

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

Kassiana Mafra Bicalho

**AVALIAÇÃO DO ESTABELECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS B
HEPÁTICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2023

Kassiana Mafra Bicalho

**AVALIAÇÃO DO ESTABELECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS B
HEPÁTICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM
CAMUNDONGOS**

Versão Final

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 Doutora em Biologia Celular

Orientador: Gustavo Batista de Menezes

Co-orientador: André Macedo Vale

Belo Horizonte

2023

043

Bicalho, Kassiana Mafra.

Avaliação do estabelecimento da população de células B hepáticas durante o desenvolvimento pós-natal em camundongos [manuscrito] / Kassiana Mafra Bicalho. – 2023.

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

Orientador: Gustavo Batista de Menezes. Co-orientador: André Macedo Vale.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Fígado. 3. Crescimento e Desenvolvimento. 4. Linfócitos B. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Vale, André Macedo. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. 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 KASSIANA MAFRA BICALHO

Às **treze horas** do dia **22 de maio de 2023**, 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: "**AValiação DO ESTABELECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS B HEPÁTICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM CAMUNDONGOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutora 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 |
| Dr. Andre Macedo Vale | UFRJ | APROVADA |
| Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela | UFMG | APROVADA |
| Dr. Flávio Almeida Amaral | UFMG | APROVADA |
| Dra. Cecília Bataglioli Cavazzoni | BWH/HMS | APROVADA |
| Dra. Patrícia Gama | USP | 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, 22 de maio de 2023.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Dr. Andre Macedo Vale (Coorientador) _____

Dr^a. Liza Figueiredo Felicori Vilela _____

Dr. Flávio Almeida Amaral _____

Dr^a. Cecília Bataglioli Cavazzoni _____

Dr^a. Patrícia Gama _____

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



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 16:51, 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 29/05/2023, às 08:04, 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 **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 17:02, 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 **Patrícia Gama, Usuária Externa**, em 30/05/2023, às 06:19, 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 **Andre Macedo Vale, Usuário Externo**, em 30/05/2023, às 14:43, 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 **Cecilia Bataglioli Cavazzoni, Usuária Externa**, em 01/06/2023, às 11:21, 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 **Liza Figueiredo Felicori Vilela, Professora do Magistério Superior**, em 01/06/2023, às 15:45, 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 **2338722** e o código CRC **181B6B57**.

Referência: Processo nº 23072.232244/2023-14

SEI nº 2338722

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe e avós, pelo maior amor do mundo e por tudo que me ensinaram nessa vida.

Aos amigos, minha segunda família, por todo companheirismo nessa jornada e por estarem comigo tornando a vida mais leve e bonita.

Ao laboratório CGB, e especialmente ao Gustavo Menezes pela oportunidade, por acreditar em meu trabalho e sempre incentivar meu crescimento.

Aos companheiros de bancada que me ajudaram em tantos experimentos e discussões de ideias e tornaram o dia a dia tão leve e divertido.

Ao André Vale e seu laboratório, por abrirem as portas do lab e me acolherem e por todas discussões e ensinamentos.

Ao Rafael Rezende e laboratório por me receberem no intercambio, terem me ensinado tanto e ajudado no avanço do trabalho. Obrigado por todo apoio e por todas as trocas nesse período.

Aos laboratórios da professora Ana Caetano e Liza Felicori que nos ajudaram com colaborações e discussões de ideias.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular pela dedicação ao trabalho.

Às agências financiadoras CNPq e CAPES que permitiram a realização desse trabalho e mantêm o funcionamento de nossa pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram para este trabalho direta ou indiretamente.

RESUMO

O processo em que o fígado neonatal reorganiza sua estrutura e funções para transitar entre os diferentes períodos fetal e adulto é pouco explorado na literatura. Sabemos que há uma alteração significativa no perfil imune celular do fígado ao longo desse desenvolvimento pós-natal, onde a predominância de células mieloides nos neonatos é substituído por células linfoides nos adultos. Os linfócitos B estão entre essas células que se alteram em número. Mas, apesar de sua grande importância em muitos processos, existem poucos estudos sobre células B no ambiente hepático e ainda menos estudos sobre as células B no fígado neonatal. Por essas razões nos perguntamos: como a população de células B hepática se altera nos neonatos até seu estabelecimento no órgão adulto maduro? Para responder a essa pergunta foram estudados camundongos nas fases de desenvolvimento fetal, neonatal e adulta. Observamos por microscopia intravital que células B estão localizadas no interior dos sinusoides hepáticos em neonatos e adultos e parecem patrulhar a vasculatura. Neonatos de uma semana também apresentaram aglomerados de células no parênquima. Nos neonatos, predominam células B maiores, mais ativas e com grandes alterações morfológicas. Por outro lado, nos adultos predominam células de morfologia arredondada clássica e com menor movimentação. Por meio da citometria de fluxo, observamos que diferentes subpopulações de células B estão presentes nas fases de desenvolvimento. Ainda predominam células precursoras no fígado até duas semanas pós-nascimento. O estabelecimento das células B ainda não está completo ao nascimento e continua no período neonatal, com o perfil das subpopulações de células B como caracterizado nos adultos se estabelecendo nos órgãos apenas na quarta semana de idade. Nesse contexto o fígado neonatal ainda desempenha um importante papel com potencial na formação de células B maduras que podem migrar para a colonização de outros órgãos. Por fim, o perfil de imaturidade de células B na fase neonatal se reflete na reduzida produção própria de anticorpos nos neonatos, o qual é suprido pelo fornecimento de IgG pelo leite materno.

Palavras-chave: Desenvolvimento neonatal. Linfócitos B. Fígado.

ABSTRACT

The process in which the neonatal liver reorganizes its structure and functions to transit between the different fetal and adult periods is poorly explored in the literature. We know that there is a significant change in the cellular immune profile of the liver throughout this postnatal development, where the predominance of myeloid cells in neonates is replaced by lymphoid cells in adults. B lymphocytes are among these cells that change in number. But, despite their great importance in many processes, there are few studies on B cells in the hepatic environment and even fewer studies on B cells in the neonatal liver. For these reasons, we asked ourselves: how does the liver B cell population change in neonates until it is established in the mature adult organ? To answer this question, mice in the fetal, neonatal, and adult stages of development were studied. We observed by intravital microscopy that B cells are located within the hepatic sinusoids in neonates and adults and seem to patrol the vasculature. One-week-old neonates also showed clusters of cells in the parenchyma. In neonates, larger, more active B cells with major morphological alterations predominate. On the other hand, in adults, cells with a classic rounded morphology and less movement predominate. Through flow cytometry, we observed that different subpopulations of B cells are present in the development phases. Precursor cells still predominate in the liver up to two weeks after birth and the profile of B cell subpopulations as characterized in adults are established in the organs only in the fourth week. B cell establishment is not yet complete at birth and continues into the neonatal period. In this context, the neonatal liver still plays an important role with potential in the formation of mature B cells that can migrate to colonize other organs. Finally, the immaturity profile of B cells in the neonatal phase is reflected in the reduced production of antibodies in neonates, which is supplied by the supply of IgG in breast milk.

Keywords: Neonatal development. B lymphocytes. Liver.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Localização anatômica do fígado e aporte sanguíneo ao órgão..... | 16 |
| Figura 2: Organização estrutural do fígado..... | 17 |
| Figura 3: Populações celulares presentes no fígado..... | 18 |
| Figura 4: Funções do fígado adulto..... | 19 |
| Figura 5: Desenvolvimento embrionário hepático..... | 20 |
| Figura 6: Processo hematopoiético..... | 21 |
| Figura 7: Estabelecimento da hematopoiese no período fetal..... | 22 |
| Figura 8: Transição do fígado nos períodos fetal, neonatal e adulto..... | 24 |
| Figura 9: Organização morfológica do fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal..... | 29 |
| Figura 10: Alterações imunes no fígado pós-natal..... | 30 |
| Figura 11: Estrutura de uma imunoglobulina..... | 31 |
| Figura 12: Recombinação de segmentos V(D)J para a formação da porção variável das imunoglobulinas..... | 32 |
| Figura 13: Etapas na formação das células B nos órgãos linfoides primários..... | 33 |
| Figura 14: Interação entre estroma hepático fetal e células precursoras..... | 34 |
| Figura 15: Maturação das células B nos órgãos linfoides secundários..... | 37 |
| Figura 16: Desenho experimental das idades do desenvolvimento analisadas no estudo..... | 43 |
| Figura 17: Esquema demonstrando o experimento de microscopia confocal intravital (IVM)..... | 44 |
| Figura 18: Esquema demonstrando o experimento de citometria de fluxo para identificação do perfil de subpopulações de células B no fígado, baço, medula óssea e sangue em estado fisiológico..... | 45 |
| Figura 19: Estratégia de análise da citometria de subpopulações de células B..... | 49 |
| Figura 20: Análise da porcentagem de células B hepáticas por citometria de fluxo em animais que foram perfundidos ou não-perfundidos..... | 50 |
| Figura 21: Desenho experimental da transferência de precursores de células B para camundongos Rag ^{-/-} | 52 |
| Figura 22: Desenho experimental dos experimentos de fotoconversão de células do fígado..... | 54 |
| Figura 23: Sistema para fotoconversão de animais <i>Kaede</i> | 55 |
| Figura 24: Dosagem de imunoglobulinas no leite materno e no soro de animais que possuem anticorpos provenientes de diferentes fontes (leite materno ou próprio)..... | 57 |
| Figura 25: Localização das células B na estrutura hepática ao longo do desenvolvimento pós-natal..... | 60 |
| Figura 26: Distribuição de células B por área do fígado no desenvolvimento pós-natal..... | 61 |
| Figura 27: Padrões de morfologia das células B hepáticas no desenvolvimento pós-natal..... | 63 |
| Figura 28: Padrões de movimentação das células B hepáticas no desenvolvimento pós-natal..... | 64 |
| Figura 29: Especificidade da marcação do anticorpo anti-B220 avaliada no fígado de animais de 1 e 9 semanas por IVM..... | 65 |
| Figura 30: Perfil das subpopulações de células B no desenvolvimento pós-natal..... | 69 |
| Figura 31: Perfil de células B precursoras, transição/imatura e maduras no desenvolvimento pós-natal do fígado, baço, medula óssea e sangue..... | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura 32: Perfil de subpopulações de células B 4 semanas após a transferência de precursores para animais receptores Rag ^{-/-} de 9 semanas..... | 72 |
| Figura 33: Perfil de subpopulações de células B 1 semana após a transferência de precursores para animais receptores Rag ^{-/-} de 1 semana..... | 73 |
| Figura 34: Porcentagem de células CD19+ Fotoconvertidas..... | 75 |
| Figura 35: Dosagem de imunoglobulinas séricas provenientes de diferentes fontes ao longo do desenvolvimento..... | 77 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

LSEC: liver sinusoidal endotelial cells

E: dia embrionário

SPC: semanas pós-concepção

HSC: célula tronco hematopoiética

AGM: aorta-gônadas-mesonefro

FO: células foliculares

MZ: células de zona marginal

BCR: receptor de células B

TD: T-dependente

TI: T-independente

GC: centro germinativo

WT: wild-type

IVM: microscopia intravital

PRR: receptor de reconhecimento de padrão

KC: células de Kupffer

i.v.: via intravenosa

s.c.: via subcutânea

MPP: progenitor multipotente

ELP: progenitor linfoide precoce

CLP: progenitor linfoide comum

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 O fígado no período adulto | 15 |
| 1.1.1 Estabelecimento da estrutura hepática no fígado adulto..... | 15 |
| 1.1.2 Funções do fígado no período adulto | 18 |
| 1.2 O fígado no período fetal | 20 |
| 1.2.1 Formação embrionária do fígado | 20 |
| 1.2.2 Funções do fígado no período fetal: hematopoiese | 20 |
| 1.3 Alterações hepáticas na transição fetal-adulto: o período neonatal..... | 25 |
| 1.3.1 O sistema imune em neonatos..... | 26 |
| 1.3.2 Modificações e adaptações hepáticas no período neonatal..... | 27 |
| 1.4 Linfócitos B | 30 |
| 1.4.1 Formação de linfócitos B nos órgãos linfoides primários: fígado fetal e medula óssea adulta | 31 |
| 1.4.2 Estabelecimento das populações de células B nos órgãos linfoides secundários... | 34 |
| 1.4.3 Linfócitos B em neonatos versus adultos | 38 |
| 1.4.4 Linfócitos B hepáticos..... | 39 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 3. OBJETIVOS | 42 |
| 3.1 Objetivo Geral | 42 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 4.1 Animais..... | 43 |
| 4.2 Microscopia Confocal Intravital (IVM) | 44 |
| 4.3 Análise de imagens da IVM | 45 |
| 4.4 Citometria de Fluxo | 45 |
| 4.4.1 Isolamento de células do fígado, baço, medula óssea, sangue e cavidade peritoneal | 46 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.4.2 | Marcação das células isoladas e leitura no citômetro ou sorter..... | 47 |
| 4.4.3 | Análise da citometria de fluxo para caracterização de populações celulares | 48 |
| 4.5 | Citometria de fluxo de animais perfundidos ou não perfundidos | 50 |
| 4.6 | Transferência adotiva de precursores de células B para camundongos Rag ^{-/-} | 50 |
| 4.7 | Fotoconversão de células do fígado em camundongos <i>Kaede</i> | 52 |
| 4.8 | Dosagem de anticorpos por ELISA..... | 55 |
| 4.9 | Análise Estatística | 58 |
| 5. | RESULTADOS..... | 59 |
| 5.1 | Linfócitos B fígado-específicos são encontrados no fígado e se localizam no interior de sinusoides hepáticos onde patrulham o órgão..... | 59 |
| 5.2 | Dois tipos de células B com diferenças na expressão de B220, morfologia e padrão de movimentação estão presentes ao longo do desenvolvimento. | 60 |
| 5.3 | O marcador B220 identifica células B de forma específica. | 64 |
| 5.4 | Linfócitos B alteram seu perfil de maturidade ao longo do desenvolvimento pós-natal hepático..... | 66 |
| 5.5 | Precursos hepáticos de células B presentes na primeira semana pós-nascimento possuem potencial de se diferenciarem em células B maduras | 71 |
| 5.6 | Células B hepáticas da primeira semana pós-nascimento podem sair do fígado e migrar para outros órgãos como baço e medula óssea | 73 |
| 5.7 | A produção própria de imunoglobulinas se estabelece ao final do período neonatal, sendo suprida pela transferência de IgG do leite materno durante o período de amamentação ... | 76 |
| 6. | DISCUSSÃO | 78 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 95 |
| | REFERÊNCIAS | 96 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR..... | 103 |

1. INTRODUÇÃO

O primeiro passo necessário neste trabalho é apresentar uma caracterização do fígado, uma vez que este órgão foi o objeto de nosso estudo. Começaremos abordando as particularidades da organização e função do fígado nas fases de desenvolvimento fetal e adulto, uma vez que esses dois períodos do órgão são bem descritos na literatura. Seguiremos para a caracterização do fígado no período neonatal, a fase de transição entre o feto e adulto e ainda pouco caracterizada.

Chegaremos, então, no nosso interesse específico de estudo no fígado: os linfócitos B, com enfoque no seu processo de estabelecimento no órgão durante a fase neonatal. Finalizaremos, assim, com uma caracterização dessas células e o que se sabe sobre sua participação no fígado.

1.1 O fígado no período adulto

Para entender como o fígado funciona e se organiza, começaremos pela descrição clássica do órgão já formado em um indivíduo adulto, o que irá facilitar a compreensão dos eventos para a formação do fígado no período fetal e as modificações no órgão durante a fase neonatal.

1.1.1 Estabelecimento da estrutura hepática no fígado adulto

O fígado é um órgão que se localiza na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma (Figura 1A), e que recebe aporte sanguíneo de duas fontes (VOLLMAR; MENGER, 2009). Cerca de 70-80% do aporte de sangue ao órgão vem da veia porta que drena o intestino, estômago, pâncreas e baço trazendo um sangue com baixa concentração de oxigênio, mas rico em antígenos alimentares e da microbiota comensal (Figura 1B) (VOLLMAR; MENGER, 2009). O restante do sangue é fornecido ao fígado pela artéria hepática que vem do tronco celíaco da aorta abdominal trazendo sangue rico em oxigênio (Figura 1B) (VOLLMAR; MENGER, 2009). Após adentrarem o fígado, veia porta e artéria hepática se anastomosam e ramificam em vasos cada vez mais finos até formarem os capilares sinusoides (Figura 1B). No fígado, portanto, os sangues venoso e arterial se misturam, percorrem os capilares sinusoides e desembocam nas veias centrais que se unem formando a veia hepática que sai do órgão (Figura 1B) (VOLLMAR; MENGER, 2009). Percebe-se, assim, que o fígado se

interpõe entre a circulação portal e sistêmica, característica que será importante para o desempenho de várias de suas funções.

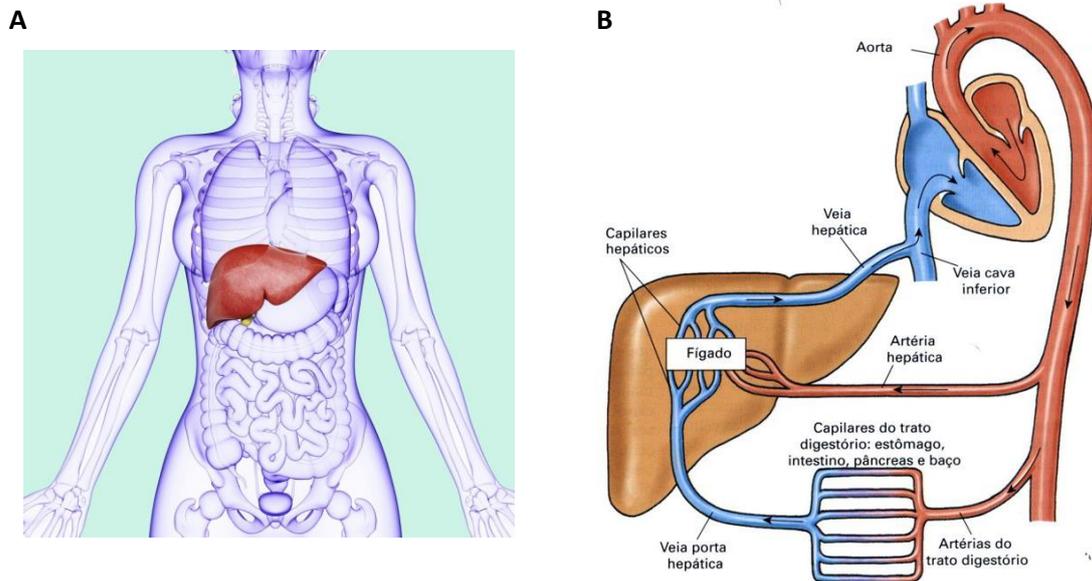


Figura 1: Localização anatômica do fígado e aporte sanguíneo ao órgão. A. O fígado está localizado na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma. **B.** O sangue chega ao fígado pela artéria hepática e veia porta que se unem, ramificam em capilares sinusoides e estes desembocam na veia hepática que sai do fígado. *Fonte: Silverthorn, D. Fisiologia humana: uma abordagem integrada, 2003*

Em torno dos capilares sinusoides se encontram cordões de hepatócitos (Figura 2). O hepatócito é a célula hepática mais abundante, constituindo 80% da massa do fígado e formando o parênquima do órgão (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). Os cordões de hepatócitos entremeados pelos sinusoides se organizam radialmente em torno de uma veia central formando o lóbulo hepático, a unidade organizacional funcional do fígado que se repete ao longo de todo o órgão formando sua estrutura (Figura 2) (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). Os lóbulos são circundados por tríades portais formadas por um ramo da veia porta, artéria hepática e ducto biliar (Figura 2). O sangue flui, portanto, a partir da tríade portal pelos sinusoides até desembocar na veia central. Células endoteliais, denominadas LSEC (*liver sinusoidal endothelial cells*) revestem esses capilares sinusoides (Figura 3) (WISSE *et al.*, 1996) e colangiócitos são as células que vão delimitar e estrutura do ducto biliar (Figura 3) (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015).

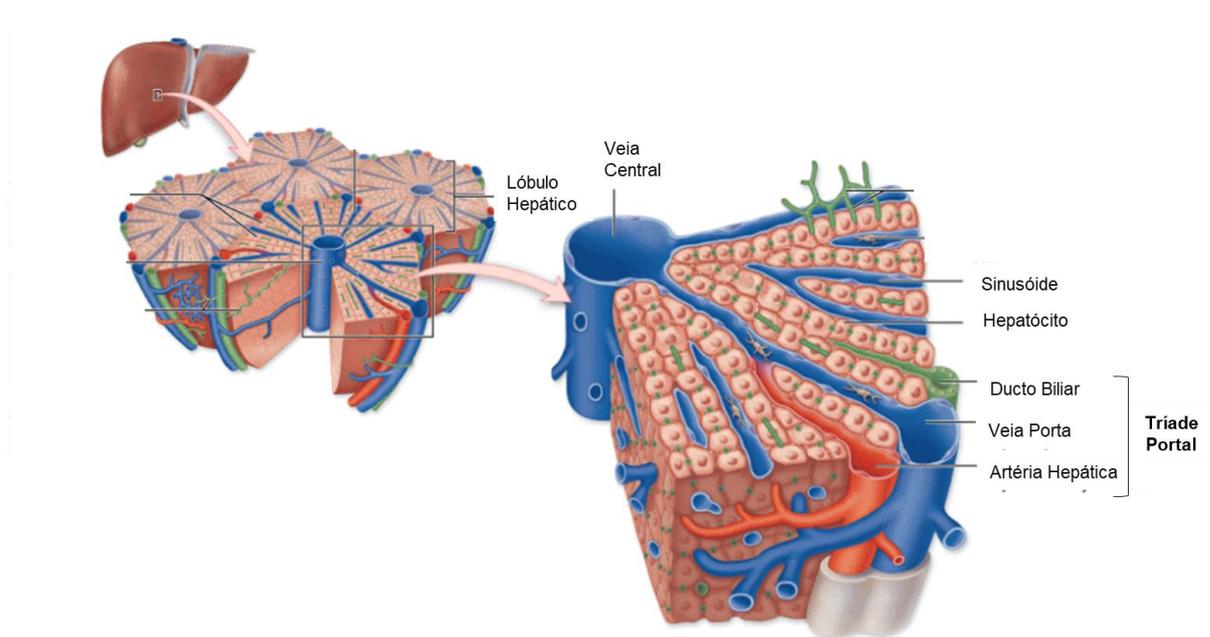


Figura 2: Organização estrutural do fígado. Cordões de hepatócitos entremeados por sinusóides se organizam em torno da veia central e formam a estrutura do lóbulo hepático. Em torno dos lóbulos se encontra a tríade portal: um ramo da veia porta, artéria hepática e ducto biliar. A estrutura de lóbulos hepáticos se repete no fígado formando o órgão. *Fonte: adaptado de Mescher, A.L., Junqueira's Basic Pathology, 2010*

Além das populações celulares de hepatócitos, colangiócitos e células endoteliais (Figura 3), o fígado também apresenta uma importante população de células imunes formada por células mielóides como células dendríticas e macrófagos (denominados células de Kupffer) e células linfóides como linfócitos NK, NKT, T e B (Figura 3) (JENNE; KUBES, 2013a). Algumas dessas populações, como as células de Kupffer, são muito bem descritas. Entretanto, ainda é necessário caracterizar todo o espectro de populações imunes residentes no fígado com mais estudos que permitam definir essas populações e entender sua localização e funções no órgão.

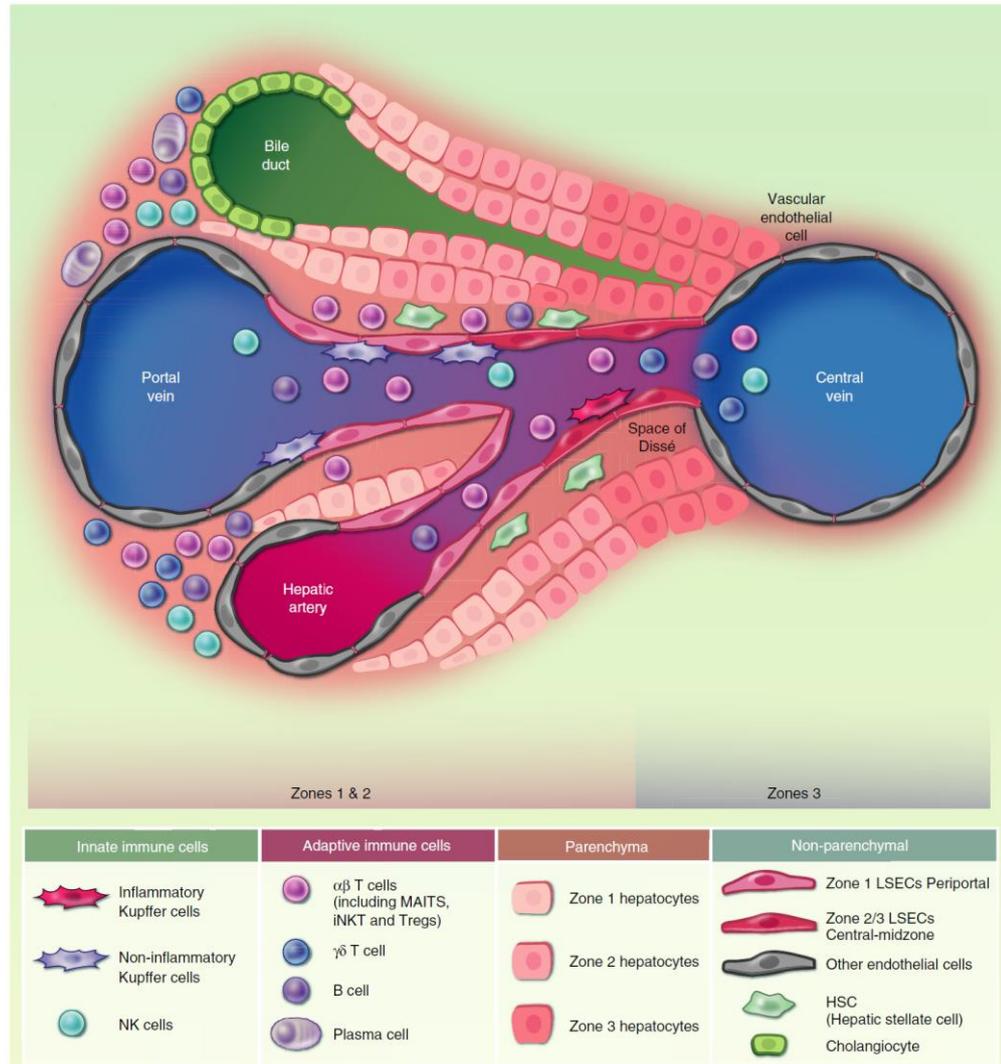


Figura 3: Populações celulares presentes no fígado. O parênquima do fígado é formado pelos hepatócitos. Além dessas células, também se encontra no órgão células endoteliais, colangiócitos e células hepática esteladas. O fígado também apresenta uma população de células imunes composta por células mielóides e linfóides. *Fonte: Zania Stamataki e Leo Swadling, Immunology, 2020*

O fígado, então, irá participar em um conjunto de funções no organismo que envolvem tanto funções metabólicas como imunes.

1.1.2 Funções do fígado no período adulto

Classicamente o fígado é associado às suas funções metabólicas desempenhadas pelos hepatócitos, sendo responsável pelo metabolismo e estoque de nutrientes, produção de bile, produção de ureia e biotransformação e eliminação de substâncias tóxicas (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). Também produz proteínas plasmáticas como fatores de coagulação, lipoproteínas e albumina (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015).

Entretanto, o fígado adulto também é um importante órgão imunológico produzindo proteínas de fase aguda, proteínas do complemento, citocinas e quimiocinas (MOSHAGE, 1997; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Além disso, o fígado recebe constantemente antígenos com potencial imunogênico, provenientes de microrganismos do trato gastrointestinal e da dieta, que chegam pelo sistema porta. Sua localização anatômica, população de células imunes residentes e a estrutura tecidual que resulta em uma baixa pressão do fluxo sanguíneo no órgão, favorecem a remoção e degradação dessas moléculas imunogênicas antes que alcancem a circulação sistêmica protegendo, assim, os outros órgãos de uma inflamação excessiva (JENNE; KUBES, 2013b). O fígado deve, portanto, balancear constantemente as funções de tolerância e imunovigilância de forma a tolerar esse aporte contínuo de antígenos, mas ao mesmo tempo manter a capacidade de resposta a patógenos ou células tumorais. As funções metabólicas e imunológicas do fígado estão esquematizadas na figura 4 abaixo:

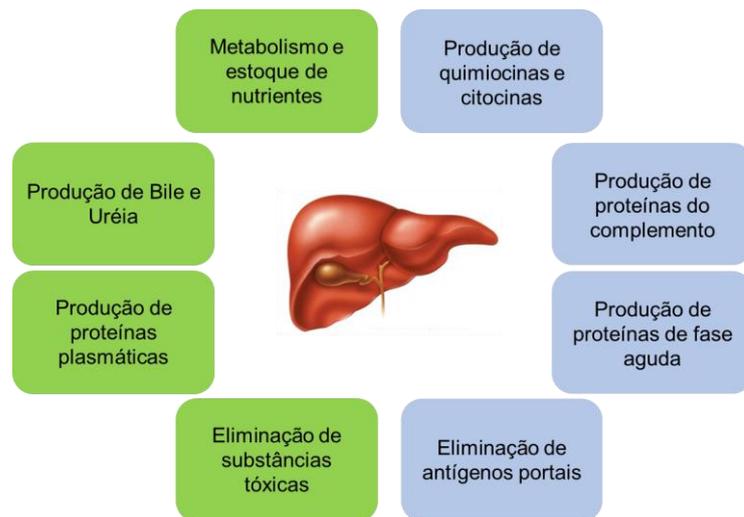


Figura 4: Funções do fígado adulto. O fígado adulto desempenha um conjunto de funções metabólicas (em verde) e imunológicas (em azul). *Fonte: produção própria*

Percebe-se, portanto, que a interposição do fígado entre a circulação portal e sistêmica favorece tanto suas funções metabólicas como imunológicas pois permite o processamento de antígenos e nutrientes antes que cheguem em outros órgãos. Entretanto, antes de sua completa formação no indivíduo adulto, o fígado apresenta outra estrutura organizacional e desempenha outras funções no organismo antes do nascimento.

1.2.0 fígado no período fetal

1.2.1 Formação embrionária do fígado

É importante ressaltar que, ao longo do texto, os períodos de desenvolvimento embrionário serão sempre representados como “dias embrionário” (E) quando referindo-se a camundongos, e como “semanas pós-concepção” (SPC) quando referindo-se ao desenvolvimento embrionário humano.

A formação do fígado durante o período embrionário se inicia em E8.5, em camundongos, e em 4 SPC em humanos (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). A primeira etapa da organogênese do órgão é a formação do divertículo hepático pela invasão do mesêquima do septo transversal por células do epitélio ventral do intestino anterior (Figura 5B) (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). A partir de então, ocorrem uma série de etapas que levam à completa formação do fígado e o início de seu funcionamento no embrião.

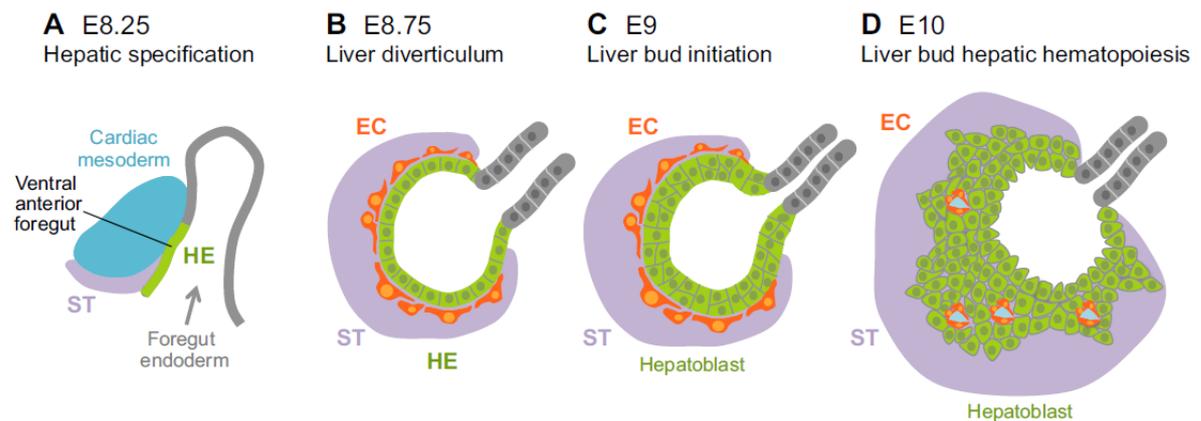


Figura 5: Desenvolvimento embrionário hepático. O endoderma hepático, adjacente ao mesoderma cardíaco e septo transversal (ST), prolifera formando hepatoblastos que invadem o ST formando o divertículo hepático. ST: septo transversal; EC: células endoteliais; HE: endoderma hepático. *Fonte: adaptado de Gordillo, 2015*

A diferente estrutura hepática do fígado fetal em relação ao adulto também é acompanhada por uma diferente função desse órgão nessa fase do desenvolvimento.

1.2.2 Funções do fígado no período fetal: hematopoiese

A principal função do fígado durante o período fetal é a hematopoiese, e este órgão se estabelece como o principal sítio hematopoiético do feto (EMA; NAKAUCHI, 2000). A hematopoiese é o processo de formação das células sanguíneas de

linhagem eritróide, mieloide e linfóide a partir de células tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cells*) (Figura 6) (MIKKOLA; ORKIN, 2006).

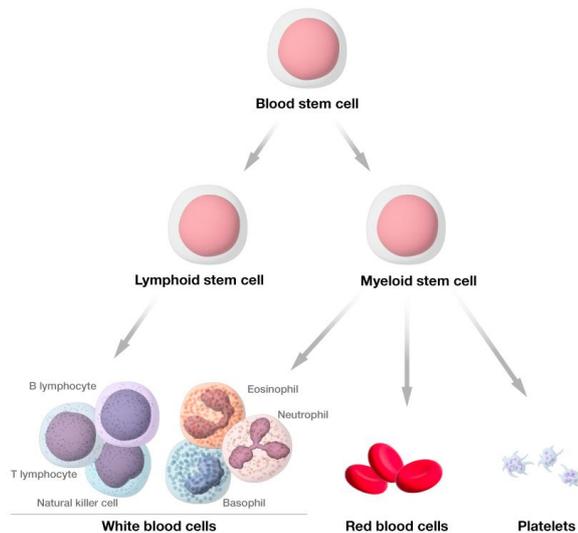


Figura 6: Processo hematopoiético. Formação de células linfóides, mieloídes, eritrócitos e plaquetas a partir de células tronco hematopoiéticas. *Fonte: NIH, National human genome research institute website*

HSC são células multipotentes, que possuem a capacidade de se diferenciarem em qualquer linhagem de células sanguíneas formando, assim, eritrócitos ou leucócitos maduros (SIMINOVITCH; MCCULLOCH; TILL, 1963). Essa capacidade de diferenciação é demonstrada em experimentos de transferência de HSC para animais irradiados, no qual as HSC podem repovoar o animal, reconstituindo todas as linhagens de células hematopoiéticas (CUMANO *et al.*, 2001; MORRISON *et al.*, 1995).

A formação das HSC no período fetal se dá em 3 ondas que se originam em diferentes locais e em diferentes momentos. A primeira onda de produção de HSC ocorre no dia E7.5 (2-3 SPC) (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020) em um local extra-embriônico, o saco vitelínico (Figura 7) (GODIN; CUMANO, 2002). A segunda onda ocorre 24h após, no dia E8.5 (4-5 SPC), e tem origem no plexo vascular do saco vitelínico (Figura 7) (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). A terceira onda de formação de HSC ocorre nos dias E9.5-11 (4 SPC) em uma região intraembriônica, a AGM (aorta-gônadas-mesonefro) (Figura 7) (MEDVINSKY; DZIERZAK, 1996). A placenta também é um local de produção de HSC, entre os dias E10.5-11 (6 SPC) (Figura 7) (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; GEKAS *et al.*, 2005). Após a formação do sistema

circulatório, as HSC com origem nesses locais iniciam um processo de migração e se estabelecem no fígado.

O fígado fetal, portanto, não produz HSC, sendo colonizado a partir do dia E10.5 pelas HSC formadas em outros locais como o saco vitelínico, AGM e placenta (Figura 7) (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). Após seu estabelecimento no fígado fetal, as HSC passam por dois processos: proliferação, para expansão do número de células (EMA; NAKAUCHI, 2000) e diferenciação nas linhagens celulares eritróide, mieloide e linfóide (LANDRETH, 2002). Assim, partir do dia E12.5 até o dia E16.5 (6-8 SPC), o fígado se estabelece como o principal sítio hematopoiético do feto (EMA; NAKAUCHI, 2000) e sua função nesse período é essencialmente hematopoiética (LEE *et al.*, 2012), apresentando uma arquitetura menos complexa que o órgão adulto (CRAWFORD; FOLEY; ELMORE, 2010).

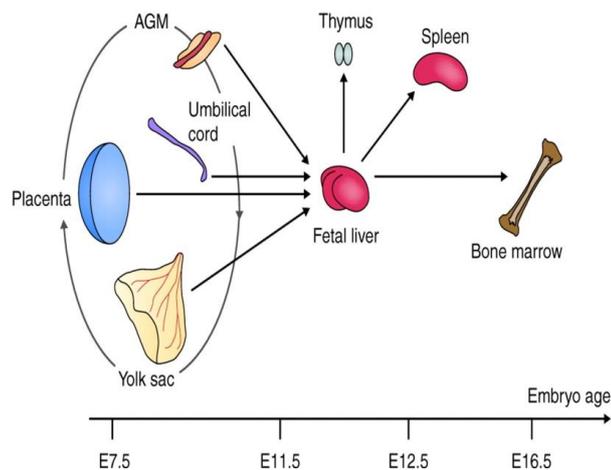


Figura 7: Estabelecimento da hematopoiese no período fetal. As HSC são formadas no saco vitelínico (yolk sac), AGM e placenta e colonizam o fígado, que se estabelece como o órgão hematopoiético do período fetal. Ao final da gestação, as HSC migram para a medula óssea que, então, se estabelece como o sítio hematopoiético do indivíduo. *Fonte: Medvinsky et al., 2011*

A atração, manutenção, proliferação e diferenciação das HSC e precursores hematopoiéticos no fígado fetal é possível devido ao microambiente hepático que dá suporte a esses processos. As células que fazem parte do estroma hepático no período fetal, constituindo o microambiente para as células hematopoiéticas, são: hepatoblastos (células bipotenciais que podem se diferenciar em hepatócitos – que vão formar o parênquima do fígado – ou colangiócitos – células do epitélio biliar), células endoteliais (LYVE1+), células mesoteliais (ALCAM+) e hepatic stellate cells

(células perisinusoidais que se encontram no espaço de disse) (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020).

Essas células do estroma hepático produzem citocinas e quimiocinas que atuam nos precursores hematopoiéticos. A quimiocina CXCL12 (que interage com o receptor CXCR4) atrai e retém as HSC no fígado fetal (CHOU; LODISH, 2010). As moléculas que atuam na sobrevivência, proliferação e diferenciação de progenitores são SCF, IL-7 e FLT3L (atuam em progenitores da linhagem B), EPO (atuam em progenitores eritroides) e TPO (atuam em progenitores que formam megacariócitos) (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). Dentre outros fatores também produzidos no fígado fetal encontram-se: KITL, IL6, IL11, TGFB, GM-CSF, CSF1, HGF, IGF1, IGF2, LIF (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020).

Essas moléculas podem ser secretadas e atuarem nos precursores à distância ou podem ser expressas na superfície das células estromais, sendo necessário um contato das células do estroma hepático com as células precursoras hematopoiéticas (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). Integrinas, selectinas e caderinas expressas pelas HSC permitem uma interação célula-célula entre as HSC e as células estromais como, por exemplo, entre VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) presente nas HSC que se liga à VCAM-1 de hepatoblastos (SUGIYAMA; KOIKE; SHIOJIRI, 2010). Também pode ocorrer uma interação das células HSC com a matriz extracelular. VLA-4($\alpha 4\beta 1$) e VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$) presentes nas HSC, por exemplo, se ligam a fibronectina da matriz extracelular e VLA-2 ($\alpha 2\beta 1$) se liga a colágeno IV da matriz extracelular (EMAMBOKUS; FRAMPTON, 2003). Essas interações permitem a manutenção das células precursoras no fígado e sua aproximação com células que produzem fatores necessários à sua sobrevivência e diferenciação.

Ao final do período gestacional, há uma queda na atividade de hematopoiese do fígado e essa função será assumida pela medula óssea. As células-tronco hematopoiéticas iniciam sua migração do fígado fetal para a medula óssea em E16.5 (10-20 SPC), juntamente com o surgimento da vascularização na medula óssea que permite a chegada das HSC a esse local (Figura 7) (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). A hematopoiese se estabelece, então, de forma definitiva na medula óssea e esse será o local de produção de células hematopoiéticas no indivíduo após o nascimento (EMA; NAKAUCHI, 2000; MORRISON *et al.*, 1995) (GUO *et al.*, 2009). Após a colonização da medula óssea, as HSC mantêm sua capacidade de proliferação por cerca de 3 semanas após o nascimento e, então, se tornam células quiescentes, ou

seja, que proliferam apenas raramente para auto renovação e manutenção do pool de HSC (MIKKOLA; ORKIN, 2006).

Não está claro em qual ordem ocorrem os eventos que envolvem o desenvolvimento do parênquima hepático e o fim da hematopoiese no fígado fetal. Por um lado, hipotetiza-se que a diferenciação dos hepatoblastos em hepatócitos e colangiócitos (GRUPPUSO; SANDERS, 2016) juntamente com o remodelamento da vasculatura e aporte de sangue no fígado (KHAN *et al.*, 2016) mudariam o microambiente hepático fazendo com que o fígado não suporte mais a função de hematopoiese, o que promove a migração de HSC para a medula. Por outro lado, o primeiro evento a ocorrer pode ser a migração das células HSC para a medula, o que irá permitir a diferenciação dos hepatoblastos, abrindo um nicho para que essa população possa se expandir (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020).

As células HSC são atraídas para a medula pela quimiocina CXCL12 produzida pelas células endoteliais vasculares desse órgão (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020), da mesma forma que CXCL12 também atrai HSC para o fígado fetal. Entretanto ainda não está claro qual sinal promove a saída da hematopoiese do fígado e seu estabelecimento na medula e porque ocorre essa troca de sítio hematopoiético no indivíduo.

Ao final do período gestacional o fígado, então, cessa sua atividade hematopoiética e continua o seu processo de desenvolvimento até estabelecer sua organização estrutural e funções que conhecemos para os indivíduos adultos, já citados anteriormente. As características do fígado fetal e adulto são, portanto, muito diferentes e o fígado deve passar por um período de transição para readaptar sua estrutura e funcionamento entre essas duas fases da vida (Figura 8). A transição de órgão hematopoiético no feto para órgão imuno-metabólico no adulto exige um período de mudanças durante a fase neonatal.



Figura 8: Transição do fígado nos períodos fetal, neonatal e adulto. A transição do fígado entre os períodos fetal e adulto exige uma fase de adaptação da estrutura e funcionamento do órgão após o nascimento, no período neonatal. *Fonte: produção própria*

1.3 Alterações hepáticas na transição fetal-adulto: o período neonatal

Entre as fases fetal e adulta existe um período de transição, o período neonatal, onde o indivíduo deve ser capaz de lidar com os novos desafios aos quais é exposto. É durante esse período pós-nascimento que ocorre o primeiro contato com bactérias derivadas da colonização do trato gastrointestinal, antígenos alimentares e compostos xenobióticos. O indivíduo, portanto, deve ser capaz de tolerar os novos antígenos ao mesmo tempo em que também deve desenvolver uma resposta inflamatória a infecções (KOCH *et al.*, 2016). Se essas respostas de tolerância não se desenvolverem de forma correta vão resultar em uma inapropriada resposta inflamatória intestinal a proteínas alimentares ou microrganismos comensais levando ao desenvolvimento de alergias ou patologias como doença de Crohn e colite ulcerativa. Por outro lado, um desenvolvimento inadequado de inflamação resulta em uma inadequada resposta a patógenos e consequente susceptibilidade a doenças (KOCH *et al.*, 2016). Fatores fornecidos pelo leite materno vão, então, ajudar a estabelecer essas respostas nos neonatos.

O leite materno, além de ser uma fonte de nutrição por conter proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas, também possui várias substâncias bioativas como: hormônios, enzimas, fatores de crescimento, citocinas, componentes do complemento, agentes anti-inflamatórios e anti-microbianos, microbiota, leucócitos e imunoglobulinas (AYDIN *et al.*, 2018). Dentre os fatores fornecidos pelo leite materno estão, portanto, as imunoglobulinas, e todos isotipos são encontrados no leite, embora em diferentes proporções. Em humanos, o anticorpo predominante no leite é IgA enquanto em camundongos predomina IgG (ZHENG *et al.*, 2020). As imunoglobulinas fornecidas pelo leite materno vão atuar em diferentes processos nos neonatos atuando tanto de forma a promover o desenvolvimento do sistema imune como fornecendo uma proteção direta enquanto o próprio sistema imune neonatal não é capaz de suprir.

Imunoglobulinas fornecem ao neonato proteção contra patógenos, tanto no trato gastrointestinal como sistêmica. Sabe-se que IgG estimulados na mãe por imunização são transmitidos para os filhotes conferindo uma proteção passiva à infecção (MADOFF *et al.*, 1992; ZAMAN *et al.*, 2008). Mas a transferência de IgG

naturais, formadas em resposta a bactérias comensais maternas, também conferem ao neonato proteção à infecção intestinal e sistêmica, provavelmente por reação cruzada do anticorpo para antígenos das bactérias comensais e patógenos (ZHENG *et al.*, 2020).

As imunoglobulinas transmitidas pelo leite materno também limitam a resposta da mucosa aos novos antígenos microbianos. IgG, por exemplo, contra antígenos comensais maternos são transmitidos para o neonato pelo leite e limitam a ativação de células T foliculares e células B, provavelmente por reter esses antígenos no lúmen intestinal (KOCH *et al.*, 2016). O IgA, por outro lado, modula a composição da microbiota intestinal e ajuda a estabelecer a barreira intestinal ao se ligar a comensais limitando, assim, sua interação com o epitélio intestinal e prevenindo a translocação dessas bactérias para o organismo, o que é fundamental para prevenir que o sistema imune neonatal seja sensibilizado pelas bactérias comensais (ROGIER *et al.*, 2014). Os anticorpos, assim, atuam sem iniciar no neonato uma reação inflamatória potencialmente danosa e agressiva neste momento de desenvolvimento e são fundamentais para ajudar a estabelecer uma relação de simbiose entre o hospedeiro e sua microbiota comensal intestinal.

Assim, após o nascimento, o sistema imune de neonatos deve estabelecer uma resposta adequada aos novos desafios, como a colonização do intestino, garantindo o desenvolvimento correto da resposta imune ao mesmo tempo em que permite a sobrevivência do indivíduo frente às novas condições extrauterinas. O cenário do organismo neonatal, entretanto, é de um sistema imune ainda em desenvolvimento e relativamente “imaturo” e com mecanismos de homeostase intestinal ainda não completamente estabelecidos.

1.3.1 O sistema imune em neonatos

Ao nascimento, o sistema imune do indivíduo ainda não está completamente estabelecido da forma como se caracteriza nos adultos. Observa-se, por exemplo, que neonatos são mais susceptíveis a infecções apresentando maior taxa de mortalidade em infecções por HIV (GOULDER *et al.*, 2001), *E. coli* (RANGEL *et al.*, 2005) e *Plasmodium falsiparum* (SHAH; PADBURY, 2014). Assim, o sistema imune de neonatos apresenta particularidades que ocorrem tanto por fatores quantitativos como qualitativos.

Em termos quantitativos, a resposta imune limitada do período neonatal pode ser explicada pela presença de um menor número de células, como células T CD4 e

células dendríticas (SUN *et al.*, 2003). Por outro lado, diferenças qualitativas, como a presença de diferentes proporções de subtipos celulares, também explicam as diferenças imunológicas do período neonatal. Observa-se, por exemplo, alterações na função de apresentação de antígeno de células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, que são menos eficientes em transportar antígenos para linfonodos e tem menor expressão de moléculas co-estimulatórias e MHCII, resultando em uma menor capacidade de ativar células T (MUTHUKKUMAR; GOLDSTEIN; STEIN, 2000). Também se observam diferenças nas células T CD4, que apresentam maior propensão para resposta Th2 em neonatos (ADKINS, 2000). Como células T CD4 influenciam a resposta de outros tipos celulares, alterações nessa população refletem em uma resposta variada também em outras células. Células T CD8, por exemplo, tem função citotóxica reduzida (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE, 2004).

O período neonatal é um momento imunologicamente muito importante no qual o indivíduo tem contato com novos antígenos. Assim, é essencial manter uma resposta imune reduzida nessa fase para tolerar esses antígenos que não são patológicos e estarão presentes ao longo de toda vida. Além disso, uma resposta a esses antígenos levaria a um estado de inflamação crônica, prejudicial neste momento pelo potencial de gerar danos em tecidos ainda em processo de formação, como o próprio fígado. Portanto, é vantajoso para neonatos manterem a resposta inflamatória controlada na maioria das circunstâncias. Entretanto, neonatos também são capazes de montar uma resposta imune madura a níveis dos adultos sob determinados estímulos e condições, ainda retendo a capacidade de responder caso encontre um agente infeccioso. Mudou-se, assim, a concepção do sistema imune de neonatos, antes considerado imaturo, para um sistema com flexibilidade de resposta, variando de um espectro de não responsividade para uma resposta madura completa a nível dos adultos (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE, 2004).

Além do sistema imune neonatal em geral, as particularidades desse período também se refletem na organização do fígado e no desenvolvimento da imunologia nesse órgão em específico.

1.3.2 Modificações e adaptações hepáticas no período neonatal

No período neonatal o fígado também deve se adaptar aos novos desafios da vida extrauterina, alterando tanto suas funções imunes quanto as metabólicas. Com o nascimento ocorre uma grande mudança no fluxo de sangue pelo fígado: a veia

umbilical, antes responsável pelo maior aporte de sangue ao órgão, agora se atrofia e a veia porta passa a fornecer a maior parte de sangue (DIEHL-JONES; FRASER ASKIN, 2002). Novos antígenos da microbiota gastrointestinal e antígenos da alimentação vão ser, portanto, carregados para o fígado pela veia porta tendo um efeito direto sobre esse órgão. Esse efeito é ainda mais acentuado nesta fase da vida devido a uma maior permeabilidade intestinal em neonatos que aumenta a carga de moléculas que chegam ao fígado pela veia porta (WESTRÖM *et al.*, 2020). Além disso, o órgão deve remodelar sua estrutura e funcionamento para permitir a transição entre os períodos fetal e adulto em que desempenha papéis tão diferentes (GUNEWARDENA *et al.*, 2015).

A forma como esse processo de adaptação neonatal ocorre no fígado, entretanto, ainda não é bem explorado pela literatura. Assim, com interesse em preencher essa lacuna no conhecimento, começamos a investigar as alterações imunes e metabólicas do fígado neonatal em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (NAKAGAKI *et al.*, 2018). Nesse trabalho, demonstramos que o tecido hepático passa por um extensivo remodelamento de sua estrutura, função metabólica e imune entre a fase neonatal e adulta.

As primeiras diferenças podem ser observadas na organização morfológica do órgão. Em neonatos os hepatócitos são menores e não organizados em cordões e, com o desenvolvimento, aumentam de tamanho e adquirem a estrutura típica de cordões de hepatócitos entremeados por sinusoides do adulto (Figura 9A). A organização vascular também se altera, com sinusoides de morfologia arredondada nos neonatos tornando-se mais alongados nos adultos (Figura 9B). A maturação morfológica do órgão se completa apenas com 4 semanas em camundongos (ALEXANDER; GUZAIL; FOSTER, 1997; NAKAGAKI *et al.*, 2018) e 5 anos em humanos (GROSSI; VELARDI; COOPER, 1985), quando o órgão adquire uma arquitetura já semelhante ao que se observa no adulto (Figura 9). As particularidades do período neonatal hepático também se estendem para as funções metabólicas do fígado, que se encontram reduzidas em neonatos.

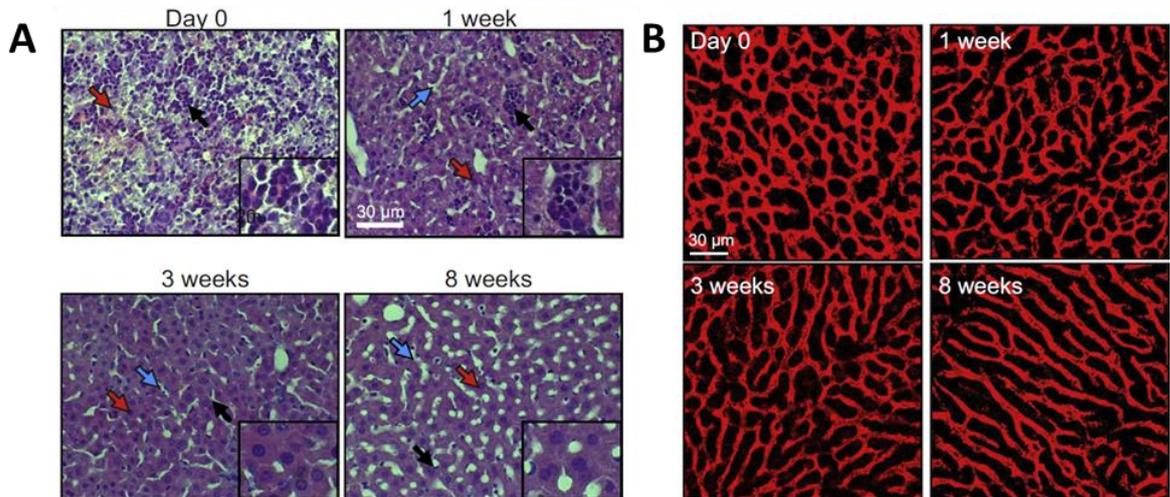


Figura 9: Organização morfológica do fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal. A. Histologia (HE) indicando hepatócitos (setas vermelhas), células imunes (setas pretas) e a vasculatura (setas azuis). Em neonatos os hepatócitos são menores e não organizados em cordões. Também é evidente nesta idade a presença de aglomerados de células imunes. **B.** Microscopia confocal evidenciando a vasculatura hepática (sinusoides vermelho, anti-CD31). A organização vascular também se altera com o desenvolvimento. *Fonte: adaptado de Nakagaki e Mafra et al., 2018.*

As diferenças morfológicas e metabólicas também são acompanhadas por alterações imunes. Neonatos ainda apresentam alta retenção de colônias de células imunes no parênquima hepático (Figura 10A) (GROSSI; VELARDI; COOPER, 1985). As funções imunes também se encontram alteradas, com células de Kupffer neonatais apresentando menor capacidade de captura e eliminação de *E. coli*, evidenciando a menor eficácia de neonatos em lidar com infecções. Por fim, a composição das células imunes também passa por transição: o número de células precursoras e imaturas reduzem com o desenvolvimento e o predomínio de células mielóides no período neonatal é substituído por um predomínio de células linfóides na vida adulta (Figura 10B), entre as quais se encontram os linfócitos B (Figura 10C) (NAKAGAKI *et al.*, 2018).

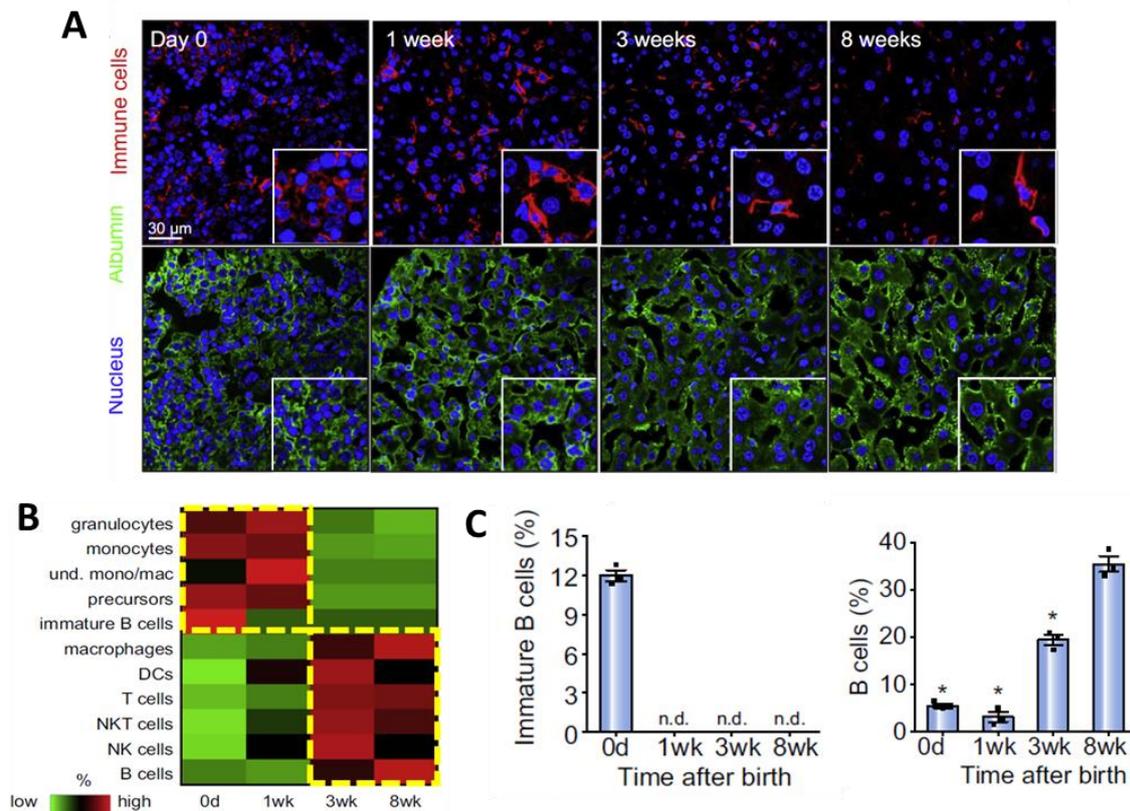


Figura 10: Alterações imunes no fígado pós-natal. **A.** Imunofluorescência evidenciando células imunes (vermelho, coquetel de anticorpos), hepatócitos (verde, albumina) e núcleos celulares (azul, DAPI). Observa-se uma retenção de colônias de células imunes no fígado neonatal. **B.** Alteração do perfil de células imunes no fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal, com predomínio de células mieloides nos neonatos e células linfoides nos adultos. **C.** Alteração na porcentagem da população de células B hepáticas ao longo do desenvolvimento pós-natal do fígado. *Fonte: adaptado de Nakagaki e Mafra et al., 2018.*

1.4 Linfócitos B

Nós observamos em nosso estudo prévio uma grande alteração da população de linfócitos B no fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal: as células B estão em menor número no fígado de neonatos e se tornam a população imune mais abundante no fígado adulto formando 40% das células imunes hepáticas (NAKAGAKI *et al.*, 2018). Os linfócitos B desempenham vários papéis como: produção de anticorpos, apresentação de antígenos, formação de memória imunológica, produção de citocinas anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias e atuação em mecanismos de tolerância (SELVARAJ *et al.*, 2016). A população de células B se divide em duas linhagens, a linhagem B1, formada pelas células B1a e B1b, e a linhagem B2, formada pelas células foliculares (FO) e de zona marginal (MZ).

Os linfócitos B são células que reconhecem antígenos de forma específica por meio das imunoglobulinas. As imunoglobulinas das células B são formadas por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas (IgH - *heavy chain*) e duas cadeias leves (IgL - *light chain*) (Figura 11). Essa molécula também possui uma porção variável, que é a região capaz de reconhecer antígenos de forma específica, e uma porção constante, responsável pelas funções efetoras da molécula (Figura 11). Quando as imunoglobulinas estão ancoradas à membrana plasmática elas formam os receptores de células B, ou BCR (do inglês *B cell receptor*). As imunoglobulinas podem também ser secretadas e são, então, denominadas anticorpos. Os anticorpos são, assim, a forma secretada do receptor de membrana das células B. (KWAK; AKKAYA; PIERCE, 2019)

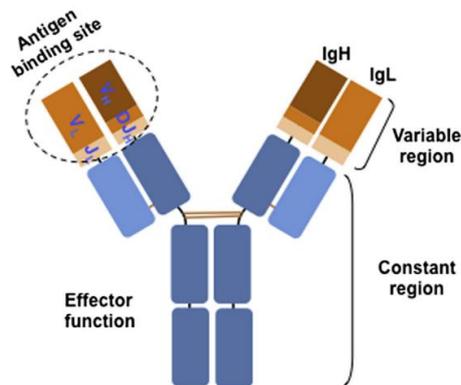


Figura 11: Estrutura de uma imunoglobulina. IgH: cadeia pesada. IgL: cadeia leve. A imunoglobulina ainda pode ser dividida em uma região variável, que reconhece antígenos de forma específica, e uma região constante, responsável pelas funções efetoras da molécula. *Fonte: adaptado de Molecular Biology of B cells, 2014*

A formação das imunoglobulinas ocorre durante o desenvolvimento das células B nos órgãos linfoides primários e o processo mais bem caracterizado, descrito nas próximas sessões, se refere à formação da linhagem B2.

1.4.1 Formação de linfócitos B nos órgãos linfoides primários: fígado fetal e medula óssea adulta

As células B são formadas nos órgãos linfoides primários: medula óssea nos adultos e fígado nos fetos. Esse processo envolve uma série de etapas durante as quais a porção variável do receptor é formada por meio da recombinação de segmentos gênicos V(D)J (Figura 12), o que permite a geração de uma grande variabilidade de receptores (HARDY; HAYAKAWA, 2001; TONEGAWA, 1983). A recombinação é guiada pelas enzimas Rag1 e Rag2, cuja expressão ocorre apenas

durante o desenvolvimento das células B, para a formação do BCR. As fases de desenvolvimento das células B podem ser caracterizadas pela fase do rearranjo dos genes de imunoglobulinas e, também, pela expressão de marcadores de superfície nas células.

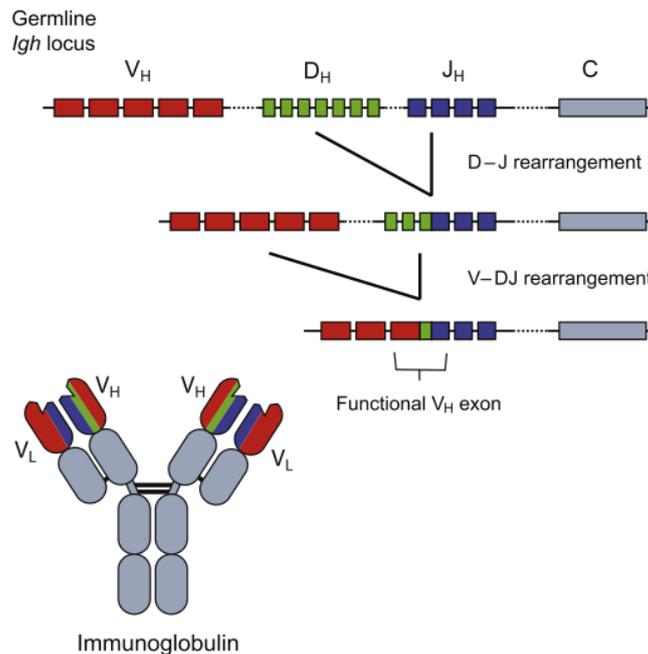


Figura 12: Recombinação de segmentos V(D)J para a formação da porção variável das imunoglobulinas. Fonte: adaptado de *Molecular Biology of B cells*, 2014

A formação dos linfócitos B tem início nas HSC, que se diferenciam em progenitores com potencial cada vez mais restrito: MPP (célula progenitora multipotente) - ELP (progenitor linfoide precoce) - CLP (progenitor linfoide comum). A partir de então as CLP se comprometem de forma definitiva com a linhagem de células B, formando células proB (proB precoce e proB tardia), preB (preB grande e preB pequena) e, por fim, as B imaturas (Figura 13) (JACKSON; LING; ROY, 2021).

Durante a fase de ProB ocorre o rearranjo da cadeia pesada (H), com a ProB precoce rearranjando os segmentos D-J e as ProB tardias rearranjando os segmentos V-DJ. Já durante a fase de PreB, ocorre o rearranjo da cadeia leve (L). Primeiramente, as células PreB grandes expressam o receptor pre-BCR, já com a presença de cadeias pesadas rearranjadas para avaliar se esse rearranjo foi funcional. Caso tenha sido, essas células então se proliferam e formam as PreB pequenas, onde ocorre o rearranjo dos segmentos V-J da cadeia leve. Por fim, é formada então a células B

imatura, já com o rearranjo das cadeias leve e pesadas completo e a expressão do receptor (IgM) na superfície.

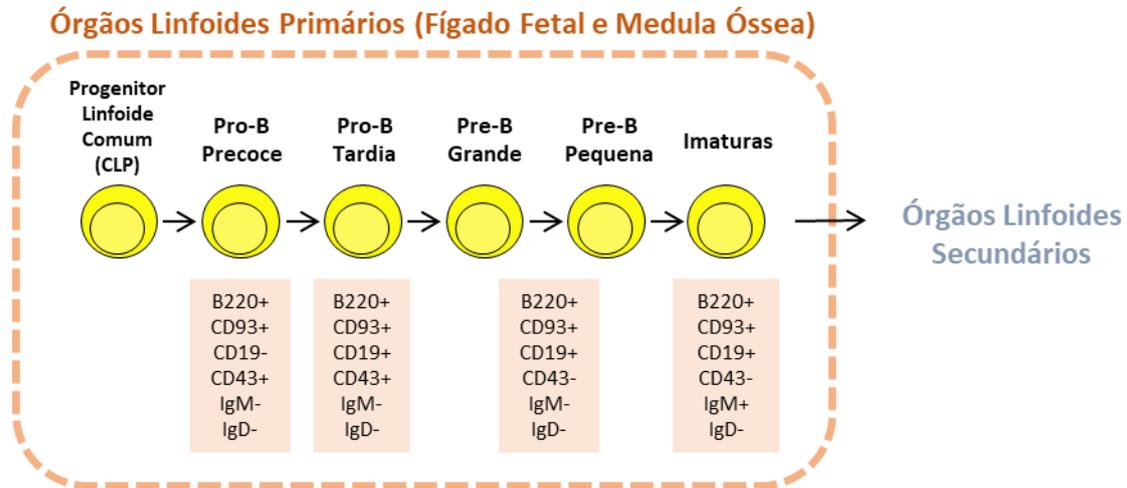


Figura 13: Etapas na formação das células B nos órgãos linfoides primários. As etapas de diferenciação são definidas pela etapa da recombinação gênica e por marcadores expressos na superfície das células. *Fonte: produção própria*

Esse processo de desenvolvimento das células B é guiado por fatores fornecidos pelo microambiente onde essas células se encontram, ou seja, as células do estroma. No caso do microambiente da medula óssea adulta, estão presentes as citocinas FLT3L, IL-7 e SCF que promovem a sobrevivência e diferenciação dos precursores; a quimiocina CXCL12, que retém os precursores na medula óssea, e as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM, que retém os precursores no microambiente e os aproxima dos fatores produzidos pelas células do estroma.

A formação de células B no fígado fetal apresenta algumas particularidades, mas segue, em geral, o que é descrito para a medula óssea adulta. No fígado fetal, as HSC são atraídas para o órgão pelas quimiocinas CXCL10 (se liga ao receptor CXCR3) e CCL19 (se liga ao receptor CCR7) produzidos pelo endotélio vascular do fígado fetal (células LYVE1+) (TSUNETO *et al.*, 2013) (Figura 14). Ocorre então a transmigração das HSC pelo endotélio para o fígado fetal. No fígado fetal, as HSC são atraídas pela quimiocina CXCL12 (se liga ao receptor CXCR4) para perto de células mesenquimais (ALCAM+) (Figura 14) (TSUNETO *et al.*, 2013). Isso permite que as células precursoras se aproximem dos locais de produção de IL-7 e FLT3L, que vão ativar sua diferenciação na linhagem de linfócitos B. TSLP também atua nos precursores do fígado fetal, se ligando ao mesmo receptor que interage com IL7. Assim, o estabelecimento de contato dos precursores com células do estroma

hepático também induz o desenvolvimento da linhagem de linfócitos B seguindo as mesmas etapas descritas para a medula (KAJIKHINA; TSUNETO; MELCHERS, 2016). Os progenitores de células B estão entremeados ao tecido em E12.5 e formam agregados perivasculares em E18.5 (CRAWFORD; FOLEY; ELMORE, 2010). Observa-se diferenças nos segmentos V(D)J utilizados para a formação do BCR durante o período fetal e adulto.

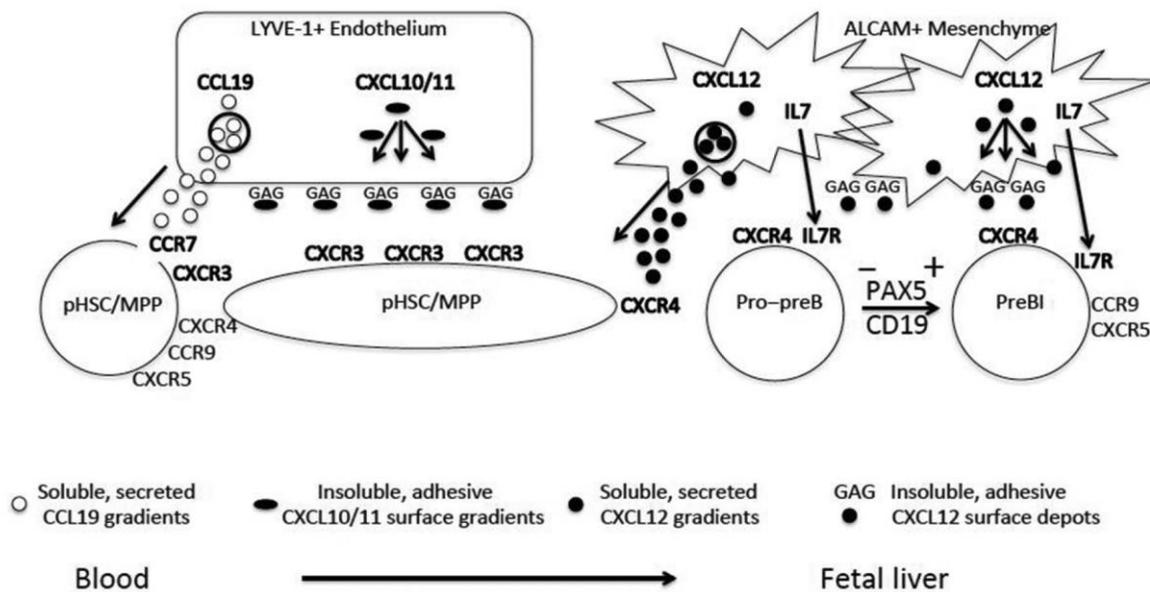


Figura 14: Interação entre estroma hepático fetal e células precursoras. As HSC são atraídas por CXCL10 e CCL19 produzido por células endoteliais LYVE+. Após adentrarem no fígado, as HSC são atraídas por CXCL12 produzido por células mesoteliais ALCAM+. As HSC podem ter, então, contato com fatores produzidos pelas células do estroma hepático que vão guiar sua diferenciação na linhagem de células B. *Fonte: Kajikhina et al., 2016*

Após a formação dos receptores e o estabelecimento de células B imaturas, essas células deixam os órgãos linfoides primários e vão terminar seu processo de maturação nos órgãos linfoides secundários como baço e linfonodos (ROLINK; ANDERSSON; MELCHERS, 2004). A saída de células B da medula óssea é promovida pela interação com S1P presente na circulação sanguínea promovendo, assim, a saída das células B do estroma da medula óssea para os sinusoides.

1.4.2 Estabelecimento das populações de células B nos órgãos linfoides secundários

Células B imaturas chegam aos órgãos linfoides secundários atraídas pelas quimiocinas CCL21/CCL18/CCL19 (que se ligam ao receptor CCR7). A quimiocina CXCL13 (que se ligam ao receptor CXCR5), então, orienta as células B a se

estabelecerem nos folículos primários. Moléculas de adesão como ICAM e VCAM também atuam retendo as células B nesses locais.

Os linfócitos B vão, assim, terminar o seu processo de desenvolvimento e formar as células B maduras (HARDY; HAYAKAWA, 2001). A população de linfócitos B, entretanto, não é homogênea e essas células vão se dividir em diferentes subpopulações caracterizadas por diferenças em seu fenótipo, função efetora, local anatômico que habitam e forma de ativação pelo antígeno dependente de células T (TD) ou independente de células T (TI) (ALLMAN, 2008).

Nesse processo de diferenciação, as células B passam por um estado intermediário de maturação denominado de “transição” (Figura 15) (ALLMAN, 2008). Essas células ainda retêm algumas características imaturas, como a expressão de CD93, e respondem fracamente à ativação por BCR, não se comprometendo na resposta imune (CARSETTI; KÖHLER; LAMERS, 1995). As células de transição passam pelos estágios de T1, T2 e T3 à medida que amadurecem (ALLMAN *et al.*, 2001). Essas células são susceptíveis à tolerância periférica, sendo submetidas ao processo de seleção positiva/negativa, (CARSETTI; KÖHLER; LAMERS, 1995) e o estágio T1 é o mais afetado pela seleção negativa, quando a apoptose guiada pelo BCR elimina a maioria das células B recém-formadas (CARSETTI; KÖHLER; LAMERS, 1995). As células T1 que sobrevivem ao processo se tornam células T2 (CARSETTI; KÖHLER; LAMERS, 1995). As células de transição, então, continuam seu processo de diferenciação formando células B maduras, que podem ser de Zona Marginal (MZ) ou Foliculares (FO).

Células B da Zona Marginal (MZ) recebem esse nome pois estão localizadas na região de zona marginal do baço, entre a polpa branca e vermelha, sendo uma população residente no baço, que não recircula entre os órgãos. Sua localização entre a polpa branca e a polpa vermelha permite que essas células tenham contato direto com o sangue da polpa vermelha podendo, assim, patrulhar antígenos que vem pela circulação (CERUTTI; COLS; PUGA, 2013). Células B MZ tem uma ativação TI, produzindo anticorpos de forma rápida, mas de baixa afinidade (Figura 15) (CERUTTI; COLS; PUGA, 2013).

Já as células B foliculares (FO) estão localizadas nos folículos primários e recirculam entre diferentes órgãos. Quando células foliculares são ativadas pelo antígeno juntamente com células T (ativação TD), elas expandem sua população e formam os folículos linfoides secundários, ou centros germinativos (GC) (PILLAI;

CARIAPPA, 2009). Nos GC as células FO passam por processos sucessivos de proliferação, mutação do BCR e seleção que levam a uma maturação da afinidade das imunoglobulinas pelo antígeno (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2012). Também passam pelo processo de troca de classe que altera a porção constante da cadeia pesada, o que vai implicar em diferentes funções efetoras para as imunoglobulinas produzidas (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2012). A resposta TD de células foliculares, portanto, é mais lenta, mas gera anticorpos de maior afinidade e diferentes isotipos (Figura 15).

Após sua ativação as células B se diferenciam, então, em células efetoras: plasmócitos (que secretam anticorpos) ou células de memória (Figura 15) (SHLOMCHIK; WEISEL, 2012). Ambas células vão colonizar a medula, onde se estabelecem como uma população de células de longa duração (CHU; BEREK, 2013). Os plasmócitos irão, assim, produzir os anticorpos de longa duração, que continuam circulantes no soro, e as células de memória poderão ser rapidamente ativadas em caso de uma segunda exposição ao antígeno (BORTNICK *et al.*, 2012).

As células MZ e FO formam a linhagem das células B2. Mas as células B também podem se diferenciar em células de linhagem B1 (Figura 15). Células B1 predominam nas cavidades peritoneal e pleural estando em baixa proporção nos órgãos linfoides secundários como baço e linfonodos (BAUMGARTH, 2011). Essas células se subdividem em dois tipos dependendo da expressão de CD5. Células B1a (CD5+) produzem anticorpos naturais que são polireativos, do tipo IgM, IgG3 e IgA, com reatividade cruzada para antígenos próprios e ambientais e naturalmente presentes no organismo, sem necessidade de um estímulo externo prévio (MADDUR *et al.*, 2020). Esses anticorpos fornecem uma primeira linha de defesa contra patógenos, atuando rapidamente nas primeiras horas após infecção. Já as células B1b (CD5-) tem uma ativação TI e, assim, função semelhante às MZ (MARTIN; OLIVER; KEARNEY, 2001). Sua produção de anticorpo é induzida pelo antígeno e, assim, confere proteção mais tardia que as células B1a.

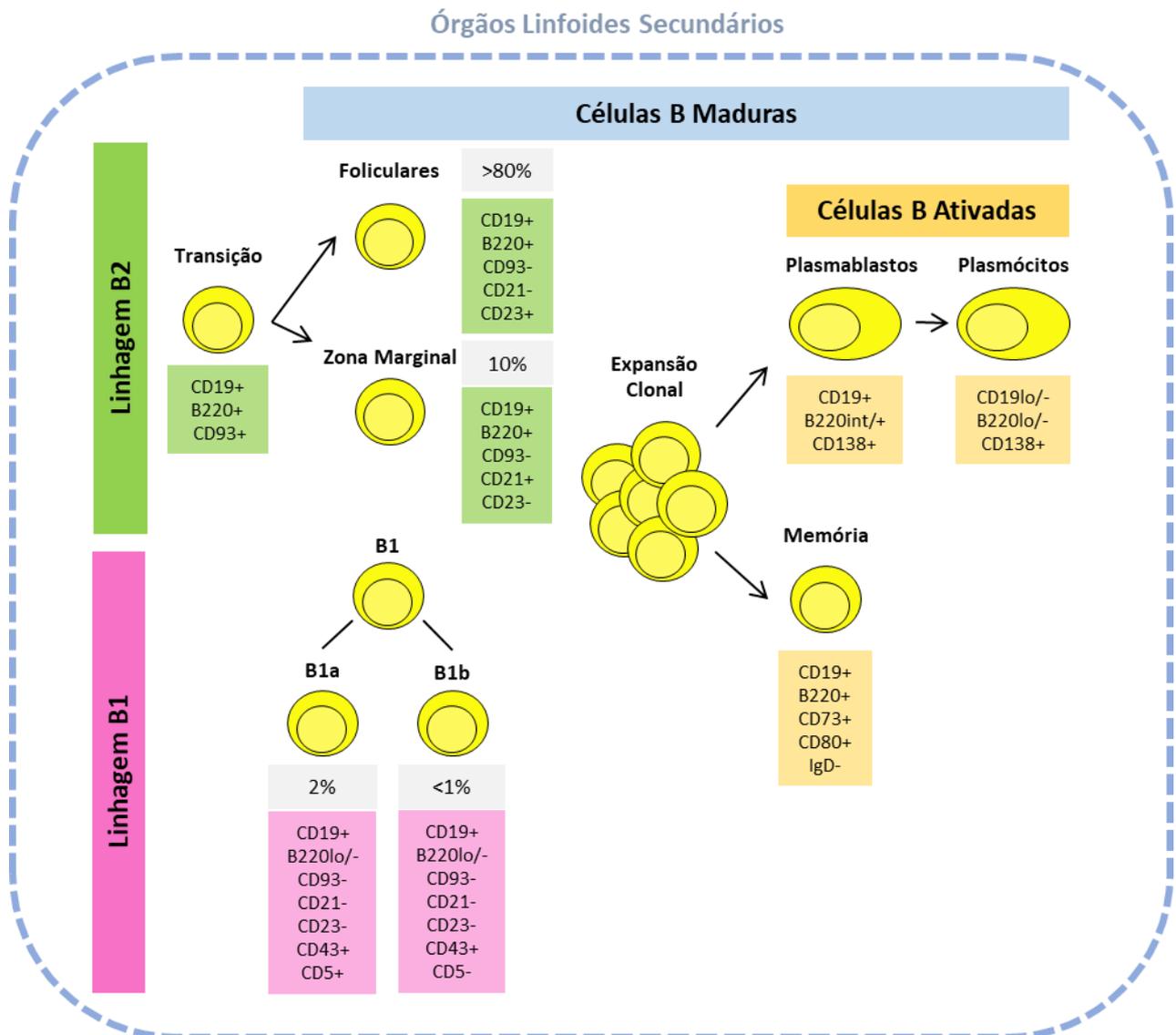


Figura 15: Maturação das células B nos órgãos linfoides secundários. As células B podem se desenvolver em células da linhagem B1 (B1a ou B1b) ou B2 (FO, MZ). Se as células B maduras encontram um antígeno, elas são ativadas, passam por uma expansão clonal e se diferenciam em células efetoras plasmócitos ou células de memória. *Fonte: produção própria*

A origem das células B1 e B2 na ontogenia é questão de debate na literatura e dois modelos foram propostos. O modelo de “ativação” considera que diferenças na sinalização pelo BCR irão distinguir esses dois tipos celulares: células B1 se desenvolvem a partir de sinal BCR forte, enquanto células B2 precisam de sinal do BCR fraco (CASOLA *et al.*, 2004). Por outro lado, o modelo de “duas linhagens” propõe que células B1 e B2 tem origem a partir de progenitores distintos na ontogenia (MONTECINO-RODRIGUEZ; LEATHERS; DORSHKIND, 2006). Os progenitores de B1 estão presentes no período fetal e se caracterizam por células B220^{low/-} CD19⁺ (MONTECINO-RODRIGUEZ; LEATHERS; DORSHKIND, 2006). Já os precursores

das células B2 são classicamente descritos presentes na medula óssea sendo B220⁺ CD19⁻ (HARDY, 1991). Independente da presença de precursores distintos, é certo que células B1 se originam principalmente durante o período fetal e se auto-renovam nos adultos, apresentando uma baixa reposição a partir de precursores presentes na medula óssea. Já as células B2 se renovam ao longo de toda vida pelos precursores da medula (ALLMAN, 2008). O fígado fetal formaria, portanto, principalmente células B de linhagem B1 e a medula formaria principalmente células B2.

Células B, portanto, se diferenciam nos órgãos secundários e são ali mantidas. Se encontrarem o antígeno, se ativam e iniciam uma resposta, proliferando e se diferenciando nas células efetoras. Se não encontrarem o antígeno, as células B morrem e são substituídas por novas, produzidas de forma constante pela medula.

Entretanto, assim como observado para outros componentes do sistema imune, os linfócitos B também apresentam diferenças entre os neonatos e adultos.

1.4.3 Linfócitos B em neonatos versus adultos

Neonatos e adultos apresentam diferenças entre as células B e resposta de anticorpo. A resposta de anticorpo nos neonatos é reduzida pois se atrasa para estabelecer, tem menor duração, alcança picos menores, tem anticorpos de menor afinidade, com heterogeneidade reduzida e diferente distribuição dos isotipos IgG (MARSHALL-CLARKE *et al.*, 2000). Neonatos apresentam, também, dois tipos de células B: células fetais, geradas a partir de precursores fetais do fígado e baço fetais e que permanecem ainda ativas no baço até 4 semanas de idade e células adultas, formadas por progenitores adultos que se encontram na medula após 1 semana (LU *et al.*, 2002).

Células B maduras ainda estão ausentes nos órgãos linfoides secundários até a primeira semana de vida, e as B imaturas são a principal população no baço neonatal, onde também predomina a linhagem B1, com as células MZ surgindo apenas entre 1-2 semanas (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE, 2004; BALOGH *et al.*, 2001). A estrutura de folículos organizados está ausente até 7-10 dias e os GC aparecem após 3 semanas (PIHLGREN *et al.*, 2003). O estabelecimento dessas células na medula óssea também é menos eficiente e possivelmente se dá por diferenças no microambiente da medula de neonatos e adultos (PIHLGREN *et al.*, 2001). Isso pode explicar a curta duração da resposta de anticorpo já que os plasmócitos de longa duração da medula são os responsáveis pela produção dos anticorpos de longa duração. É também descrito que a população de células B1a é

maior no período neonatal, refletindo em uma maior produção de anticorpos naturais nos neonatos em relação aos adultos e uma diminuição de produção com a idade (MADDUR *et al.*, 2020).

1.4.4 Linfócitos B hepáticos

Os linfócitos não estão presentes apenas nos órgãos linfoides especializados e também podem ser encontrados em todos os locais do corpo formando uma população de “linfócitos residentes nos tecidos”.

O fígado, por exemplo, apresenta uma população de linfócitos residentes NK, NKT, MAIT, $T\gamma\delta$, $T\alpha\beta$ CD4 e $T\alpha\beta$ CD8 (ROBINSON; HARMON; O’FARRELLY, 2016). A proporção desses linfócitos no fígado difere de outros órgãos, como por exemplo, por uma maior densidade de células NK, NKT, T CD8 e $T\gamma\delta$ (JENNE; KUBES, 2013a). Há também no fígado um acúmulo de linfócitos T CD8 apoptóticos (ROBINSON; HARMON; O’FARRELLY, 2016).

Também se encontra no fígado os linfócitos B, que formam cerca de 8% dos linfócitos totais no fígado em humanos (ROBINSON; HARMON; O’FARRELLY, 2016) e 40% em camundongos (BLOM *et al.*, 2009). A presença de células B no fígado já foi descrita em experimentos de RNA-seq em humanos (AIZARANI *et al.*, 2019; MACPARLAND *et al.*, 2018). Algumas pesquisas também demonstraram que o fígado abriga plasmablastos de origem das placas de peyer e que secretam IgA (MORO-SIBILOT *et al.*, 2016b) e que as células B hepáticas apresentam atividade fagocítica (NAKASHIMA, Masahiro *et al.*, 2012).

Entretanto, apesar dos linfócitos B serem importantes em vários processos imunes do organismo, ainda são pouco estudados no fígado, principalmente no contexto neonatal. Evidências de trabalho anterior do nosso grupo nos indicam que há uma grande alteração no número de células B hepáticas ao longo do desenvolvimento pós-natal. Entretanto, ainda não sabemos se essa alteração em número é acompanhada por alterações qualitativas nas células B. Nos perguntamos então como, além do número celular, a população de células B hepática se altera no desenvolvimento pós-natal até seu completo estabelecimento no órgão adulto: há uma alteração na localização, perfil de subpopulações e função dessas células entre as fases neonatal e adulta?

Nossa hipótese é que a população de células B hepáticas apresenta diferentes características em neonatos e adultos, em relação à localização, subpopulações presentes e funções das células, e os eventos específicos da fase neonatal vão moldar

as mudanças nos linfócitos B que levam ao seu estabelecimento típico de um órgão adulto. Nosso objetivo, portanto, foi caracterizar os linfócitos B no contexto do fígado neonatal, estudando mais a fundo como ocorre a dinâmica dessa população celular hepática no período pós-natal em relação à sua localização no órgão, perfil de subpopulações e funções que essas células realizam nas diferentes fases do desenvolvimento neonatal.

2. JUSTIFICATIVA

A grande importância dos linfócitos B em diversos processos levou a sua extensa caracterização nos órgãos linfoides secundários clássicos como baço e linfonodos (FENG *et al.*, 2016; TAS *et al.*, 2016). No entanto, ainda há poucos estudos dos linfócitos B no contexto hepático, principalmente durante a transição neonatal do órgão. Temos evidências que as células B se alteram de forma quantitativa entre a fase pós-natal e adulta. Entretanto, é necessário entender quais alterações qualitativas acompanham essa alteração em número na população de células B hepáticas do período pós-natal.

Ao compreender os processos imunes que ocorrem nos linfócitos B durante o desenvolvimento pós-natal hepático podemos ter uma referência do desenvolvimento do órgão saudável e em situação fisiológica que nos permite entender melhor quais eventos durante essa fase da vida podem alterar o curso do desenvolvimento normal. Além de compreender o que pode alterar o desenvolvimento de linfócitos B hepáticos também podemos identificar como essa alteração ocorre, ou seja, quais processos do desenvolvimento estão sendo alterados. Podemos, assim, compreender de que forma o desenvolvimento pós-natal hepático de linfócitos B pode ser alterado impactando nas fases neonatal, infantil e adulta. Perturbações durante o período neonatal como, por exemplo, o desmame precoce e infecções, poderiam alterar o desenvolvimento dos linfócitos B hepáticos levando, por exemplo, a uma atividade de linfopoiese anormal que pode culminar no estabelecimento de câncer infantil.

O acúmulo desse corpo teórico nos traz, portanto, um embasamento para fundamentar estratégias de saúde pública que possam garantir um bom desenvolvimento infantil com pleno desenvolvimento do capital humano das crianças. O investimento na atenção primária às crianças também significa reduzir os impactos nos indivíduos adultos decorrentes de problemas no desenvolvimento infantil, consequentemente diminuindo futuros gastos de saúde pública com esses adultos e melhorando a qualidade de vida da população.

Negligenciar essa fase da vida pode, assim, impactar no desenvolvimento infantil com reflexos nos adultos, e o estudo do desenvolvimento neonatal hepático e de suas células B pode ser a chave para o entendimento do desenvolvimento de doenças crônicas futuras. Fica evidente, assim, a importância em caracterizar a dinâmica da população de células B no contexto do fígado neonatal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os linfócitos B no contexto do desenvolvimento hepático pós-natal em relação à sua localização no órgão, perfil de subpopulações e funções que essas células realizam nas diferentes fases do desenvolvimento neonatal.

3.2 Objetivos Específicos

1. Visualizar as células B no fígado e determinar como essas células se organizam e onde se localizam na arquitetura hepática durante o desenvolvimento pós-natal utilizando microscopia confocal intravital.
2. Avaliar ao longo do desenvolvimento pós-natal se as células B são fígado-específicas ou células circulantes utilizando citometria de fluxo em animais perfundidos e não perfundidos.
3. Caracterizar o perfil e frequência das subpopulações de células B hepáticas ao longo do desenvolvimento pós-natal utilizando imunofenotipagem por citometria de fluxo.
4. Avaliar qual o potencial de precursores hepáticos de células B se diferenciarem para formar novas células B maduras por meio da transferência adotiva de precursores de células B para camundongos Rag^{-/-}.
5. Avaliar qual o potencial de células B hepáticas migrarem para outros órgãos *in vivo* utilizando fotoativação de células do fígado em camundongos Kaede.
6. Dosar, pela técnica de ELISA, a contribuição das imunoglobulinas de origem própria e de origem do leite materno nos diferentes tempos de desenvolvimento pós-natal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 em diferentes períodos do desenvolvimento: fetal (E17), pós-natal (semanas 1, 2, 3 e 4) e idade adulta (semana 9) (Figura 16). As idades de 1 e 2 semanas correspondem a um período pós-natal inicial enquanto as idades de 3 e 4 semanas já correspondem a um período pós-natal de desmame. Os experimentos abrangem o uso de diferentes camundongos C57BL/6, de acordo com o objetivo experimental: camundongos selvagens (*wild-type*: WT), camundongos geneticamente modificados *Kaede* e camundongos geneticamente modificados *Rag^{-/-}*.

Os animais *WT* e *Kaede* foram obtidos a partir de matrizes formadas por 2 fêmeas para cada macho e acondicionados em microisoladores de polisulfona (Alesco®) com livre acesso a água e ração autoclavada e sob condições controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h) e temperatura (25°C). Animais *Rag^{-/-}* foram adquiridos das empresas Jackson® ou Taconic®.

Os camundongos foram mantidos até o momento do experimento no biotério do Centro de Biologia Gastrointestinal (ICB/UFMG – Belo Horizonte, Brasil) ou no biotério do Ann Romney Center for Neurologic Diseases (BWH/HMS – Boston, EUA). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA Protocolo Nº 289/2020) e pelo “*Institutional Animal Care & Use Committee (IACUC)*”, BWH, protocolo número 2016N000230.



Figura 16: Desenho experimental das idades do desenvolvimento analisadas no estudo. Foram avaliadas as idades de 1, 2, 3 e 4 semanas do desenvolvimento pós-natal. Também se avaliou uma idade fetal (E17) e a idade adulta (9 semanas).

4.2 Microscopia Confocal Intravital (IVM)

Para entender como as células B se organizam na arquitetura hepática durante o desenvolvimento, utilizamos a técnica de microscopia confocal intravital (IVM) que permite avaliar o comportamento das células em tempo real e em seu ambiente fisiológico no animal vivo (Figura 17). Para esses experimentos foram utilizadas apenas as idades de 1s (período pós-natal inicial), 3s (período pós-natal tardio, próximo ao desmame) e 9s (controle adulto).

Os experimentos de IVM foram realizados conforme descrito previamente em Marques (2015). Antes da cirurgia, os animais receberam, por via intravenosa (*i.v.*), isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado a albumina (12,5mg/kg, Sigma) e, 5 minutos após, um mix de anticorpos conjugados a fluorocromos e diluídos em solução salina para um volume final de 0,1mL – para animais de 3 ou 9 semanas – ou 0,025mL – para os animais de 1 semana. Os anticorpos utilizados foram anti-B220 AF647 (0,06mg/kg, BD, Cat.557683) para identificação das células B e anti-CD31 BV421 (0,15mg/kg, BD, Cat.563356) para identificação dos sinusóides hepáticos. Para os experimentos de controle da especificidade de marcação, também foram utilizados os anticorpos anti-Ly6G BV421 (0,1mg/kg, Biolegend, Cat.127628) para identificação de neutrófilos e anti-F4/80 PE (0,06mg/kg, BD, Cat 565410) para identificação das células de Kupffer. Após um intervalo de 5 minutos para circulação dos anticorpos, os animais foram anestesiados por via subcutânea (*s.c.*) (ketamina 160mg/kg e xilazina 12mg/kg), submetidos a cirurgia, posicionados lateralmente em placa acrílica adaptada com lamínula e o lobo direito do fígado foi exposto e posicionado na lamínula. O fígado foi, então, avaliado em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 (Nikon, Japão) em objetiva de 20x (Plan Apo 20x/0.75). Foram adquiridas imagens, vídeos de 1h de duração (30 segundos de intervalo entre os frames, 120 frames totais) e 3D (1µm de intervalo entre frames, profundidade total de 30 µm).



Figura 17: Esquema demonstrando o experimento de microscopia confocal intravital (IVM). Foram utilizados anticorpos anti-B220 AF647 para evidenciar as células B e anticorpos anti-CD31 BV421 para evidenciar os sinusoides. Os anticorpos foram administrados por via intravenosa (*i.v.*).

4.3 Análise de imagens da IVM

Os dados obtidos na IVM foram analisados no software Nikon NIS Elements AR (Nikon, Japão). A avaliação do número de células por μm^2 foi realizada por meio da contagem manual das células nas imagens, adquiridas em objetiva de 20x e resolução de 1024x1024 pixels. O resultado foi representado graficamente como a média de 5-10 imagens por animal.

Os vídeos, adquiridos em objetiva de 20x e resolução de 1024x1024 pixels, foram cortados em 512x512 pixels sendo, assim, avaliado $\frac{1}{4}$ do vídeo original. O processo de binarização foi realizado por meio da combinação de detecção automática dos objetos pelo algoritmo do software com posterior refinamento visual manual. Foi, então, realizado o tracking dos objetos binários por meio da função “Track Binaries”, permitindo a obtenção de informações dos objetos (intensidade média de fluorescência, área, perímetro, diâmetro equivalente, circularidade, alongamento) e de sua trajetória (comprimento, velocidade, e gráfico polar).

4.4 Citometria de Fluxo

Utilizamos a citometria de fluxo para avaliar o perfil das subpopulações de células B. Essa técnica nos permite identificar populações celulares por meio de diferentes combinações de marcadores de superfície celular ou intracelulares. Avaliamos diferentes órgãos como o fígado, baço e medula óssea (Figura 18). Para os experimentos de caracterização das subpopulações em estado fisiológico foi acrescentado também o sangue (Figura 18) e para os experimentos de transferência foi acrescentada a avaliação da cavidade peritoneal.

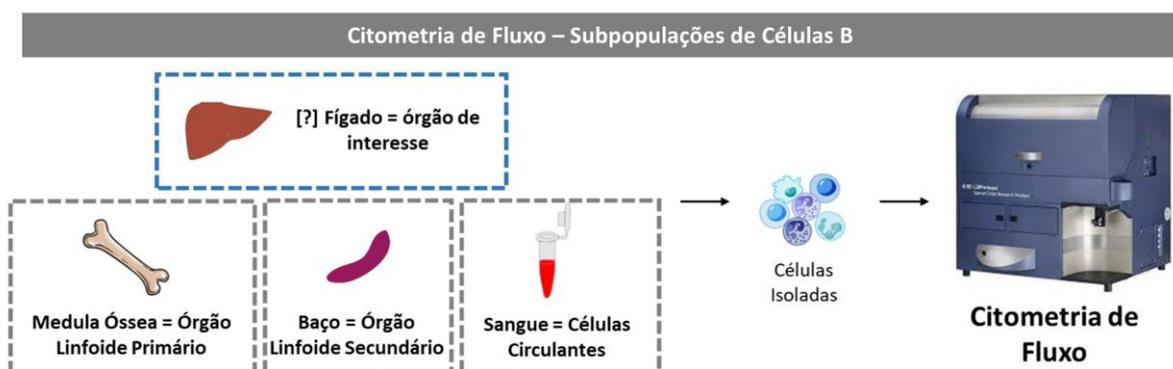


Figura 18: Esquema demonstrando o experimento de citometria de fluxo para identificação do perfil de subpopulações de células B no fígado, baço, medula óssea e sangue em estado fisiológico.

4.4.1 Isolamento de células do fígado, baço, medula óssea, sangue e cavidade peritoneal

Após eutanásia do animal em câmara de CO₂, o átrio direito do coração foi cortado e o sangue foi coletado e adicionado em tubo contendo 50µl de heparina (500UI/mL). Anteriormente à coleta dos órgãos, os animais foram perfundidos com HBSS (Sigma) para retirada de todo resquício de sangue do interior dos órgãos. Foi utilizado 20mL de HBSS para animais adultos de 9 semanas e 5-10mL para o restante das idades.

O procedimento inicial para coleta e processamento difere entre os órgãos. O fígado foi macerado com êmbolo de seringa diretamente em *cell strainer* de 100µm sobre placa de petri. O baço foi macerado com êmbolo de seringa diretamente em *cell strainer* de 70µm sobre placa de petri. A medula óssea foi coletada a partir do fêmur e tíbia das duas patas traseiras. Para a retirada da medula óssea, utilizou-se o seguinte aparato: um eppendorf de 0,5mL teve a base perfurada com o auxílio de uma agulha e foi colocado dentro de um eppendorf de 2mL. Os ossos, com as extremidades cortadas, foram colocados dentro do eppendorf de 0,5mL e todo o aparato foi centrifugado a 10.000g por 30 segundos. Assim, as células que estavam dentro da cavidade da medula óssea desceram para o eppendorf de 2mL e puderam ser coletadas.

Após esse procedimento de isolamento inicial, fígado, baço, medula óssea e sangue foram transferidos separadamente para tubos de 15mL e o volume completado para 10mL com FACS Buffer (HBSS + 2%FCS + 12,5Mm HEPES + 2mM EDTA). As amostras foram centrifugadas a 500g por 5min a 4°C e, a partir de então, os órgãos seguiram para diferentes etapas.

Para o baço, medula óssea e sangue, o pellet obtido foi lisado com 2mL de ACK1X por 1min a temperatura ambiente para a retirada de hemácias. A lise foi interrompida com adição de 10mL de FACS Buffer e as amostras centrifugadas a 500g, 5min a 4°C. O pellet final obtido seguiu para marcação com o painel de anticorpos e leitura no citômetro conforme protocolo detalhado no tópico 4.4.2.

Para o fígado, o pellet foi ressuspenso em 5mL de Percoll 80%. Sobre esta camada, adicionou-se Percoll 40%. As amostras foram centrifugadas a 800g por

20min a 25°C com aceleração de 5 e desaceleração de 3. Assim, os leucócitos foram separados através de um gradiente de densidade e, após a centrifugação, ficaram localizados na interface entre as duas camadas de Percoll. Os leucócitos da interface foram recolhidos para um novo tubo falcon com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As amostras foram centrifugadas a 500g, 5min a 4°C e o pellet final obtido seguiu para marcação com o painel de anticorpos e leitura no citômetro conforme protocolo detalhado no tópico 4.4.2.

Quando necessário, o lavado peritoneal foi o primeiro procedimento a ser feito, anteriormente à coleta de sangue e perfusão. Entre 2-5mL de FACS Buffer foi injetado na cavidade peritoneal e coletado em tubos de 15mL. O volume foi completado para 10mL com FACS Buffer e as amostras foram centrifugadas a 500g por 5min a 4°C. O pellet final obtido seguiu para marcação com o painel de anticorpos e leitura no citômetro conforme protocolo detalhado no tópico 4.4.2.

4.4.2 Marcação das células isoladas e leitura no citômetro ou sorter

As células obtidas nos protocolos de isolamento do fígado, baço, medula óssea, sangue e cavidade peritoneal seguiram para marcação com os anticorpos. Foi acrescentado ao pellet 20µl de mix do painel de anticorpos ou dos controles FMO. Após 20min a 4°C, as amostras foram lavadas com 200µl de FACS Buffer e centrifugadas a 500g, 5min, 4°C. O pellet foi incubado por 15min em temperatura ambiente com 50µl do corante de viabilidade 7-AAD (1:20, BD Biosciences, 559925). As amostras foram lavadas com 200µl de FACS Buffer e centrifugadas a 500g, 5min, 4°C. O pellet final foi ressuspensionado em 200µl de FACS Buffer e seguiu para leitura em citômetro Fortessa (BD) ou separação de populações celulares específicas no sorter ARIA (BD).

Os mix de anticorpos usados variaram de acordo com o experimento:

- a. *Caracterização de subpopulações de células B*: CD45 APCy7 (1:300, Biolegend, Cat. 103116), CD19 BV421 (1:300, Biolegend, 115538), CD93 PE (1:100, Biolegend, Cat. 136503), IgM PECy7 (1:100, Biolegend, Cat. 406513), CD21 BUV395 (1:100, BD, Cat. 740249), CD23 BUV496 (1:100, BD, Cat. 741058), CD43 Pe-Dazzle (1:200, Biolegend, Cat. 143217), CD5 BV711 (1:100, Biolegend, Cat. 100639) e CD3 AF700 (1:200, Biolegend, 100216).

- b. *Isolamento de precursores de células B para transferência: CD45 APCCy7 (1:300, Biolegend, Cat. 103116), CD19 BV421 (1:300, Biolegend, 115538), CD93 PE (1:100, Biolegend, Cat. 136503), IgM PECy7 (1:100, Biolegend, Cat. 406513), CD3 PerCP (1:200, Biolegend, 100326), Ly6G PerCP (1:200, Biolegend, 127654), Ly6C PerCP (1:200, Biolegend, 128028) e NK1.1 PerCP (1:200, Biolegend, 108726).*

4.4.3 Análise da citometria de fluxo para caracterização de populações celulares

As análises da citometria de fluxo foram realizadas no software FlowJo v10. As subpopulações foram identificadas com base na seguinte combinação de marcadores e estratégia de *gates* (Figura 19):

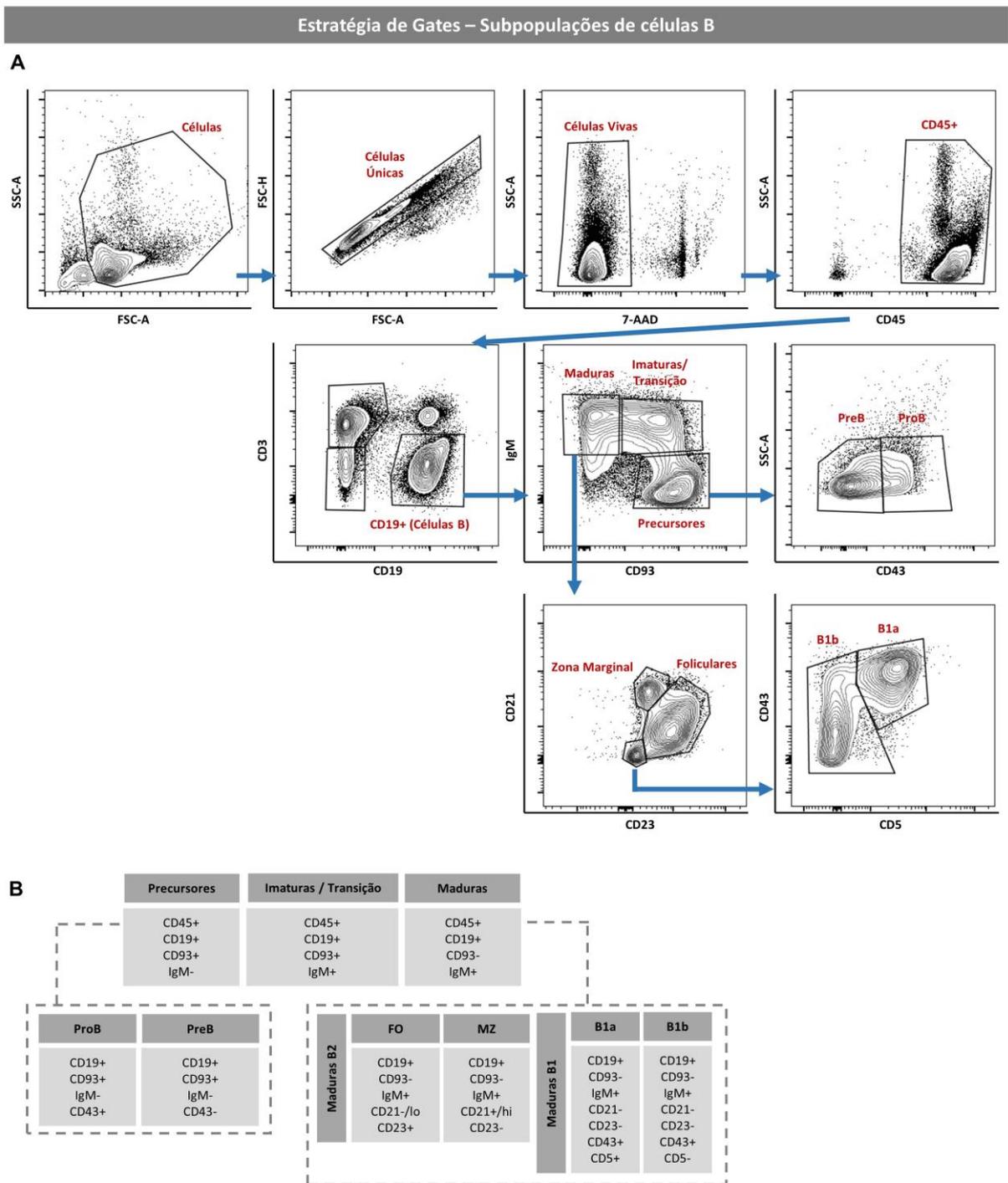


Figura 19: Estratégia de análise da citometria de subpopulações de células B. As subpopulações de células B foram identificadas com base na combinação de diferentes marcadores de superfície. A sequência de *gates* utilizados para análise dos dados se encontra detalhada na imagem.

4.5 Citometria de fluxo de animais perfundidos ou não perfundidos

A fim de avaliar se as células B presentes no fígado são específicas do órgão ou apenas circulantes juntamente com o sangue, realizamos uma citometria comparando-se animais perfundidos e não perfundidos (Figura 20). Metade dos animais foram submetidos a perfusão com 20mL de PBS por via transcardíaca na velocidade de 10RPM antes da coleta do fígado. A outra metade dos animais foram apenas exanguinados antes da retirada do fígado. Ambos seguiram, então, para os protocolos de isolamento de células hepáticas, marcação com anticorpo e leitura em citômetro descritos anteriormente. Para esse experimento as células B foram marcadas com anticorpos anti-CD19 APCCy7 (1:200, Biolegend, Cat. 115530) e lidos no citômetro Accuri C6 (BD).

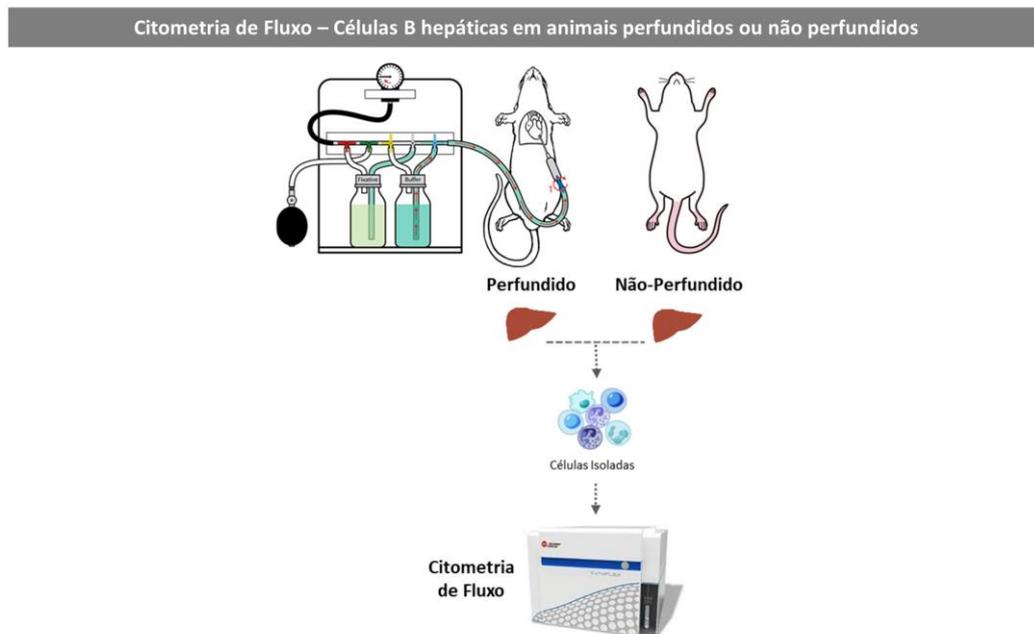


Figura 20: Análise da porcentagem de células B hepáticas por citometria de fluxo em animais que foram perfundidos ou não-perfundidos.

4.6 Transferência adotiva de precursores de células B para camundongos $Rag^{-/-}$

Para avaliar qual o potencial dos precursores de células B hepáticas se diferenciarem em novas células B maduras, realizamos um experimento de transferência adotiva de precursores de células B para camundongos geneticamente modificados $Rag^{-/-}$. Camundongos $Rag^{-/-}$ não expressam a enzima Rag responsável pela recombinação dos segmentos VDJ. Assim, as células B e T desses

camundongos não formam seu receptor e seu desenvolvimento não se completa. Animais $Rag^{-/-}$, portanto, não possuem células B ou T e, nesse contexto, funcionam como um “recipiente vazio” que permite a colonização de linfócitos B ou T em experimentos de transferência.

Precusores de células B foram isolados a partir do fígado ou medula óssea conforme descrito no tópico 4.4. Dois experimentos de transferência foram realizados. No primeiro, precusores de células B do fígado de camundongos WT de 1 semana de idade ou precusores de células B da medula óssea de camundongos WT de 9 semanas de idade foram isolados e transferidos para camundongos $Rag^{-/-}$ de 9 semanas de idade. 1×10^6 precusores foram transferidos por via *i.v.* O fígado, baço, medula óssea e lavado peritoneal dos animais $Rag^{-/-}$ foram coletados 4 semanas após a transferência e processados para análise das subpopulações de células B por citometria de fluxo conforme previamente descrito no tópico 4.4 (Figura 21A).

No segundo experimento de transferência, precusores de células B do fígado ou medula óssea de camundongos WT de 1 semana de idade foram isolados e transferidos para camundongos $Rag^{-/-}$ de 1 semana de idade. 3×10^5 precusores foram transferidos por via *i.v.* O fígado, baço, medula óssea e lavado peritoneal dos animais $Rag^{-/-}$ foram coletados 1 semana após a transferência e processados para análise das subpopulações de células B por citometria de fluxo conforme previamente descrito no tópico 4.4 (Figura 21B).

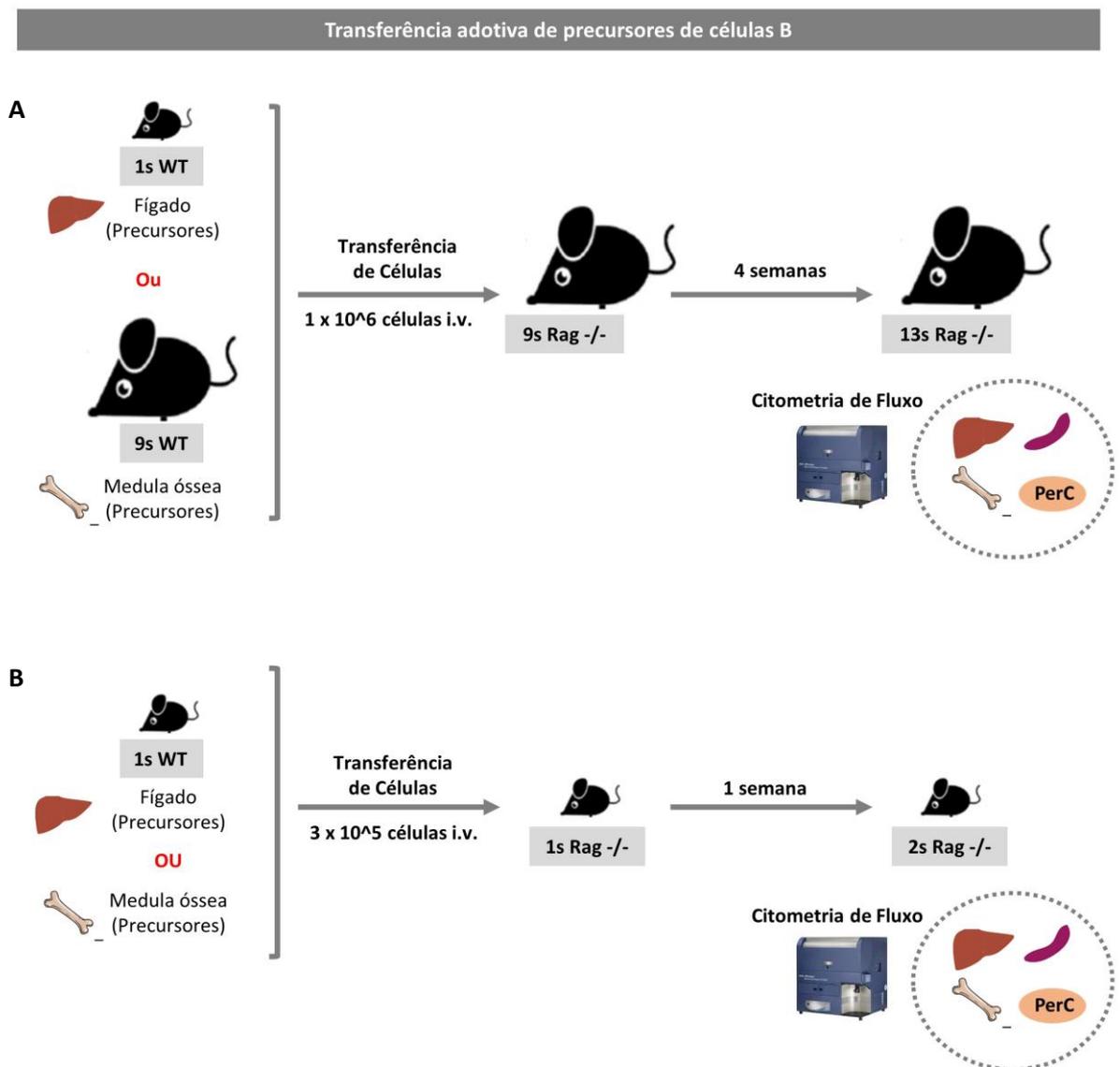


Figura 21: Desenho experimental da transferência de precursores de células B para camundongos Rag^{-/-}. **A.** 1×10^6 precursores de célula B do fígado de animais de 1 semana ou precursores de células B da medula óssea de animais de 9 semanas foram transferidos para animais Rag^{-/-} de 9 semanas. 4 semanas após a transferência o fígado, baço, medula óssea e cavidade peritoneal foram avaliados em citometria de fluxo para a presença de subpopulações de células B. **B.** 3×10^5 precursores de célula B do fígado ou medula óssea de animais de 1 semana foram transferidos para animais Rag^{-/-} de 1 semana. 1 semana após a transferência o fígado, baço, medula óssea e cavidade peritoneal foram avaliados em citometria de fluxo para a presença de subpopulações de células B.

4.7 Fotoconversão de células do fígado em camundongos *Kaede*

Para avaliar qual o potencial de células B hepáticas migrarem para outros órgãos *in vivo*, realizamos a fotoconversão de células do fígado de camundongos geneticamente modificados *Kaede*. *Kaede* é uma proteína que emite fluorescência no comprimento de onda verde. Ao ser exposta a um laser de 405nm, entretanto, a

proteína Kaede é clivada e passa a emitir fluorescência no comprimento de onda vermelha. Esse processo em que a proteína que antes emitia fluorescência verde passa a emitir fluorescência vermelha após exposição ao laser é denominado fotoconversão.

Os animais *Kaede* expressam a proteína Kaede sob controle do promotor CAG, ou seja, a expressão da proteína Kaede é ubíqua e, assim, todas as células do animal emitem fluorescência verde. Apenas aquelas células que foram expostas a um laser de 405nm passam a emitir fluorescência no vermelho pois possuem proteínas que foram fotoconvertidas (Figura 22).

Nesse experimento, apenas células do fígado de animais *Kaede* de 1 semana de idade foram fotoconvertidas por meio de 2 minutos de exposição a um laser de 405nm (Electra Pro Portable Violet Laser, Laserglow Technologies). O laser foi mantido a uma distância fixa de 6cm sobre o animal. O animal foi mantido anestesiado durante todo o procedimento por meio da inalação de isoflurano. Foi feita uma marcação na pele do animal sobre a região onde se localiza o fígado. Todo o animal foi, então, recoberto com um papel alumínio que possuía uma abertura apenas acima da região marcada do fígado. O papel alumínio bloqueia a passagem do laser e, assim, garante que apenas a região do fígado será exposta ao laser e fotoconvertida (Figura 23). Após 2 minutos de exposição ao laser e retorno da anestesia os animais voltaram para as caixas com as mães até o momento de coleta dos órgãos.

Fígado, baço e medula óssea foram coletados em diferentes tempos após a fotoconversão: 0, 1, 2, 3 e 7 dias (Figura 22). Esses órgãos seguiram para os procedimentos descritos no tópico 4.4 de isolamento de células e marcação com mix de anticorpos - CD45 APC-Cy7 (1:300, Biolegend, Cat. 103116), CD19 BV421 (1:300, Biolegend, 115538) - e corante de viabilidade 7-AAD. As amostras foram então lidas em citômetro e analisadas para a presença de células CD19+ vermelhas. Animais *Kaede* que não passaram pelo processo de fotoconversão foram usados como controle negativo do procedimento.

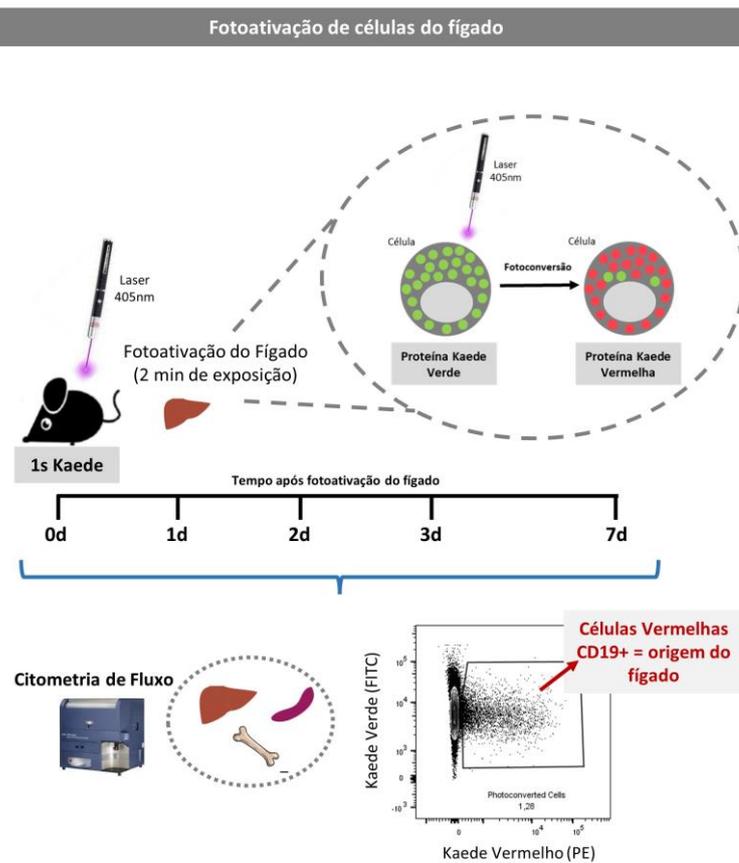


Figura 22: Desenho experimental dos experimentos de fotoconversão de células do fígado. O fígado de animais *Kaede* de 1 semana de idade foi fotoconvertido por meio de 2 minutos de exposição a um laser de 405nm. Em diferentes tempos após a fotoconversão (0, 1, 2, 3 e 7 dias) o fígado, baço e medula óssea desses animais foram coletados e avaliados em citometria de fluxo para a presença de células CD19+ vermelhas (células fotoconvertidas de origem do fígado).

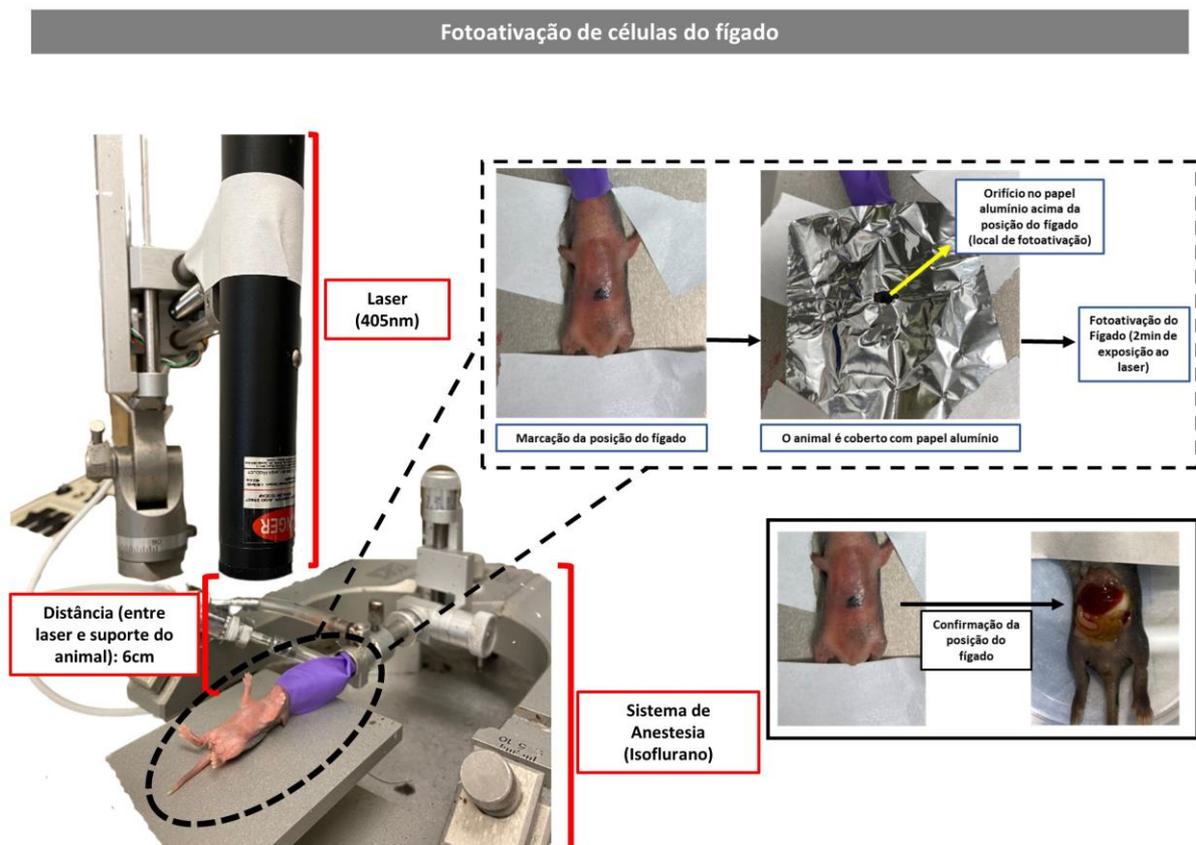


Figura 23: Sistema para fotoconversão de animais *Kaede*. Os animais foram mantidos anestesiados durante todo o procedimento por inalação de isoflurano. O laser foi posicionado a 6cm de distância acima do animal. A região do fígado foi demarcada e o animal foi completamente recoberto por papel alumínio, com um orifício apenas acima da região do fígado para fotoconversão. Após 2 minutos de exposição ao laser e recuperação da anestesia, os animais retornaram para as caixas com as mães até o momento da coleta dos órgãos para análise.

4.8 Dosagem de anticorpos por ELISA

Para avaliar o estabelecimento da produção própria de anticorpos do indivíduo e as contribuições de anticorpos vindos do leite materno, realizamos diferentes cruzamentos entre animais $Rag^{-/-}$ e WT, combinados com a utilização de mães adotivas. Quatro grupos foram formados (Figura 24). O primeiro grupo, o controle negativo sem presença de anticorpos de nenhuma fonte, foi formado pelo cruzamento de animais $Rag^{-/-}$ x $Rag^{-/-}$, dando origem a filhotes também $Rag^{-/-}$ (Figura 24). O segundo grupo, o controle positivo com a presença de anticorpos de todas as fontes, foi formado pelo cruzamento de animais WT x WT, dando origem a filhotes também WT (Figura 24). O terceiro grupo, onde os animais possuem anticorpos provenientes apenas do leite, foi formado pelo cruzamento de animais $Rag^{-/-}$ x $Rag^{-/-}$, gerando filhotes $Rag^{-/-}$. Porém, logo após o nascimento, os filhotes $Rag^{-/-}$ foram transferidos

para mães adotivas WT (Figura 24). Assim, esses filhotes não possuíam produção própria de anticorpos, mas receberam anticorpos provenientes do leite da mãe adotiva WT. O quarto grupo foi formado pelo cruzamento de animais Rag^{-/-} (fêmea) x WT (macho), dando origem a filhotes Rag^{+/-}. Assim, esses filhotes possuíam apenas a produção própria de anticorpos e não recebiam anticorpos do leite materno (Figura 24). O soro dos filhotes pertencentes aos 4 grupos de cruzamentos foi recolhido nas idades de 1, 2, 3, 4 e 9 semanas e armazenado em freezer -20°C até o momento de análise.

Também se realizou a coleta do leite materno de mães WT em diferentes tempos (0 e 4 dias, 1, 2, 3 e 4 semanas) para avaliação da presença de anticorpos no leite materno (Figura 24). A mãe foi separada dos filhotes por 2h antes da coleta de leite. Após esse período, a fêmea foi anestesiada por via *i.p.* com ketamina (85mg/kg) e xilazina (1mg/kg) e recebeu via *i.p.* 1UI de ocitocina. Após 2 minutos da aplicação de ocitocina teve início a coleta, onde as fêmeas foram ordenhadas e o leite coletado com a ajuda de uma pipeta. O leite foi armazenado em freezer -20°C até o momento de análise. Após o retorno da anestesia a mãe foi novamente reunida aos filhotes. A mesma fêmea foi utilizada para coleta de leite em todos os tempos, com a realização de 4 replicatas.

Tanto para as amostras de soro como de leite as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM foram dosadas pelo método de ELISA. Para o protocolo de ELISA, placas de 96 poços foram recobertas com 100ul/poço de anticorpo de captura (goat anti-mouse Ig, Human ads, UNLB, 1010-01, SouthernBiotech) diluído em Coating Buffer a 1:5000. As placas foram mantidas a 4°C em câmara úmida overnight e, após esse período, foram lavadas com PBS-Tween. O processo de bloqueio foi feito com 200ul/poço de PBS-caseína e incubação por 1h a temperatura ambiente seguida de lavagem com PBS-Tween. As amostras, diluídas em PBS-caseína, foram então adicionadas à placa. Para o branco, adicionou-se apenas PBS-caseína ao poço. As curvas padrões foram feitas por meio da diluição seriada (12 pontos no intervalo de 1000ng/mL a 0,48ng/mL) dos anticorpos: mouse IgM isotype control UNLB (0101-01, SouthernBiotech) ou mouse IgA isotype control UNLB (0106-01, SouthernBiotech) ou mouse IgG isotype control UNLB (0107-01, SouthernBiotech). Após adição das amostras, branco e padrão, a placa foi incubada a 37°C por 1h. Após lavagem com PBS-Tween, as placas foram incubadas a 37°C por 1h com os anticorpos de detecção, diluídos em PBS-Caseína a 1:10000: goat anti-mouse IgM, human ads, BIOT (1020-08,

SouthernBiotech) ou goat anti-mouse IgG, human ads, BIOT (1030-08, SouthernBiotech) ou goat anti-mouse IgA, BIOT (1040-08, SouthernBiotech). Após lavagem com PBS-Tween, seguiu-se outra incubação a temperatura ambiente por 1h com streptavidina-HRP diluída em PBS-Caseína a 1:5000. Após lavagem com PBS-Tween, as placas foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 5 minutos com solução de revelação (4mg OPD, 10ml tampão citrato, 2ul H₂O₂ 30%). Após os 5 minutos, a reação de revelação foi interrompida com a adição de 20ul/poço de ácido sulfúrico 2N. As placas foram, então, lidas em espectrofotômetro com laser a 492nm.

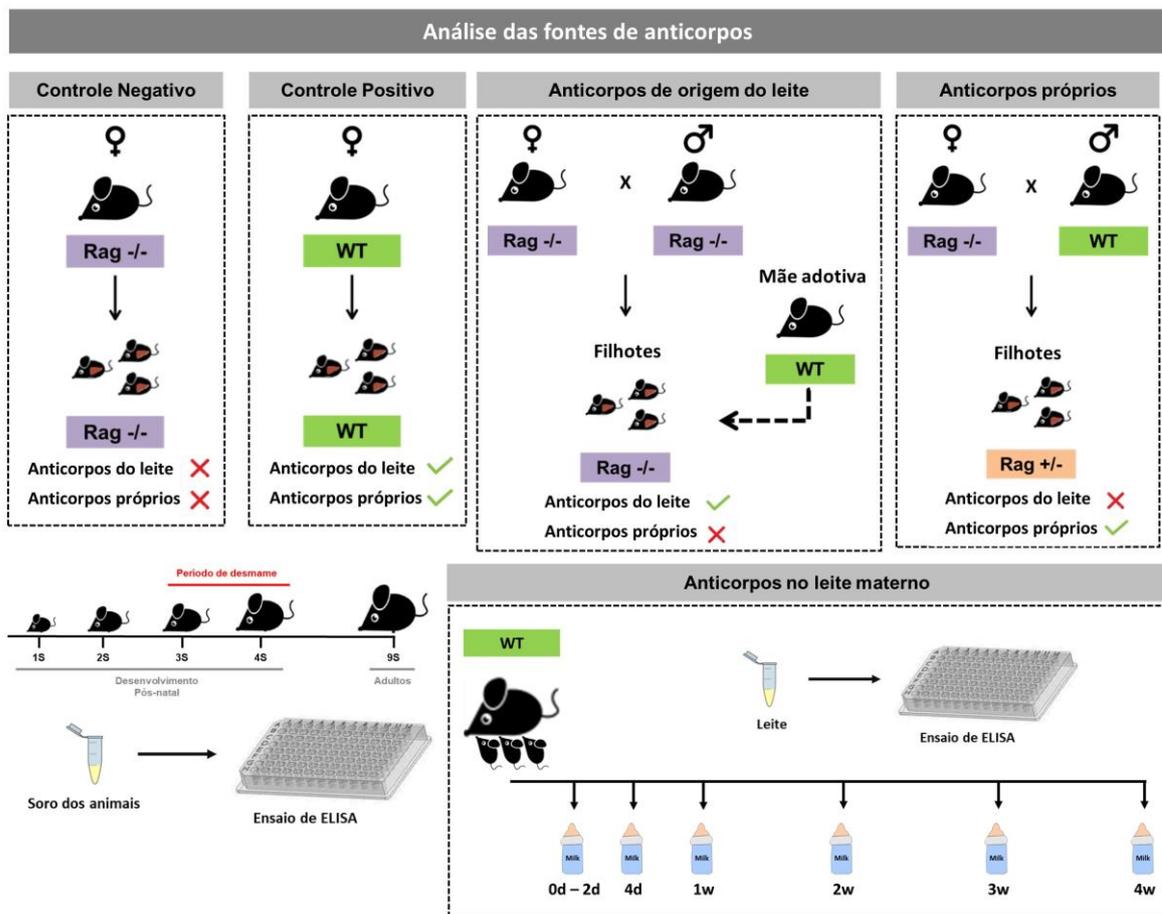


Figura 24: Dosagem de imunoglobulinas no leite materno e no soro de animais que possuem anticorpos provenientes de diferentes fontes (leite materno ou próprio). Diferentes fontes de anticorpos foram isoladas com base em diferentes estratégias de cruzamento entre animais Rag^{-/-} e WT. O soro desses animais foi, então, coletado nas idades de 1, 2, 3, 4 e 9 semanas e analisado por ELISA para a dosagem das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Também foram coletadas amostras de leite em diferentes tempos (0 e 4 dias, 1, 2, 3 e 4 semanas) para análise por ELISA para a dosagem das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM.

4.9 Análise Estatística

As análises estatísticas e elaboração de gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism 6. Nos experimentos de perfusão, transferência de precursores e citometria de WT e EF, foi realizado Teste T não pareado nos dados de distribuição normal e Teste Mann-Whitney nos dados que não possuem distribuição normal. Nos experimentos de citometria de subpopulações, para as comparações entre todas as idades foi utilizado o teste One-way ANOVA com a idade de 9 semanas como controle e pós-teste de Dunnet nos dados com distribuição normal. Para os dados que não possuem distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnet.

Os resultados foram apresentados como a média +/- erro padrão da média (SD) com no mínimo 4 animais por grupo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Linfócitos B fígado-específicos são encontrados no fígado e se localizam no interior de sinusoides hepáticos onde patrulham o órgão.

Primeiramente procuramos visualizar os linfócitos B no fígado e avaliar como essas células se organizam na arquitetura hepática ao longo do desenvolvimento pós-natal em um contexto fisiológico. Para isso, utilizamos a microscopia confocal intravital (IVM) onde as células B hepáticas puderam ser analisadas em um animal vivo, nos permitindo observar a localização das células na estrutura do tecido, os padrões de movimentação e interações celulares.

Pela análise dos vídeos de 1h (Suplementar 1-3) e 3D (Suplementar 4-6) pudemos observar que, ao longo de todo desenvolvimento, as células B estão localizadas no interior dos sinusoides hepáticos (Figura 25A) onde se movimentam em forma de patrulha. Além das células no interior dos sinusoides, os neonatos de 1 semana também apresentam aglomerados de várias células B no parênquima tecidual (Figura 25B, Suplementar 7). Esses aglomerados aparecem raramente em animais de 3 semanas (Suplementar 2) e já não estão presentes nos animais adultos (Suplementar 3).

A localização das células B no interior dos sinusoides nos levou a questionar se essas células são realmente fígado-específicas ou células circulantes do sangue. Para responder a essa pergunta, analisamos a porcentagem de células B (CD19+) em citometria de fluxo no fígado de animais perfundidos ou não perfundidos. Observamos que a porcentagem de células B no fígado não se alterou entre os animais perfundidos ou não perfundidos em nenhuma idade analisada indicando que os linfócitos B não foram retirados juntamente com o sangue durante a perfusão (Figura 25C). Podemos concluir, portanto, que os linfócitos B fazem parte da estrutura hepática e interagem com o órgão durante todas as fases de desenvolvimento neonatal.

Seguindo com a análise dos experimentos de IVM, observamos que algumas células permanecem praticamente todo o vídeo próximas à sua posição inicial no capilar sinusoide e não são levadas pelo fluxo sanguíneo (Suplementar 9). Além disso, também pudemos observar pequenos grupamentos intravasculares de 2-4 células B em todas as idades (Figura 25A, Suplementar 8).

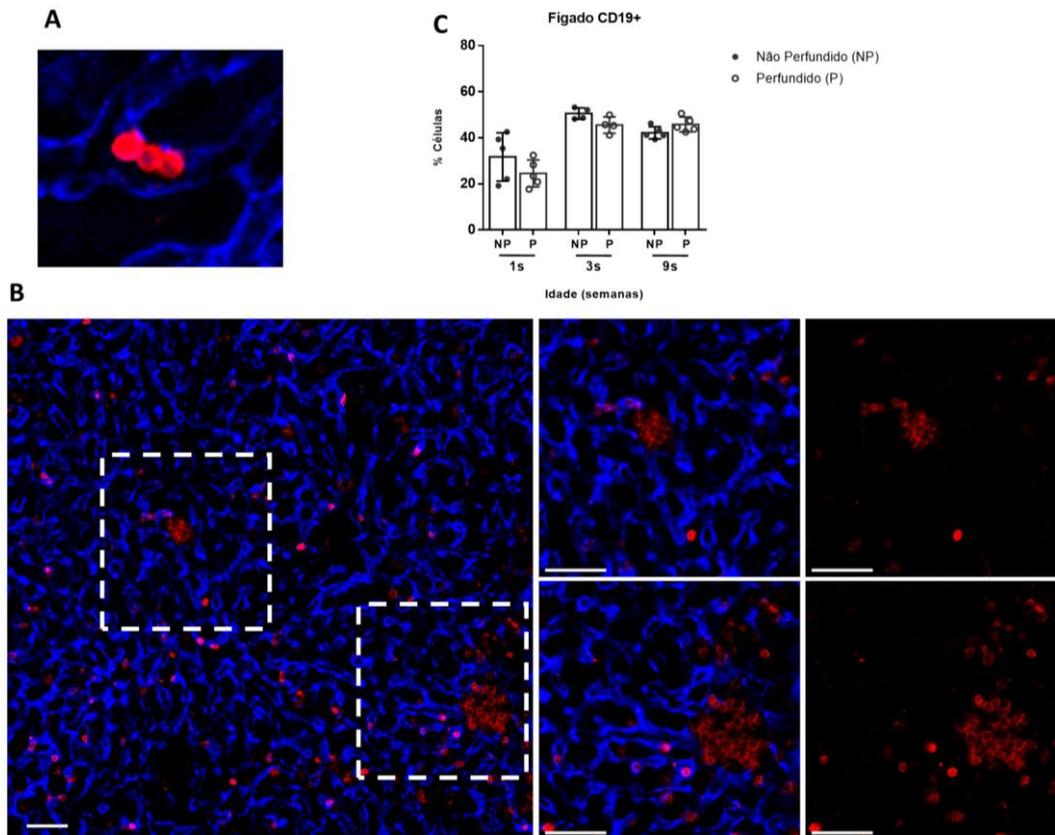


Figura 25: Localização das células B na estrutura hepática ao longo do desenvolvimento pós-natal. **A.** Células B no interior dos sinusoides hepáticos. Foco em grupamento de 2-4 células. **B.** Aglomerados no parênquima de neonatos com 1 semana de idade. As imagens à direita são ampliações (9x) das áreas destacadas na imagem à esquerda. **C.** Porcentagem de células B (CD19+) em relação aos linfócitos totais presentes no fígado de animais não perfundidos (NP) ou perfundidos (P) avaliadas por citometria de fluxo. Células B (B220 AF647) em vermelho e capilares sinusoides (CD31 BV421) em azul. N=4 animais por grupo. Barra de escala=50µm. Média +/- SD. Teste T. Imagens adquiridas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 em objetiva de 20x e analisadas no software Nikon NIS Elements AR

5.2 Dois tipos de células B com diferenças na expressão de B220, morfologia e padrão de movimentação estão presentes ao longo do desenvolvimento.

Sabendo onde as células B se localizam no fígado, seguimos para analisar essas células em relação ao seu número, morfologia e padrão de movimentação nas imagens e vídeos adquiridos na IVM. Observamos nas imagens que os neonatos de 1 semana apresentam um maior número de células por μm^2 de área do órgão enquanto animais de 3 e 9 semanas apresentam um menor número de células por área (Figura 26A e B). A intensidade média de fluorescência do marcador B220 aumenta ao longo do desenvolvimento sugerindo uma menor expressão de B220 nas células de neonatos de 1 semana com aumento até os adultos de 9 semanas (Figura 26C).

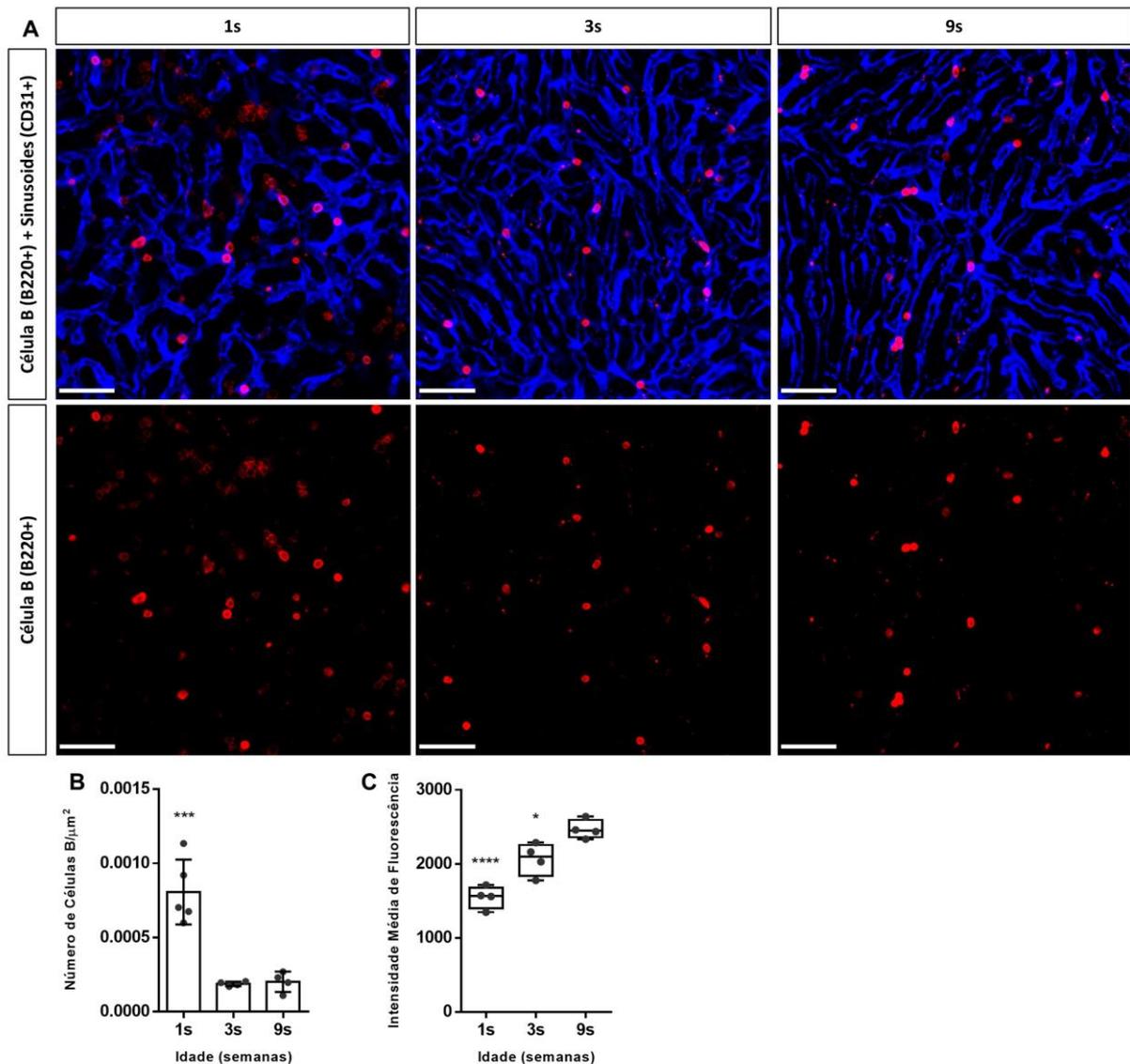


Figura 26: Distribuição de células B por área do fígado no desenvolvimento pós-natal. A. Imagens em microscopia confocal intravital. **B.** Número de células B por μm^2 de área do fígado. Média de 5-10 imagens por animal. **C.** Intensidade média de fluorescência do AF647 (B220). Células B (B220 AF647) em vermelho e capilares sinusoides (CD31 BV421) em azul. N=4 animais por grupo. Barra de escala=50 μm . Média +/- SD. * indica diferença estatística em relação à idade 9 semanas (ANOVA, $p < 0,05$). Imagens adquiridas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 em objetiva de 20x e analisadas no software Nikon NIS Elements AR.

Dois tipos de células e padrões de movimentação foram observados nas células B localizadas nos sinusoides. O primeiro tipo se caracteriza por células maiores com alta movimentação, que resulta em grandes alterações morfológicas durante o processo (Figura 27A, Suplementar 10). Esse grupo foi encontrado com alta frequência nos neonatos de 1 semana e apenas raramente nos animais de 3 e 9 semanas (Figura 27C). Já o segundo tipo celular apresenta células com a morfologia arredondada clássica de linfócitos, que pouco se altera, e menor movimentação

estando presente em todas as idades, mas sendo o tipo predominante nos adultos (Figura 27B e C, Suplementar 11).

As células B hepáticas nos animais de 1 semana apresentaram, assim, maior área (Figura 27D), diâmetro equivalente (Figura 27E) e perímetro (Figura 27F), demonstrando a predominância de células maiores. Essas células também se caracterizaram por um formato menos arredondado, com menor circularidade (Figura 27G) e maior alongamento (Figura 27H) demonstrando uma morfologia mais irregular e alongada. As células B nos animais de 1 semana também apresentaram maior padrão de movimentação com maior distância percorrida, porém menor velocidade (Figura 28A-C). O oposto é observado nos animais de 3 e 9 semanas (Figura 27D-H e 28A-C), indicando a predominância das células de formato clássico mais arredondado, regular e com menor movimentação. Esses dados indicam uma diferença na morfologia e padrão de movimentação entre as células B de neonatos e adultos.

Nas análises do IVM em geral observa-se que os animais de 3 semanas possuem características intermediárias entre os neonatos de 1 semana e adultos de 9 semanas. Em 3 semanas ainda há, por exemplo, a presença de alguns aglomerados no parênquima, mas suas células já possuem concentração, padrão de movimentação e morfologia semelhante aos adultos.

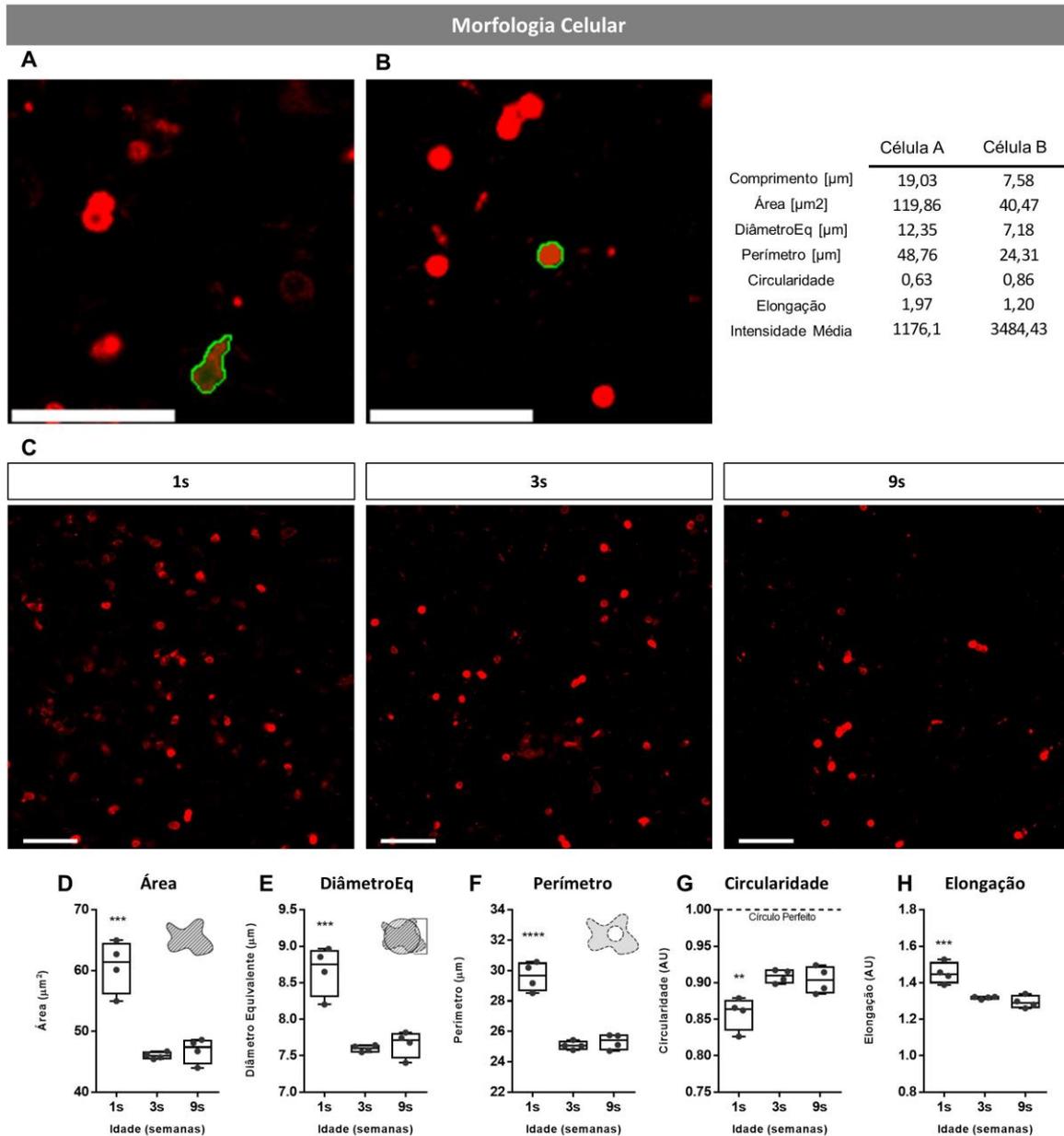


Figura 27: Padrões de morfologia das células B hepáticas no desenvolvimento pós-natal. A. Destaque em célula B maior, de formato irregular, menor intensidade de fluorescência e alto padrão de migração presente nos animais de uma semana de idade. **B.** Destaque em célula B menor, arredondada, de maior intensidade de fluorescência e menor padrão de migração presente nos animais adultos. **C.** Visão geral das células B presentes nas idades de 1, 3 e 9 semanas. As características morfológicas analisadas nas células foram **D.** Área (μm^2), **E.** Diâmetro equivalente (μm), **F.** Perímetro (μm), **G.** Circularidade (UA) e **H.** Alongamento (UA). Células B (B220 AF647) em vermelho. N=4 animais por grupo. Barra de escala=50 μm . Média +/- SD. * indica diferença estatística em relação à idade 9 semanas (ANOVA, $p < 0,05$). Imagens adquiridas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 em objetiva de 20x e analisadas no software Nikon NIS Elements AR.

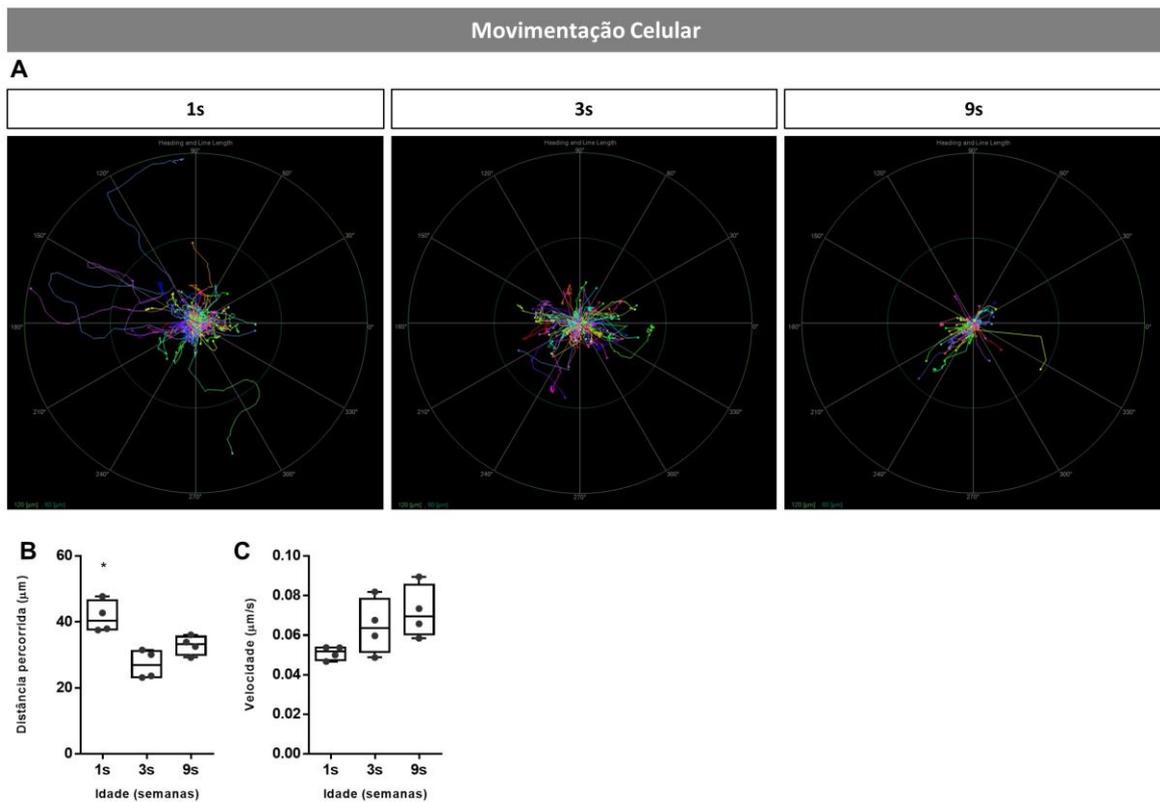


Figura 28: Padrões de movimentação das células B hepáticas no desenvolvimento pós-natal. A. Gráficos polares indicando a trajetória percorrida e orientação do movimento das células B nas idades de 1, 3 e 9 semanas. O círculo mais interno indica uma distância de 60µm e o círculo mais externo uma distância de 120µm. **B.** Distância percorrida pelas células (µm). **C.** Velocidade das células (µm/s). N=4 animais por grupo. Média +/- SD. * indica diferença estatística em relação à idade 9 semanas (ANOVA, $p < 0,05$). Análise no software Nikon NIS Elements AR.

5.3 O marcador B220 identifica células B de forma específica.

Para demonstrar a especificidade da marcação do anticorpo anti-B220 para as células B hepáticas nos experimentos de IVM e garantir que outro tipo celular não está sendo identificado, realizamos a IVM marcando também outros leucócitos: neutrófilos com anticorpos anti-Ly6G e células de Kupffer com anticorpos anti-F4/80. Esse controle foi realizado nos pontos de tempo mais extremos do trabalho: os neonatos de 1 semana e os adultos de 9 semanas. Em ambos, não foi observado dupla marcação do anticorpo anti-B220 para os outros tipos celulares, demonstrando que o anticorpo anti-B220 está identificando especificamente as células B hepáticas (Figura 29A e B).

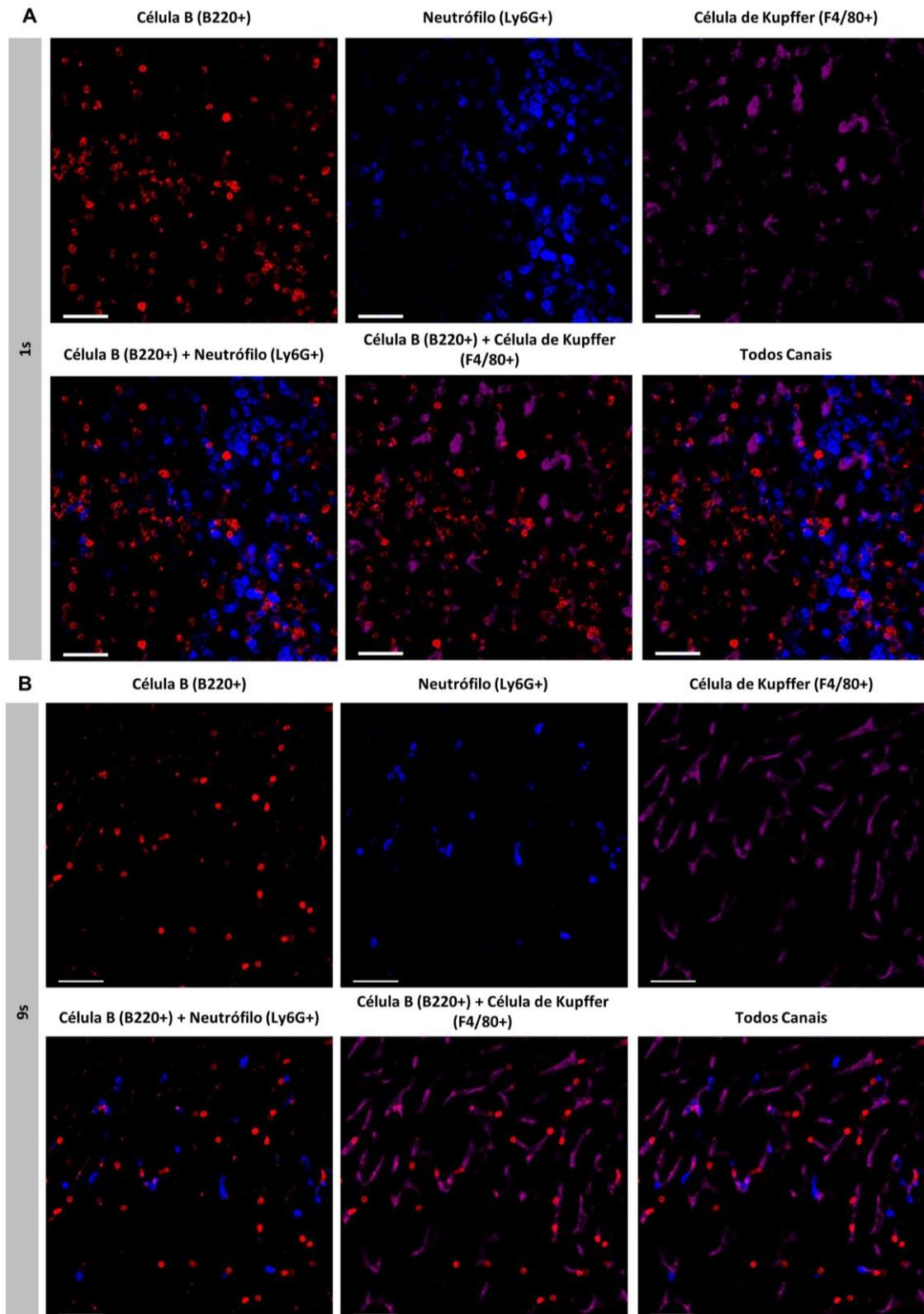


Figura 29: Especificidade da marcação do anticorpo anti-B220 avaliada no fígado de animais de 1 e 9 semanas por IVM. Os animais receberam anticorpos anti-B220 AF647 (células B em vermelho), anti-Ly6G BV421 (neutrófilos em azul) e anti-F4/80 PE (células de Kupffer em roxo). O experimento foi realizado em animais de **A.** 1 semana e **B.** 9 semanas. N=2 animais por grupo. Barra de escala=50µm.

Imagens adquiridas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 em objetiva de 20x e analisadas no software Nikon NIS Elements AR.

5.4 Linfócitos B alteram seu perfil de maturidade ao longo do desenvolvimento pós-natal hepático.

Nosso próximo passo foi identificar a quais subpopulações pertencem essas células B hepáticas e entender se existe uma mudança no tipo ou frequência das subpopulações ao longo do desenvolvimento pós-natal. Para isso, realizamos uma citometria de fluxo do fígado, mas também de outros órgãos onde as subpopulações de células B já são bem descritas. Assim, também avaliamos a medula óssea (órgão linfóide primário), baço (órgão linfóide secundário) e o sangue (células circulantes) permitindo ter um parâmetro de comparação para o nosso órgão de interesse e ainda desconhecido, o fígado. Para as análises, reunimos as subpopulações em três grandes grupos denominados de “células precursoras” (agrupando precursores proB e preB), “células imaturas/transição” e “células maduras” (agrupando a linhagem B1 e B2), com base na expressão de CD93 e IgM.

No período fetal, os precursores são as células predominantes e há uma alta quantidade de precursores de células B nos órgãos analisados: fígado (~95%) e baço (~75%) (Figura 30F). Em ambos, praticamente todos os precursores se classificam como precursores pro-B (Figura 30G, 30H).

Na primeira semana pós nascimento, observa-se uma redução na quantidade de precursores desses dois órgãos. No baço a redução é expressiva e os precursores se encontram em porcentagens menores que 20% (Figura 30F). Já no fígado, apesar da redução em relação ao período fetal, a porcentagem de precursores de células B ainda se mantém em altos níveis (~65%) (Figura 30F). As quantidades de proB e preB se igualam no fígado (~30% cada), ou seja, há uma redução na porcentagem de proB (Figura 30G) e aumento de preB (Figura 30H). O fígado, portanto, se mantém com precursores na fase pós-natal, enquanto o baço já apresenta expressiva redução dessas células e passa a apresentar um predomínio de células B maduras (~40%) (Figura 30B).

A medula apresenta um perfil de subpopulações de células B muito semelhante ao fígado, apenas com o diferencial de porcentagens um pouco maiores: ~85% de precursores (Figura 30F), com proB e preB em cerca de ~40% cada (Figura 30G,

30H). Já no sangue, a maior proporção de células B são as imaturas (~55%) (Figura 30E).

Na segunda semana pós-nascimento, o perfil de subpopulações de células B é semelhante ao descrito na primeira semana. Entretanto, cabe destacar algumas particularidades dessa idade. Os precursores do fígado continuam a reduzir (~50%) (Figura 30F) enquanto praticamente se mantém em mesmos níveis na medula (~80%) (Figura 30F). Em ambos os órgãos, fígado e medula, novamente proB reduz (Figura 30G) e preB aumenta (Figura 30H), chegando a ~40% no fígado e ~60% na medula (Figura 30H). Em ambas as idades de 1 e 2 semanas, observa-se também que o fígado possui uma quantidade de células B imaturas a níveis semelhantes ou maiores que na medula, em cerca de 20-30% (Figura 30E).

Na terceira semana pós-nascimento, os precursores do fígado reduzem novamente e de forma definitiva se tornando praticamente ausentes nesse órgão (Figura 30F). As células B maduras vinham aumentando de forma progressiva no fígado em 1s (~10%) e 2s (~20%) e agora na 3s atingem os níveis dos animais adultos (~40%) (Figura 30B). O fígado agora se iguala ao perfil de células B do baço, com praticamente ausência de precursores e predominância de células maduras. Concomitante ao desaparecimento de precursores no fígado, há um aumento de precursores de células B no sangue (~75%) (Figura 30F). A medula óssea continua a abrigar os precursores seguindo a mesma proporção, com predominância de preB em relação a proB (Figura 30G, 30H).

Na quarta semana pós-nascimento, o perfil da subpopulação de células B já está estabelecido como no adulto. O fígado e baço abrigam cerca de ~40% células B maduras (Figura 30B), a maioria de linhagem B2 (Figura 30C, 30D). As proporções de células B1 e B2 são iguais nas primeiras semanas do desenvolvimento (Figura 30C, 30D). A porcentagem de B1 cai com o desenvolvimento pós-natal, após a terceira semana (Figura 30C). E as células B2 aumentam até se tornarem predominantes na terceira semana, no fígado, e na quarta semana, no baço (Figura 30D). Também há uma redução nas células B imaturas no fígado nessa idade (Figura 30E).

A medula óssea agora é o único órgão que abriga precursores de células B (Figura 30F). A maioria de suas células são precursores, com maior proporção de preB (Figura 30G, 30H), mas também há presença de imaturas (~20%) (Figura 30E). Os níveis de precursores reduzem na medula óssea entre a quarta e nona semana (~70% para ~50%) (Figura 30F). No sangue os precursores voltam a níveis muito

baixos (Figura 30F) e encontramos células imaturas (~15-20%) (Figura 30E) e um predomínio de maduras (~30%) (Figura 30B).

Podemos observar, portanto, que diferentes subpopulações de linfócitos B estão presentes nas fases de desenvolvimento pós-natal (Figura 31). Até a segunda semana, o fígado se assemelha mais a um órgão linfoide primário, como a medula óssea, pelo predomínio de células B precursoras (Figura 31). A partir da terceira semana, o fígado passa a se assemelhar mais a um órgão linfoide secundário, como o baço, pois perde os precursores e células maduras e imaturas/transição passam a predominar (Figura 31). Nessa fase de transição da terceira semana, há um aumento de precursores circulantes no sangue (Figura 31). O perfil de subpopulações de células B se estabelece nos órgãos, assim, da quarta semana em diante.

Assim, podemos concluir que o perfil de células B dos órgãos ainda não está estabelecido ao nascimento e esse processo continua ainda no período pós-natal. Na fase pós-natal, o estabelecimento da população de células B ainda está em processo e, assim, essa fase do desenvolvimento provavelmente ainda possui um papel importante para a formação das células B no organismo. Nesse cenário, nos chamou a atenção a alta quantidade de precursores de células B ainda presentes no fígado de 1 e 2 semanas. Isso nos sugere que o fígado pós-natal ainda pode contribuir para a formação das células B, estendendo essa função do fígado fetal também para o período pós-natal. Procuramos, então, avaliar se os precursores de células B do fígado podem contribuir para a formação de células B que vão colonizar outros órgãos.

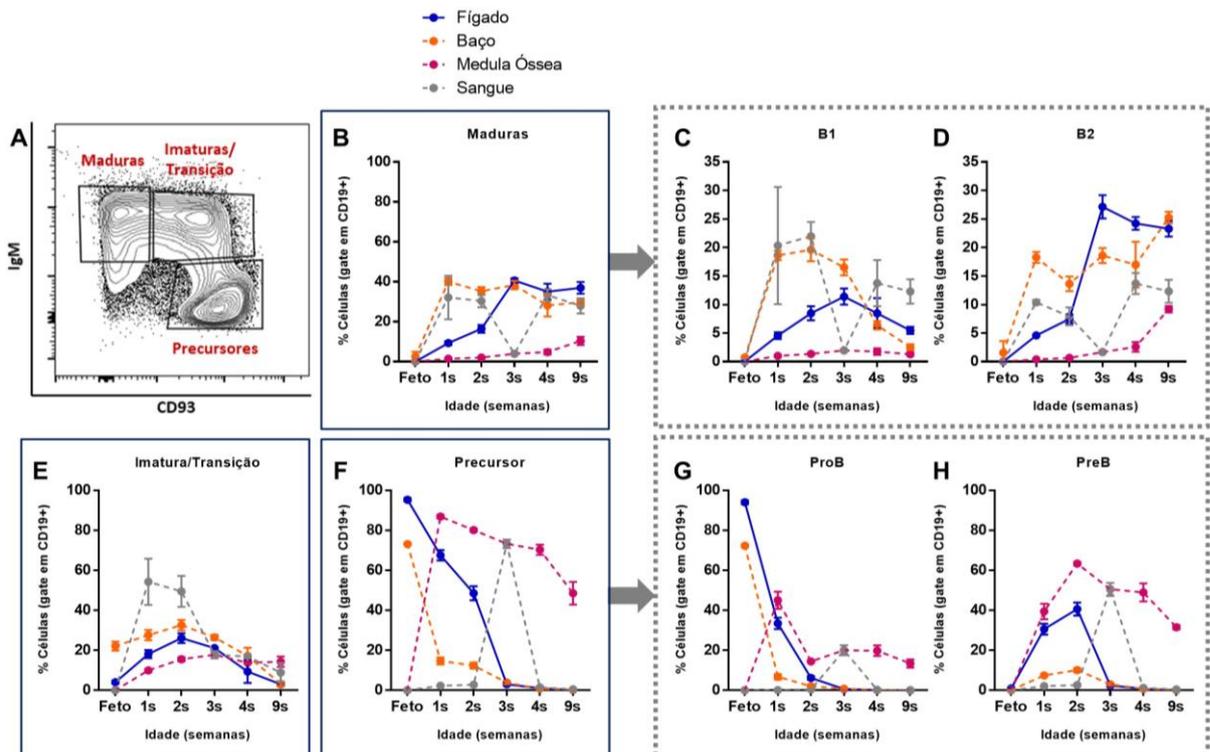


Figura 30: Perfil das subpopulações de células B no desenvolvimento pós-natal. Fígado, medula óssea, baço e sangue foram plotados em conjunto. **A.** Estratégia de gate para definição das populações Maduras, Imaturas/Transição e Precursores. Populações de células **B.** Maduras; **C.** B1; **D.** B2; **E.** Imaturas/Transição; **F.** Precursor; **G.** ProB; **H.** PreB. Análises a partir de experimento em citometria de fluxo no software FlowJo e GraphPad Prism. N=5 animais por grupo. Média +/- SD.

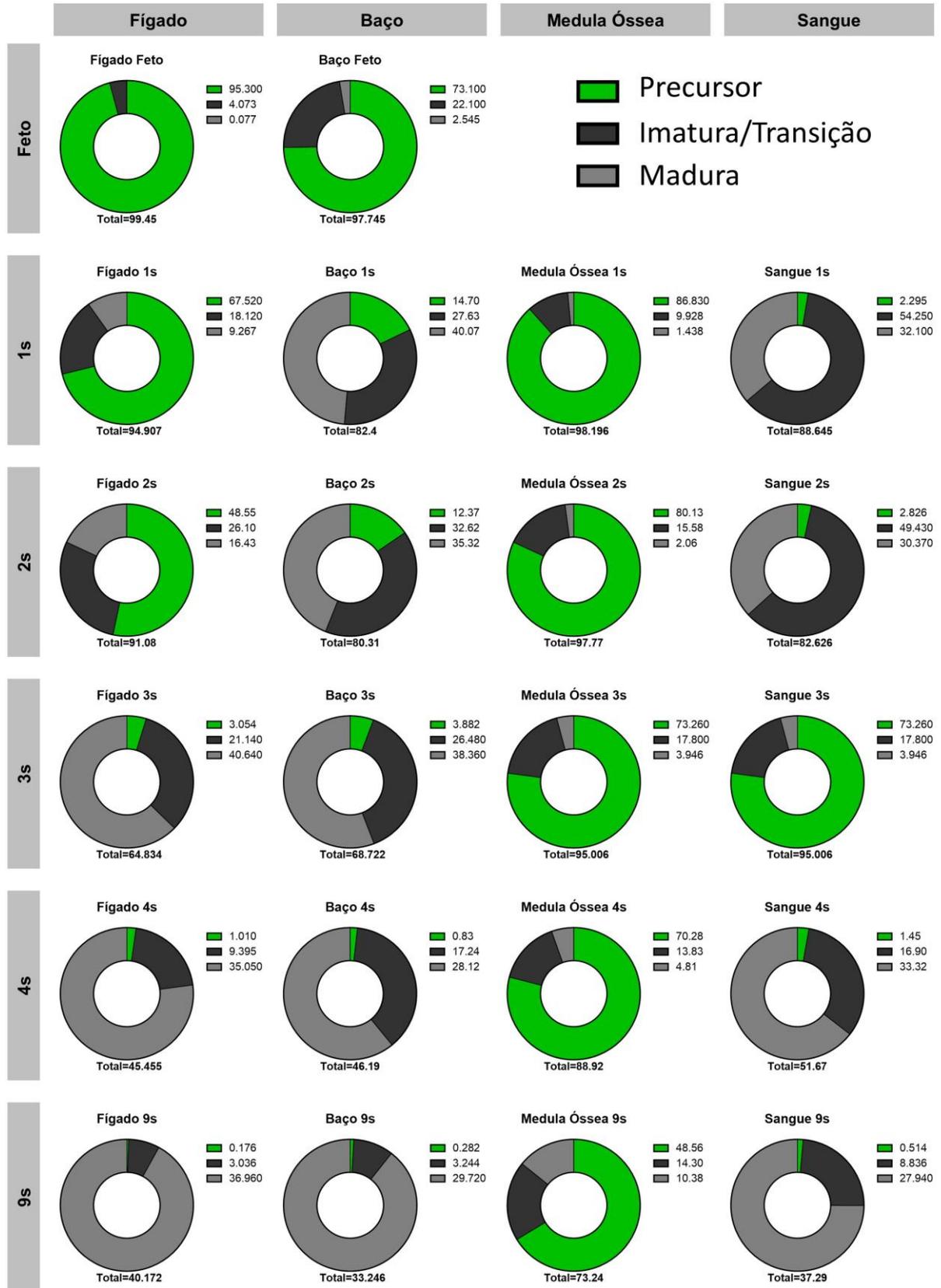


Figura 31: Perfil de células B precursoras, transição/imatura e maduras no desenvolvimento pós-natal do fígado, baço, medula óssea e sangue. Os valores representam a média de cada grupo.

5.5 Precusores hepáticos de células B presentes na primeira semana pós-nascimento possuem potencial de se diferenciarem em células B maduras

Para avaliar se os precusores de células B do fígado pós-natal tem a capacidade de se diferenciarem em células B maduras e, assim, ainda contribuir com a formação de células B do organismo, realizamos uma transferência adotiva de precusores de células B para camundongos Rag^{-/-}. Após a transferência, fígado, baço, medula óssea e cavidade peritoneal foram avaliados por citometria de fluxo para a identificação de subpopulações de células B presentes nesses órgãos. Dois órgãos linfoides secundários foram escolhidos para avaliação, um com predomínio de células B de linhagem B1 (cavidade peritoneal) e outro com predomínio de células B de linhagem B2 (baço).

Nos experimentos cujos animais receptores eram camundongos Rag^{-/-} de 9 semanas, observamos que não há diferença no potencial de diferenciação entre precusores do fígado de 1 semana e precusores da medula óssea de 9 semanas (Figura 32). Ambos diferenciam em células B maduras no baço (principalmente da linhagem B2) (Figura 32A) e cavidade peritoneal (principalmente da linhagem B1) (Figura 32B). Os precusores também foram capazes de colonizar a medula óssea, onde se mantiveram como precusores (Figura 32C). Também há colonização do fígado por precusores de células B, mas em menor porcentagem em relação à medula (Figura 32D). Células B maduras também foram encontradas no fígado, mas também em menor porcentagem quando comparado ao baço e cavidade peritoneal (Figura 32D).

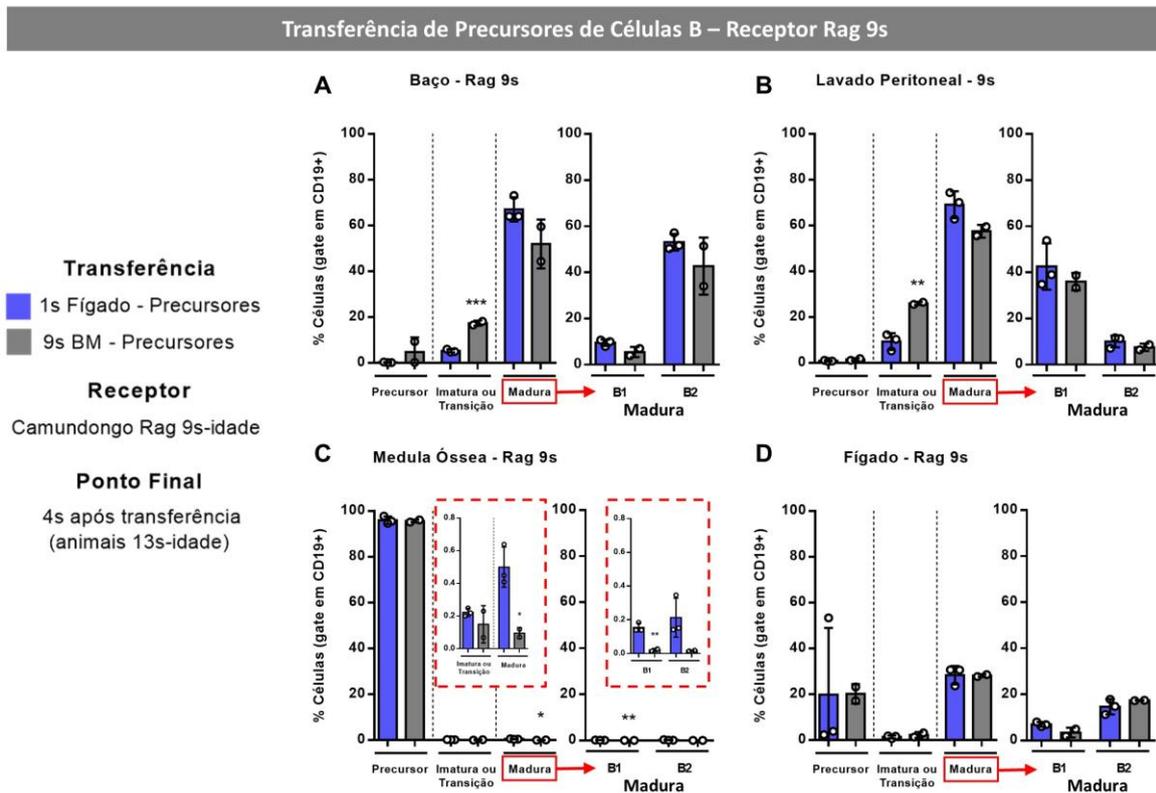


Figura 32: Perfil de subpopulações de células B 4 semanas após a transferência de precursores para animais receptores Rag^{-/-} de 9 semanas. As subpopulações de células B foram analisadas por citometria de fluxo no **A. Baço**; **B. Lavado Peritoneal**; **C. Medula Óssea** e **D. Fígado**. N=5 animais por grupo. Média +/- SD. * indica diferença estatística entre o grupo de precursores do fígado de 1 semana e precursores da medula óssea de 9 semanas (Teste T, p<0,05).

Nos experimentos onde o animal receptor eram camundongos Rag^{-/-} de 1 semana, observamos que também não há diferença no potencial de diferenciação entre precursores do fígado de 1 semana e precursores da medula óssea de 1 semana (Figura 33). Ambos os precursores colonizam todos os órgãos, mas não se diferenciam em células B maduras, sendo encontrados apenas os precursores nos órgãos analisados (Figura 33 A-D).

Observamos, portanto, que os precursores de células B hepáticas ainda possuem o potencial para se diferenciarem em células B maduras que se estabelecem em outros órgãos.

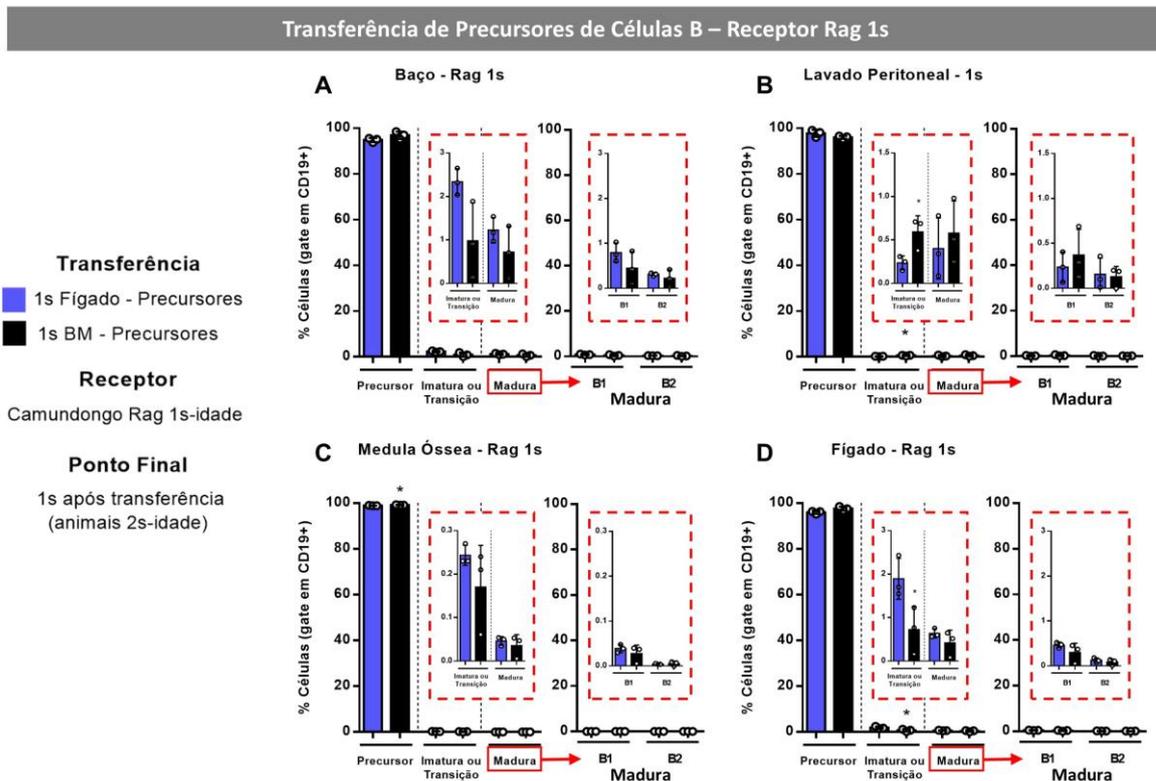


Figura 33: Perfil de subpopulações de células B 1 semana após a transferência de precusores para animais receptores Rag^{1s} de 1 semana. As subpopulações de células B foram analisadas por citometria de fluxo no **A. Baço**; **B. Lavado Peritoneal**; **C. Medula Óssea** e **D. Fígado**. N=5 animais por grupo. Média +/- SD. * indica diferença estatística entre o grupo de precusores do fígado de 1 semana e precusores da medula óssea de 1 semana (Teste T, p<0,05).

5.6 Células B hepáticas da primeira semana pós-nascimento podem sair do fígado e migrar para outros órgãos como baço e medula óssea

Nos experimentos de transferência temos uma condição artificial, onde as células são transferidas diretamente para a corrente sanguínea do animal e tem a capacidade de alcançar e colonizar todos os órgãos. Entretanto, nos perguntamos se a migração de células B vindas do fígado para outros órgãos é uma situação que ocorre naturalmente no indivíduo, o que reforçaria a hipótese de que o fígado ainda pode fornecer células B. Para avaliar qual o potencial das células B hepáticas migrarem para outros órgãos em uma condição *in vivo*, realizamos a fotoconversão de células do fígado de camundongos *Kaede* de 1 semana de idade e avaliamos por citometria de fluxo a presença de células fotoconvertidas no fígado, baço e medula óssea nos dias 0, 1, 2, 3 e 7 após a fotoconversão.

A fotoconversão se mostrou específica, uma vez que no dia 0 apenas o fígado possui células fotoconvertidas (Figura 34A-D). Nos dias 1 e 2, essas células reduzem

no fígado (Figura 34A e 34B) e são encontradas na medula óssea (Figura 34A e 34D) e, principalmente, no baço (Figura 34A e 34C). Como apenas o fígado teve suas células fotoconvertidas por exposição ao laser, a presença de células B CD19+ vermelhas no baço ou medula óssea indica que essas células se deslocaram do fígado para esses órgãos. No dia 3 após a fotoconversão já não há presença de células fotoconvertidas em nenhum órgão, assim como em 7 dias (Figura 34 A-D). Podemos concluir, portanto, que as células B hepáticas possuem capacidade de se deslocarem para outros órgãos e não ficam restritas apenas ao fígado.

Corroborando a hipótese de que o fígado pós-natal ainda poderia contribuir para a formação de células B do organismo, confirmamos que os precursores hepáticos de células B tem o potencial de se diferenciarem em células B maduras e que as células B hepáticas podem se deslocar para outros órgãos.

Percebe-se, assim, que a população de célula B ainda está se estabelecendo durante o período neonatal, com o fígado ainda participando desse processo. Nos perguntamos, então, se essa relativa imaturidade de células B na fase neonatal teria consequências para a produção de anticorpos no indivíduo. Procuramos, assim, dosar as imunoglobulinas presentes no soro dos animais nas diferentes fases de desenvolvimento pós-natal.

Fotoconversão de células do Fígado – camundongos Kaede

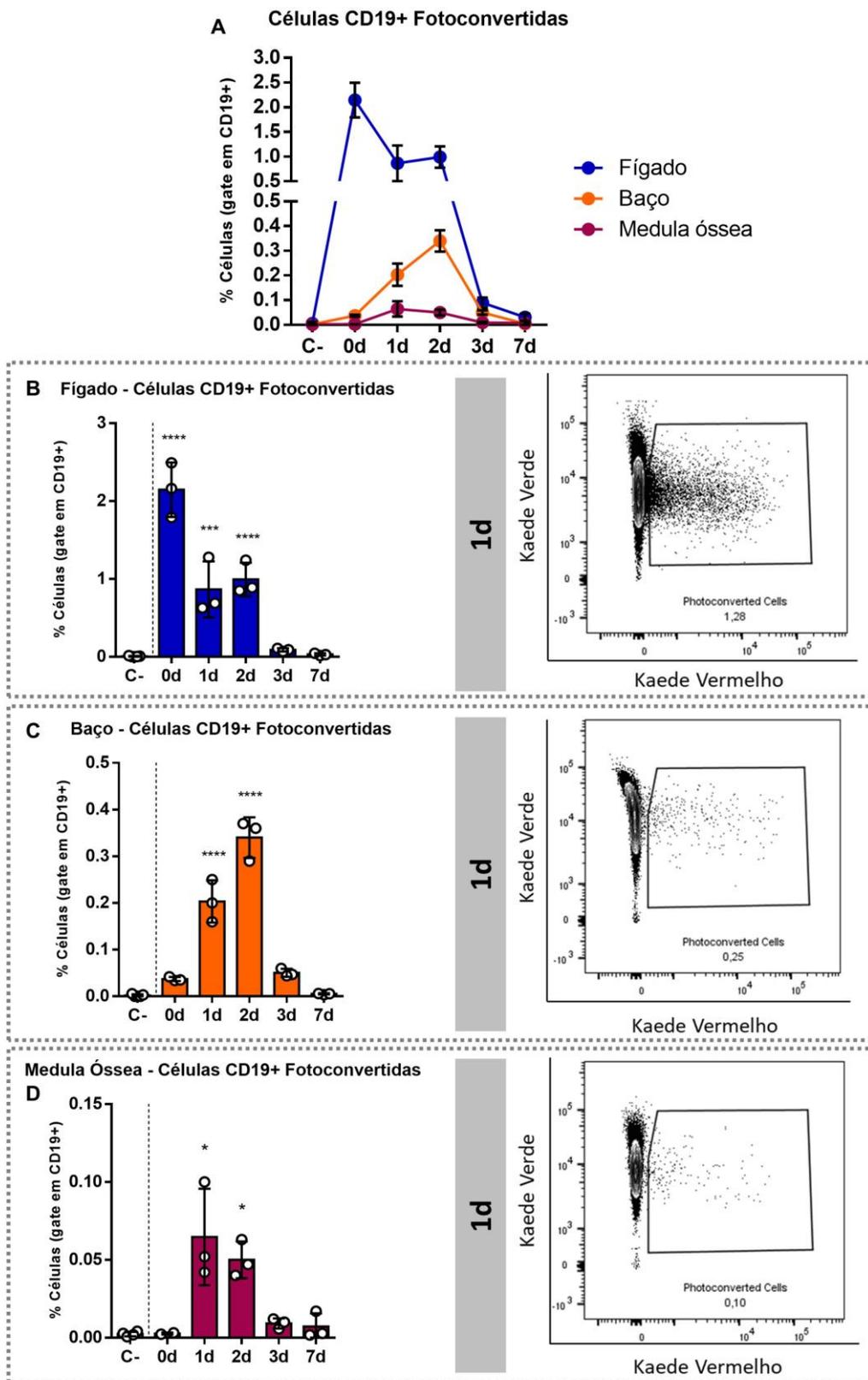


Figura 34: Porcentagem de células CD19+ Fotoconvertidas. Após fotoconversão do fígado por 2 minutos com laser de 405nm, fígado, baço e medula óssea foram analisados por citometria de fluxo para avaliar a presença de células CD19+ fotoconvertidas. Foram analisados os tempos após conversão de 0, 1, 2, 3 e 7 dias. Um animal Kaede que não passou pelo processo de fotoconversão foi usado como controle negativo.

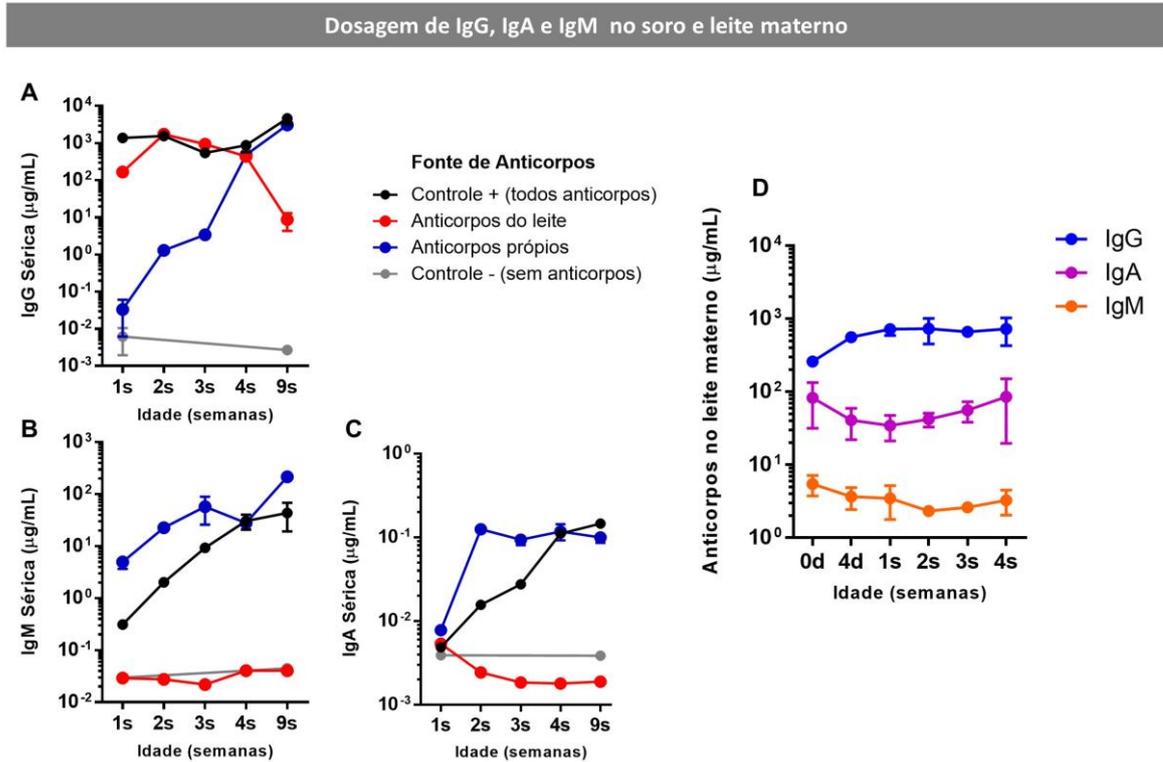
5.7 A produção própria de imunoglobulinas se estabelece ao final do período neonatal, sendo suprida pela transferência de IgG do leite materno durante o período de amamentação

Para avaliar a dinâmica de anticorpos séricos ao longo do desenvolvimento, dosamos as imunoglobulinas IgM, IgA e IgG. Como na fase neonatal o animal está amamentando e recebe anticorpos do leite materno, procuramos separar as fontes de anticorpo para avaliar isoladamente a dinâmica da produção própria e dos anticorpos do leite. Assim, foram avaliados animais apenas com anticorpos do leite materno (filhotes Rag^{-/-} com mães adotivas WT), apenas com anticorpos de produção própria (filhotes Rag^{+/-} proveniente do cruzamento de animais Rag^{-/-} fêmea x WT macho), com todas as fontes de anticorpo (animais WT) e com nenhuma fonte de anticorpo (animais Rag^{-/-}).

Nos animais WT, observamos que a produção de IgM e IgA aumentam gradualmente com o desenvolvimento, atingindo quantidades semelhantes ao adulto na quarta semana (Figura 35B e 35C, grupo em preto). Não há presença no soro dos animais de IgM e IgA de origem do leite materno (Figura 35B e 35C, grupo em vermelho). É importante observar que a produção própria dessas imunoglobulinas se estabelece mais cedo quando não há contribuição de anticorpos maternos e os anticorpos próprios são a única fonte de anticorpo (Figura 35B e 35C, grupo em azul).

Em animais WT, IgG já se apresenta em níveis elevados desde o início do desenvolvimento (Figura 35A, grupo em preto). Entretanto, podemos observar que a IgG sérica presente no período neonatal vem do leite materno (Figura 35A, grupo em vermelho) e sua produção própria aumenta apenas com a idade, principalmente na quarta semana, após desmame (Figura 35A, grupo em azul). Apesar da ausência de anticorpos IgM e IgA séricos com origem do leite materno, observamos que todos os isotipos testados – IgG, IgA e IgM – estão presentes no leite (Figura 35D). Entretanto, estes variam em abundância, sendo IgG mais abundante e o IgM menos abundante.

Observamos, assim, que a produção própria de anticorpos do indivíduo também se estabelece ao longo do desenvolvimento de forma concomitante ao estabelecimento da população de células B maduras no indivíduo. Anticorpos IgG são fornecidos pela mãe por meio do leite materno nessa fase de imaturidade da produção própria de anticorpos.



6. DISCUSSÃO

O fígado é o principal sítio hematopoiético no feto, mas apresenta outras funções metabólicas e imunes nos adultos (GORDILLO, Miriam; EVANS; GOUON-EVANS, 2015; GUO *et al.*, 2009; JENNE; KUBES, 2013a). A transição entre esses diferentes papéis do fígado ocorre nos neonatos. Porém, o processo em que o fígado neonatal reorganiza sua estrutura e funções para transitar do feto para o adulto é pouco explorado na literatura. O fígado abriga uma ampla população de células imunes, muitas ainda pouco caracterizadas e estudadas (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Dentre estas se encontram as células B que, apesar de constituírem uma grande população de células imunes do fígado adulto e terem importância em muitos processos da resposta imune, ainda são pouco estudadas no ambiente hepático, principalmente durante a fase de remodelamento do fígado neonatal. Este trabalho teve como objetivo, portanto, caracterizar como a população de células B hepáticas se altera nos neonatos até seu estabelecimento no órgão maduro adulto.

Ao dar início à caracterização das células B no fígado, nosso primeiro objetivo foi visualizar essas células no órgão. É fundamental caracterizar a localização dessas células no órgão uma vez que as funções de uma célula estão relacionadas ao nicho que esta ocupa. O contato mais íntimo com o sangue pela localização na vasculatura hepática, por exemplo, favorece a rápida fagocitose de antígenos sanguíneos pelas células de Kupffer (BILZER; ROGGEL; GERBES, 2006). O mesmo ocorre com as células B de zona marginal no baço, onde um contato íntimo com o sangue da polpa vermelha favorece a captura e ativação por antígenos presentes no sangue (CERUTTI; COLS; PUGA, 2013). Portanto, caracterizar o nicho em que as células B ocupam no fígado pode trazer importantes indícios sobre as funções que essas células estão exercendo. Essa caracterização foi realizada por meio da técnica de IVM que tem como vantagem a capacidade de visualizar processos celulares que dependem da célula viva, como sua movimentação e interação com outras células. Na IVM, portanto, não temos apenas uma visão estática das células no tecido, como em outras técnicas de imagem, sendo possível visualizar as células em um animal vivo e no seu contexto nativo (MARQUES *et al.*, 2015).

A estrutura básica de organização dos órgãos linfoides secundários (SLO), como o baço e linfonodos, consiste na presença de zonas de células B, que formam folículos linfoides, e zonas de células T (DRAYTON *et al.*, 2006). Observamos que a

organização de células B no fígado se difere dessa organização geral de SLO pois, no fígado, os linfócitos B estão localizados no interior dos sinusoides hepáticos e não há a presença de zonas de células B formando a estrutura clássica de folículos linfoides. Por outro lado, os sinusoides também são locais importantes para a localização de células B na medula óssea. Quando terminam seu processo de desenvolvimento na medula, as células B imaturas são direcionadas para o interior dos sinusoides, onde permanecem por um tempo aderidas e “rastejando” pelo endotélio (PEREIRA, 2009). Além disso, a medula também atua como um órgão linfóide secundário abrigando células B maduras em nichos perisinusoidais, o que facilita a patrulha de antígenos *blood-borne* e demonstra, novamente, que sinusoides são um nicho especializado para a localização de células B na medula óssea (CARIAPPA *et al.*, 2005). Também é descrito que células imunes hepáticas são residentes no interior de sinusoides ou no compartimento sub-endotelial, o espaço de Disse (ROBINSON; HARMON; O’FARRELLY, 2016), o que se confirmou neste trabalho em relação aos linfócitos B. Zonas específicas de células T, por exemplo, também são ausentes no fígado e essas células também são encontradas no interior dos sinusoides (CRISPE, 2003).

O fígado recebe aporte de sangue de duas fontes: a veia porta e a artéria hepática (VOLLMAR; MENGER, 2009). A presença de linfócitos B no interior de sinusoides permite que estes patrulhem o sangue rico em antígenos alimentares e da microbiota intestinal vindo da veia porta. Observamos que os linfócitos B realmente parecem apresentar comportamento de patrulha dos vasos, emitindo prolongamentos de membrana e se movimentando pela vasculatura, mesmo quando lentamente. É descrita a presença de atividade fagocítica nas células B hepáticas (NAKASHIMA, M. *et al.*, 2012). Os linfócitos B poderiam, assim, se ligar a esses antígenos da circulação portal, através de receptores inatos de reconhecimento de padrão (PRR), fagocitando os antígenos antes que alcancem a circulação sistêmica e contribuindo para esse papel desempenhado pelas células de Kupffer (BILZER; ROGGEL; GERBES, 2006). Por outro lado, seu contato direto com o sangue também poderia permitir uma rápida ativação TI dessas células por antígenos circulantes, permitindo uma rápida resposta contra patógenos invasores vindos do intestino, de forma semelhante ao que acontece com as células B MZ (MARTIN; OLIVER; KEARNEY, 2001).

A localização dos linfócitos B na vasculatura hepática nos levantou a questão se essas células realmente são específicas do fígado e interagem com o órgão ou são

células que estão apenas circulando juntamente com a corrente sanguínea. Para isso, realizamos citometria de fluxo comparando a porcentagem das células B hepáticas em animais perfundidos e não perfundidos. Caso os linfócitos B estivessem apenas de passagem pelo fígado juntamente com o sangue, essas células seriam retiradas pela perfusão e sua presença no fígado iria se reduzir. Entretanto, observamos que a perfusão não alterou a porcentagem de células B hepáticas em nenhuma idade avaliada, indicando que essa população é específica do fígado desde o nascimento até a vida adulta. Outros trabalhos também nos mostram que há uma população de células B no fígado (MORO-SIBILOT *et al.*, 2016a; ZHANG *et al.*, 2013), entretanto sem explorar se essas células estão interagindo com o órgão ou apenas circulando por ele. Assim, a confirmação de que há uma grande população de células B que é específica do fígado ao longo de todo desenvolvimento nos aponta novamente para a importância em estudar e caracterizar as células B no nicho hepático, o qual se difere em relação aos outros órgãos linfoides onde essas células são classicamente descritas.

Outro resultado que nos indica que as células B são específicas do fígado são os experimentos de IVM. Nos vídeos adquiridos podemos observar que muitas células B permanecem no mesmo local durante toda a duração do vídeo, indicando que essas células não são carregadas juntamente com a corrente sanguínea e devem, assim, estarem aderidas ao endotélio por meio da interação de integrinas nas células B com moléculas de adesão nas células endoteliais. A localização das células B em diferentes tecidos, como baço, linfonodos e placas de peyer, é regulada por interações entre moléculas de adesão no endotélio ou células do estroma – como ICAM, VCAM, L-selectina e PSGL-1 – e seus ligantes presentes nas células B – LFA-1, VLA-4, PNA_d e E-selectina (BERLIN *et al.*, 1995; LO; LU; CYSTER, 2003). Na região de zona marginal, por exemplo, as moléculas de adesão VCAM e ICAM são abundantes e interagem com as integrinas VLA-4 e LFA-1 presentes nas células B MZ (LU; CYSTER, 2002). Essa interação retém as células B nesse local permitindo que resistam à força de cisalhamento do fluxo sanguíneo. Células B MZ também expressam S1P1, que interage com a molécula S1P, presente em altas concentrações na corrente sanguínea, promovendo, assim, o direcionamento e retenção das células nessa região de contato com o sangue (CINAMON *et al.*, 2004). Mecanismos semelhantes também poderiam estar atuando nas células B hepáticas, uma vez que também ocupam um nicho na corrente sanguínea.

Sabe-se que as LSEC hepáticas expressam as moléculas de adesão VAP-1 e ICAM-1, com VCAM-1 surgindo em processos inflamatórios (SHETTY; LALOR; ADAMS, 2008). Também é descrita a presença das quimiocinas CXCL16 e CXCL9-11 no fígado (SHETTY; LALOR; ADAMS, 2008). Essas moléculas parecem estar envolvidas no recrutamento de linfócitos para o fígado, com um aumento em CXCL9/CXCR3 e CXCL16/CXCR6 durante infecção com *Schistosoma mansoni* resultando em migração de células B para o fígado (FAIRFAX *et al.*, 2013). Entretanto, ainda é necessário caracterizar quais moléculas permitem a interação de células B com o endotélio hepático em uma situação fisiológica, garantindo o estabelecimento e manutenção das células B no fígado. Da mesma forma, também seria importante avaliar se essas moléculas estão diferencialmente expressas ao longo do desenvolvimento, guiando o estabelecimento de diferentes populações de células B no fígado em cada etapa da vida.

A relação entre células B e células endoteliais (LSEC) pode ir além de uma interação de adesão para manter as células no tecido. LSEC também poderiam apresentar antígenos para as células B, justificando seu contato próximo. Já foi descrito que, devido ao fluxo lento de sangue no fígado, células T circulantes fazem contato com o endotélio. Nesse momento as LSEC apresentam antígenos para células T CD8 (LIMMER *et al.*, 2000) ou T CD4 (KNOLLE *et al.*, 1999) retendo essas células no fígado e induzindo tolerância. Também vale ressaltar que, além da interação com o endotélio, as células B também parecem interagirem entre si. A presença de células B juntas em grupamentos de 2 a 4 células nos vídeos da IVM indicam que essas células podem estar se comunicando por contato direto célula-célula.

Durante a análise das células B hepáticas por IVM, dois tipos celulares distintos foram observados com base em sua morfologia, comportamento e expressão de B220. Nos adultos predominam células com morfologia arredondada e constante, com menor movimentação e alta intensidade de fluorescência para o B220. Além desse tipo celular, neonatos de 1 semana de idade também apresentaram células maiores, com morfologia irregular e variável, muito ativas na movimentação e menor intensidade de fluorescência para B220. Possivelmente há perda dos mecanismos que mantêm essas células aderidas aos sinusoides hepáticos permitindo essa maior movimentação. As características desse último tipo celular se enquadram na descrição de células B ativadas como os plasmablastos. Essas células têm um maior

tamanho como resultado do aumento de seu conteúdo citoplasmático pelos retículos endoplasmáticos necessários à ativa síntese proteica para a produção das imunoglobulinas (SHLOMCHIK; WEISEL, 2012). Sua perda de adesão e maior movimentação pode ser um mecanismo para essas células saírem do fígado e migrarem para a medula, onde geralmente se estabelecem como plasmócitos de vida longa (CHU; BEREK, 2013).

Essas células de maior movimentação poderiam, também, se enquadrar nas características de células B *naive* que patrulham o ambiente hepático por antígenos (MILLER *et al.*, 2002). Miller (2002) descreveu a movimentação de células B e T em linfonodos, mostrando que essas células se movimentam de forma aleatória procurando por antígenos. As células B se movimentam por lamelipódios que estão constantemente se formando e retraindo, no mesmo padrão que encontramos neste trabalho. Além disso, os autores observaram que as células T mudam sua morfologia de acordo com a movimentação, ficando mais alongadas quando se movem rápido e arredondadas quando param. As células paradas apresentaram comportamento de “*probing behaviour*” emitindo projeções de membrana para interagir com outros elementos do ambiente. Essas alterações correspondem ao que observamos, uma vez que células B em movimento alteram muito sua morfologia e ficam mais alongadas enquanto células paradas apresentam formato arredondado e parecem interagir com o ambiente com emissão de prolongamentos. Miller (2002) também observou como as células T se comportavam após desafio com antígeno e dois padrões foram encontrados: um comportamento de *swarming* e a formação de cluster de células paradas. É interessante notar que esses clusters se assemelham aos clusters de células B que encontramos. Nota-se, portanto, que ainda não está claro qual seria a função desse tipo celular e de seu alto padrão de movimentação no fígado, podendo indicar uma patrulha de antígenos por células *naive* ou uma movimentação de células ativadas.

É importante ressaltar que, à primeira vista, o padrão de morfologia, movimentação e patrulha do fígado presente nessas células se assemelham a granulócitos já descritos em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (MATTOS *et al.*, 2020). Entretanto, nos experimentos de controle de marcação do anticorpo, não observamos dupla marcação de B220 com Ly6G, indicando que essas células positivas para B220 são realmente células B e não granulócitos. Também é descrito que neonatos tem diferente proporção das subpopulações de células dendríticas, com

maior presença de dendríticas plasmacitóides que os adultos (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE, 2004). Células dendríticas plasmacitóides receberam esse nome pois se assemelham aos plasmócitos quando vistos ao microscópio. Essas células apresentam fenótipo $CD11c^+ B220^+ NK1.1^- CD19^- CD11b^- Ly6G/C^+$ (ASSELIN-PATUREL *et al.*, 2001; NAKANO; YANAGITA; GUNN, 2001). Pela ausência de dupla marcação para B220 e Ly6G podemos também excluir a possibilidade das células que visualizamos serem células dendríticas plasmacitóides, confirmando sua caracterização como uma célula B. Entretanto, o fígado retém células T ativadas em processo de apoptose e acredita-se que esse órgão seja um local de eliminação desses linfócitos. Essas células T apresentam o seguinte fenótipo: $B220^+ CD4^- CD8^- TCR\alpha\beta^+ CD3^{int} Thy1^{low} J11d^+ Pgp-1^+ Ly6C^{low} CD25^{low}$ (CRISPE, 2003). Observa-se, assim, que também há expressão de B220 nesse tipo celular. Entretanto, os experimentos de citometria nos mostram que uma grande parte da população de NPC hepática é $CD19^+$, com a expressão de B220 e CD19 similar. Podemos inferir, portanto, que a maior parte das células marcadas nas imagens seriam células B. Mas, ainda assim, seria necessário um controle para avaliar a proporção de células que são linfócitos T apoptóticos.

Nosso próximo passo foi caracterizar a quais subpopulações pertencem essas células B presentes no fígado. As células B se subdividem em diferentes subpopulações que apresentam diferenças fenotípicas em marcadores de superfície celular, funcionais, localização anatômica, processo de maturação e ativação celular. Essas subpopulações se dividem nas células B1, que podem ser B1a ou B1b, e B2 (ou convencionais), que englobam células foliculares e da zona marginal (ALLMAN, 2008). Analisamos as diferentes subpopulações de linfócitos B por meio da técnica de citometria de fluxo, que nos permite identificar as populações celulares com base na presença de marcadores de superfície. O perfil de subpopulações de células B do período neonatal foi comparado com o perfil das fases de desenvolvimento fetal e adulta para permitir a identificação das particularidades da fase pós-natal. Ainda, as subpopulações do fígado foram comparadas às subpopulações de células circulantes do sangue e a outros órgãos linfóides já bem descritos como a medula óssea (PLO) e baço (SLO).

Observamos que no período fetal E17 praticamente todas as células B no fígado e no baço são células precursoras, sendo a maioria proB. Esse resultado está de acordo com a principal função do fígado no período fetal como órgão

hematopoiético que produz leucócitos e eritrócitos (EMA; NAKAUCHI, 2000). O baço também é descrito como tendo uma importância nesse processo de hematopoiese fetal, também justificando a presença de grande quantidade de precursores de linfócitos B nesta fase (WOLBER *et al.*, 2002). Por uma limitação técnica não conseguimos isolar células da medula óssea do feto para avaliar se precursores de B já estavam presentes nesse órgão. É descrito que a colonização da medula óssea por células HSC tem início no dia E16.5 (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2020). Assim, provavelmente no dia E17 a quantidade de precursores hematopoiéticos presentes na medula ainda é muito baixa, o que justificaria nossa impossibilidade de isolar essas células na medula óssea nos fetos analisados.

Na primeira semana após o nascimento, há uma redução nos precursores de células B de ambos os órgãos, fígado e baço. No baço, essa redução é acentuada, com os precursores já praticamente desaparecendo do órgão e as células B maduras já predominando entre as subpopulações de B. A redução, porém, é menos acentuada no fígado e este ainda retém uma maioria de precursores. Dentre os precursores, observa-se no fígado uma redução em proB e aumento de preB, resultando em uma mesma proporção de ambos os precursores no órgão. Nessa mesma idade de uma semana, o perfil da medula é igual ao do fígado, ou seja, a maioria das células B são precursores, com proB e preB em uma mesma proporção. Já no sangue, a maioria das células B são imaturas.

O perfil de subpopulações de células B na segunda semana pós-nascimento é semelhante ao perfil da primeira semana. Os precursores no fígado continuam reduzindo e, novamente, observa-se uma redução de proB e aumento de preB, tanto no fígado como na medula, com as preB agora sendo a maioria das células precursoras. As células B imaturas também continuam predominando no sangue. Na terceira semana pós-nascimento os precursores do fígado caem de forma definitiva e as B maduras, que vinham aumentando no fígado desde a primeira semana, atingem os níveis dos adultos agora na terceira semana. Juntamente a esse processo, vemos um aumento de precursores no sangue.

Por fim, na quarta semana pós-nascimento o perfil de células B nos órgãos analisados está estabelecido como nos adultos. No fígado e baço, a maioria das células B são maduras, sendo a maior parte da linhagem B2, como esperado, uma vez que as células B1 estão em maior proporção na cavidade peritoneal (BAUMGARTH, 2011). A medula se estabelece como o único órgão que abriga

precursores de células B, mantendo a proporção maior de preB em relação a proB. No sangue, predominam células B maduras e não mais as imaturas.

Observamos, assim, que diferentes subpopulações de células B estão presentes em cada fase do desenvolvimento pós-natal e apresentam uma diferente dinâmica entre os órgãos.

A redução na quantidade de precursores de células B no fígado e baço na primeira semana pós-natal está de acordo com a redução da atividade hematopoiética nesses órgãos e a passagem de células HSC para a medula óssea ao fim do período gestacional (EMA; NAKAUCHI, 2000). Observamos, entretanto, que esse processo está completo no baço uma semana após o nascimento, mas ainda não está completo no fígado. De acordo com essa presença de precursores de células B no fígado de uma semana observado pela citometria, também foram observados pelo IVM aglomerados de células B no parênquima de neonatos com uma semana de idade, que podem ser remanescentes das ilhas de precursores hematopoiéticos do fígado fetal (KAZUNOBU SASAKI AND YUJI SONODA, 2000). O processo de maturação do fígado ainda continua por um período após o nascimento com a diferenciação dos hepatoblastos (GORDILLO, M.; EVANS; GOUON-EVANS, 2015) e uma modificação da arquitetura do órgão para a formação de cordões de hepatócitos e alongamento dos sinusoides (NAKAGAKI *et al.*, 2018). O processo de remodelamento do órgão ainda na fase neonatal juntamente à retenção de precursores podem ser um indício de que a transição da hematopoiese para as funções adultas ainda está em percurso no fígado neonatal.

Algumas hipóteses podem, então, explicar a dinâmica dos precursores de B no fígado neonatal, que ainda estão presentes no fígado pós-nascimento e reduzem no órgão ao longo das duas primeiras semanas de idade até a finalização desse processo na terceira semana. Primeiro, as células hepáticas precursoras de B remanescentes no órgão vindas do período fetal podem estar morrendo e sendo eliminadas, no próprio fígado ou em outro local.

Por outro lado, o processo de transferência da hematopoiese do fígado para a medula óssea, que se iniciou no período fetal, pode ainda não estar completo ao nascimento e, assim, os precursores do fígado ainda migram para colonizar a medula até entre a segunda e terceira semana pós-natal.

Por fim, os precursores hepáticos podem continuar se diferenciando no fígado durante a fase neonatal e ir colonizar outros órgãos, ou seja, o fígado ainda pode estar

exercendo uma função hematopoiética na fase neonatal. A redução de proB e aumento de preB no fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal pode ser um indício de que a diferenciação dos precursores de células B está em andamento no fígado neonatal, com as células proB formando células preB à medida que se diferenciam. Além disso, nas duas primeiras semanas o fígado apresenta um nível de células imaturas semelhante ou maior que a medula, o que pode também indicar que os precursores do fígado estão se diferenciando até a formação de células imaturas.

Como a maior parte de células B presentes no sangue neonatal são células imaturas, temos um indício mais forte para a terceira hipótese, de diferenciação dos precursores de B no fígado neonatal e sua migração como células imaturas para outros órgãos, e um indício mais fraco para a segunda hipótese, de transferência de precursores do fígado neonatal para a medula, uma vez que os precursores não estão em alta proporção no sangue na primeira e segunda semana, e aumentam apenas na terceira semana.

Acredita-se que o fígado neonatal perca suas funções hematopoiéticas entre os dias 2-4 após o nascimento, quando suas células-tronco migram para a medula (WOLBER *et al.*, 2002). Nossos dados parecem indicar, entretanto, que ainda há uma manutenção de funções hematopoiéticas pelo fígado por um período maior após o nascimento, pelo menos em relação à formação de células B.

Na terceira semana os precursores já não estão presentes no fígado e as células B maduras se tornam a população de B predominante. Isso pode indicar que os precursores podem ter finalizado seu desenvolvimento e formado células maduras que se mantêm no próprio fígado, ou que os precursores saem do fígado, abrindo um nicho para colonização por células B maduras vindas de outro local. Juntamente à queda de precursores no fígado vemos um aumento de precursores no sangue. Assim, é mais provável que os precursores estejam saindo do fígado e indo para o sangue para se estabelecerem em outro local ou serem eliminados do organismo. Entretanto, ambas possibilidades não são excludentes e podem ocorrer juntas, ou seja, alguns precursores podem se diferenciar e formar células B maduras que se mantêm no fígado, mas o restante de precursores que não se diferenciou sai do órgão na terceira semana após o nascimento.

A mudança no perfil das células B hepáticas ocorre, assim, da segunda para a terceira semana após o nascimento. Até a segunda semana pós-nascimento o fígado se assemelha mais à medula óssea, um órgão linfóide primário, e a partir da terceira

semana se assemelha mais ao baço, um órgão linfoide secundário. Ainda é necessário investigar qual o sinal para os precursores de células B reduzirem no fígado, ou seja, qual o sinal necessário para o fígado deixar de ser um órgão hematopoiético. Esses sinais poderiam ser fornecidos por antígenos da microbiota comensal, que passam a deixar o fígado um ambiente “sujo” para esse tipo de processo de diferenciação celular. Fatores provenientes do leite materno também poderiam ser responsáveis por essa sinalização para a saída de precursores hematopoiéticos do fígado.

Assim, é apenas da terceira para a quarta semana que a medula óssea realmente se estabelece como o único órgão que abriga precursores de células B. É também nesse período que as células B2 maduras passam a predominar em relação às B1 no fígado e baço. É descrito uma maior produção de B1 no período fetal e neonatal e a predominância da produção de B2 pela medula óssea adulta (ALLMAN, 2008). Assim, o aumento de B2 na terceira semana pode reforçar a hipótese de que apenas nessa fase do desenvolvimento o fígado perde os precursores e sua atividade hematopoiética e a medula óssea se estabelece como o único órgão linfoide primário.

Temos, portanto, alguns indícios que a alta quantidade de precursores no fígado ainda na primeira e segunda semana pós-natal pode significar que o papel hematopoiético do fígado deve se estender ainda por um período maior após nascimento, com esse órgão ainda contribuindo para a formação de células B no período neonatal.

Para confirmar essa hipótese avaliamos qual o potencial de diferenciação dos precursores de células B presentes no fígado de uma semana. Ou seja, esses precursores ainda podem se diferenciar em células B maduras? E, caso se diferenciem, qual a linhagem predominante? Para isso, transferimos precursores de células B do fígado para animais $Rag^{-/}$. Após a transferência, foi avaliado por citometria quais subpopulações de células B estão presentes no baço, cavidade peritoneal, fígado e medula óssea. Como os animais $Rag^{-/}$ não possuem nenhum tipo de células B no organismo, as células B encontradas nesses órgãos necessariamente tiveram origem dos precursores transferidos para o animal. Dessa forma podemos avaliar se os precursores hepáticos ainda podem se diferenciar em células B e em quais das subpopulações. Também foi realizada a transferência de precursores da medula óssea como um controle para comparação com o potencial dos precursores hepáticos.

A transferência de precursores de B do fígado de uma semana para animais Rag^{-/-} adultos mostrou que essas células possuem o mesmo potencial dos precursores da medula óssea adulta para se diferenciarem e formar células B maduras: ambos podem colonizar a medula e podem se diferenciar em células B maduras que colonizam o baço e a cavidade peritoneal. Isso nos sugere que os precursores de B do fígado neonatal ainda podem contribuir para a formação de células B do organismo pois retém potencial para se diferenciarem em células B maduras.

O perfil das linhagens de células B que se estabeleceram em cada órgão foi como o esperado, com predominância de B2 no baço e B1 na cavidade peritoneal (BAUMGARTH, 2011). É descrito uma maior formação de células B1 nos períodos fetal e neonatal, e uma predominância de formação de células B2 pela medula óssea adulta (ALLMAN, 2008). Entretanto, não houve diferença na linhagem de células B formada pelos precursores do fígado neonatal ou da medula adulta e ambos possuem potencial para diferenciação nas linhagens B1 e B2. Isso pode indicar que a diferenciação nas linhagens é guiada principalmente por fatores do órgão que vai abrigar essas células, e menos por fatores intrínsecos às células, corroborando a hipótese da diferenciação entre as linhagens B1 e B2 por meio de sinais recebidos pelo BCR (CASOLA *et al.*, 2004).

O fígado também é colonizado por precursores. Apesar da proporção ser reduzida em relação à medula, é bem mais elevada em relação ao baço ou cavidade peritoneal. Isso pode indicar que o fígado ainda pode ter o nicho para o estabelecimento de precursores mesmo nos indivíduos adultos. Um indício para essa hipótese é o fato do fígado adulto ser um dos locais predominantes para o estabelecimento de hematopoiese extramedular, que ocorre em situações patológicas no adulto que provocam a saída de HSC da medula óssea e seu estabelecimento em outros locais do organismo (CARDIER; BARBERÁ-GUILLEM, 1997).

Um menor número de células B maduras foram encontradas no fígado em relação ao baço e cavidade peritoneal. Por um lado, isso indica que o fígado também possui sinais para atrair e manter células B maduras no órgão. Mas por outro lado, mostra que o fígado não é o local preferencial para colonização dessas células e estas não possuem um tropismo específico para o fígado mesmo quando os precursores são de origem hepática. Isso pode indicar que as células B formadas pelos precursores hepáticos não vão ter preferência para ficar no fígado e podem sair para colonizar outros órgãos.

Quando precursores de uma semana de idade são transferidos para animais Rag^{-/-} de uma semana de idade, também não vemos diferença no potencial de diferenciação do fígado e da medula. Ambos colonizam todos os órgãos, porém, diferente do observado nos animais adultos, essas células permanecem como precursores e não se diferenciam em células B maduras. Podemos concluir que provavelmente o ambiente neonatal não é propício à diferenciação de células B, o que poderia explicar a ainda grande proporção de células B precursoras e poucas células maduras no período neonatal. O fato de os precursores do fígado de uma semana não terem se diferenciado nos animais receptores de uma semana de idade, mas terem se diferenciado nos receptores de nove semanas, nos traz um forte indício de que o determinante para a diferenciação está no ambiente e é menos intrínseco à célula. Entretanto, para a confirmação dessa hipótese, seria interessante transferir, também, precursores da medula adulta para os animais Rag^{-/-} de uma semana de idade, para confirmar se a diferença é do ambiente ou do potencial de diferenciação das células.

Também é importante observar que a diferença no resultado dos dois experimentos pode ser devido à diferença no tempo para diferenciação após a transferência entre os experimentos. Nos adultos os precursores tiveram 4 semanas para diferenciar enquanto nos neonatos tiveram apenas uma semana. Assim, nos neonatos os precursores podem não ter tido tempo suficiente para colonizar o animal e se diferenciar e talvez, em um tempo maior de experimento, teríamos visto essa diferenciação. Entretanto, se esperarmos as mesmas 4 semanas após a transferência para um neonato de uma semana de idade, este terá 5 semanas no momento da análise. O animal já estará mais velho, passado do momento de desmame e não é mais um neonato. Assim, uma diferenciação nesse experimento poderia ocorrer porque o animal já adquiriu um nicho com as características próximas do adulto, sendo difícil algum tipo de conclusão.

Em cada experimento foi escolhido como controle a medula óssea da mesma idade do animal que estava recebendo as células precursoras para permitir a comparação do fígado com a medula óssea compatível da idade do animal, o que mais se aproxima do que ocorre na realidade. Entretanto, também seria interessante observar o comportamento da medula de uma semana no animal adulto e da medula adulta no animal de uma semana, o que poderia nos ajudar a ampliar as conclusões e confirmar os potenciais intrínsecos das células ou do meio ambiente.

Os experimentos de transferência, portanto, confirmam uma possível atividade hematopoiética no fígado durante a fase neonatal, pelo menos no que diz respeito à formação de células B, e corroboram que o fígado pode ainda formar células B na fase neonatal. No experimento de transferência temos uma condição artificial, onde a inoculação das células por via endovenosa dá condições para que as células alcancem todos órgãos. Entretanto, queríamos avaliar se esse processo de saída de células B do fígado para o estabelecimento em outros órgãos é um processo que naturalmente ocorre nos organismos.

Por meio da fotoconversão apenas de células hepáticas, pudemos observar a presença de células B de origem do fígado em outros órgãos como baço e medula, indicando que células B hepáticas podem sair do fígado e ir para outros órgãos e sugerindo que o fígado ainda poderia fornecer células B para o organismo.

Entretanto, no experimento de fotoconversão conseguimos ter apenas a resolução a nível de células B totais e não sabemos quais são as subpopulações que migram do fígado para os outros locais. A migração poderia ser de células B imaturas que se desenvolvem no fígado, mas saem para colonizar outros órgãos, o que se sustenta pelos resultados da citometria onde observamos a presença de precursores no fígado de uma semana que parecem estar ainda diferenciando para formar células imaturas e uma alta quantidade de células B imaturas no sangue. Também pode estar ocorrendo a migração de precursores de B que saem do fígado para colonizar a medula óssea, apesar da maior porcentagem de células com origem no fígado ser encontrada no baço e não na medula e não encontrarmos a presença de muitos precursores no sangue pela citometria. Essas possibilidades, entretanto, não são excludentes e ambas as situações também podem estar ocorrendo, com a migração de células imaturas para o baço e precursores para a medula.

Também se poderia pensar que células B em processo de morte celular saem do fígado para serem eliminadas nos outros órgãos. Entretanto, a exclusão de células mortas nos *gates* de análise da citometria de fluxo nos mostra que as células de origem hepática encontradas nesses órgãos não são células que estão em morte celular. Por mais que esse processo também possa estar ocorrendo, ele não é exclusivo, e podemos dizer que células vivas migram do fígado para outros órgãos.

No terceiro e sétimo dia pós fotoconversão já não há presença de células B fotoconvertidas em nenhum órgão. O processo de fotoconversão da proteína kaede verde em uma proteína kaede vermelha é irreversível (ANDO *et al.*, 2002). Porém,

ocorre uma perda desse sinal nas células por alguns motivos. As células podem proliferar e as proteínas vermelhas vão se diluindo nas células filhas até o sinal se perder (TOMURA *et al.*, 2008). A proteína kaede pode ser degradada e as novas proteínas kaede formadas são verdes (TOMURA *et al.*, 2008). Por fim a própria célula pode morrer, sendo substituída por outras células não fotoconvertidas que expressam a proteína kaede verde (TOMURA *et al.*, 2008). Esse período em que ainda é possível o rastreamento das células fotoconvertidas seria uma limitação da técnica, pois restringe o tempo em que é possível acompanhar o destino das células fotoconvertidas e o período em que estas se mantêm nos órgãos.

Obtivemos uma fotoconversão inicial de 2% das células CD19. A porcentagem encontrada nos outros órgãos foi cerca de 0,05-0,3%, o que corresponderia à migração de 2,5-15% do total de células fotoconvertidas inicialmente. Outros trabalhos também observam um padrão similar de comportamento das células fotoconvertidas, mesmo com uma porcentagem inicial de fotoconversão maior: cerca de 1-9% do total de células iniciais fotoconvertidas migram para outros órgãos e um dia após a fotoconversão há uma redução de 50% ou mais de células fotoconvertidas no órgão alvo e em 7 dias quase não são identificadas células fotoconvertidas (TOMURA *et al.*, 2008).

Apenas uma pequena área do fígado é fotoconvertida, e todo o órgão é processado ao final para a citometria, o que explica os valores baixos de fotoconversão. Poderíamos tentar aumentar a porcentagem inicial de células fotoconvertidas aumentando o tempo de exposição ao laser. Tentar aumentar a área de cobertura do laser seria mais arriscado pela possibilidade de alcance de outros órgãos ao redor do fígado. Apesar da fotoconversão inicial parecer baixa, ela possui como vantagem ser específica ao fígado e não prejudicou a execução do experimento, sendo possível detectar as células que migraram para outros órgãos.

Também seria importante fazer o experimento de fotoconversão em outras idades para avaliar se há alguma mudança nesse comportamento de migração das células observado na primeira semana pós-natal. A saída de células B do fígado pode se dar, principalmente, em outra idade e não na primeira semana. Da segunda para a terceira semana de idade, por exemplo, há uma queda de precursores no fígado e seu aumento no sangue: poderíamos, assim, ver um maior movimento de células saindo do fígado e uma maior porcentagem nos outros órgãos em animais fotoconvertidos com duas semanas de idade. A fotoconversão de animais adultos também permitiria

avaliar se as células B maduras do fígado são células recirculantes que transitam em outros órgãos. Células B recirculantes poderiam, por exemplo, ser retidas nos sinusoides hepáticos por mecanismos já discutidos acima, com interação com células LSEC na forma de apresentação de antígeno ou interação com moléculas de adesão. Assim, o fígado também seria um nicho para células B que recirculam entre os órgãos periféricos. Entretanto, seria necessário a padronização da mesma porcentagem de fotoconversão inicial para ser possível a comparação entre os animais de diferentes idades, uma vez que por diferenças de tamanho do animal e espessura da pele, o nível de fotoativação deve ser diferente entre os animais de diferentes idades.

Assim, corroborando a hipótese de que o fígado pós-natal ainda poderia contribuir para a formação de células B do organismo, confirmamos que os precursores hepáticos de células B tem o potencial de se diferenciarem em células B maduras e que as células B hepáticas podem se deslocar para outros órgãos.

Observamos que neonatos apresentam um perfil geral de células B mais imaturo enquanto os adultos apresentam um perfil mais maduro. Esse dado confirma a concepção de uma certa imaturidade do sistema imune neonatal (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE, 2004). O perfil de células B, portanto, não está estabelecido ao nascimento e esse processo continua no período pós-natal, o que é demonstrado pelo predomínio de células B imaturas na circulação nas duas primeiras semanas pós-nascimento. Visto que o período neonatal é marcado por um predomínio de células B precursoras e imaturas e o estabelecimento da população de células B maduras ocorre mais tardiamente no desenvolvimento, procuramos identificar os níveis de imunoglobulinas séricas ao longo do desenvolvimento pós-natal e como ocorre o estabelecimento da dinâmica de produção própria e do fornecimento de imunoglobulinas pela mãe.

O anticorpo mais abundante no leite das mães foi o IgG, seguido de IgA e IgM, o que também foi observado nos estudos de Zheng (2020).

A dosagem das imunoglobulinas IgM e IgA em animais WT aumenta gradualmente com o desenvolvimento e estas atingem quantidade semelhante ao adulto apenas na quarta semana. Não há transmissão de IgM e IgA do leite materno para a circulação dos animais. Essas imunoglobulinas passam da mãe para o filhote pelo leite materno, uma vez que estão presentes no leite. Entretanto, elas não são transportadas para a circulação sanguínea e sua atuação deve ficar restrita ao lúmen intestinal, sendo necessário a dosagem desses anticorpos no lavado intestinal para

confirmar essa hipótese. A transferência de IgA pelo leite materno e sua manutenção apenas no lúmen intestinal é descrita por Rogier (2014) e o IgA presente no lúmen intestinal dos neonatos ajuda a formar a barreira intestinal e moldar a composição da microbiota (ROGIER *et al.*, 2014).

O transporte de anticorpos do leite materno para a circulação do filhote é seletivo para IgG. Zheng (2020) também demonstrou que o IgG do leite materno é transferido para o filhote e seu transporte para o soro ocorre por meio dos receptores FcRn presentes no epitélio intestinal (ROOPENIAN; AKILESH, 2007; ZHENG *et al.*, 2020). Observamos que, assim como IgA e IgM, a produção própria de IgG também aumenta com o desenvolvimento atingindo níveis semelhantes aos adultos a partir da quarta semana de idade.

O predomínio de anticorpos com origem do leite materno e o aumento da produção própria apenas após o desmame também foi observado por Zheng (2020) e Rogier (2014). Percebemos que a produção própria de imunoglobulinas do indivíduo se estabelece apenas na quarta semana, na mesma época em que o perfil de células B se estabelece no indivíduo e fica igual o adulto, com predomínio das células maduras. Assim, o estabelecimento de população de B madura e capacidade de produção própria de anticorpo se correlacionam.

A produção própria de IgM e IgA aumenta precocemente quando não há contribuição de nenhum anticorpo do leite materno. Isso pode ser um indício de que a presença de anticorpos do leite materno inibe a produção própria do indivíduo, ou seja, o IgG, atuando a nível sérico, e o IgM e IgA, atuando a nível intestinal, podem estar inibindo a produção das imunoglobulinas do filhote. Quando se retira esses anticorpos vindos do leite materno, a produção própria de imunoglobulinas dos filhotes, portanto, se eleva. A atuação de anticorpos de origem materna inibindo a produção de anticorpo em neonatos já foi demonstrada em trabalhos onde a transferência de anticorpos de uma mãe vacinada para o filhote inibe a produção de anticorpos no filhote quando este é desafiado pelo patógenos (VONO *et al.*, 2019).

A princípio esse fenômeno parece contraintuitivo: os anticorpos vindos da mãe inibirem o indivíduo de produzir os próprios anticorpos parece um desfecho ruim. Entretanto, inibir a ativação de células B para a produção de anticorpos na fase neonatal pode ser algo necessário. A mãe prove proteção de anticorpos para o filho na fase neonatal, que então não precisa ativar suas próprias células B para produção de anticorpos. Isso seria importante nessa fase do desenvolvimento para evitar uma

ativação inadequada das células B a antígenos que devem ser tolerados. Já foi demonstrado, por exemplo, que IgG transferido da mãe para filhotes pelo leite materno limita a resposta adaptativa da mucosa dos neonatos aos antígenos comensais recém adquiridos, reduzindo a ativação de células Tfh e B (KOCH *et al.*, 2016). O anticorpo proveniente da mãe, portanto, reduz a ativação de B evitando uma resposta dessas células à nova microbiota comensal.

Percebemos então que o estabelecimento das populações de células B no organismo ainda está em processo após o nascimento e, assim, a fase neonatal também irá constituir um período importante no desenvolvimento e formação de células B. A presença de uma alta porcentagem de precursores de B no fígado dos neonatos de uma semana indica que o fígado neonatal pode ter uma importante contribuição para a formação do pool de células B do organismo. Entretanto ainda fica o questionamento: por que seria importante manter a formação de B no fígado neonatal?

O organismo tem contato com antígenos ambientais pela primeira vez logo após o nascimento e no início do período neonatal. Como o fígado recebe pela veia porta uma grande quantidade desses antígenos da alimentação e da microbiota intestinal, o fígado pode ser um importante nicho para o desenvolvimento do pool de células B sendo importante na seleção do repertório de células B por antígenos alimentares e da microbiota. Manter a formação de células B ainda no período neonatal seria, portanto, uma importante estratégia por permitir que as células que vão formar o pool de B tenham contato com esses novos antígenos. Como a especificidade e sinalização pelo BCR guiam o destino das células B nas diferentes subpopulações, a presença dos antígenos portais tornaria o microambiente hepático um local único na seleção dos diferentes repertórios para as subpopulações.

Por outro lado, o fígado também apresenta uma expressiva população de células B na idade adulta. O fígado pode ser um importante local para desenvolvimento de tolerância periférica nas células B a partir de antígenos alimentares e da microbiota vindos do intestino pelo sistema porta. Por outro lado, em uma situação em que há invasão de patógeno ou antígeno estranho vindo do intestino, a presença de grande quantidade de células B patrulhando o sistema vascular hepático seria importante pois o fígado é um dos primeiros locais aonde esses antígenos chegariam via sistema porta. As células B hepáticas poderiam, assim, responder rapidamente ao antígeno antes que ele alcance outros locais.

7. CONCLUSÕES

Observamos com este trabalho que células B órgão-específicas são encontradas no fígado durante todas as fases do desenvolvimento pós-natal. Essas células B estão localizadas no interior dos sinusoides hepáticos e também em aglomerados no parênquima de animais de 1 semana de idade. O perfil da subpopulação de células B muda ao longo do desenvolvimento pós-natal: o fígado de 1 e 2 semanas é semelhante a um órgão linfoide primário, como a medula óssea, apresentando um alto número de precursores de células B. Entretanto, a partir de 3 semanas, o fígado é semelhante a um órgão linfoide secundário, como o baço, com um alto número de células B maduras. Esses precursores de células B presentes no fígado de 1 semana tem o potencial de se diferenciarem em células B maduras e migrar para outros órgãos. Por fim, o perfil de imaturidade de células B na fase neonatal se reflete na reduzida produção própria de anticorpos nos neonatos, o qual é suprido pelo fornecimento de IgG pelo leite materno.

REFERÊNCIAS

- ADKINS, Becky. Development of Neonatal Th1/Th2 Function. **International Reviews of Immunology**, [s. l.], v. 19, n. 2–3, p. 157–171, 2000.
- ADKINS, Becky; LECLERC, Claude; MARSHALL-CLARKE, Stuart. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 553–564, 2004.
- AIZARANI, Nadim *et al.* A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. **Nature**, [s. l.], v. 572, n. 7768, p. 199–204, 2019.
- ALEXANDER, Barry; GUZAIL, Muna A.; FOSTER, Christopher S. Morphological changes during hepatocellular maturity in neonatal rats. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 248, n. 1, p. 104–109, 1997.
- ALLMAN, Shiv Pillai and David. Peripheral B cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], p. 149–157, 2008.
- ALLMAN, David *et al.* Resolution of Three Nonproliferative Immature Splenic B Cell Subsets Reveals Multiple Selection Points During Peripheral B Cell Maturation. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 167, n. 12, p. 6834–6840, 2001.
- ALVAREZ-SILVA, Marcio *et al.* Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development**, [s. l.], v. 130, n. 22, p. 5437–5444, 2003.
- ANDO, Ryoko *et al.* An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 20, p. 12651–12656, 2002.
- ASSELIN-PATUREL, Carine *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 1144–1150, 2001.
- AYDIN, Mehmet Şerif *et al.* Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 14289, 2018.
- BALOGH, Péter *et al.* Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 214, n. 1, p. 45–53, 2001.
- BAUMGARTH, Nicole. The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 34–46, 2011.
- BERLIN, C. *et al.* A4 Integrins Mediate Lymphocyte Attachment and Rolling Under Physiologic Flow. **Cell**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 413–422, 1995.
- BILZER, Manfred; ROGGEL, Frigga; GERBES, Alexander L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liver International**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1175–1186, 2006.
- BLOM, K G *et al.* Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 155, n. 2, p. 320–329, 2009.
- BORTNICK, Alexandra *et al.* Long-Lived Bone Marrow Plasma Cells Are Induced Early in Response to T Cell-Independent or T Cell-Dependent Antigens. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 188, n. 11, p. 5389–5396, 2012.

- CARDIER, J E; BARBERÁ-GUILLEM, E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells: Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. **Hepatology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 165–175, 1997.
- CARIAPPA, Annaiah *et al.* Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. **Immunity**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 397–407, 2005.
- CARSETTI, Rita; KÖHLER, Georges; LAMERS, Marinus C. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 181, n. 6, p. 2129–2140, 1995.
- CASOLA, Stefano *et al.* B cell receptor signal strength determines B cell fate. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 317–327, 2004.
- CERUTTI, Andrea; COLS, Montserrat; PUGA, Irene. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 118–132, 2013.
- CHOU, Song; LODISH, Harvey F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 17, p. 7799–7804, 2010.
- CHU, Van T.; BEREK, Claudia. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 251, n. 1, p. 177–188, 2013.
- CINAMON, Guy *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 713–720, 2004.
- CRAWFORD, Laura Wilding; FOLEY, Julie F.; ELMORE, Susan A. Histology Atlas of the Developing Mouse Hepatobiliary System with Emphasis on Embryonic Days 9.5-18.5. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 872–906, 2010.
- CRISPE, Ian Nicholas. Hepatic T cells and liver tolerance. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 51–62, 2003.
- CUMANO, Ana *et al.* Intraembryonic, but Not Yolk Sac Hematopoietic Precursors, Isolated before Circulation, Provide Long-Term Multilineage Reconstitution. **Immunity**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 477–485, 2001.
- DIEHL-JONES, William; FRASER ASKIN, Debbie. The Neonatal Liver, Part 1: Embryology, Anatomy, and Physiology. **Neonatal Network**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 5–12, 2002.
- DRAYTON, Danielle L. *et al.* Lymphoid organ development: From ontogeny to neogenesis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 344–353, 2006.
- EMA, Hideo; NAKAUCHI, Hiromitsu. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. [s. l.], v. 95, n. 7, p. 6, 2000.
- EMAMBOKUS, Nikla R; FRAMPTON, Jonathan. The Glycoprotein IIb Molecule Is Expressed on Early Murine Hematopoietic Progenitors and Regulates Their Numbers in Sites of Hematopoiesis. **Immunity**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 33–45, 2003.

- FAIRFAX, Keke C. *et al.* Regulation of the Development of the Hepatic B Cell Compartment during *Schistosoma mansoni* Infection. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 191, n. 8, p. 4202–4210, 2013.
- FENG, Zipei *et al.* Multispectral Imaging of T and B Cells in Murine Spleen and Tumor. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 196, n. 9, p. 3943–3950, 2016.
- GEKAS, Christos *et al.* The Placenta Is a Niche for Hematopoietic Stem Cells. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 365–375, 2005.
- GODIN, Isabelle; CUMANO, Ana. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 593–604, 2002.
- GORDILLO, Miriam; EVANS, Todd; GOUON-EVANS, Valerie. Orchestrating liver development. **Development (Cambridge)**, [s. l.], v. 142, n. 12, p. 2094–2108, 2015.
- GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V. Orchestrating liver development. **Development**, [s. l.], v. 142, n. 12, p. 2094–2108, 2015.
- GOULDER, Philip JR *et al.* Paediatric HIV infection: correlates of protective immunity and global perspectives in prevention and management. **British Medical Bulletin**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 89–108, 2001.
- GROSSI, C E; VELARDI, A; COOPER, M D. Postnatal liver hemopoiesis in mice: generation of pre-B cells, granulocytes, and erythrocytes in discrete colonies. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 2303–2311, 1985.
- GRUPPUSO, Philip A; SANDERS, Jennifer A. Regulation of liver development: implications for liver biology across the lifespan. **Journal of Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. R115–R125, 2016.
- GUNEWARDENA, Sumedha S. *et al.* Deciphering the developmental dynamics of the mouse liver transcriptome. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1–29, 2015.
- GUO, Yuanbiao *et al.* Relationships between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2009.
- HARDY, Richard. Resolution and characterization of Pro-B and Pre-Pro-B stages in normal mouse bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], 1991.
- HARDY, Richard R; HAYAKAWA, Kyoko. B cell development pathways. [s. l.], p. 595–621, 2001.
- JACKSON, Thomas R.; LING, Rebecca E.; ROY, Anindita. The Origin of B-cells: Human Fetal B Cell Development and Implications for the Pathogenesis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 637975, 2021.
- JENNE, Craig N.; KUBES, Paul. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 996–1006, 2013a.
- JENNE, Craig N.; KUBES, Paul. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 996–1006, 2013b.

KAJIKHINA, K.; TSUNETO, M.; MELCHERS, F. B-Lymphopoiesis in Fetal Liver, Guided by Chemokines. *Em: ADVANCES IN IMMUNOLOGY*. [s. l.]: Elsevier, 2016. v. 132, p. 71–89. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277616300360>. Acesso em: 29 abr. 2023.

KAZUNOBU SASAKI AND YUJI SONODA. **Histometrical and Three-Dimensional Analyses of Liver Hematopoiesis in the Mouse Embryo**. [s. l.: s. n.], 2000.

KHAN, Jalal A. *et al.* Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. **Science**, [s. l.], v. 351, n. 6269, p. 176–180, 2016.

KNOLLE, P. A. *et al.* Induction of cytokine production in naive CD4+ T cells by antigen- presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward T(h1) cells. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 116, n. 6, p. 1428–1440, 1999.

KOCH, Meghan A. *et al.* Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. **Cell**, [s. l.], v. 165, n. 4, p. 827–841, 2016.

KWAK, Kihyuck; AKKAYA, Munir; PIERCE, Susan K. B cell signaling in context. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 963–969, 2019.

LANDRETH, K S. Critical windows in development of the rodent immune system. **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 21, n. 9–10, p. 493–498, 2002.

LEE, Janice S *et al.* Transcriptional ontogeny of the developing liver. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 33, 2012.

LIMMER, Andreas *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1348–1354, 2000.

LO, Charles G.; LU, Theresa T.; CYSTER, Jason G. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 197, n. 3, p. 353–361, 2003.

LU, Li Sheng *et al.* Identification of a germ-line pro-B cell subset that distinguishes the fetal/neonatal from the adult B cell development pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 3007–3012, 2002.

LU, Theresa T.; CYSTER, Jason G. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. **Science**, [s. l.], v. 297, n. 5580, p. 409–412, 2002.

MACPARLAND, Sonya A. *et al.* Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 4383, 2018.

MADDUR, Mohan S. *et al.* Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 213–228, 2020.

MADOFF, L C *et al.* Protection of neonatal mice from group B streptococcal infection by maternal immunization with beta C protein. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 4989–4994, 1992.

MARQUES, Pedro E. *et al.* Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 258–268, 2015.

- MARSHALL-CLARKE, Stuart *et al.* Neonatal immunity: How well has it grown up?. **Immunology Today**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 35–41, 2000.
- MARTIN, F.; OLIVER, A. M.; KEARNEY, J. F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. **Immunity**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 617–629, 2001.
- MATTOS, Matheus Silvério *et al.* Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 1199–1213, 2020.
- MEDVINSKY, Alexander; DZIERZAK, Elaine. Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. **Cell**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 897–906, 1996.
- MIKKOLA, Hanna K. A.; ORKIN, Stuart H. The journey of developing hematopoietic stem cells. **Development**, [s. l.], v. 133, n. 19, p. 3733–3744, 2006.
- MILLER, Mark J. *et al.* Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. **Science**, [s. l.], v. 296, n. 5574, p. 1869–1873, 2002.
- MONTECINO-RODRIGUEZ, Encarnacion; LEATHERS, Hyosuk; DORSHKIND, Kenneth. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 293–301, 2006.
- MORO-SIBILOT, Ludovic *et al.* Mouse and Human Liver Contain Immunoglobulin A–Secreting Cells Originating From Peyer’s Patches and Directed Against Intestinal Antigens. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 151, n. 2, p. 311–323, 2016a.
- MORO-SIBILOT, Ludovic *et al.* Mouse and Human Liver Contain Immunoglobulin A–Secreting Cells Originating From Peyer’s Patches and Directed Against Intestinal Antigens. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 151, n. 2, p. 311–323, 2016b.
- MORRISON, S. J. *et al.* The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 92, n. 22, p. 10302–10306, 1995.
- MOSHAGE, Han. Cytokines and the hepatic acute phase response. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 181, n. 3, p. 257–266, 1997.
- MUTHUKKUMAR, Subramanian; GOLDSTEIN, Julia; STEIN, Kathryn E. The Ability of B Cells and Dendritic Cells to Present Antigen Increases During Ontogeny. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 165, n. 9, p. 4803–4813, 2000.
- NAKAGAKI, Brenda Naemi *et al.* Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 2018.
- NAKANO, H.; YANAGITA, M.; GUNN, M. D. CD11c+B220+Gr-1+ cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 194, n. 8, p. 1171–1178, 2001.
- NAKASHIMA, M. *et al.* Pivotal Advance: Characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 537–546, 2012.
- NAKASHIMA, Masahiro *et al.* Pivotal Advance: Characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 537–546, 2012.

PEREIRA, João. Cannabinoid receptor 2 mediates retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. **Nature Immunology**, [s. l.], p. 403–411, 2009.

PIHLGREN, Maria *et al.* Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 939–946, 2001.

PIHLGREN, Maria *et al.* Unresponsiveness to Lymphoid-Mediated Signals at the Neonatal Follicular Dendritic Cell Precursor Level Contributes to Delayed Germinal Center Induction and Limitations of Neonatal Antibody Responses to T-Dependent Antigens. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 170, n. 6, p. 2824–2832, 2003.

PILLAI, Shiv; CARIAPPA, Annaiah. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 767–777, 2009.

RANGEL, Josefa M. *et al.* Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 603–609, 2005.

ROBINSON, Mark W.; HARMON, Cathal; O'FARRELLY, Cliona. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 267–276, 2016.

ROGIER, Eric W. *et al.* Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 8, p. 3074–3079, 2014.

ROLINK, Antonius G.; ANDERSSON, Jan; MELCHERS, Fritz. Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 197, p. 41–50, 2004.

ROOPENIAN, Derry C.; AKILESH, Shreeram. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 715–725, 2007.

SELVARAJ, Uma Maheswari *et al.* Heterogeneity of B Cell Functions in Stroke-Related Risk, Prevention, Injury, and Repair. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 729–747, 2016.

SHAH, Birju A; PADBURY, James F. Neonatal sepsis: An old problem with new insights. **Virulence**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 170–178, 2014.

SHETTY, Shishir; LALOR, Patricia F.; ADAMS, David H. Lymphocyte recruitment to the liver: Molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis. **Toxicology**, [s. l.], v. 254, n. 3, p. 136–146, 2008.

SHLOMCHIK, Mark J.; WEISEL, Florian. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 247, n. 1, p. 52–63, 2012.

SIMINOVITCH, L.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 327–336, 1963.

SOARES-DA-SILVA, Francisca *et al.* Crosstalk Between the Hepatic and Hematopoietic Systems During Embryonic Development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, p. 612, 2020.

SUGIYAMA, Yoshinori; KOIKE, Toru; SHIOJIRI, Nobuyoshi. Developmental Changes of Cell Adhesion Molecule Expression in the Fetal Mouse Liver. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 293, n. 10, p. 1698–1710, 2010.

- SUN, Cheng-Ming *et al.* Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. **Blood**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 585–591, 2003.
- TAS, Jeroen M.J. *et al.* Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. **Science**, [s. l.], v. 351, n. 6277, p. 1048–1054, 2016.
- TOMURA, Michio *et al.* Monitoring cellular movement *in vivo* with photoconvertible fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 31, p. 10871–10876, 2008.
- TONEGAWA, Susumu. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, [s. l.], v. 302, n. 5909, p. 575–581, 1983.
- TSUNETO, Motokazu *et al.* B-Cell Progenitors and Precursors Change Their Microenvironment in Fetal Liver During Early Development. **Stem Cells**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2800–2812, 2013.
- VICTORA, Gabriel D.; NUSSENZWEIG, Michel C. Germinal centers. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 30, p. 429–457, 2012.
- VOLLMAR, Brigitte; MENGER, Michael D. The hepatic microcirculation: Mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 1269–1339, 2009.
- VONO, Maria *et al.* Maternal Antibodies Inhibit Neonatal and Infant Responses to Vaccination by Shaping the Early-Life B Cell Repertoire within Germinal Centers. **Cell Reports**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1773–1784.e5, 2019.
- WESTRÖM, Björn *et al.* The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. June, 2020.
- WISSE, Eddie *et al.* Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 100–111, 1996.
- WOLBER, Frances M. *et al.* Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1010–1019, 2002.
- ZAMAN, K. *et al.* Effectiveness of Maternal Influenza Immunization in Mothers and Infants. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 359, n. 15, p. 1555–1564, 2008.
- ZHANG, H. *et al.* Hepatic B cells are readily activated by Toll-like receptor-4 ligation and secrete less interleukin-10 than lymphoid tissue B cells. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 173, n. 3, p. 473–479, 2013.
- ZHENG, Wen *et al.* Microbiota-targeted maternal antibodies protect neonates from enteric infection. **Nature**, [s. l.], v. 577, n. 7791, p. 543–548, 2020.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Suplementar 1: vídeo 1w

Suplementar 2: vídeo 3w

Suplementar 3: vídeo 8w

Suplementar 4: 3D 1w

Suplementar 5: 3D 3w

Suplementar 6: 3D 8w

Suplementar 7: vídeo aglomerado

Suplementar 8: vídeo grupo de 2-4 células

Suplementar 9: vídeo célula aderida ao sinusoide

Suplementar 10: vídeo célula grande

Suplementar 11: vídeo célula pequena redonda