semelhante ao dos adultos apenas na fase de desmame. Além disso, o cronograma metabólico pode ser regulado pela dieta, já que camundongos desmamados precocemente apresentam alterações profundas em enzimas envolvidas no manejo de diferentes macronutrientes (Nakagaki *et al.*, 2018). A arquitetura hepática também muda ao longo do desenvolvimento pós-natal, no que diz respeito à organização do parênquima, das células imunes e da microvasculatura; o fígado adulto é, especialmente, um órgão linfoide, enquanto o fígado neonatal é, em sua maior parte, composto por células mieloides, e células precursoras com características monocíticas podem dar origem a células maduras residentes.

A organogênese hepática é um processo bem descrito em termos de morfologia, regulação gênica, fatores de transcrição. A regulação tênue desses processos influencia no papel que o fígado vai exercer no organismo do indivíduo até a sua vida adulta. Estudos descrevem o papel do fígado no adulto, destacando sua importante função metabólica e imune (Chiang, 2014) (Nakagaki *et al.*, 2018).

Ao nascimento, os granulócitos são os principais tipos celulares presentes no fígado (~35%), sendo a população celular majoritária nas primeiras semanas de vida. Sabe-se que mudanças funcionais e imunológicas significativas devem ocorrer no fígado de um recém-nascido para que ele se configure um fígado adulto/maduro e que, nos primeiros momentos da vida após o nascimento, o fígado é, principalmente, um sítio imune/hematopoiético (Nakagaki *et al.*, 2018). No entanto, pouco se sabe sobre como o sistema imune influencia na maturação do fígado até a fase adulta, o que justifica o intuito deste trabalho, que é estudar como o sistema imune, especialmente os granulócitos, dentre eles os neutrófilos, atua no desenvolvimento pós-natal do fígado e na regulação dos processos que o estruturam para a realização de suas funções.

2. *Justificativa*

Mudanças na composição imunológica do fígado ocorrem ao longo da vida após o nascimento. Até as primeiras semanas de vida pós-parto, os granulócitos são os principais tipos celulares imunes presentes no fígado. Sabe-se que a plasticidade e a diversidade dessas células permitem que elas desempenhem funções importantes na imunidade inata do indivíduo, uma vez que essas células são responsáveis pela eliminação de patógenos, indução e resolução da inflamação, remodelação tecidual, dentre outras funções. No entanto, não se sabe como os granulócitos atuam no desenvolvimento pós-natal do fígado e na regulação dos processos que o estruturam para que ele se torne o órgão maduro conhecido no adulto.

3. *Objetivos*

3.1 **Objetivo geral**

Caracterizar a dinâmica dos granulócitos hepáticos no desenvolvimento pós-natal do fígado.

3.2 **Objetivos específicos**

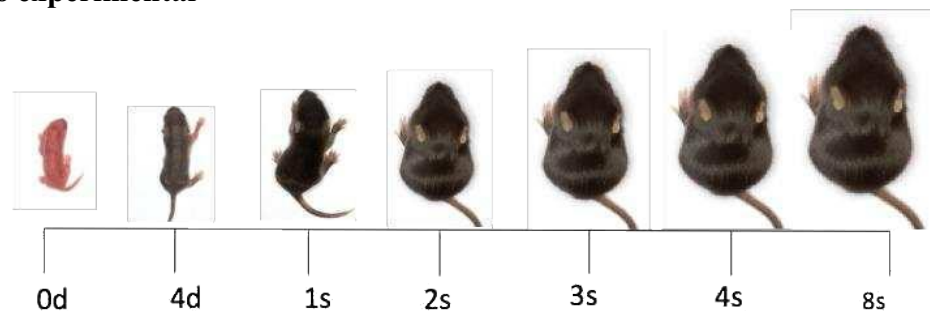
1. Determinar, por microscopia confocal intravital, a proporção e a localização dos granulócitos no fígado, em diferentes idades ao longo do desenvolvimento pós-natal.
2. Caracterizar a morfologia dos granulócitos hepáticos em diferentes idades por meio de isolamento por *beads* magnéticas.
3. Avaliar o perfil de migração de granulócitos em resposta a lesão estéril por queimadura.
4. Avaliar, através de citometria de fluxo, a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos hepáticos de animais de diferentes idades.

4. Metodologia

4.1 Animais experimentais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Animais de diferentes idades (0 e 4 dias, 1, 2, 3, 4 e 8 semanas) foram gerados de matrizes acondicionadas em grupos de 2 fêmeas para cada macho por gaiola, com ração (NUVILAB) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA 34/2017) da UFMG.

4.2 Desenho experimental



0d = dia 0 – dia do nascimento.

3s = 3 semanas pós-nascimento

4d = 4 dias pós-nascimento.

4s = 4 semanas pós-nascimento

1s = 1 semana pós-nascimento.

8s = 8 semanas pós-nascimento

2s = 2 semanas pós-nascimento.

4.3 Microscopia confocal intravital

A microscopia intravital é uma técnica que permite observar fenômenos biológicos *in vivo*, trazendo a possibilidade de análises mais fidedignas e detalhadas. Realizamos a microscopia intravital do fígado de camundongos utilizando um microscópio confocal Nikon A1 e marcadores fluorescentes, a fim de observar e quantificar a localização dos granulócitos no fígado. O

camundongo recebeu os marcadores fluorescentes por via intravenosa (i.v.). Foram utilizados os seguintes marcadores: anti-Ly6G PE (0,35 μ l/g), para a marcação de granulócitos/neutrófilos e anti-CD31 APC (0,66 μ l/g). Todos os marcadores foram diluídos em 10 μ l – 100 μ l de salina 0,9% para injeção intravenosa. Posteriormente, para as imagens *in vivo*, usamos um pequeno suporte de acrílico para posicionar o camundongo anestesiado e expor um lobo do fígado a uma distância adequada da objetiva. Em seguida, foram feitas imagens de diferentes áreas do tecido hepático ao microscópio confocal. As imagens foram analisadas utilizando os programas Volocity (PerkinElmer) e NIS-Elements Viewer 4.50 (Nikon).

4.4 Modelo de quimiotaxia *in vivo*

O modelo de quimiotaxia *in vivo* foi utilizado para gerar uma de lesão estéril no tecido, conforme o protocolo de imagem *in vivo* da biologia hepática usando microscopia confocal convencional (Marques, Antunes, David, Pereira, Teixeira e Menezes, 2015), em que uma agulha quente adaptada a um cauterizador gera uma lesão pontual ao tocar a superfície do fígado. Os animais foram submetidos à marcação intravenosa com anticorpo Ly6G-PE para marcar os granulócitos e, após 40 minutos, foram anestesiados e submetidos à cirurgia. Ao término do processo e com o fígado exposto, foi feita a queimadura. Para marcar os neutrófilos, foi utilizado o anticorpo anti-Ly6G PE. Os animais foram filmados por 2 a 4 horas, receberam pequenas quantidades de anestésico e solução salina e foram mantidos aquecidos ao longo do processo. Os vídeos foram analisados através do software NIS-Element Viewer 4.50, pelo qual foram observados os parâmetros de deslocamento, comprimento do percurso realizado pelos neutrófilos até a lesão e velocidade em que o trajeto foi percorrido.

4.5 Eutanásia e obtenção de amostras

Os animais foram anestesiados com injeção subcutânea de ketamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) (Syntec), diluídos em salina fisiológica. Os animais receberam 4 μ l/g do anestésico. Após a anestesia, foram submetidos à laparotomia seguida da retirada do fígado.

4.6 Isolamento de células não-parenquimais hepáticas

Para os tempos 0, 4 e 7 dias, foram obtidas células totais hepáticas devido à uma limitação

na separação das células parenquimais dos hepatócitos por centrifugação diferencial. Os camundongos foram anestesiados e, em seguida, sangrados por cisão simultânea da artéria aorta e veia cava inferior. Os fígados foram removidos, picados e digeridos em meio RPMI com colagenase tipo 8 (0,25mg/g animal; Sigma-Aldrich) sob agitação constante, a 37°C, por 1 hora. A suspensão fora centrifugada a 300 x g, a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante, descartado. O *pellet* de células foi utilizado para os animais dos grupos 0, 4 e 7 dias. Para as demais idades, o *pellet* foi ressuspenso em solução PBS 1x 2 mM EDTA 0,5% BSA e centrifugado a 60 x g, 4°C, por 3 minutos, para a separação dos hepatócitos. O sobrenadante resultante foi recolhido e centrifugado novamente a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado em *cell strainer* de 70µm (Becton-Dickinson) e centrifugado a 300 x g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspenso em solução PBS 1x 2mM EDTA 0,5% BSA para a lise de eritrócitos, utilizando a solução ACK Lysing Buffer (Thermo Fisher Scientific) a 1x. O *pellet* foi incubado com 2ml da solução de lise por 10 min no gelo. Após a lise, foram adicionados 10ml da solução PBS 1x 2mM EDTA 0,5% BSA. Foi centrifugado a 300 x g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante fora descartado e o *pellet* final de células corresponde às células não-parenquimais hepáticas para emprego da citometria de fluxo.

4.7 Isolamento de células por *beads* magnéticas

Foi utilizada a técnica de citometria de fluxo (FACS) para determinar a população de interesse a ser isolada, nos animais com 0 dia a 8 semanas de vida. Para a marcação das células de interesse, foi utilizado o anticorpo anti-Ly6G conjugado à ficoeritrina (PE) a 1mg/ml (BD Pharmingen). O anti-Ly6G se liga especificamente à Ly-6G, uma proteína ancorada à GPI de 21-25 kDa. No fígado, a Ly6G é expressa em granulócitos, classicamente em neutrófilos, a população celular de interesse deste trabalho. Após a determinação das células não marcadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ e a contagem, as células não-parenquimais (NPCs) previamente isoladas foram incubadas com 1µl de anti-Ly6G PE, por 30 minutos, 4°C. Após a incubação, foram adicionados 2ml da solução PBS 1x 2 mM EDTA 0,5% BSA, para posterior centrifugação a 300 x g, 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e foram adicionados 10µl das *beads* magnéticas anti-PE em cada amostra. Após a incubação, novamente foram adicionados 2ml da solução PBS 1x 2 mM EDTA 0,5% BSA, para posterior centrifugação a 300 x g, 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet*, ressuspenso em 3ml da solução PBS 1x 2mM

EDTA 0,5% BSA. Os tubos com as amostras ficaram acoplados a um magneto para a separação das células por 20 minutos. Posteriormente, os tubos foram vertidos e as amostras foram lavadas uma vez com 3ml de PBS 1x 2mM EDTA 0,5% BSA. O conteúdo foi vertido e, então, foi adicionado 1ml desta solução à amostra. Esta foi lida no citômetro para a contagem de células marcadas e determinação das células Ly6G⁺ obtidas.

Após o isolamento das células Ly6G⁺, os tubos foram centrifugados a 300 x g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 100µl de PBS 1x 2mM EDTA 0,5% BSA. Os tubos foram, então, centrifugados em uma centrífuga de cytospin a 500 rpm por 5 minutos. As lâminas foram coradas por Panótico Rápido para posteriores análise e fotografia ao microscópio óptico.

4.8 Citometria de fluxo

Usamos o FACS para determinar o perfil das populações de granulócitos nos animais com as diferentes idades. As NPCs previamente isoladas foram incubadas com *FcBlock* para bloqueio das ligações inespecíficas e, posteriormente, marcadas com os anticorpos fluorescentes específicos para neutrófilos, a nossa principal população de interesse. Como estratégia de *gate*, foram consideradas neutrófilos, células CD45⁺/Ly6G⁺/F4/80⁻. Após lavagem com PBS 1x, as amostras foram centrifugadas (300 x g, 4°C, por 5 minutos) para remoção de excesso de anticorpos, ressuscitadas em *wash B* e adquiridas logo em seguida, usando o citômetro de fluxo BD Accuri™. As análises foram realizadas no software FlowJo.

4.9 CellROX™

O teste CellROX™ foi realizado para medir o estresse oxidativo de células vivas, com máximos de absorção/emissão em ~644/665nm. O corante celular não é fluorescente enquanto a amostra está um estado reduzido. Após a oxidação por espécies reativas de oxigênio (ROS), exhibe fluorescência brilhante que é detectada por citometria de fluxo. Para isso, foi seguido o protocolo de isolamento de células não-parenquimais do fígado. O *pellet* final deste isolamento foi incubado com apocinina (inibidor de NADPH-oxidase) como controle negativo, lavado e ressuscitado em 100µl de PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), composto que estimula a produção de ROS via NADPH-oxidase, a 1nM, 10nM e 100nM por 1 hora e meia a -4°C, dentro do fluxo laminar. Após

esse tempo, a amostra foi centrifugada a 300g por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 50µl da solução contendo CellROX™ a 5µM em meio RPMI suplementado. A amostra foi incubada por 30 minutos a 37°C e, após isso, as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. Logo após, a amostra foi incubada com o anticorpo anti-Ly6G PE por 30 minutos a 4°C. Após esse tempo, foi centrifugada a 300g por 5 minutos e ressuspensa em 1ml de *wash B* para análise no citômetro.

4.10 Análise estatística

Os gráficos e estatística serão feitos com o auxílio do software GraphPad Prism 6. Os resultados serão apresentados como a média ± erro padrão da média. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se *one-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnett. Todos os grupos serão comparados ao grupo 8 semanas. O nível de significância será definido como $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Os granulócitos são a população celular predominante no fígado de neonatos

Uma vez que o fígado apresenta uma diversidade de células imunes, foi realizada a análise de uma imunofenotipagem de alta dimensão usando citometria de massa em tempo de voo (CyTOF), previamente feita pelo nosso grupo de pesquisa. O CyTOF agrupa populações celulares por meio do algoritmo viSNE (algoritmo de redução dimensional de recurso aberto), uma ferramenta de análise CyTOF bem estabelecida que utiliza o algoritmo de incorporação estocástica de vizinhança t-distribuída (t-SNE) para analisar e exibir dados de alta dimensão. Os *gates* (seleção de células agrupadas) são feitos com base na expressão de marcadores específicos que permitem sua classificação e quantificação.

Reunindo juntos dados de alta dimensão em uma representação agrupada por *heatmap*, vimos que células da linhagem mielóide compõem o fígado de camundongos no período pós-natal inicial e, ao longo de 1 semana, 21 dias até a idade adulta, 8 semanas, o perfil imunológico do fígado é completamente alterado para um perfil linfóide (Nakagaki *et al.*, 2018). Uma população de células que nos chamou a atenção foi a de granulócitos. Ao nascimento até as primeiras semanas de vida, os granulócitos são os principais e mais numerosos tipos celulares imunes presentes no fígado.

Como resultado da análise, vimos que, no dia 0, o tipo celular predominante no fígado são células positivas para o marcador Ly6G, um antígeno acoplado à proteína G. Ao analisarmos o *gate* nas células Ly6G⁺, vimos que essas células apresentam, exclusivamente, marcadores de granulócitos (Ly6G⁺ CD11b⁺ CD172⁺ e/ou Siglec F⁺), e não de outros leucócitos. A porcentagem de células Ly6G⁺ permanece elevada no fígado até a primeira semana após o nascimento, e sofre uma redução a partir da terceira semana até a oitava semana, quando o animal é considerado adulto.

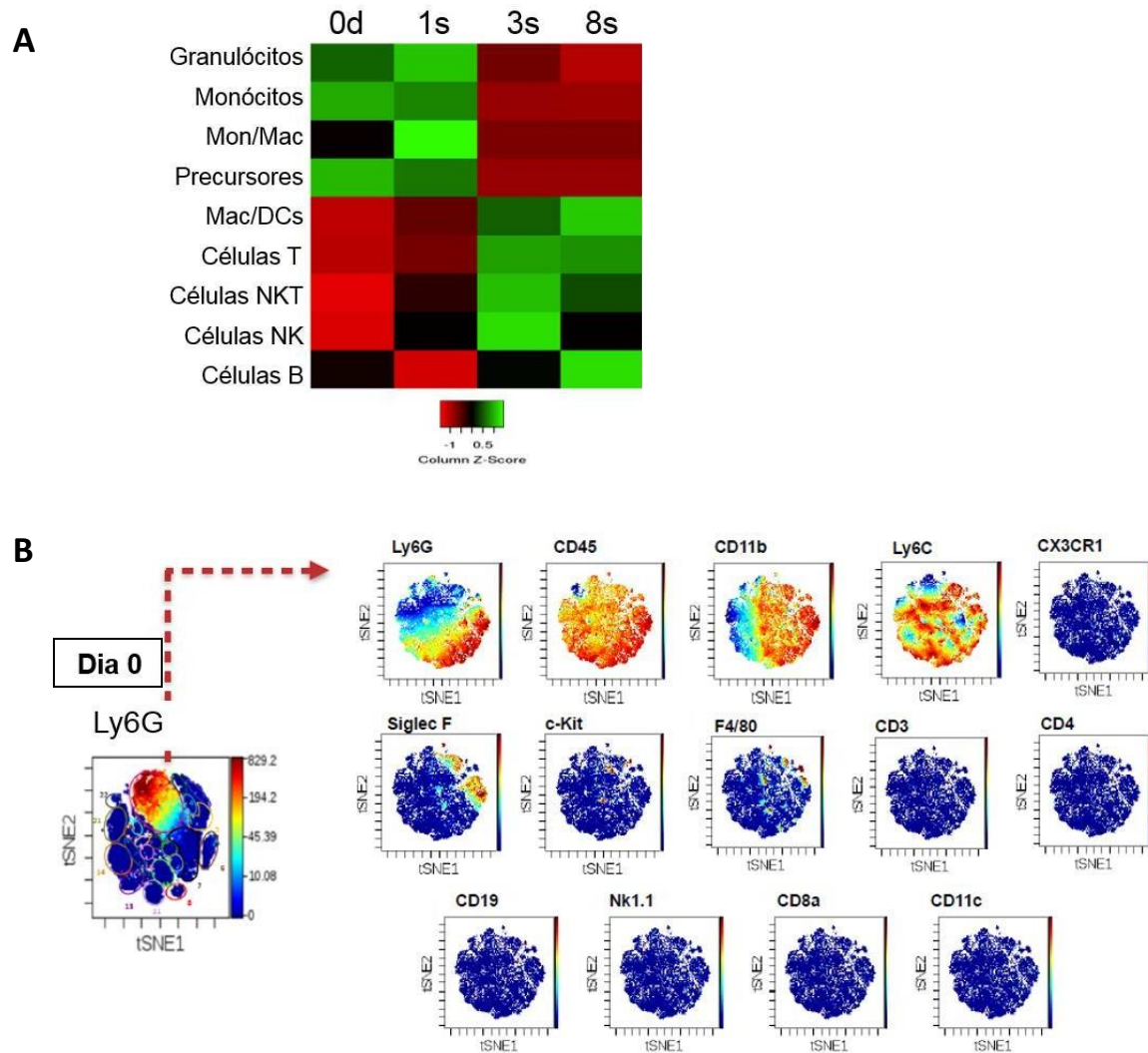


Figura 1 – As células Ly6G⁺ do fígado ao nascimento apresentam, exclusivamente, marcadores de granulócitos

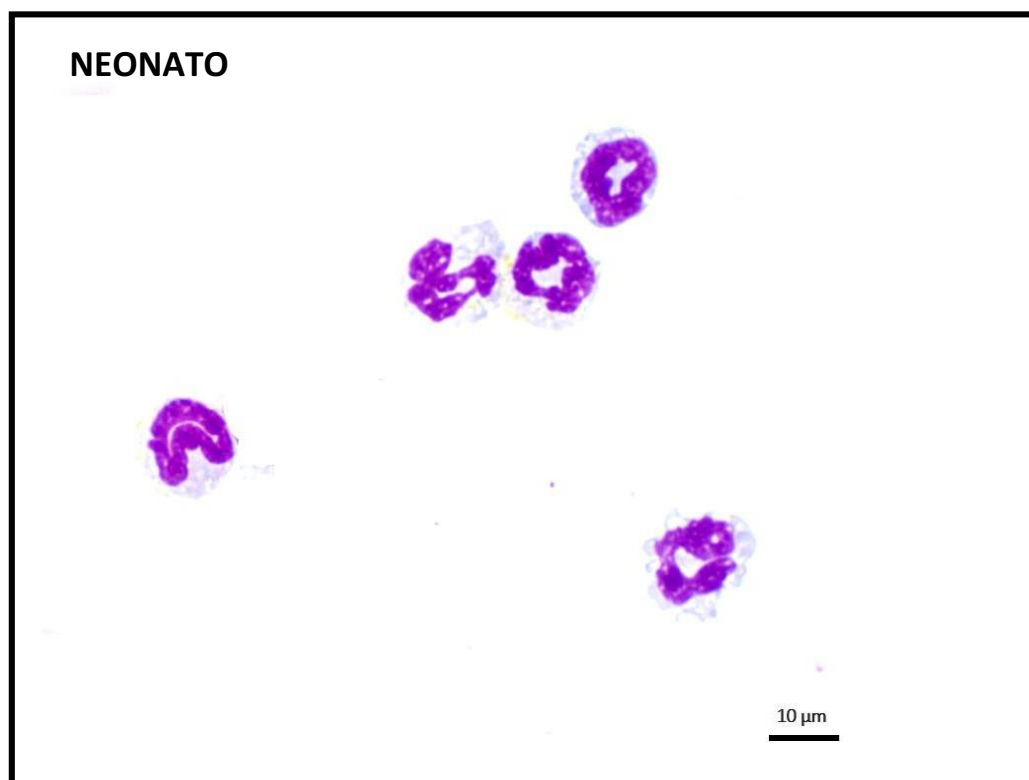
A análise do fenótipo das células imunes do fígado por CyTOF mostrou que células positivas para Ly6G são predominantes no fígado do nascimento até a primeira semana, e essas células correspondem à população de granulócitos. (A) Representação em *heatmap* da sucessão cronológica de populações imunes hepáticas. n = 3 (Nakagaki *et al.*, 2018). (B) Análise do *gate* de células Ly6G⁺ e a expressão dos marcadores contidos nessa população.

5.2 As células Ly6G⁺ hepáticas ao nascimento mostram uma morfologia celular de neutrófilos

Os granulócitos são leucócitos que apresentam grânulos em seu citoplasma. A plasticidade e a diversidade dessas células permitem que elas desempenhem funções importantes na imunidade inata. No fígado, a localização e as consequências do infiltrado de granulócitos eosinófilos e basófilos dependem da condição da doença, já os neutrófilos são células que, classicamente, circulam nos sinusoides hepáticos e têm um papel importante no fígado frente a uma inflamação. Um marcador de superfície clássico de neutrófilos é o Ly6G. Uma vez que vimos, por CyTOF, que a maioria das células imunes do fígado ao nascimento são células Ly6G⁺, foi feito o isolamento por *beads* magnéticas para a visualização da morfologia dessas células.

Nas lâminas dos camundongos recém-nascidos, podem ser observadas células com uma morfologia de neutrófilo com aspecto imaturo, caracterizado, em camundongos, pelo núcleo com aspecto circular (Pillay, Tak, Kamp e Koenderman, 2013). Em comparação às lâminas de camundongos adultos (8 semanas de idade), estes apresentam células Ly6G⁺ hepáticas com aspecto mais semelhante ao de um neutrófilo murino maduro, caracterizado pela segmentação do núcleo.

A



B

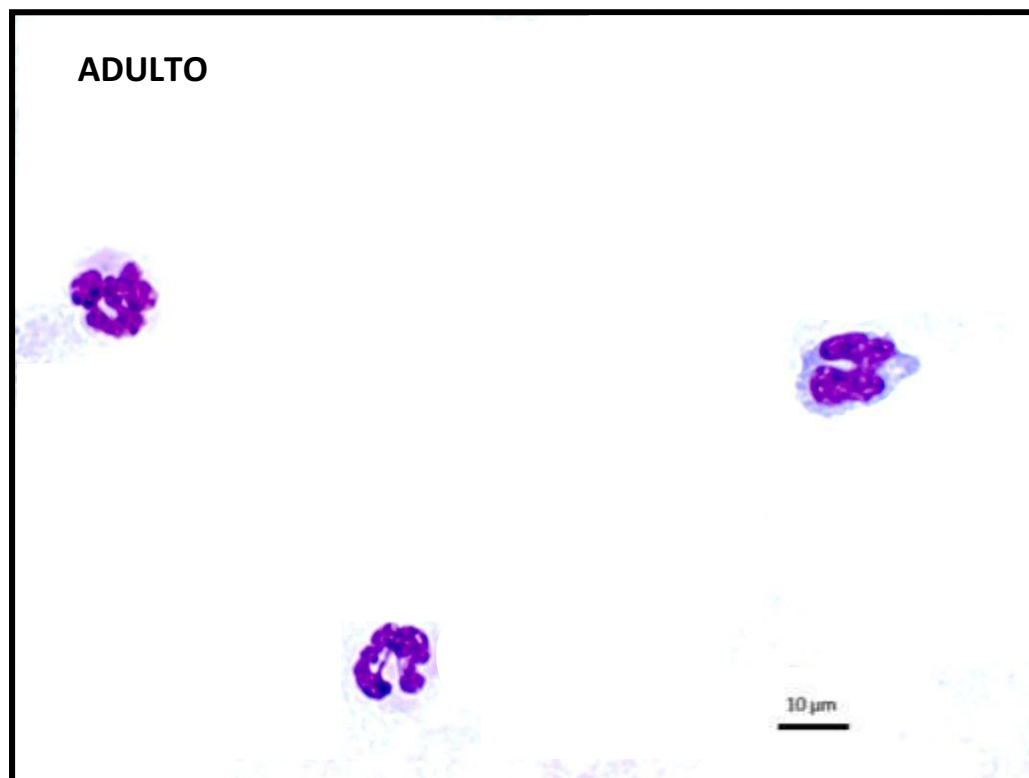


Figura 2 – Morfologia das células Ly6G⁺ hepáticas em camundongos adultos e recém-nascidos

Fotos de lâminas de células isoladas por *beads* magnéticas e coradas com panótico. (A) Neutrófilos do fígado de camundongo recém-nascido. (B) Neutrófilos do fígado de camundongo adulto.

Escala: 10 μ m.

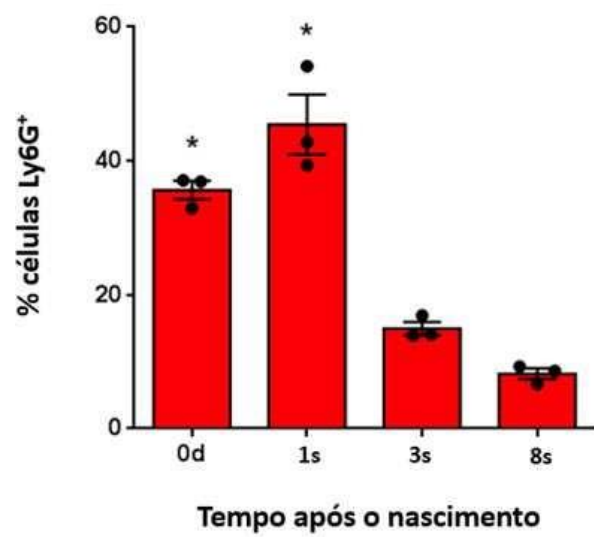
5.3 Os granulócitos correspondem à 40% da composição imune celular do fígado de neonatos e há uma variação de seu percentual ao longo do tempo

Os resultados obtidos pelo CyTOF foram quantificados em frequência (% do total de células) e analisados. Como resultado da análise, vimos que, no dia 0, as células Ly6G⁺ correspondem a aproximadamente 40% das populações de células imunes hepáticas, o que confirmou a maior frequência de granulócitos nos fígados neonatais.

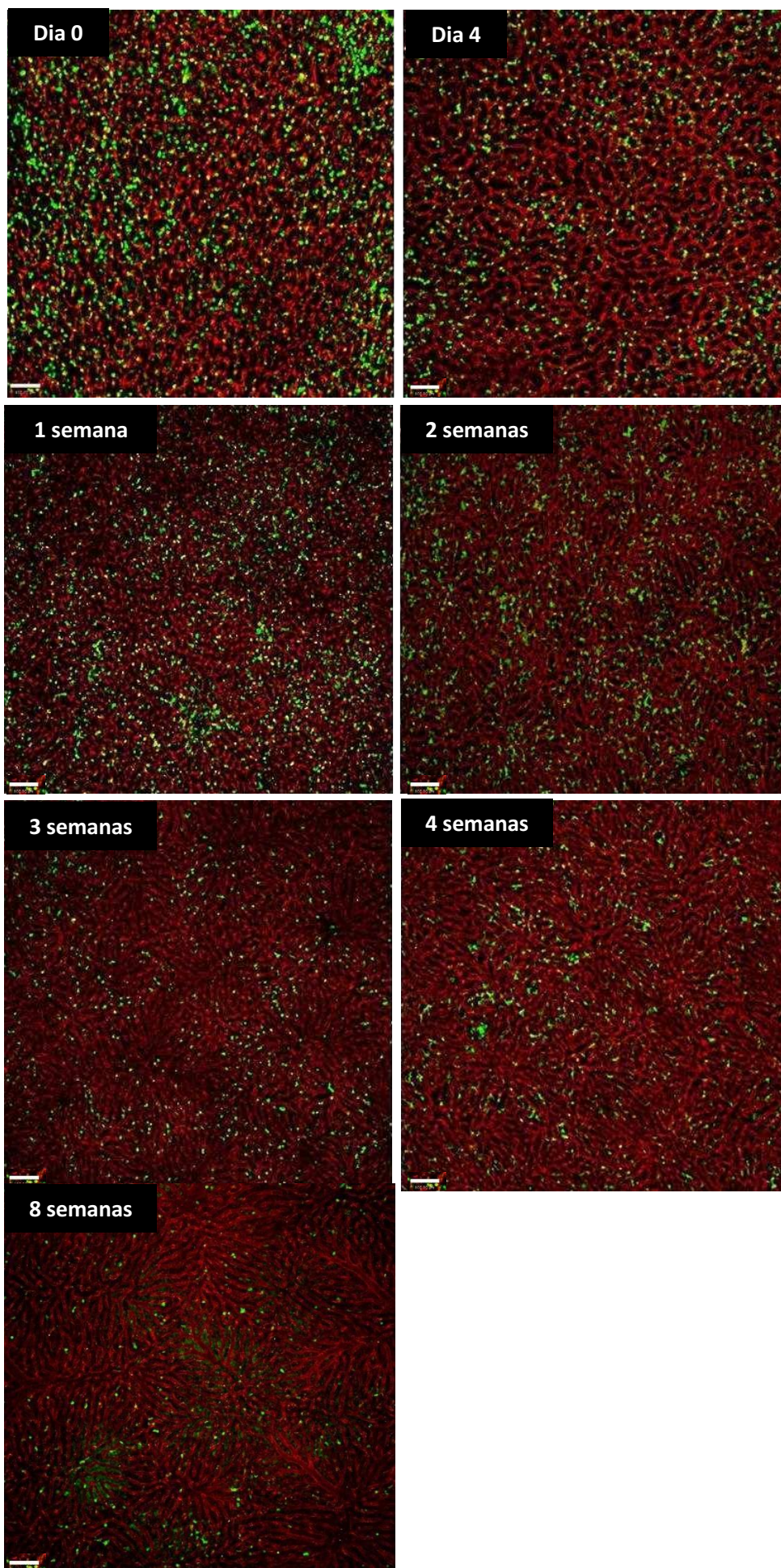
Com o objetivo de visualizar os granulócitos hepáticos, utilizamos a microscopia confocal intravital (MIV), e foi possível marcar e observar as células no fígado de camundongos de diferentes idades *in vivo*. A MIV permite o estudo da biologia celular, da organização e da estrutura de determinado órgão de forma mais próxima do seu contexto nativo, uma vez que visualizamos microscopicamente o tecido e as células circulantes e vivas, inseridos no corpo do animal que permanece vivo durante todo o procedimento.

Marcamos as células Ly6G⁺ e os sinusoides hepáticos, e visualizamos a provável distribuição dessas células em todo o órgão. Injetamos um volume de anticorpo conjugado a um fluoróforo, o anti-Ly6G PE, proporcional ao peso do camundongo em gramas, em camundongos de diferentes idades após o nascimento (0 e 4 dias; 1, 2, 3, 4 e 8 semanas), para marcar as células Ly6G⁺, e o anti-CD31 APC, também proporcional ao peso do animal, para marcar células endoteliais e, assim, permitir a visualização dos sinusoides hepáticos. Desta forma, o microambiente do fígado pôde ser visualizado *in vivo*. Há a presença de numerosas células Ly6G⁺ até 3 semanas de idade. A partir da terceira semana até a oitava semana, há diminuição significativa do número de células Ly6G⁺, de aproximadamente 33% do número total de células no campo em relação ao camundongo recém-nascido (correlacionando com o dado do CyTOF, que mostrou uma redução de ~20% a partir da primeira semana após o nascimento).

A



B



C

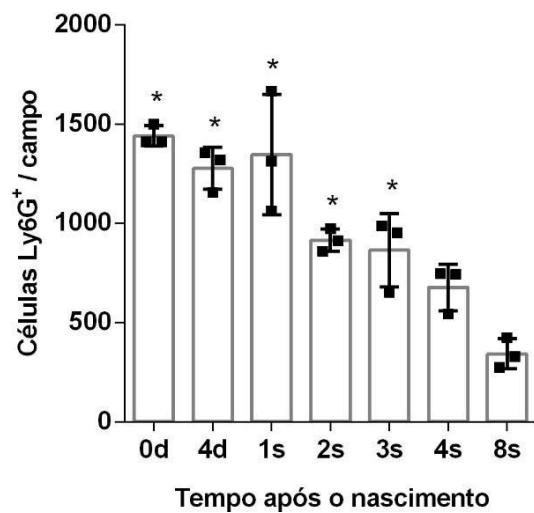


Figura 3 – Frequência de neutrófilos no fígado em diferentes idades e a sua visualização *in vivo*

(A) Frequência de células Ly6G⁺ ao longo do tempo após o nascimento (% do total de células adquiridas da análise por CyTOF). n = 3. (B) Imagens obtidas por MIV do fígado de animais de diferentes idades. Neutrófilos evidenciados em verde (anti-Ly6G PE) e sinusoides hepáticos evidenciados em vermelho (anti-CD31 APC). As cores não são as mesmas da fluorescência emitida pela marcação com os anticorpos ao microscópio; foram modificadas a fim de se ter melhor contraste e melhor visualização das estruturas. Escala: 120 μ m. Objetiva de 10x. (C) Quantificação do número total de células Ly6G⁺ por campo do fígado do dia 0 até a oitava semana após o nascimento. 5 campos por animal, n = 3. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo 8s.

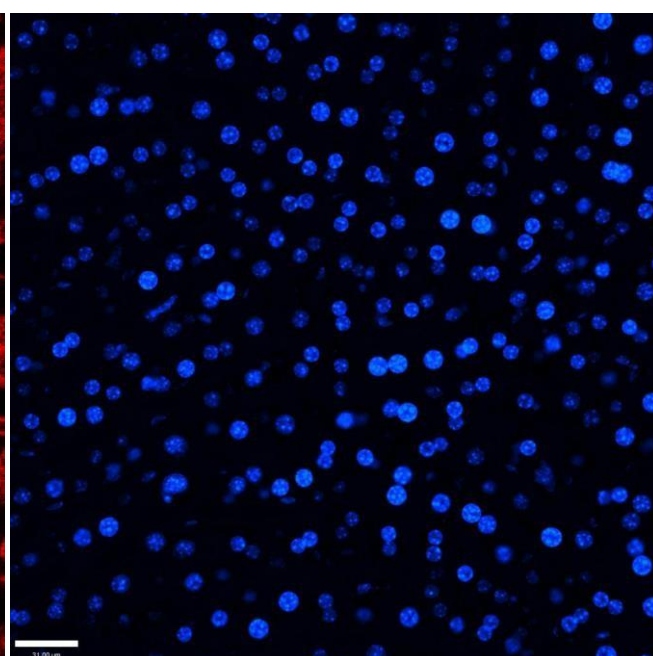
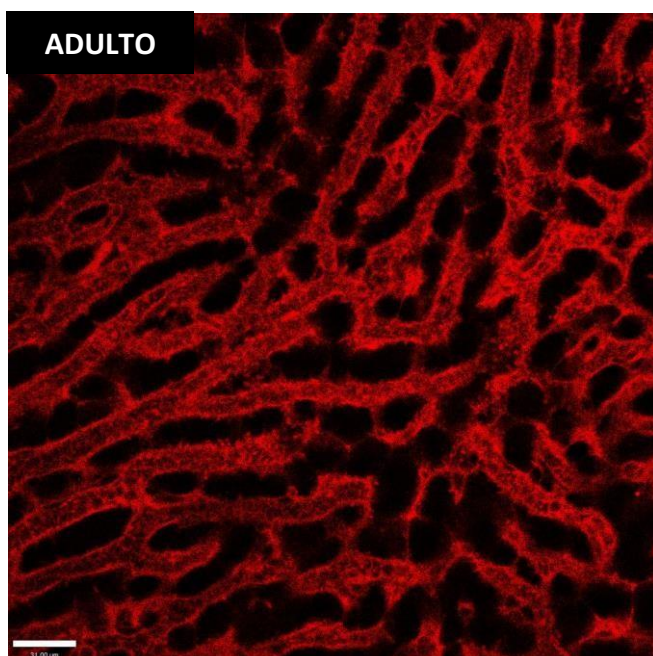
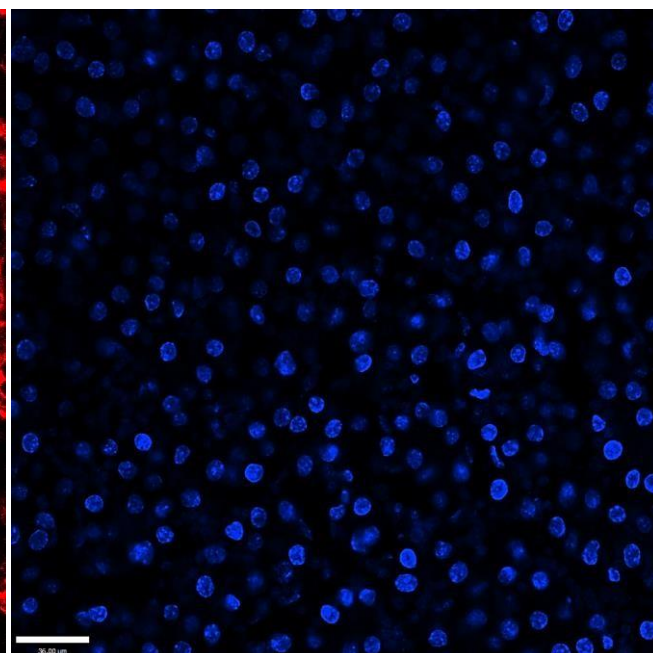
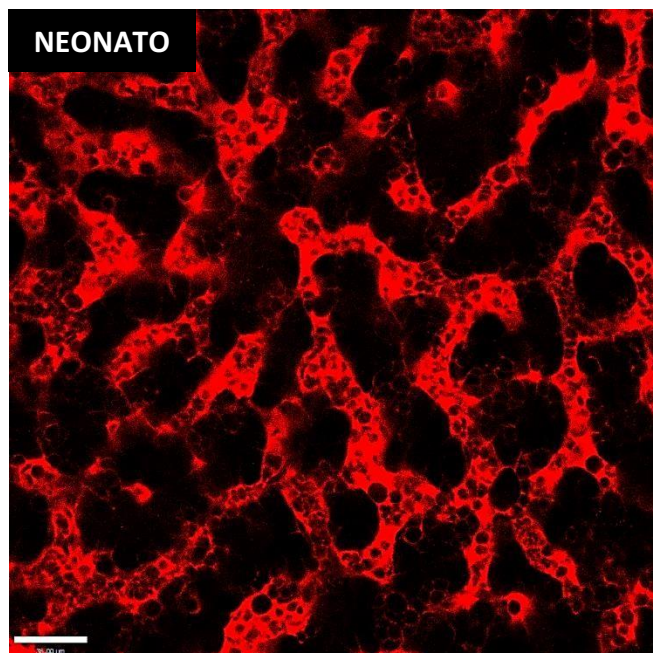
5.4 Mesmo com mudanças na estrutura do fígado até a idade adulta, os neutrófilos permanecem localizados no ambiente intravascular

Ao longo do desenvolvimento, ocorrem mudanças na arquitetura hepática no que diz respeito à organização do parênquima, das células imunes e da microvasculatura. Utilizamos a microscopia intravital (MIV) para a visualização dos vasos e dos cordões de hepatócitos. Uma vez que o uso de anticorpos conjugados gera custos elevados, e visando otimizar os experimentos e gerar alternativas que funcionassem no nosso modelo, seguimos os experimentos de imagem marcando o núcleo das células com Hoechst 33342 (100ug/20g de peso corporal do camundongo) e a circulação sanguínea foi corada com Azul de Evans.

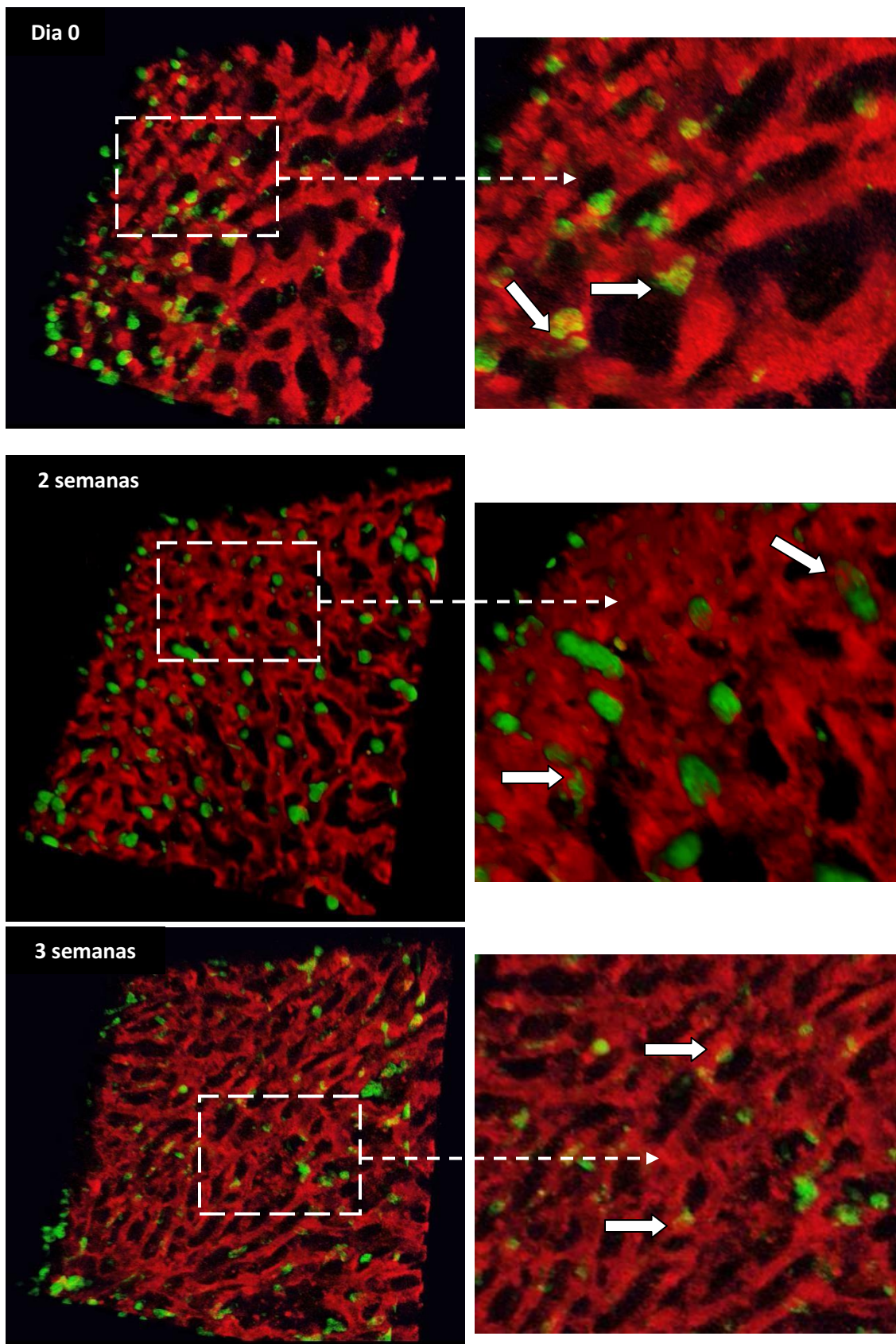
Observou-se que o alongamento da vasculatura hepática é concomitante às formações de fileiras de hepatócitos (visualizados pela marcação com Hoechst) e à redução do número de neutrófilos nas regiões avasculares. Há uma dinâmica de estruturação da morfologia dos compartimentos vasculares e avasculares do fígado após o nascimento. Vimos que a organização dos hepatócitos em cordões só é observada em estágios mais tardios do desenvolvimento após o nascimento, e que os vasos se tornam alongados com o tempo. Com isso, perguntamo-nos também como estaria a localização dos neutrófilos no fígado diante de tantas mudanças estruturais.

Através da MIV, foi possível observar a localização dos neutrófilos em relação aos compartimentos intravascular e extravascular do fígado. Diante de métodos que sugerem a digestão do tecido para o estudo da localização celular, e para evitar a perda do contexto hepático natural, foi feita uma análise por meio de animações tridimensionais (3D), as quais mostraram melhor a localização da célula em relação ao vaso. Embora as imagens dos campos do fígado com as marcações fluorescentes para neutrófilos e sinusoides mostrem nichos de neutrófilos em todo o campo, a análise 3D do órgão mostrou que essas células estão localizadas dentro dos vasos ao longo do desenvolvimento após o nascimento. Os neutrófilos têm o seu número e a sua distribuição modificados no fígado, mas permanecem sendo células intravasculares na homeostase ao longo do tempo pós-natal, mesmo com as mudanças ocorridas em toda o microambiente hepático.

A



B



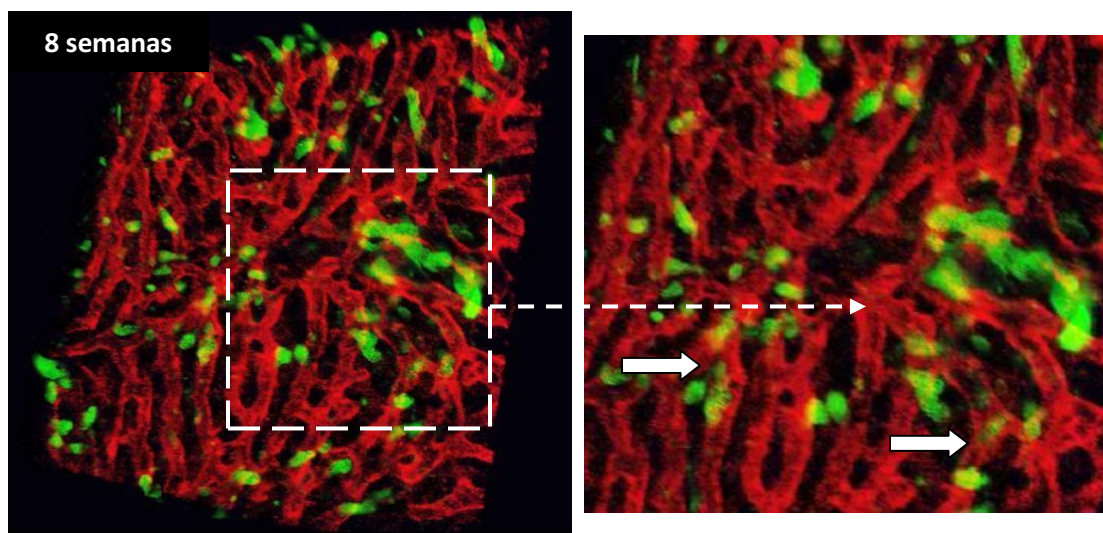


Figura 4 – Neutrófilos visualizados no interior dos sinusoides hepáticos *in vivo*

(A) Imagens por MIV de fígado de camundongo neonato e adulto. Núcleo de hepatócitos evidenciado em azul (Hoechst) e os sinusoides hepáticos estão evidenciados em vermelho (Azul de Evans). Escala = 31 μm . Objetiva de 40x. (B) Imagens tridimensionais por MIV de camundongos com 0 dia, 2 semanas, 3 e 8 semanas após o nascimento mostrando a localização dos neutrófilos em relação aos vasos sanguíneos do fígado. Neutrófilos evidenciados em verde (anti-Ly6G PE) e sinusoides hepáticos evidenciados em vermelho (anti-CD31 APC). As imagens com maior aumento digital representam as áreas tracejadas, e as setas apontam para células Ly6G⁺ que exemplificam células intravasculares, reconhecidas pela marcação em vermelho sobreposta à verde. Objetiva de 20x.

5.5 As células Ly6G⁺ se encontram armazenadas no fígado do embrião de camundongo

Com o intuito de investigar se as células Ly6G⁺ já estavam presentes no fígado antes do nascimento, o fígado de um embrião murino foi coletado após injeção intravenosa de anticorpos anti-Ly6G PE e anti-CD31 APC. Usando imagens *ex vivo*, feitas a partir do corte transversal do fígado do embrião posicionado ao microscópio, confirma-se que as células Ly6G⁺ já estavam presentes no fígado do embrião de camundongo na segunda semana gestacional, aproximadamente. Ou seja: as células Ly6G⁺ não se infiltram no fígado após o nascimento, porém, há uma dinâmica de mudança de distribuição dessas células até a vida adulta.

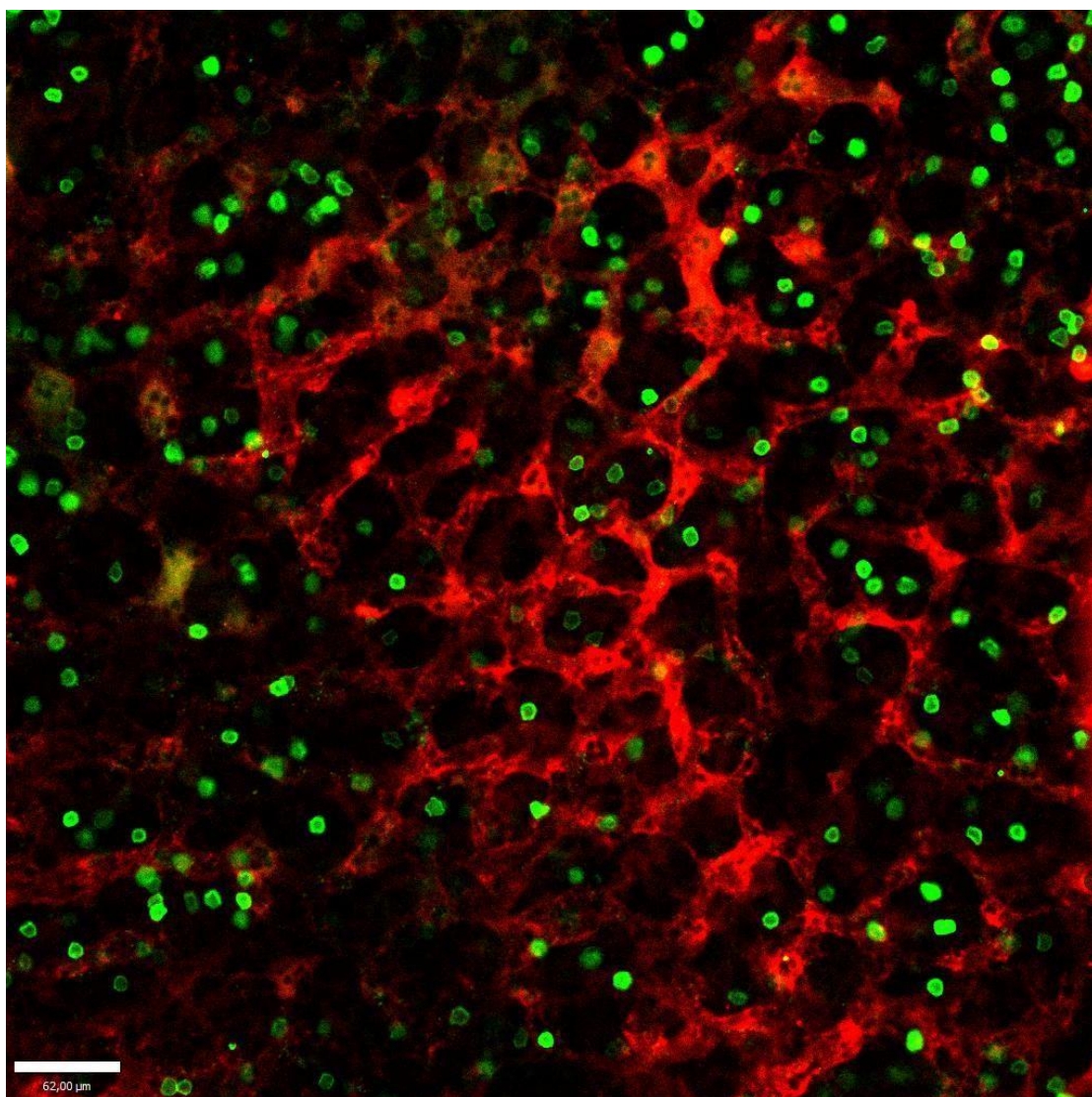


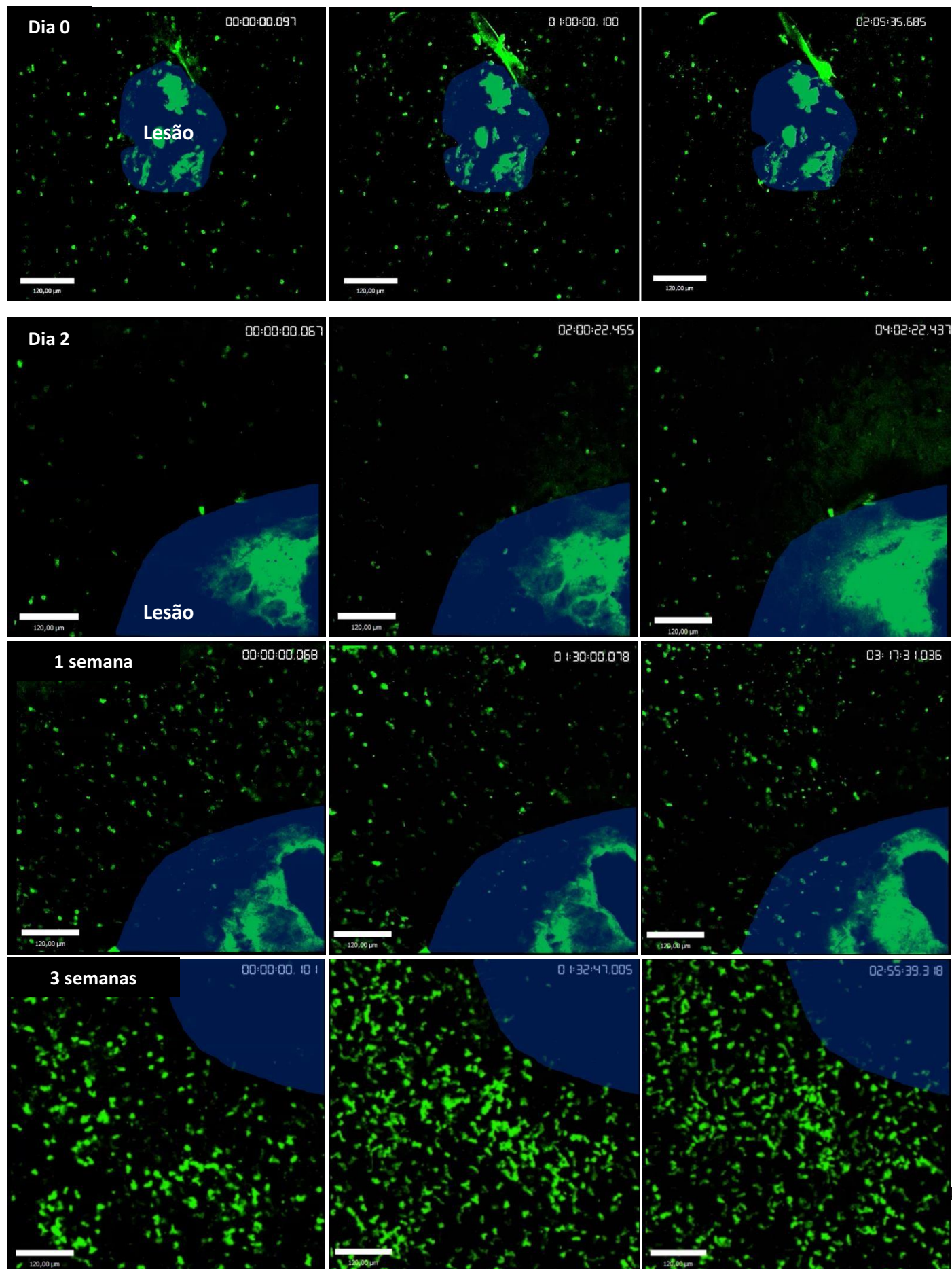
Figura 5 – Neutrófilos visualizados no fígado de embrião de camundongo ao microscópio

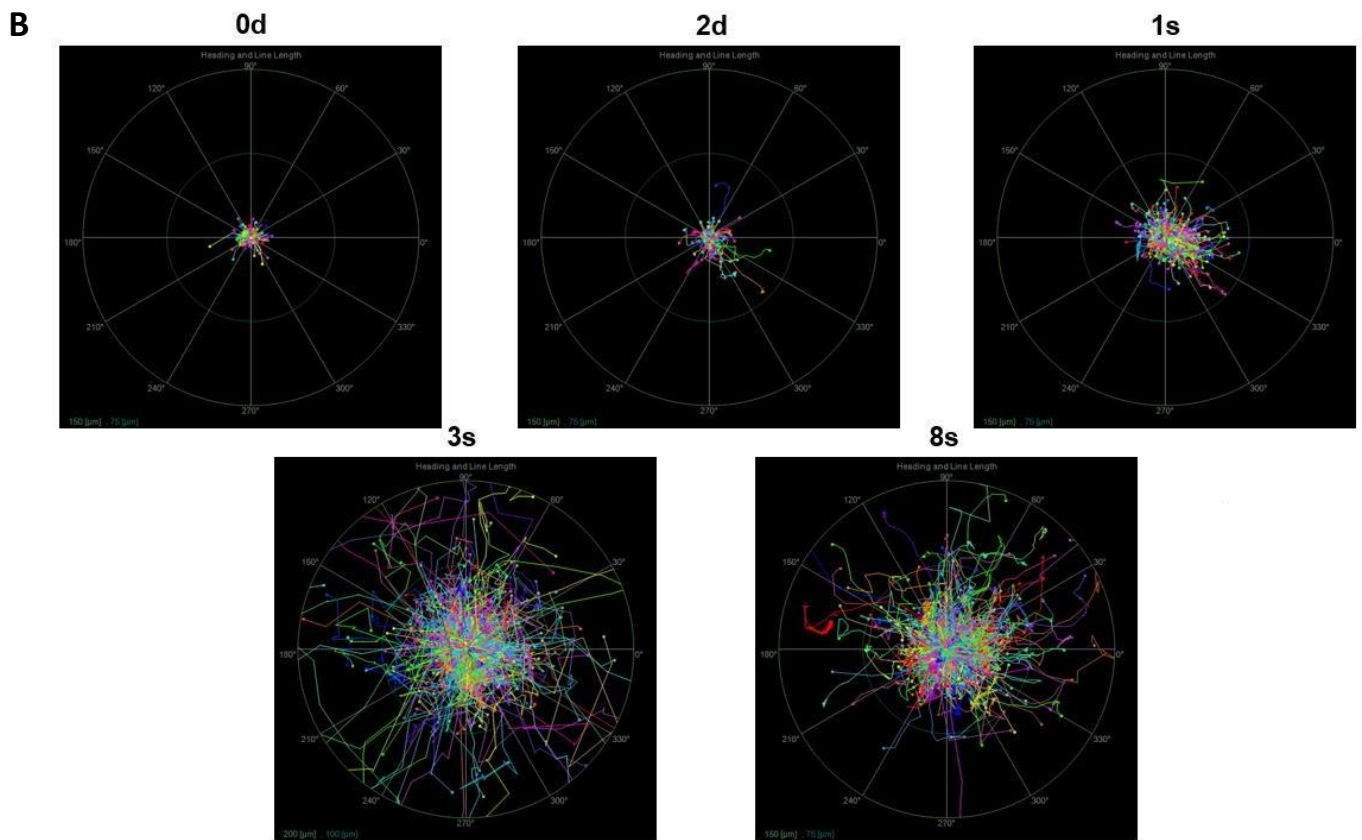
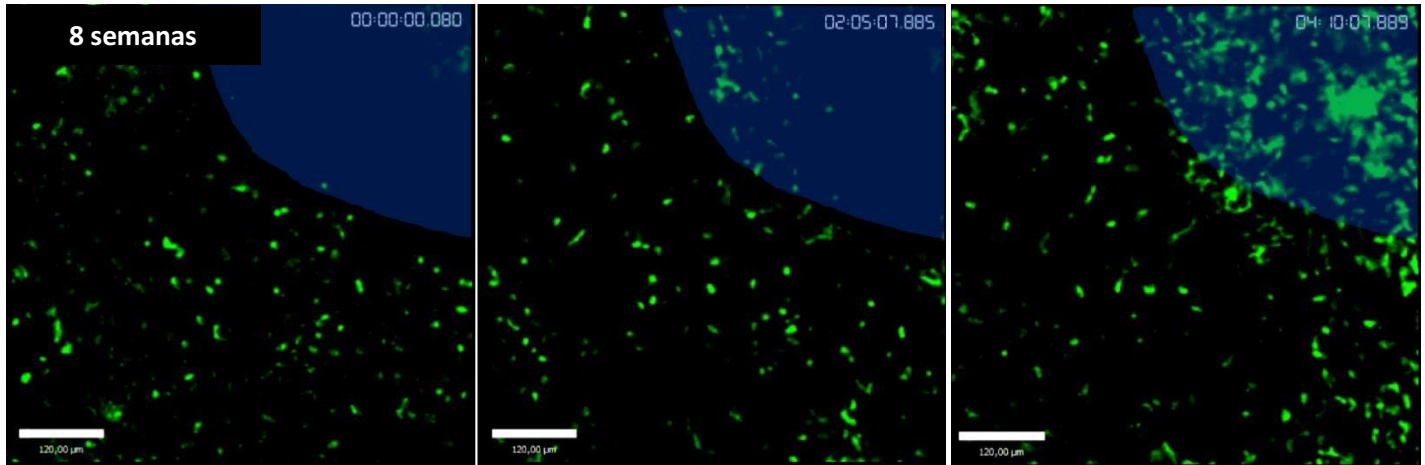
Imagem *ex vivo* do fígado de um embrião de camundongo. Em verde, neutrófilos marcados com anti-Ly6G PE. Em vermelho, sinusoides hepáticos evidenciados pela marcação com anti-CD31 APC. Escala: 62 μm. Objetiva de 20x.

5.6 A motilidade dos neutrófilos no fígado aumenta durante o desenvolvimento pós-natal

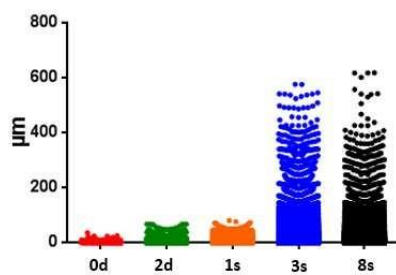
Visando entender se os neutrófilos são funcionais no desenvolvimento pós-natal do fígado, utilizamos um modelo para induzir a quimiotaxia dos neutrófilos, uma vez que são células com funções migratórias para lesões estéreis em adultos. Fizemos um modelo de necrose *in vivo* cauterizando um ponto do fígado e os animais de diferentes idades foram filmados e mantidos anestesiados ao microscópio por até 4 horas (duração variando entre as diferentes idades). A análise dos vídeos mostrou que, em camundongos neonatos, os neutrófilos não se deslocam tanto até a lesão quanto nos tempos mais avançados de 3 e 8 semanas. Analisando e quantificando o deslocamento, a aceleração e a velocidade de cada neutrófilo, viu-se que o comportamento dos neutrófilos mudou: ao longo do tempo, essas células vão apresentando maior motilidade e são mais rápidos.

A

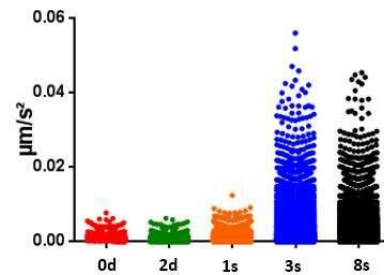




C **Deslocamento**



D **Aceleração**



E **Velocidade**

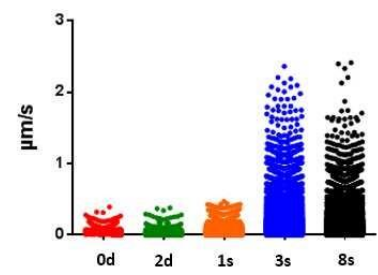


Figura 6 – O comportamento dos neutrófilos frente a uma lesão estéril induzida por queimadura no fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal hepático

(A) Sequência de *frames* em *time lapse* obtidas de vídeos feitos por MIV de camundongos com 0 e 2 dias, 1, 3 e 8 semanas de idade. As imagens mostram os momentos pausados dos vídeos nos tempos 0, na metade e ao final dos vídeos. Destacada em azul está a área correspondente à lesão por queimadura, e os neutrófilos são evidenciados em verde (anti-Ly6G PE). Escala: 120 μm . Objetiva de 10x. (B) *Tracking* (rastreamento) de cada neutrófilo marcado por MIV no modelo de quimiotaxia por queimadura. As linhas representam o deslocamento dessas células no campo. Quantificação (C) do deslocamento, (D) aceleração e (E) velocidade dos neutrófilos nas diferentes idades.

5.7 Há um transiente aumento na capacidade de produção de ROS por neutrófilos hepáticos

Para complementar o estudo da função dos neutrófilos ao nascimento e ao longo do desenvolvimento pós-natal, fizemos a análise da produção de espécies reativas de oxigênio (mais conhecidas pela sigla em inglês, ROS) por essas células. Sabemos que ROS é um componente da resposta de células imunes à invasão microbiana. ROS também desempenham um papel fundamental como mensageiro na transdução dos sinais celulares, e uma das importantes funções dos neutrófilos é produzir ROS (Winterbourn, Kettle e Hampton, 2016). Vimos que, apesar de a porcentagem de células Ly6G⁺ produtoras de ROS tenha se mantido constante ao longo do tempo após o dia 0, a produção de ROS apresentou um aumento pontual no sétimo dia após o nascimento, o que sugere que o comportamento de alguns neutrófilos muda ao longo da vida.

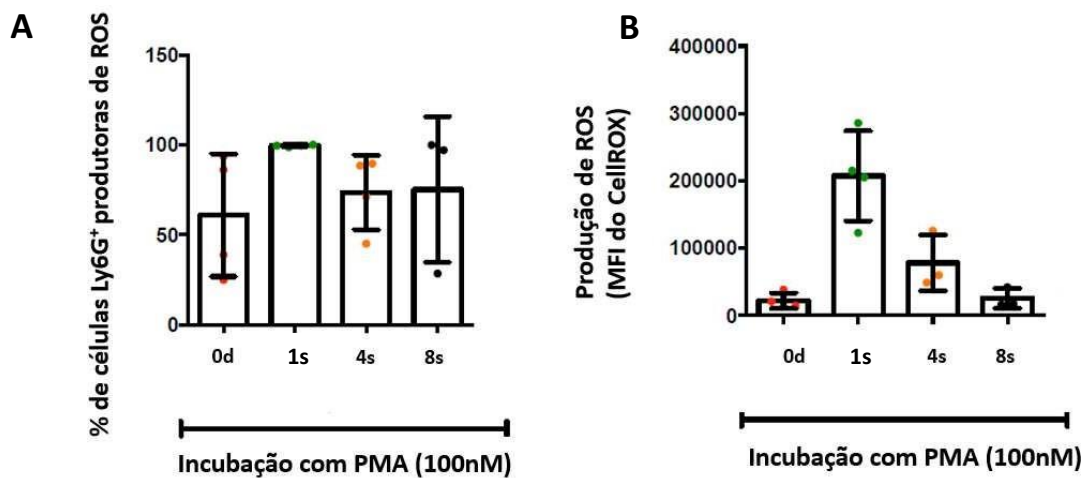


Figura 7 – Produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos de animais em diferentes fases da vida após o nascimento

Avaliação da produção de ROS por neutrófilos hepáticos em animais com 0 dia, 1, 4 e 8 semanas de idade, isolados do fígado e cuja produção de ROS foi induzida por PMA. (A) Porcentagem das células Ly6G⁺ produtoras de ROS. (B) Intensidade mediana de fluorescência (MFI) mostrando a produção de ROS pelas células isoladas.

6. Discussão

Este trabalho buscou entender a dinâmica de uma determinada população de células imunes no fígado desde o nascimento até a idade adulta: os granulócitos. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que o fígado de um animal recém-nascido é diferente do de um animal adulto em termos de estrutura, diversidade celular, quantidade de células imunes e função (Nakagaki *et al.*, 2018). Não somente diferente de um fígado maduro, mas o fígado do animal recém-nascido passa por mudanças graduais ao longo do tempo, e existe uma complexidade e uma dinâmica de processos que regem essas mudanças.

Partindo de dados prévios do nosso grupo com modelo murino, vimos que células Ly6G⁺ compõem a população imune hepática mais numerosa no fígado ao nascimento. Analisando os marcadores utilizados para a imunofenotipagem dos fígados por CyTOF, concluiu-se que as células Ly6G⁺ hepáticas no camundongo recém-nascido são granulócitos (Figuras 1). O Ly6G é uma proteína encontrada no citoplasma e é expressa também em monócitos que estão amadurecendo na medula óssea, enquanto é expressa em neutrófilos periféricos e em diferentes estágios de maturação. A partir desse dado e do estudo da morfologia dessas células, correlacionando diferentes técnicas, as células Ly6G⁺ do fígado, ou seja, os granulócitos hepáticos, são denominados “neutrófilos” (Figura 2).

Um ponto que chama a atenção é que, segundo a literatura, os neutrófilos são as primeiras células a migrar para sítios de infecção e inflamação e desempenham funções importantes na imunidade frente a patógenos, atuando também na regeneração dos tecidos e na comunicação celular. Dessa forma, muito se associa um grande de neutrófilos à presença de lesão. No entanto, vimos que mesmo recém-nascidos saudáveis apresentam numerosos neutrófilos no fígado, o que sugere que os neutrófilos podem desempenhar funções diversas, não só em um contexto inflamatório. Essas células podem, também, ter uma função não-imune.

O fígado também passa por mudanças em sua arquitetura tecidual. Os arranjos microvasculares são diferentes nos recém-nascidos em comparação aos fígados de animais adultos. Os neonatos têm uma rede vascular com morfologia alveolar, além de espaços circulares ocupados por ninhos de células imunes e hepatócitos. Tal padrão foi observado após 4 dias até 2 semanas de vida, a partir da qual a rede vascular vai se ramificando. Em momentos posteriores (4 semanas), a

microvasculatura hepática exibiu morfologia semelhante a de adultos (Figura 3), embora a circulação não tenha sofrido impacto diante de tais mudanças estruturais. Há uma dinâmica de estruturação da morfologia dos compartimentos vasculares e avasculares do fígado após o nascimento, sugerindo que este órgão passa também por uma maturação morfológica após a embriogênese.

Com o objetivo de descrever a localização e a distribuição dos neutrófilos hepáticos, obtivemos imagens do fígado de animais vivos, através das quais visualizamos os neutrófilos em um estado mais próximo ao natural. Controlando a temperatura do camundongo e mantendo a circulação do mesmo, buscamos garantir estudar o neutrófilo, que é uma célula circulante, de forma mais fidedigna ao contexto do organismo. Nas idades iniciais, vimos que os camundongos, embora numerosos no fígado, não circulam tanto quanto os neutrófilos de animais adultos, nem na homeostase, nem em contexto de lesão (Figura 6). Tal comportamento pode sugerir que há um processo que coordena a maturação dessas células no fígado após o nascimento nas idades iniciais que é independente de lesão, sendo intrínseco ao organismo. Já em animais adultos, os neutrófilos respondem à inflamação local, migrando rapidamente e em grandes quantidades para a região afetada pela queimadura. No fígado, a migração dos neutrófilos até a área de lesão é feita dentro dos vasos sanguíneos.

Uma perspectiva obtida com este trabalho se deve a respeito do comportamento dos neutrófilos em uma lesão remota. Promovendo uma lesão em uma região distante do fígado, podemos avaliar se o recrutamento de células da medula óssea de animais de diferentes idades é o mesmo, e podemos avaliar se o número de células mieloides no fígado se altera nesse contexto, o que pode responder se os neutrófilos hepáticos são mais migratórios ou se, realmente, eles têm outra função no microambiente hepático em recém-nascidos, por exemplo.

À medida em que a idade dos camundongos avança, não somente o comportamento dos neutrófilos muda, como também o seu número total no fígado. Há uma redução gradual e significativa no número de neutrófilos hepáticos (Figura 3). Ao longo do tempo, essas células permanecem dentro do vaso (Figura 4), mas se organizam em nichos nas idades iniciais. O estudo da localização dos neutrófilos nos compartimentos intravascular e extravascular foi possível com a utilização da reconstrução em 3D, uma alternativa mais precisa quando se trata de células circulantes. Por variação focal, é possível confirmar se determinada célula está fora do caso, ou se está dentro do vaso, mas em um plano focal diferente.

Os neutrófilos são conhecidos classicamente por iniciarem uma inflamação aguda e são responsáveis por uma resposta imune pró-inflamatória eficaz. Quando reativos, essas células produzem espécies reativas de oxigênio, que podem atuar no crescimento celular, apoptose, migração de outros tipos celulares, na liberação de vasoconstritores, por exemplo. Desta forma, a avaliação da produção de ROS por neutrófilos é um modelo tradicional e estabelecido para se estudar a função dessas células. Neste trabalho, vimos que a porcentagem de neutrófilos produtores de ROS não se alterou ao longo do tempo, mas a produção total de ROS, avaliada pela intensidade mediana de fluorescência das amostras, sofreu um aumento transiente nas primeiras semanas após o nascimento (Figura 7).

As amostras emitem fluorescência quando há oxidação por ROS. O aumento transiente na produção de ROS na primeira semana de vida pós-natal sugere que, mesmo os neutrófilos apresentando menor motilidade frente a uma lesão na primeira semana de vida do camundongo, é nesta idade que, aparentemente, essas células produzem mais ROS, tendo maior resposta frente a determinada mudança no ambiente, podendo ser uma mudança na própria arquitetura hepática. Também como perspectiva do trabalho, é importante avaliar como as mudanças estruturais no desenvolvimento pós-natal do fígado são coordenadas, e se os granulócitos hepáticos têm um papel nesse processo.

Trabalhos recentes têm mostrado como a microbiota intestinal no início da vida está envolvida em vários processos biológicos, como o metabolismo, a imunidade e o neurodesenvolvimento cognitivo. A perturbação na microbiota intestinal do bebê aumenta o risco de doenças no início e mais tarde na vida, e existem momentos pontuais da vida do bebê em que possíveis perturbações podem afetar mais a microbiota intestinal (Raspini *et al.*, 2021). Segundo o estudo recente feito por Raspini e colaboradores, existem fatores pré-natais e pós-natais que influenciam a composição da microbiota intestinal infantil aos seis meses de idade. Considerando isto, faz-se importante conectar o estudo do sistema imune hepático ao estudo da microbiota intestinal, uma vez que ambos podem reger processos importantes que ditam a maturação do sistema imune como um todo e, conseqüentemente, a saúde do indivíduo ao longo de toda a sua vida. Tais processos acontecem nos primeiros dias, ou nas primeiras semanas e meses pós-parto. Como mais uma perspectiva, pode-se buscar entender se a colonização bacteriana intestinal está relacionada à função dos granulócitos hepáticos. Para tal, faz-se interessante a utilização de

camundongos *germ-free*.

O fígado, portanto, é um órgão chave para que se compreenda melhor o desenvolvimento do sistema imune logo após o nascimento, um período em que os bebês estão expostos a desafios, a microrganismos, dietas e a demais fatores que podem moldar a sua resposta imune por toda a vida. Vimos que o fígado passa por uma maturação imune e morfológica após a embriogênese, e os granulócitos podem ter um papel relevante nessa dinâmica e, conseqüentemente, no sistema imune como um todo.

7. *Conclusões*

Com este trabalho, podemos concluir que:

1. Os granulócitos são a população imune mais abundante no fígado ao nascimento, e a maioria dessas células são neutrófilos.
2. Há uma redução gradual no número de neutrófilos no fígado desde o nascimento até a idade adulta, acompanhando uma mudança estrutural nos vasos hepáticos.
3. Os neutrófilos respondem de forma diferente a uma lesão no desenvolvimento pós-natal.
4. O fígado passa por uma maturação imune e morfológica após a embriogênese, e os granulócitos podem ter um papel relevante nessa dinâmica.

8. Referências bibliográficas

Balmer M *et al.* (2014) **The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota.** *Sci Transl Med* 6:237ra266.

Ben-Moshe S, Itzkovitz S (2019) **Spatial heterogeneity in the mammalian liver.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1.

Bort R *et al.* (2006). **Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development.** *Dev Biol* 290(1): 44-56.

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

David B *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.

Eckert C *et al.* (2015) **The Complex Myeloid Network of the Liver with Diverse Functional Capacity at Steady State and in Inflammation.** *Front Immunol* 6.

Ginhoux F, Guilliams M (2016). **Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis.** *Immunity* 44(3): 439-449.

Gordillo M *et al.* (2015). **Orchestrating liver development.** *Development* 142(12): 2094-2108.

Lee J *et al.* (2012). **Transcriptional ontogeny of the developing liver.** *BMC Genomics* 13: 33.

Lorenz L *et al.* (2018) **Mechanosensing by beta1 integrin induces angiocrine signals for liver growth and survival.** *Nature* 562: 128–132.

Kinoshita M *et al.* (2010) **Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice.** *J Hepatol* 53:903-910.

Kretzschmar K, Clevers H (2017) **Wnt/ β -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells.** *Dev. Biol.* 428, 273–282.

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

Lalor P *et al.* (2002) **Recruitment of lymphocytes to the human liver.** *Immunol Cell Biol* 80:52-64.

Marques P, Antunes M, David B, Pereira R, Teixeira M, Menezes G (2015) **Imaging liver biology *in vivo* using conventional confocal microscopy.** *Nature Protocols* 10, 258–268.

Nakagaki B *et al.* (2018) **Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function.** *J Hepatol* 69:1294-1307.

Nusse R, Clevers H (2017) **Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities.** *Cell* 169, 985–999.

Perugorria M *et al.* (2019) **Wnt-beta-catenin signalling in liver development, health and disease.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*;16(2):121–36.

Pillay J, Tak T, Kamp V. M, Koenderman L (2013) **Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences.** *Cellular and Molecular Life Sciences*; 70(20):3813-27.

Ramaiah S, Jaeschke H (2007) **Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury.** *Toxicol Pathol* 35:757-766.

Raspini B *et al.* (2021) **Early Life Microbiota Colonization at Six Months of Age: A**

Transitional Time Point. Front. Cell. Infect. Microbiol. Vol. 11.

Reynolds E (1977) **Environmental aspects of injury and disease: liver and bile ducts.** Environ Health Perspect v. 20, p. 1-13.

Rossaint J, Zarbock A (2013) **Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney.** J Innate Immun v. 5, n. 4, p. 348-57.

Tarasenko T, McGuire P (2017) **The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM).** Mol Genet Metab, v. 121, n. 4, p. 283-288.

Vollmar B, Menger M (2009) **The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair.** Physiol Rev v. 89, n. 4, p. 1269-339.

Wang J *et al.* (2017) **Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair.** Science 358:111-116.

Weller P, Spencer L (2017) **Functions of tissue-resident eosinophils.** Nat Rev Immunol 17:746-760.

Wenzel P *et al.* (2011) **Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction.** Circulation 124: 1370– 1381.

Winterbourn C, Kettle A, Hampton M (2016) **Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function.** Annual Review of Biochemistry 85:765-92.

Zimmermann N *et al.* (2008) **Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils.** Allergy 63:1156-1163.