

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Sarah Campos de Sales

**IMPACTO DA DEFICIÊNCIA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXCR6 NA
RESPOSTA HEPÁTICA A INFECÇÕES**

Belo Horizonte
2024

Sarah Campos de Sales

**IMPACTO DA DEFICIÊNCIA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXCR6 NA
RESPOSTA HEPÁTICA A INFECÇÕES**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

2024

043

Sales, Sarah Campos de.

Impacto da deficiência do receptor de quimiocina CXCR6 na resposta hepática a infecções [manuscrito] / Sarah Campos de Sales. – 2024.

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

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

1. Biologia Celular. 2. Células T Matadoras Naturais. 3. Fígado. 4. Sistema Imunitário. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE SARAH CAMPOS DE SALES

Às **quatorze horas** do dia **20 de agosto de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"IMPACTO DA DEFICIÊNCIA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXCR6 NA RESPOSTA HEPÁTICA A INFECÇÕES"**, requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADA
Dr. Caio Tavares Fagundes	UFMG	APROVADA
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

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

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Dr. Caio Tavares Fagundes _____

Dr^a. Erika Cristina Jorge _____

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 22/08/2024, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2024, às 11:51, 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 **Caio Tavares Fagundes, Subcoordenador(a)**, em 22/08/2024, às 12:54, 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 3483994 e o código CRC 26E94593.

*Ao Angelo e a Lucília, cujos valores e
princípios me norteiam.*

AGRADECIMENTOS

Nunca desejei ser mestre, mas sempre sonhei em fazer um mestrado. O título nunca me encantou, mas o caminho, sim. Conhecer a ciência e seus processos foi meu propósito. Sempre busquei compreender o porquê e o sentido das coisas, acreditando que a ciência pudesse me trazer essas respostas. No entanto, ela me presenteou com ainda mais perguntas. Descobri, então, que a ciência é uma busca infinita pelo "porquê", onde a solução de uma questão sempre revela outra. Um mergulho no desconhecido infinito. Talvez, a busca pelo sentido das coisas seja, ela mesma, o verdadeiro sentido. Agradeço, portanto, àqueles que compreendem e, acima de tudo, incentivam minha "busca".

Agradeço primeiramente ao meu pai, Angelo, e à minha mãe, Lucília, que compartilharam comigo a paixão pelas profissões de cirurgião-dentista e professora, respectivamente. Suas vidas e ensinamentos foram a base sólida sobre a qual construí minha jornada profissional. Ao Henrique, que, com seu amor pela profissão, me motiva, e à Maro, cuja trajetória como cientista foi uma fonte de inspiração. Não posso esquecer de Raul, meu sobrinho e afilhado, cuja presença é alegria e renovação. Agradeço profundamente ao Luís, cujo apoio incondicional e incentivo constante foram essenciais para superar os desafios dessa jornada. E a minha família, em geral, merece um agradecimento especial pelo suporte constante e amoroso.

Não posso deixar de mencionar meus colegas de trabalho da Fhemig, FAMINAS, UNIPAC, Virtus, Logus, Horal e Simone que, compreendendo os desafios dos horários, foram sempre sensíveis e solidários; e meus amigos, que foram suporte emocional inabalável.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram diretamente para a construção deste trabalho. Primeiramente, ao Prof. Dr. Gustavo, que me apresentou um novo universo, uma nova forma de ver o mundo e, com muita paciência, me ensinou desde os processos laboratoriais até o raciocínio científico. Além de orientador, se tornou um importante amigo. Agradeço aos amigos do laboratório, que com sua inteligência inspiradora, transformaram uma simples convivência em algo enriquecedor e memorável. Também agradeço à Profa. Dra. Mila, pela doação das bactérias *E. Coli*,

à Cícera e ao Prof. Dr. Aristóbolo, pela doação de reagentes, e ao Prof. Dr. Roberto Botelho, pela doação da *E. Coli RFP*. Cada um desempenhou um papel crucial nesta jornada, e sou eternamente grata pelas contribuições.

Este trabalho é um reflexo do apoio e amor que recebi ao longo do caminho. A todos os supracitados, meu mais sincero agradecimento.

“... ao aprendermos mais sobre o mundo, acabamos por criar mais ignorância; as novas perguntas que podemos fazer que, antes, não podiam ser antecipadas. Ou seja, o conhecimento gera novos desconhecimentos.”

(GLEISER, 2016)

RESUMO

O fígado desempenha um papel fundamental na homeostase do organismo, não apenas em funções metabólicas, mas também imunológicas. Ele abriga inúmeras células imunes, destacando-se as células Natural Killer T (NKT), que se apresentam em maior proporção no fígado em comparação com outros tecidos corporais. Essas células combinam características das células T e células NK, expressando receptores de superfície típicos desses dois tipos celulares. As NKTs exibem expressão diferencial de receptores de acordo com os tecidos ou locais de inflamação, sendo notável sua expressão de CXCR6 no fígado. Nesse contexto, o presente estudo visou compreender o papel do receptor de quimiocina CXCR6 no fígado. Para tanto, foram utilizados animais C57BL/6 com o genótipo CXCR6, homo e heterozigotos, e animais do tipo selvagem (WT). A dinâmica das células CXCR6+ foi avaliada ao longo da vida por meio de microscopia intravital confocal, revelando que camundongos adultos apresentam menor número de células CXCR6+ por campo e que estas migram ao longo dos sinusoides hepáticos. Enquanto isso, em neonatos, observou-se um maior número de células que permaneciam estacionárias. Além disso, foi avaliada a resposta imune hepática na ausência de CXCR6, utilizando um modelo de infecção por *E. coli*. Comparativamente, os camundongos WT apresentaram uma reação mais grave à infecção, enquanto os animais com depleção de CXCR6 exibiram uma resposta mais branda, avaliada por meio de taxas de mortalidade, variação de peso e aspectos clínicos, além de quantificação de unidades formadoras de colônias no fígado. Por meio de microscopia confocal intravital, observou-se que a ausência do receptor CXCR6 resultou em um menor aumento no número de células GFP+ ao longo do tempo em comparação com animais que apresentavam o receptor. Esses achados fornecem dados importantes sobre como o receptor CXCR6 influencia na resposta à infecção, já que sua ausência parece estar associada a um estado menos inflamatório e menos danoso ao fígado do camundongo. Assim, compreender esses mecanismos pode abrir novas perspectivas terapêuticas para o manejo de doenças hepáticas inflamatórias e infecciosas, contribuindo para avanços significativos na prática clínica.

Palavras-chave: Células T Natural Killer; Fígado; Sistema Imune.

ABSTRACT

The liver plays a fundamental role in the organism's homeostasis, not only in metabolic functions but also in immunological ones. It harbors numerous immune cells, with Natural Killer T (NKT) cells standing out for their highest proportion compared to other body tissues. These cells combine features of both T cells and NK cells, expressing typical surface receptors of these cell types. NKT cells exhibit differential receptor expression according to tissues or sites of inflammation, notably expressing CXCR6 in the liver. In this context, the present study aimed to understand the role of the chemokine receptor CXCR6 in the liver. To achieve this, animals with the CXCR6GFP/GFP genotype, homozygous and heterozygous, as well as wild-type (WT) animals, were used. The dynamics of CXCR6⁺ cells were evaluated throughout life using intravital confocal microscopy analysis, revealing that adult mice have fewer CXCR6⁺ cells per field, which migrate along hepatic sinusoids. In contrast, neonates showed a greater number of stationary cells. Additionally, hepatic immune response in the absence of CXCR6 was evaluated using an *E. coli* infection model. Comparatively, WT mice exhibited a more severe reaction to infection, whereas CXCR6-depleted animals displayed a milder response, assessed through mortality rates, clinical aspects, weight variation, and quantification of colony-forming units in the liver. Intravital confocal microscopy showed that the absence of the CXCR6 receptor resulted in less expansion of GFP⁺ cells over time compared to animals with the receptor. These findings provide significant insights into how the CXCR6 receptor influences infection response. Its absence appears associated with a less inflammatory and less damaging state to the mouse liver. Understanding these mechanisms may offer new therapeutic perspectives for managing inflammatory and infectious liver diseases, contributing to significant advances in clinical practice.

Keywords: T-Cells, Natural Killer; liver; Immune System

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação entre apresentação de células CXCR6+ em camundongos adultos e neonatos.	25
Figura 2. Comparação entre apresentação de células em camundongos CXCR6 ^{GFP/WT} e CXCR6 ^{GFP/GFP} adultos.	27
Figura 3. Padronização de modelo de infecção hepática por <i>E. coli</i> em animais WT adultos.....	28
Figura 4. Avaliação da presença de bactérias no fígado de camundongos WT adultos	30
Figura 5. Avaliação da infecção por <i>E. coli</i> 10 ⁶ em animais adultos WT, CXCR6 ^{GFP/WT} e CXCR6 ^{GFP/GFP}	31
Figura 6. Comparação entre apresentação de células CXCR6+ em camundongos CXCR6 ^{GFP/WT} sem infecção, e 12 e 24 horas após a infecção por <i>E.coli</i>	33
Figura 7. Comparação entre apresentação de células em camundongos adultos CXCR6 ^{GFP/WT} e CXCR6 ^{GFP/GFP} sem infecção, e 12 e 24 horas após a infecção por <i>E.coli</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM-10: A *Disintegrin and Metalloproteinase 10*
ADAM-17: A *Disintegrin and Metalloproteinase 17*
CEBIO/ICB: Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas
CD1d: *Cluster of Differentiation 1d*
CFU: Unidade Formadora de Colônia (*Colony Forming Unit*)
CXCL16: C-X-C Motif Chemokine Ligand 16
CXCR6: C-X-C Motif Chemokine Receptor 6
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
E. coli: *Escherichia coli*
GFP: Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
GPCRs: Receptores Acoplados à Proteína G (*G-Protein-Coupled Receptors*)
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ : Interferon Gama
IL-1 β : Interleucina 1 Beta
IL-2: Interleucina 2
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-15: Interleucina 15
IL-18: Interleucina 18
IL-21: Interleucina 21
IL-33: Interleucina 33
IVM: Microscopia Intravital (*Intravital Microscopy*)
KC: Célula de Kupffer
LPS: Lipopolissacarídeo
MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal
NK: Células Natural Killer
NKT: Células Natural Killer T
OD600: Densidade Óptica a 600 nm (*Optical Density at 600 nm*)
PCR: Reação em Cadeia Polimerase
RFP: Proteína Vermelha Fluorescente (*Red Fluorescent Protein*)
RNA: Ácido Ribonucleico

SIV: Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simian Immunodeficiency Virus*)

STRL33: *Seven-Transmembrane Receptor, Lymphocyte-Specific*

TCR: Receptor de Células T (*T Cell Receptor*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TYMSTR: *Tympanic Sympathetic Trunk Resection*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WT: Tipo Selvagem (*Wild Type*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivos gerais	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Animais	19
3.2	Micro-organismos	19
3.3	Microscopia intravital confocal camundongos	22
3.4	Análises estatísticas.....	23
4	RESULTADOS	24
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O fígado desempenha um papel central no sistema digestório, sendo fundamental tanto para o metabolismo quanto para a desintoxicação do organismo. Embora tradicionalmente não seja classificado como um órgão imunológico primário, sua função nas respostas imunes é crucial e não deve ser subestimada (WEILER-NORMANN; REHERMANN, 2004; JENNE; KUBES, 2013; ZHENG; TIAN, 2019; GU et al., 2022). O papel do fígado na imunidade é evidenciado em estudos que realizam a deleção de macrófagos residentes no fígado, conhecidos como células de Kupffer (KCs) (EBE et al., 1999; LEE et al., 2010) ou de receptores imunológicos hepáticos (HELMY, et al., 2006) e desafiam o organismo com uma infecção bacteriana. Os seus resultados indicam um aumento significativo na disseminação bacteriana e na mortalidade animal após a infecção. Esses achados reforçam que o fígado desempenha um papel crucial na detecção e eliminação de patógenos presentes no sangue, e sua vigilância imunológica é indispensável para a imunidade e a sobrevivência do hospedeiro. (JANE e KUBES, 2013). Além disso, o posicionamento anatômico do fígado favorece seu papel imune, tendo em vista sua localização estratégica na cavidade abdominal, entre o intestino e a circulação sistêmica, que o expõe continuamente a insultos nutricionais, toxinas e antígenos microbiológicos provenientes do intestino (HEYMANN; TACKE, 2016; FREITAS-LOPES et al., 2017).

Dessa forma, o fígado representa um órgão central tanto para a imunidade quanto para o metabolismo nos adultos. Sua relevância no contexto imunológico começa desde o início da vida, quando atua como um órgão hematopoético. Estudos em camundongos e humanos demonstram que, no período neonatal, o fígado possui uma composição celular, predominantemente formada por células mieloides e B imaturas, que conferem maior suscetibilidade a infecções. No entanto, conforme o fígado amadurece, ocorre uma rápida adaptação do sistema imunológico, tornando-o mais eficiente na resposta a patógenos. Simultaneamente, a função metabólica do fígado neonatal é limitada, com uma redução na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios e carboidratos, que só atinge níveis normais próximo ao período de desmame (NAKAGAKI et al., 2018). Essas adaptações imunológicas e metabólicas reforçam o papel do fígado como um órgão essencial na defesa do

hospedeiro e no processamento de macronutrientes, consolidando sua importância em adultos.

No fígado adulto, os hepatócitos, células que compõem o parênquima hepático responsáveis pela maioria das funções secretoras e metabólicas, se organizam em cordões entremeados por uma estrutura vascular, constituída pelas células endoteliais sinusoidais hepáticas. Além dos hepatócitos, células imunológicas sustentam o funcionamento desse órgão. Mesmo em homeostase, o fígado contém uma abundância de células imunes, incluindo células dendríticas, células de Kupffer, neutrófilos e linfócitos (FREITAS-LOPES *et al.*, 2017). Grande parte dessa rede imunológica está estrategicamente posicionada nos sinusoides hepáticos, onde o fluxo sanguíneo é desacelerado, aumentando a sua interação com patógenos circulantes e endotoxinas (JENNE; KUBES, 2013). As células de Kupffer são os macrófagos residentes do fígado, e constituem a maior população de células imunes hepáticas, seguidas pelos linfócitos. A população linfocitária é composta principalmente por células NK (NK), células *natural killers* T (NKT) e células T (DOHERTY; O'FARRELLY, 2000), sendo que as NKT, curiosamente, representam aproximadamente 25-40% dos linfócitos intra-hepáticos de camundongos (GU *et al.*, 2022; SWAIN, 2008; KLUGEWITZ *et al.*, 2004; EXLEY e KOZIE, 2004). O estudo de Eberl e colaboradores (1999) que avaliou a distribuição tecidual de células NKT no organismo de camundongos selvagens, demonstrou um expressivo número no fígado (22%). Esse número se torna ainda mais instigante quando comparado aos achados do timo (21%), da medula (3,1%) e do baço (1,2%) que são órgãos classicamente linfoides. Estudos subsequentes consolidaram esse achado evidenciando que o fígado possui uma proporção maior de células NKT em comparação a outros órgãos (DONG *et al.*, 2007; GU *et al.*, 2022), sugerindo que essas células podem ter um importante papel no contexto hepático.

As células NKT são uma subpopulação única de linfócitos que compartilham características de células T e células NK. Essas células expressam tanto o receptor de células T (TCR) quanto receptores de superfície característicos das células NK, desempenhando um papel crucial na resposta imune inata e adaptativa, incluindo a eliminação de patógenos, vigilância tumoral e respostas autoimunes. No contexto hepático, sabe-se de funções dessas células durante a patogênese e o

desenvolvimento de algumas doenças. As células NKT são fundamentais na regulação da resposta inflamatória em hepatites virais, doenças hepáticas autoimunes influenciando a progressão da doença. Nas doenças hepáticas alcoólicas e não alcoólicas, as NKT têm sido associadas à modulação da inflamação e fibrose hepática, contribuindo para o desenvolvimento de cirrose e outras complicações. E em tumores hepáticos, como o carcinoma hepatocelular, essas células podem desempenhar papéis antitumorais ou pró-tumorais, dependendo do microambiente imunológico, influenciando assim a progressão e a resposta à terapia (GU *et al.*, 2022). No entanto, quando se trata de infecções bacterianas, pouco tem sido discutido na literatura.

Sabe-se que as células podem ser ativadas por antígenos lipídicos, especialmente alfa-galactosilceramida (α -GalCer) e lipopolissacarídeo (LPS), por meio da via dependente de moléculas do grupo de diferenciação 1d (CD1d). Interleucinas (IL), como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 e IL-33 também promovem a ativação das células NKT ao se ligarem diretamente aos seus receptores de interleucina. Além disso, quimiocinas das famílias CC, CXC e CX3C estão associadas ao recrutamento e proliferação dessas células, interagindo com seus receptores do tipo acoplados à proteína G (GPCRs) (GU *et al.*, 2022). As células NKT apresentam subconjuntos distintos que exibem produção diferencial de citocinas e padrões únicos de receptores que as direcionam para diferentes tecidos ou locais de inflamação (SLAUENWHITE; JOHNSTON, 2015). No fígado, o receptor de quimiocina CXCR6 (c-x-c chemokine receptor tipo 6) se destaca por ser altamente expresso pelas células NKT hepáticas (GERMANOV *et al.*, 2004). Um estudo que avaliou o comportamento dessas células, utilizando o cDNA da proteína fluorescente verde para substituir o gene que codifica o CXCR6, revelou que as células NKT representam 99% das células CXCR6⁺ no fígado (GEISSMANN *et al.*, 2015).

O CXCR6, também conhecido como Bonzo, STRL33 ou TYMSTR, é um receptor que se liga especificamente à quimiocina CXCL16. Ele foi originalmente descrito como um co-receptor para o SIV e HIV; no entanto, posteriormente, descobriu-se que ele promove o direcionamento de linfócitos para tecidos não linfoides. O CXCR6 é expresso em NKT, mas também em subconjuntos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, NK, e células NKT, plasmócitos, células dendríticas (ASHHURST; *et al.*, 2019). No fígado, 99% das células NKT são CXCR6⁺ (GEISSMANN *et al.*, 2005). O seu ligante específico, CXCL16, pode existir em forma transmembrana ou solúvel. A clivagem do

CXCL16 de membrana pelas proteases ADAM-10 ou ADAM-17 resulta na liberação de quimiocina solúvel, que atua como um recrutador (ASHHURST; *et al.*, 2019). O CXCL16 é expresso por macrófagos ativados, monócitos, células dendríticas, linfócitos B e, notavelmente, pelas células endoteliais sinusoidais hepáticas, sugerindo um papel no recrutamento ou retenção a longo prazo de NKT no fígado (GEISSMANN; *et al.*, 2005).

As quimiocinas e suas interações com os respectivos receptores desempenham um papel essencial no recrutamento, retenção e inibição de linfócitos em diversos órgãos, incluindo o fígado (ASHHURST *et al.*, 2019). Contudo, o papel específico dessas moléculas em diferentes hepatopatias que ameaçam a saúde global ainda não está completamente compreendido. Entre os receptores de quimiocina presentes no fígado, destaca-se o CXCR6, cuja alta expressão nas células imunes NKT nesse contexto sugere uma função fundamental na imunidade hepática. Por isso, uma compreensão detalhada do papel do CXCR6 e de suas interações no fígado é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a doenças hepáticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Compreender a função do receptor de quimiocina CXCR6 no contexto hepático para elucidar como o CXCR6 pode afetar a homeostase hepática, a resposta a infecções, e a progressão de doenças hepáticas, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever a dinâmica das células CXCR6⁺ ao longo da vida comparando animais neonatos e adultos através da microscopia intravital confocal;
- Analisar a dinâmica das células GFP⁺ nos genótipos CXCR6^{GFP/GFP} e CXCR6^{GFP/WT} afim de compreender os efeitos da ausência de CXCR6 em homeostase;
- Padronizar a infecção hepática por *Escherichia coli* para estudar a resposta imune hepática. Essa padronização considerou a taxa de sobrevivência e condições clínicas dos animais, as Unidades Formadoras de Colônia no fígado e sangue e a visualização da bactéria no fígado em modelo *in vivo*.
- Compreender a resposta imune hepática na ausência de CXCR6 através de um insulto infeccioso bacteriano em animais com a depleção desse receptor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 tipo selvagem (WT - *wild-type*) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO/ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Além dos WT, animais com o genótipo CXCR6GFP/GFP, gentilmente cedidos pelo Dr. Alexandre Keller (UFRJ), foram utilizados neste estudo. Esses animais foram geneticamente modificados para expressar a proteína fluorescente verde aprimorada (e-GFP) no loco correspondente ao receptor de superfície CXCR6. Essa modificação permite a visualização das células que expressam esse receptor por meio de microscopia confocal. Quando excitadas por um laser com comprimento de onda de 488 nm, essas células emitem fluorescência verde com comprimento de onda máximo de 516 nm, facilitando sua detecção. Também foram usados animais com o genótipo CXCR6^{GFP/WT}, obtidos a partir do cruzamento dos animais selvagens com CXCR6^{GFP/GFP}.

Os animais utilizados tinham idade de até uma semana (neonatos) e entre 8 e 12 semanas (adultos) e foram acondicionados em microisoladores de polipropileno (Alesco®) no biotério do Departamento de Morfologia do ICB-UFMG, contendo água e ração *ad libitum* em condições controladas de temperatura (25°C), umidade e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os camundongos neonatos foram mantidos em microisoladores junto à matriz progenitora.

Os procedimentos experimentais estavam de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA / UFMG), protocolo nº 241/2023. Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, seguida por deslocamento cervical ao final dos experimentos ou quando apresentaram qualquer sinal de sofrimento durante o estudo. O descarte das carcaças e dejetos de animais utilizados durante a execução deste trabalho está de acordo com o PGRSS (Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde) do ICB, da UFMG.

3.2 Micro-organismos

Para a infecção sistêmica foi utilizada a amostra de bactérias *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC25922, gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia do ICB UFMG. Também foi utilizada a *Escherichia coli Red Fluorescent Protein* (*E. coli RFP*)

ATCC25922RFP, para observar a fagocitose, cedidas por Dr. Roberto Botelho, do Departamento de Química e Biologia da *Toronto Metropolitan University*. A utilização de uma amostra bacteriana modificada geneticamente (que recebeu a inserção do plasmídeo - Enhanced Red Fluorescent Protein – e-rFP) permitiu a visualização da mesma à luz da microscopia confocal. Quando excitada por um laser de comprimento de onda igual a 561nm, emite um feixe de luz com comprimento de onda de emissão máxima de 585nm, tornando possível sua visualização através da fluorescência na cor vermelha.

3.2.1 Cultivo de *Escherichia coli* (*E.coli*) para desafio

Uma pequena quantidade de bactérias *E. coli* presentes na alíquota conservada em meio de criopreservação é repassada para tubo tipo de falcon de 50 mL contendo meio de cultura líquido Luria (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). A cultura é mantida sob agitação (100 rpm/min) à temperatura de 37°C durante 12 horas.

Após esse período, foi realizada a quantificação de bactérias presentes no inóculo através da leitura do comprimento de onda (absorção/emissão de luz) em espectrofotômetro, na densidade óptica de 600 nm em espectrofotômetro (VersaMax, Califórnia, USA), onde OD600 = 1 corresponde a 8×10^8 bactérias / mL

3.2.2 Determinação do inóculo ideal

Os camundongos foram inoculados, por via intravenosa, com diferentes quantidades de *E. coli* (10^5 , 10^6 e 10^7 bactérias por 20g de peso corporal em 100 µL de solução). Ao longo de um período de 24 horas após a infecção, foram avaliados a taxa de sobrevivência dos animais, variações no peso corporal e o escore clínico. O escore clínico foi determinado conforme descrito por Malavolta (2019), baseado na soma de cinco observações em uma escala de 0, 0.5 e 1, onde 1 representa a condição ideal e 0 a pior condição, enquanto 0.5 indica uma condição intermediária ou difícil de avaliar. Os parâmetros observados incluíram reatividade ao estímulo, aspecto do pelo, condição dos olhos, aspecto das fezes e padrão de respiração.

3.2.3 Unidades Formadoras de Colônia de *Escherichia coli*

Para uma avaliação quantitativa da carga bacteriana tanto nos tecidos hepáticos quanto no sistema circulatório dos animais, foi realizada a avaliação de Unidades Formadoras de Colônia (CFU; *colony forming units*).

Para tanto, após 24 horas de infecção por *Escherichia coli*, os animais foram anestesiados, e amostras de sangue e fígado foram coletadas. O fígado foi processado e diluído em salina, em uma proporção de 1 mg de tecido para cada 10 microlitros. Em seguida, realizou-se diluição seriada em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e plaqueamento de gotas de 20 microlitros em triplicata em meio de ágar (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). As amostras foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas.

O número de colônias presentes foi contado após o período de incubação. Esses valores foram quantificados e normalizados de acordo com o volume de sangue em mililitros (mL) e o peso do fígado em gramas (g), segundo as seguintes fórmulas:

Amostras de sangue:

$CFU/mL = (n^{\circ} \text{ de colônias} - \text{média das triplicatas}) \times \text{diluição em que cresceram colônias contáveis (ex: } 10^4) / 0,02 \text{ (volume de cada gota plaqueada = 20 microlitros = 0,02 mL)}.$

Amostras de fígado:

$CFU/g = (n^{\circ} \text{ de colônias} - \text{média das triplicatas}) \times \text{diluição em que cresceram colônias contáveis (ex: } 10^4) / 0,002 \text{ g de tecido plaqueado}.$

3.2.4 Cultivo de *Escherichia coli* Red Fluorescent Protein (*E. coli* RFP) para desafio

Inicialmente a cultura da *E. coli* RFP foi realizada como descrito acima. Em seguida, foi realizada uma subcultura das bactérias adicionando 1500 µL de meio LB fresco, 1500 µL da suspensão bacteriana em PBS, 3 µL de ampicilina e 330 µL de solução de arabinose a 1%, resultando em uma concentração final de 0,1% de arabinose. Essa mistura foi incubada em estufa a 37°C sob agitação constante (80 a 100 rpm) por um período aproximado de três horas.

Após o período de incubação, o volume da cultura foi completado até 50 mL com PBS 1x. A cultura foi então centrifugada a 1500g por 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o pellet resultante foi ressuspenso em 1 mL de PBS 1x. Como indicador de sucesso do processo, o pellet apresentou uma coloração avermelhada, o que indicou que estava pronto para uso na etapa subsequente dos experimentos.

3.3 Microscopia intravital confocal camundongos

A microscopia intravital confocal (IVM) foi utilizada para observação *in vivo*, permitindo o acompanhamento das interações celulares em tempo real.

Primeiramente, os camundongos foram anestesiados com uma combinação de cetamina 10% (160 mg/kg) e xilazina 2% (30 mg/kg) administrada por via intradérmica e, em seguida, submetidos a uma laparotomia mediana. O fígado foi exposto e posicionado em uma plataforma de acrílico para a aquisição de imagens em um microscópio confocal Nikon Ti A1R, equipado com detector espectral e estágio motorizado XYZ (MARQUES et al., 2015).

3.3.1 Microscopia intravital confocal camundongos neonatos e adultos CXCR6^{GFP/WT}

Para observar o comportamento das células CXCR6⁺ ao longo da vida, foi realizada IVM conforme descrito, utilizando camundongos neonatos e adultos com o genótipo CXCR6^{GFP/WT}. Devido à maior sensibilidade dos animais neonatos, o calor corporal foi mantido com o uso de papel alumínio após o posicionamento no microscópio. Primeiramente foram adquiridos imagens e vídeos em tempo real para verificar a presença, distribuição e característica de movimentação das células CXCR6⁺. Em seguida, foi realizada a injeção intravenosa com Azul de Evans para evidenciar o fluxo sanguíneo e novas imagens e vídeos foram adquiridos para verificar a relação dessas células com os vasos sanguíneos.

3.3.2 Microscopia intravital confocal camundongos CXCR6^{GFP/GFP} e CXCR6^{GFP/WT}

Com a finalidade de analisar a dinâmica das células GFP⁺ nos genótipos CXCR6^{GFP/GFP} e CXCR6^{GFP/WT} foi realizada imagens e vídeos de IVM, conforme descrito acima, em ambos os genótipos.

3.3.3 Microscopia intravital confocal camundongos infectados por *E. coli* RFP

Para avaliação da presença de bactérias no fígado em tempo real, foi feita a IVM de camundongos infectados por *E. coli* RFP.

Antes do início dos procedimentos, os camundongos receberam, por via intravenosa, anticorpos anti-F4/80 conjugado à Alexa Fluor 647 (AF, 0,1µg/mL, clone BM8, *ThermoFisher*). Em seguida, foi feita a exposição cirúrgica e posicionamento do fígado conforme descrito acima, um vídeo foi iniciado e, então, o animal recebeu um inóculo intravenoso da *E. coli* RFP.

3.3.4 Microscopia intravital confocal camundongos infectados por *E. coli*

Com a finalidade de compreender a resposta imune hepática na ausência de CXCR6, foi realizada a infecção com 10^6 *E. coli* por via intravenosa em Os camundongos WT, CXCR6^{GFP/WT}, CXCR6^{GFP/GFP}. OS grupos foram avaliados sob microscopia confocal intravital 12 e 24 horas após. O grupo controle recebeu injeções intravenosas de soro fisiológico a 0,9%, com avaliações realizadas nos mesmos tempos que os grupos experimentais. Após exposição e posicionamento do fígado, foi realizada a injeção intravenosa com Azul de Evans. Foram adquiridos imagens e vídeos em tempo real de todos os grupos.

3.4 Análises estatísticas

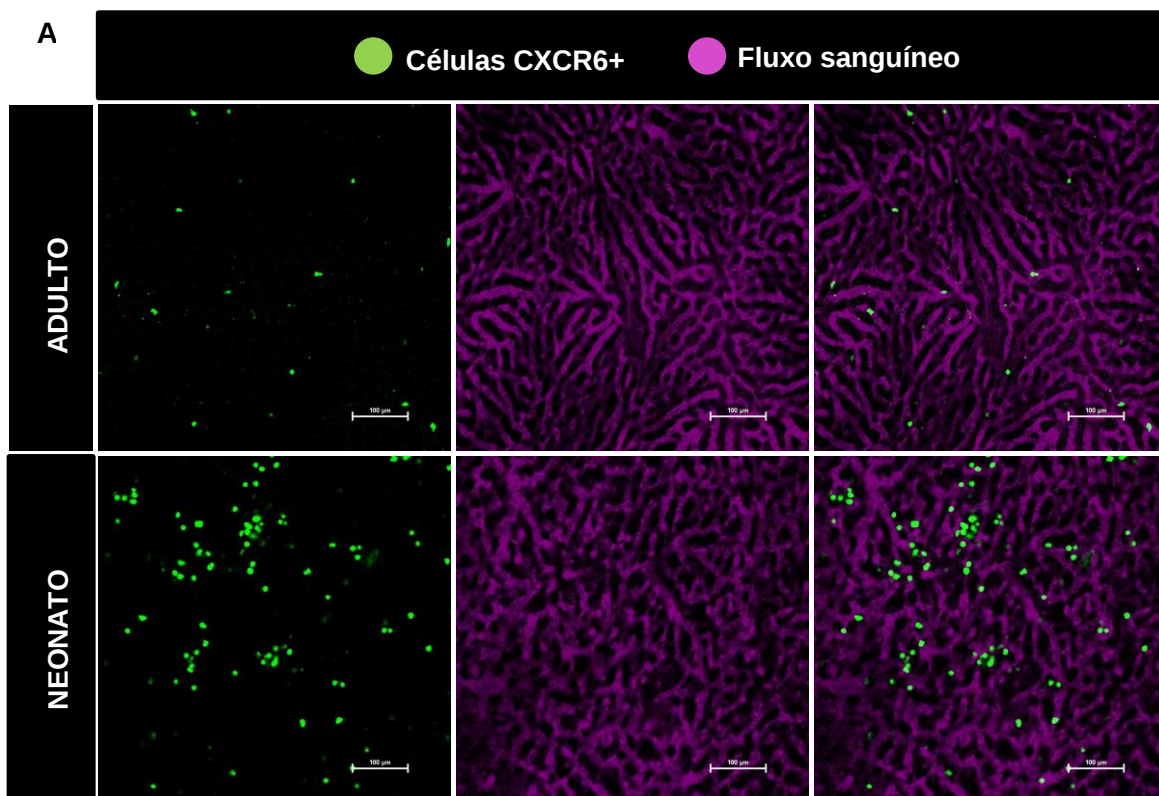
Imagens obtidas pela técnica de microscopia confocal foram analisadas no programa *NIS-Elements Advanced Research* com o módulo *NIS.ai* (*Nikon Instruments*).

Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPrism 6 (GraphPad, LaJolla, CA). Os dados que apresentam distribuição não paramétrica (D'Agostino & Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilk normality test) foram analisados utilizando os testes One-WayANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e múltipla comparação pelo teste de Dunn's. Os dados de CFU de animais foram analisados utilizando testes T com pós-test Mann-Whitney. Os que apresentaram distribuição normal (paramétrica) foram analisados utilizando os testes One-WayANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e múltipla comparação pelo teste de Dunnett's. Todos os grupos foram comparados com o grupo controle.

Todos os resultados foram apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Camundongos adultos apresentam menor número de células CXCR6+ por campo e estas migram ao longo dos sinusoides hepáticos, diferentemente dos neonatos. Para determinar o comportamento das células CXCR6+ ao longo da vida, os animais adultos (com idade entre 8 e 12 semanas) e neonatos (com até uma semana de vida), portadores do genótipo CXCR6^{GFP/WT}, ou seja, que expressavam o receptor CXCR6 e a proteína GFP, foram submetidos à microscopia confocal intravital do fígado. Conforme representado na **Figura 1**, animais adultos apresentaram aproximadamente oito células GFP+ por campo, sob ampliação de 20x, as quais migraram ao longo dos sinusoides hepáticos a uma velocidade média de 0,06 $\mu\text{m/s}$. Por outro lado, os animais neonatos mostraram uma média de 63 células GFP+ por campo, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa quando comparados aos adultos ($p=0,0027$, teste t). Além disso, essas células permaneceram agrupadas e praticamente imóveis, com uma velocidade média de 0,01 $\mu\text{m/s}$, também demonstrando diferença estatisticamente significativa ($p=0,0006$, teste t). Concluindo que as células CXCR6+ apresentam uma distribuição geográfica, quantificação e comportamento diferente ao longo da vida.



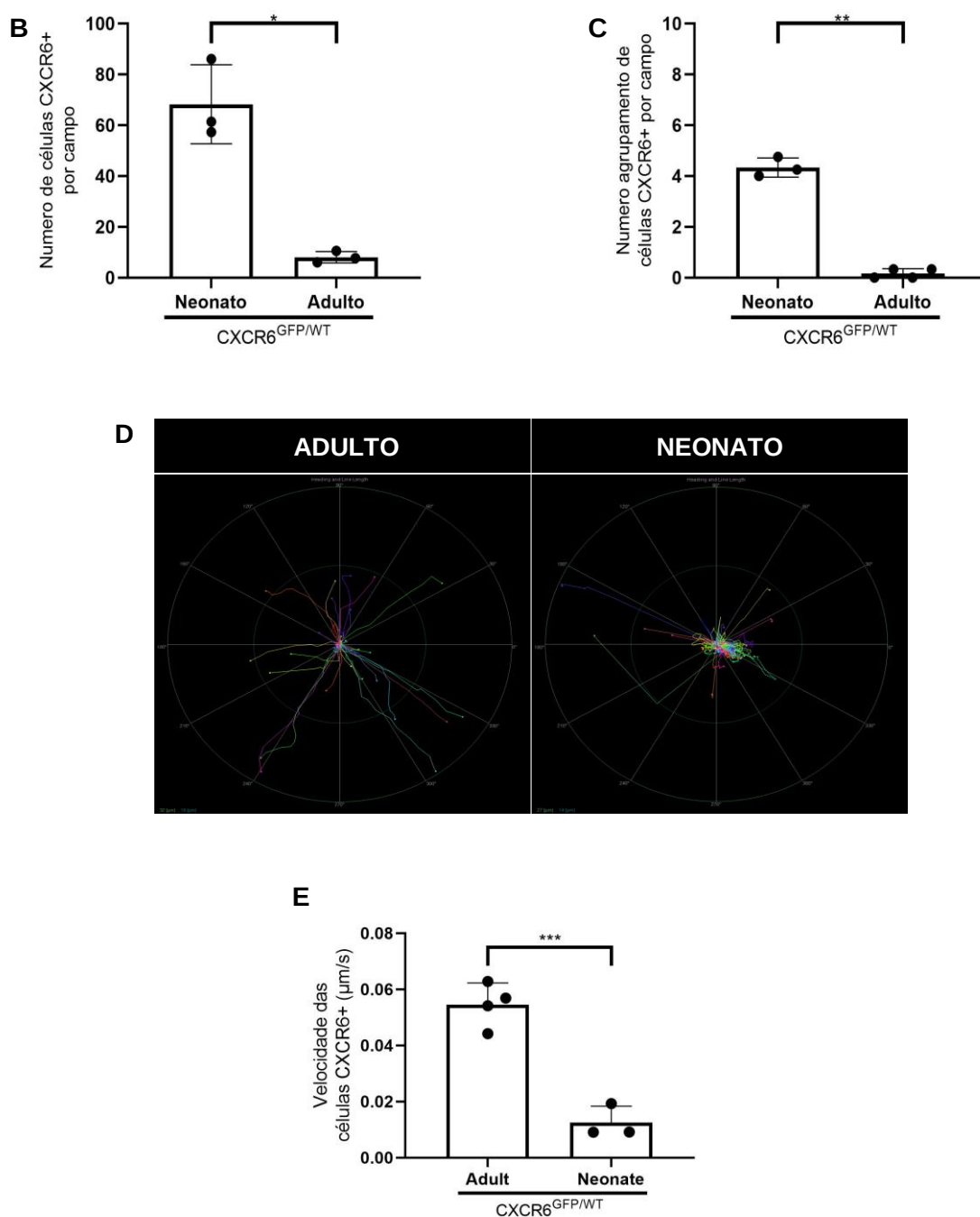


Figura 1. Comparação entre apresentação de células CXCR6+ em camundongos adultos e neonatos. (A) Microscopia intravital confocal evidenciando células CXCR6+ (verde; GFP) e fluxo sanguíneo (roxo; azul de Evans). **(B)** Número de células CXCR6+ por campo. **(C)** Número de agrupamentos de células CXCR6+ por campo. **(D)** Deslocamento das células CXCR6+ ao longo de 30 minutos. **(E)** Velocidade média de deslocamento das células CXCR6+ ao longo de 30 minutos. Objetiva 20x. * $p=0,0027$ ** $p<0.0001$. *** $p=0,0006$.

4.2 O número de células GFP+ no fígado de animais heterozigotos ($CXCR6^{GFP/WT}$) e homozigotos ($CXCR6^{GFP/GFP}$) é semelhante, quando avaliados sob microscopia confocal intravital

Para compreender a dinâmica das células GFP+ na ausência do receptor CXCR6 no contexto hepático, camundongos adultos homozigotos ($CXCR6^{GFP/GFP}$), que apresentam depleção genética do receptor, foram submetidos à microscopia intravital confocal. Comparando esses animais com heterozigotos ($CXCR6^{GFP/WT}$), não se observou diferença estatisticamente significativa no número de células GFP+ por campo do fígado sob ampliação de 20x, nem na velocidade de deslocamento dessas células durante um vídeo de 30 minutos (**Figura 2**). Assim, neste estudo, os camundongos $CXCR6^{GFP/GFP}$ foram utilizados como ferramenta para avaliar a ausência do receptor CXCR6, e não das células GFP+ em si.

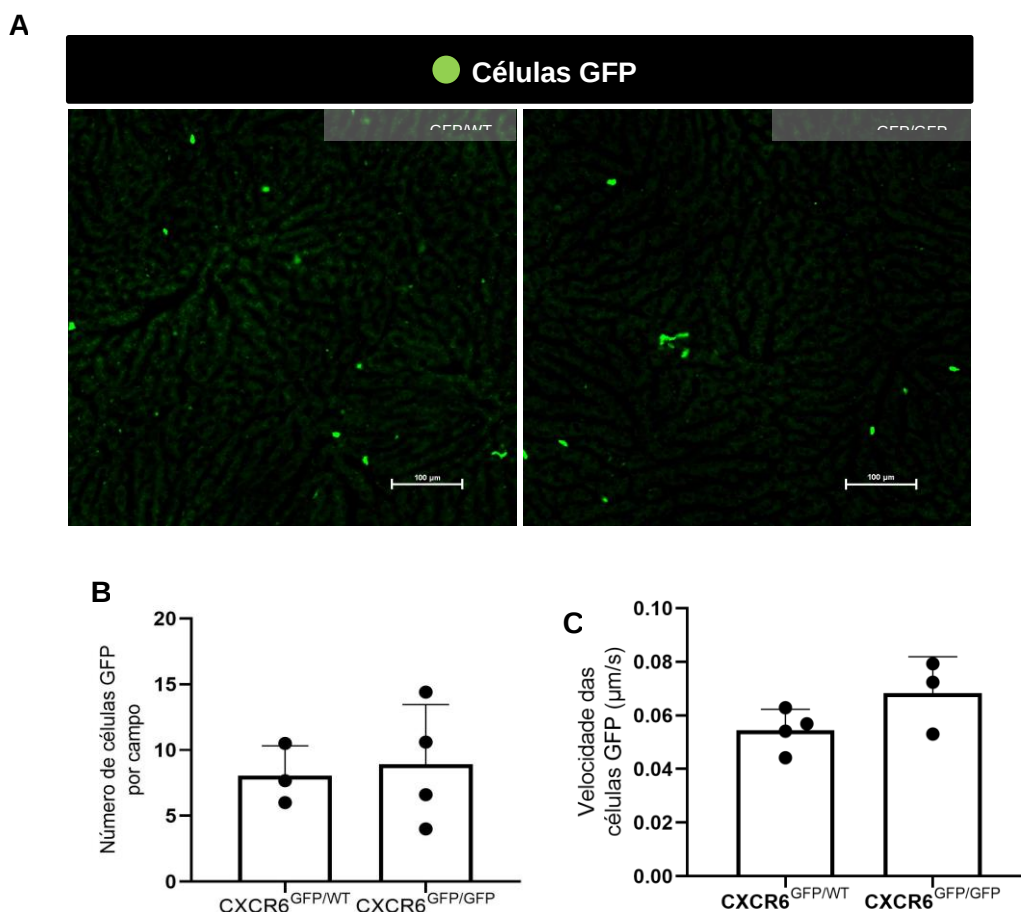


Figura 2. Comparação entre apresentação de células em camundongos $CXCR6^{GFP/WT}$ e $CXCR6^{GFP/GFP}$ adultos. (A) Microscopia intravital evidenciando células GFP+ (verde). (B) Número de células GFP por campo. (C) Velocidade de células GFP ao longo de 30 minutos. Objetiva 20x.

4.3. O inóculo de 10^6 *E. coli* gera resposta clínica no camundongo WT com uma taxa de mortalidade aceitável

Para estudar a resposta imune hepática, foi necessário padronizar um modelo replicável de infecção neste órgão. O patógeno escolhido foi *Escherichia coli* (*E. coli*), uma bactéria com relevância clínica e impacto significativo na saúde pública global. Estima-se que infecções por *E. coli* contribuam anualmente para milhares de mortes em todo o mundo, podendo causar desde infecções do trato urinário, até o gastrointestinal, resultando em diarreia e desidratação, até sepse, frequentemente levando à óbito. No camundongo, a infecção hepática por *E. coli* se inicia com a disseminação bacteriana pelo sistema vascular, alcançando o fígado e desencadeando uma resposta inflamatória intensa. Embora o camundongo não apresente sintomas clínicos de diarreia, como os humanos, a infecção pode evoluir para sepse, potencialmente fatal. Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa indicaram que esse microrganismo é uma ferramenta eficiente para a avaliação da suscetibilidade dos camundongos à infecção, apresentando uma taxa de mortalidade aceitável de aproximadamente 20% e sinais clínicos de infecção compatíveis (LOPES et al., 2022; NAKAGAKI et al., 2018).

Para determinar o inóculo mais apropriado, camundongos WT foram inoculados intravenosamente com diferentes quantidades de *E. coli* (10^5 , 10^6 e 10^7 bactérias por 20g de peso corporal em 100 μ L de solução). A taxa de sobrevivência foi avaliada ao longo de 24 horas, demonstrando que a inoculação com 10^6 bactérias de *E. coli* foi a mais adequada (**Figura 3A**). Este inóculo resultou em uma média de perda de peso corporal de 13% e uma variação média de aproximadamente 0,3 no escore clínico durante o mesmo período (**Figuras 3B e C**). Esses resultados clínicos indicam que uma quantidade de 10^6 bactérias de *E. coli* é a mais indicada para este modelo de estudo.

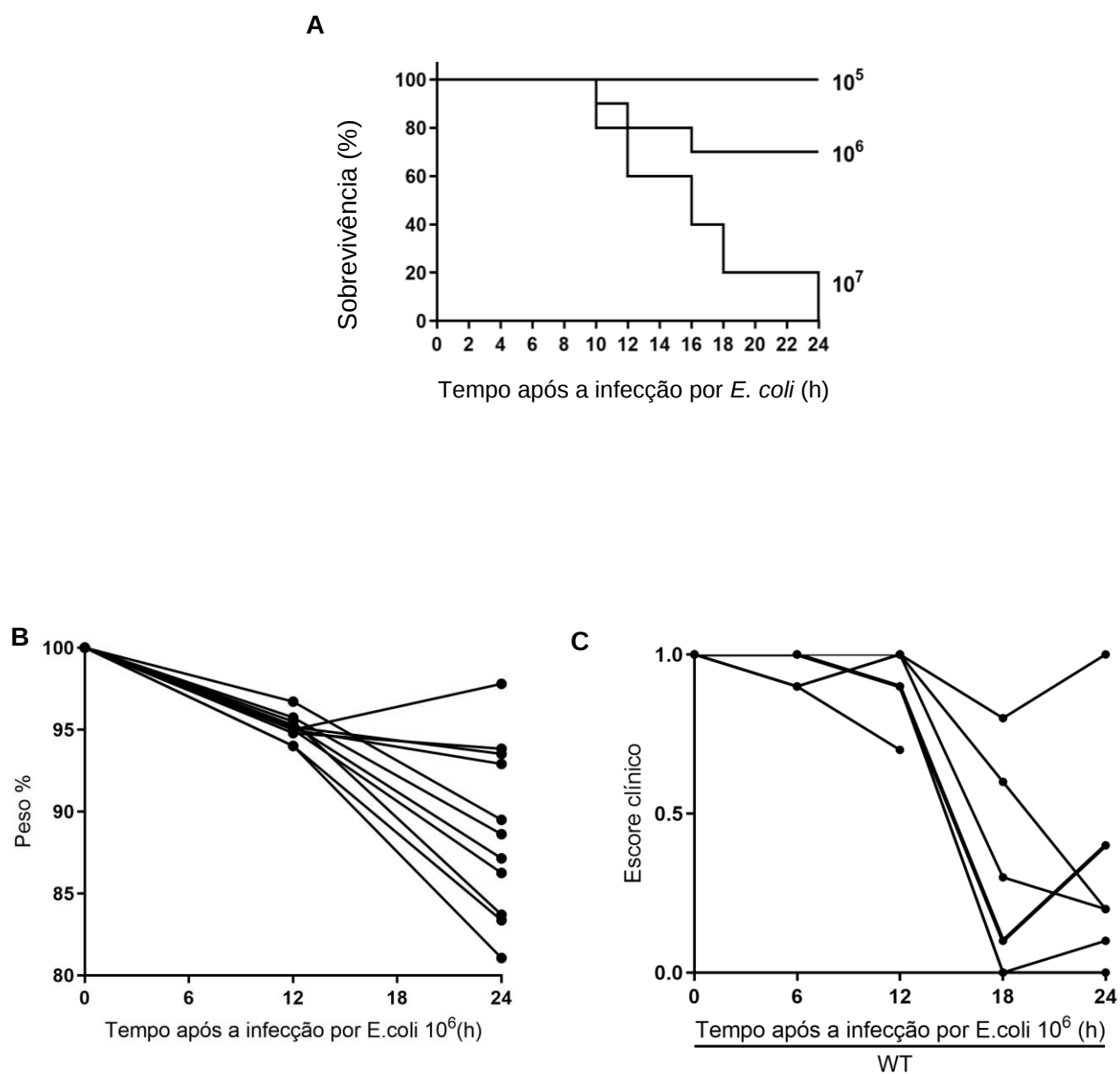
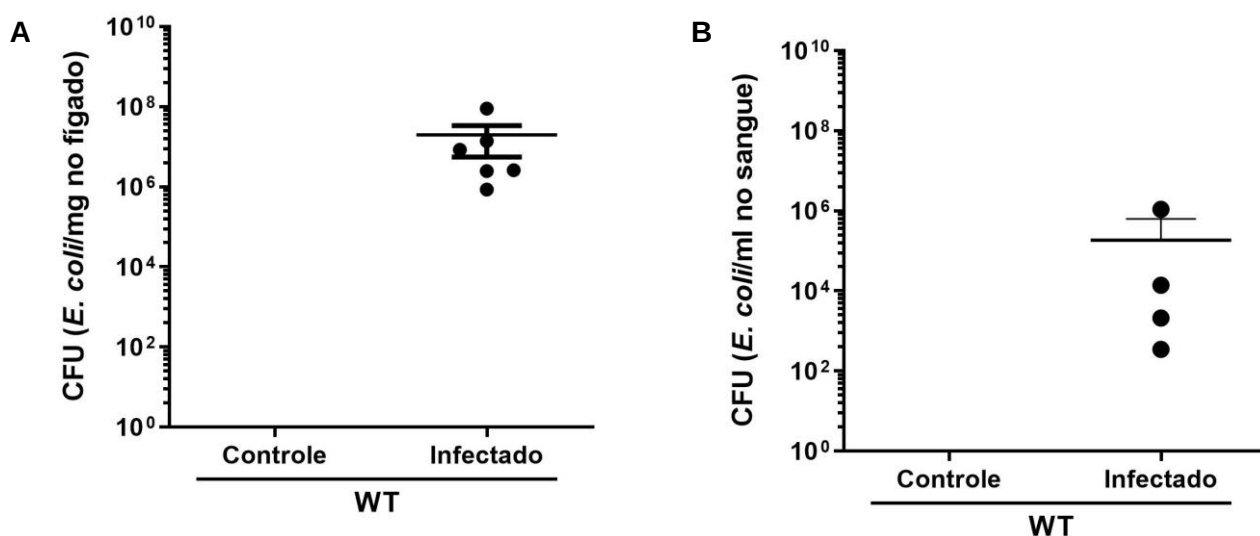


Figura 3. Padronização de modelo de infecção hepática por *E. coli* em animais WT adultos. (A) Curva de sobrevivência após 24 horas de infecção por *E. coli* com três inóculos diferentes: 10^5 , 10^6 e 10^7 . **(B)** Variação de peso dos animais ao longo de 24 horas de infecção por *E. coli* com inóculo de 10^6 . **(C)** Escore clínico ao longo de 24 horas de infecção com *E. coli* 10^6 .

4.4. Presença de *E. coli* no fígado em inóculos de 10^6 bactérias

Apesar dos achados clínicos positivos observados no inóculo 10^6 , as bactérias precisavam estar presentes no fígado para gerar o insulto e consequente resposta imune para avaliação do papel do receptor CXCR6 nesse contexto. Para averiguar a presença de *E. coli* no fígado e a eficácia do método, foram quantificadas Unidades Formadas de Colônia (CFU) no fígado e no sangue após 24h de infecção por *E. coli* a 10^6 . Foram encontradas grande quantidade de CFUs no fígado, média de 10^7 (**Figura 4A**) e menor proporção, mas também expressiva, no sangue, média de 10^5 (**Figura 4B**). Além disso, também foi realizada a microscopia confocal intravital para avaliação da presença de bactérias no fígado em tempo real. Bactérias *E. coli RFP* foram injetadas por via intravenosa e um vídeo contínuo de 10 minutos foi gravado. As bactérias foram detectadas no fígado a partir do 15º segundo, com um aumento abrupto em dois minutos. As mesmas permaneceram no fígado, associadas às células de Kupffer, em um número estável de aproximadamente 180 *E. coli RFP* por campo ao longo do vídeo (**Figuras 4C e D**). Portanto, as bactérias *E. coli* 10^6 formam CFU no fígado e são visíveis na microscopia intravital hepática após a administração intravenosa de *E. coli*, sendo esse modelo de infecção útil para o objetivo pretendido.



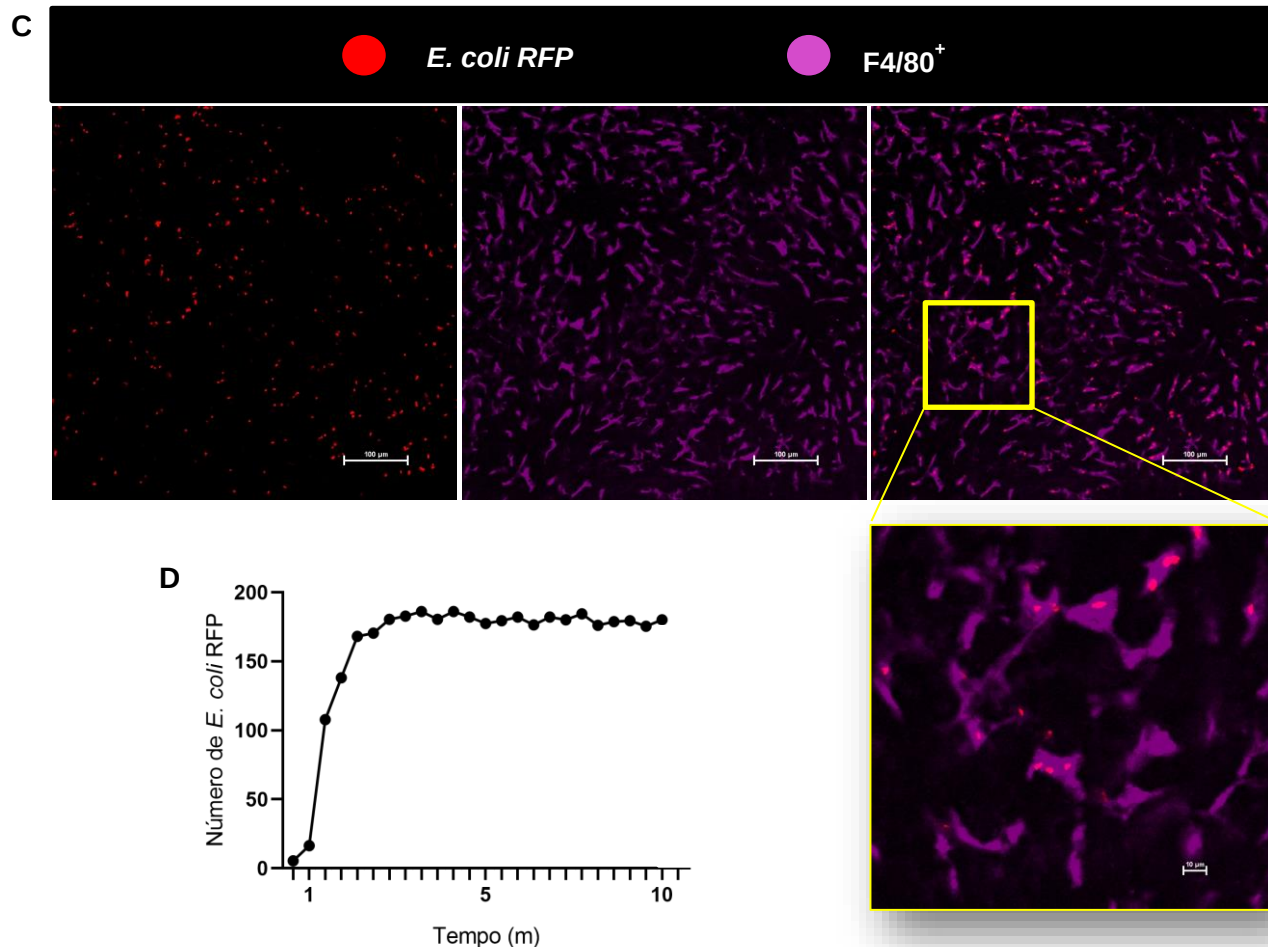
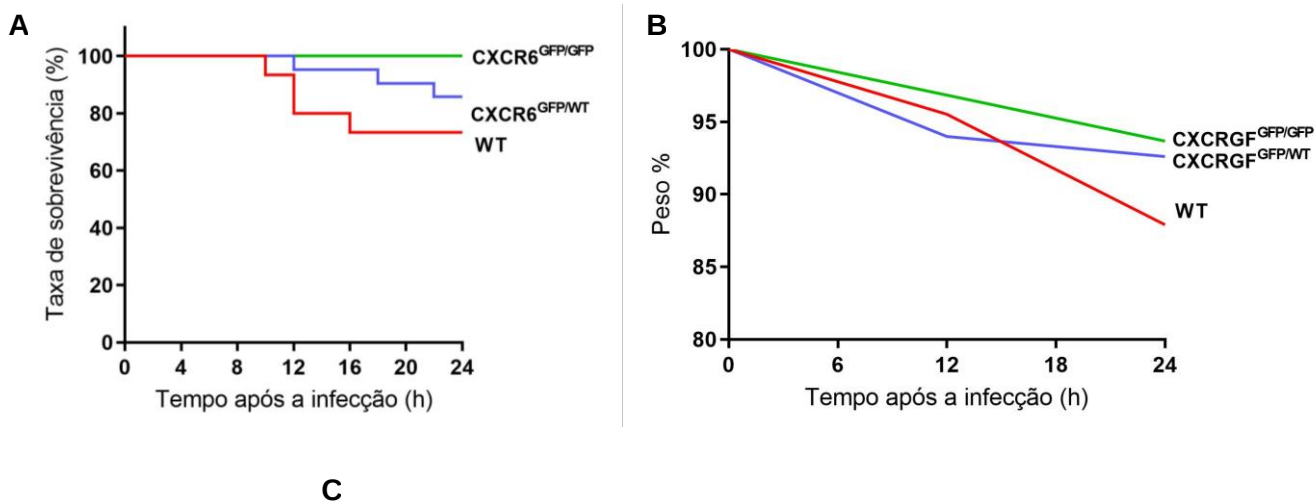


Figura 4. Avaliação da presença de bactérias no fígado de camundongos WT adultos. (A) CFU no fígado 24 horas após infecção por *E. coli* 10⁶. **(B)** CFU no sangue após 24 horas de infecção por *E. coli* 10⁶. **(C)** Captura de bactérias *E. coli* RFP (vermelho) pelas células de Kupffer (F4/80; roxo) por microscopia intravital confocal 10 minutos após a injeção intravenosa de bactérias. **(D)** Número de *E. coli* RFP por campo ao longo do tempo, imediatamente após a injeção intravenosa de *E. coli* RFP. CFU: *Colony unit form*; Unidade formadora de colônia. RFP: *Red fluorescent protein*; Proteína fluorescente vermelha. Objetiva 20x.

4.5 A ausência de CXCR6 pareceu proteger o camundongo dos efeitos da infecção por *E.coli*.

Considerando que o modelo de infecção com inóculo de 10^6 de *E. coli* se mostrou adequado em camundongos WT, era necessário verificar se esse padrão se repetia em animais heterozigotos ($CXCR6^{GFP/WT}$) e homozigotos ($CXCR6^{GFP/GFP}$). Assim, a infecção foi repetida nesses outros grupos e os mesmos parâmetros foram avaliados. Os camundongos WT apresentaram uma reação mais grave à infecção, enquanto os animais $CXCR6^{GFP/GFP}$ exibiram uma resposta mais branda, avaliadas pelas taxas de mortalidade (**Figura 5A**), variações de peso (**Figura 5B**) e aspectos clínicos (**Figura 5C**) ao longo de 24 horas. Os animais heterozigotos apresentaram uma resposta intermediária em relação aos dois grupos. A quantificação da CFU acompanhou esses resultados, mostrando diferença estatisticamente significativa entre WT e heterozigotos ($p=0,0369$; teste t), bem como entre WT e homozigotos ($p=0,0054$; teste t) na CFU do fígado (**Figura 5D**). Assim sendo, WT manifestou uma reação mais grave ao modelo de infecção por *E. coli*, ao passo que os animais com depleção de CXCR6 demonstrou uma resposta clínica mais suave.



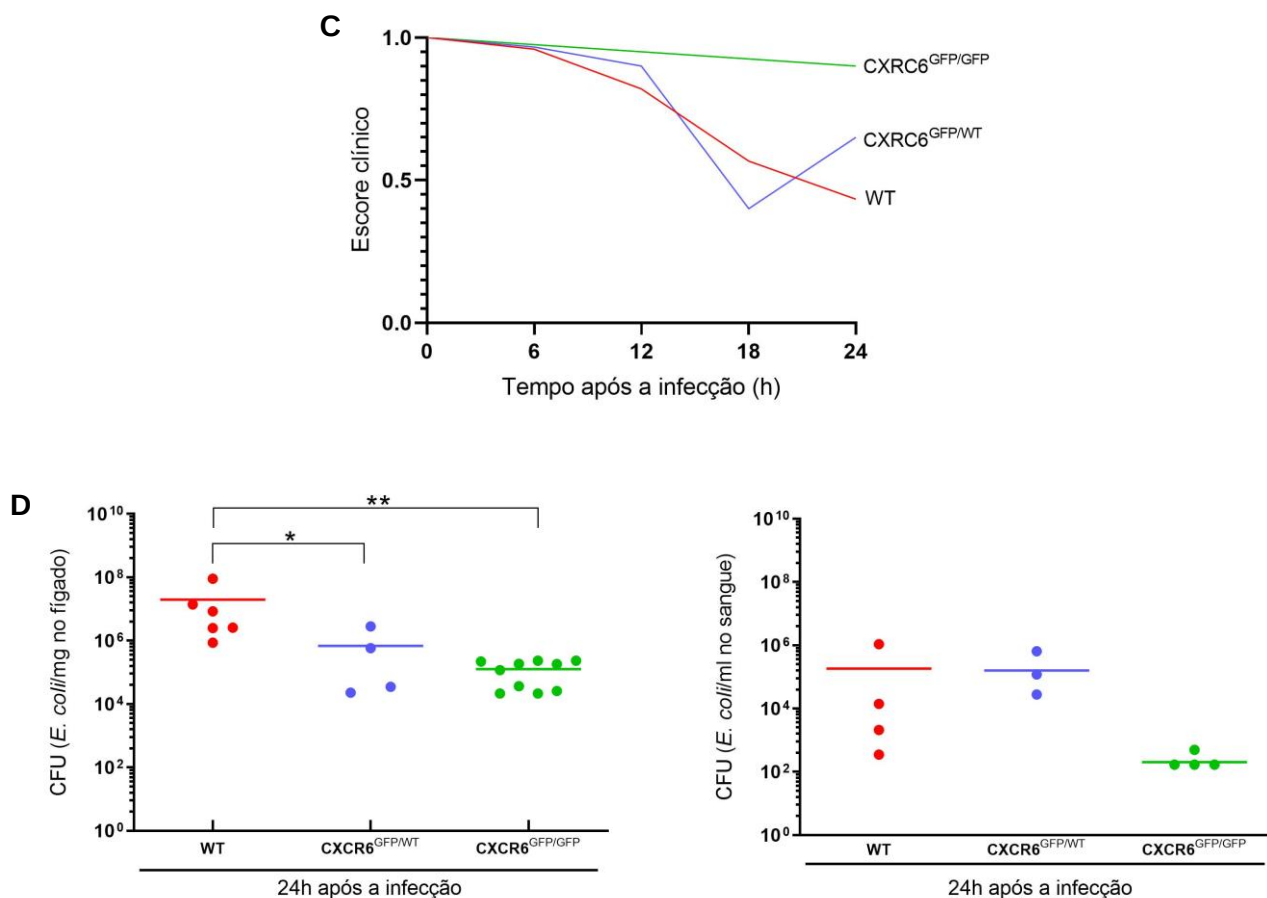
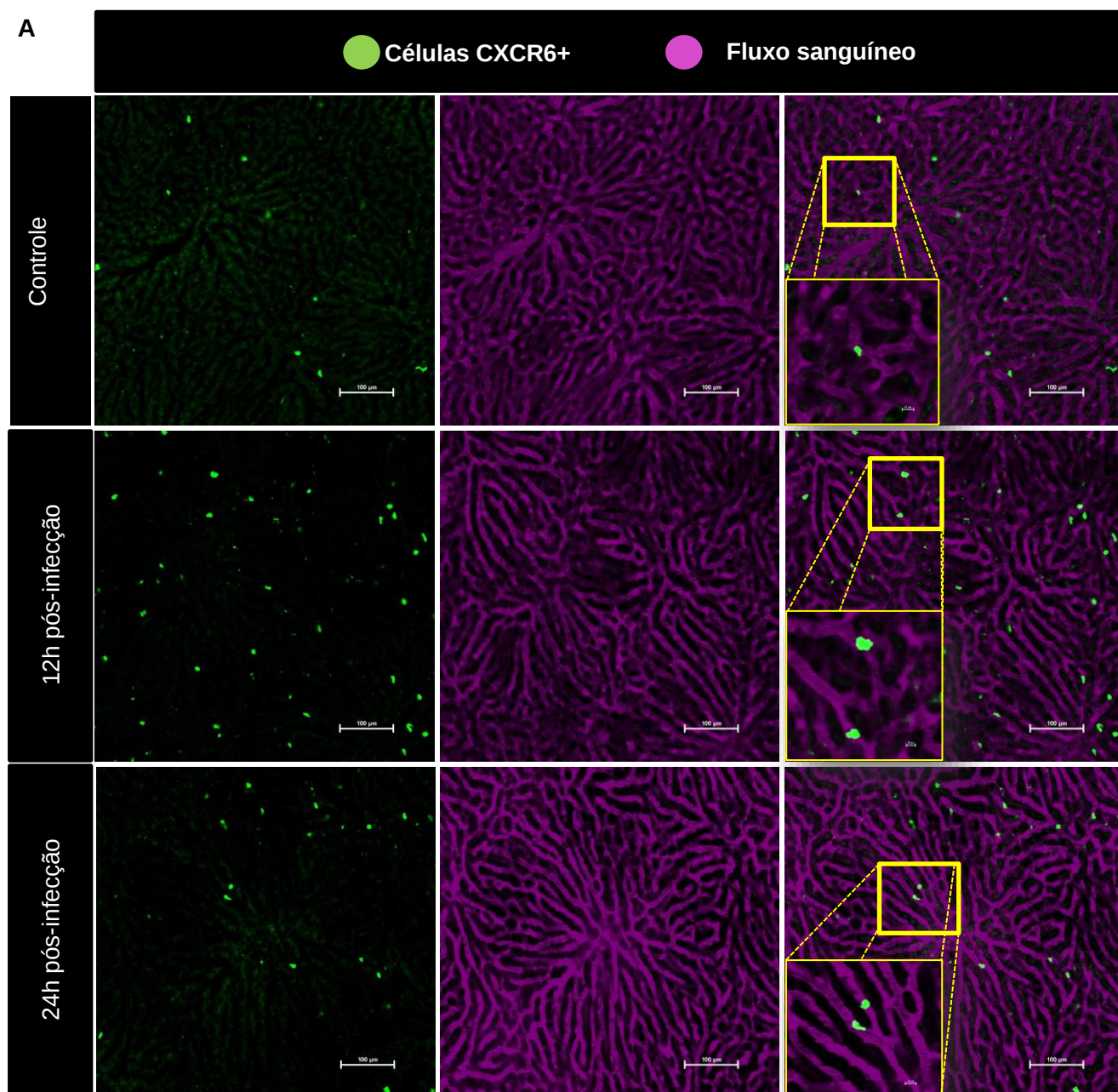


Figura 5. Avaliação da infecção por *E. coli* 10⁶ em animais adultos WT, CXCR6^{GFP/WT} e CXCR6^{GFP/GFP}. (A) Curva de sobrevivência 24 horas após infecção por *E. coli* 10⁶. (B) Variação de peso ao longo de 24 horas de infecção com *E. coli* 10⁶. (C) Escore clínico dos animais ao longo de 24 horas de infecção com *E. coli* 10⁶. (D) CFU no fígado após 24 horas de infecção por *E. coli* 10⁶. (E) CFU no sangue após 24 horas de infecção por *E. coli* 10⁶. CFU: *Colony unit form*; Unidade formadora de colônia. * $p=0,0369$; ** $p=0,0054$.

4.6 A infecção por *E. coli* resultou em um aumento de células CXCR6⁺ após 12 horas, que mantiveram sua localização intravascular enquanto patrulham os sinusoides hepáticos

Para observar se a dinâmica das células CXCR6⁺ se alterava durante a infecção por *E. coli*, foram realizados experimentos de microscopia intravital confocal (IVM) em animais heterozigotos. As imagens foram adquiridas em três grupos: um grupo controle (não infectado); um grupo 12 horas após a infecção; e um grupo 24 horas após a infecção (**Figura 6A**). Os resultados mostraram um aumento abrupto das células CXCR6⁺ após 12 horas de infecção, seguido por uma leve redução após 24 horas (**Figura 6B**). Os vídeos adquiridos revelaram que as células mantiveram sua

localização intravascular nos três grupos nos diferentes tempos de infecção. Essas células patrulhavam os sinusoides hepáticos e, apesar de a velocidade média de patrulha aparentemente ter diminuído ao longo do tempo, essa diferença não foi estatisticamente significativa (**Figura 6C**).



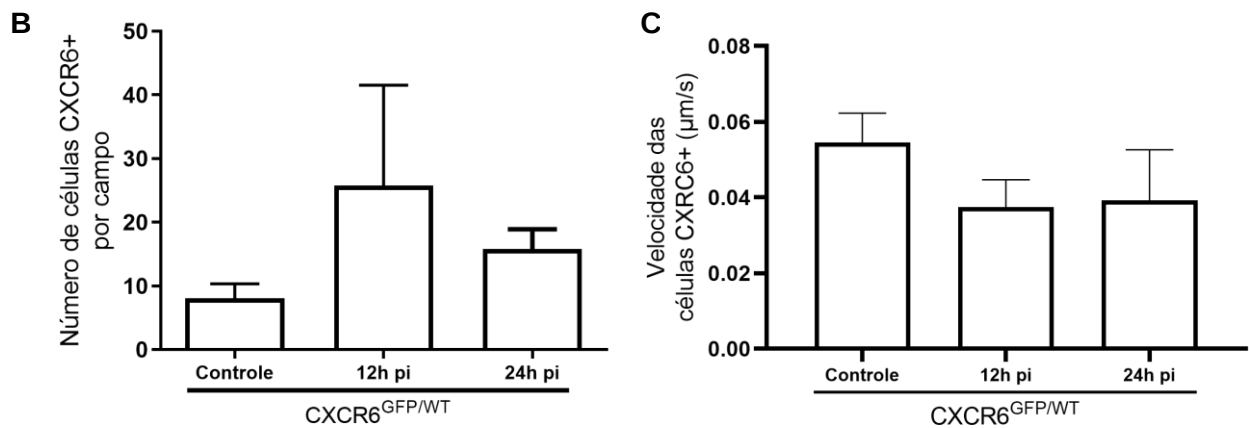
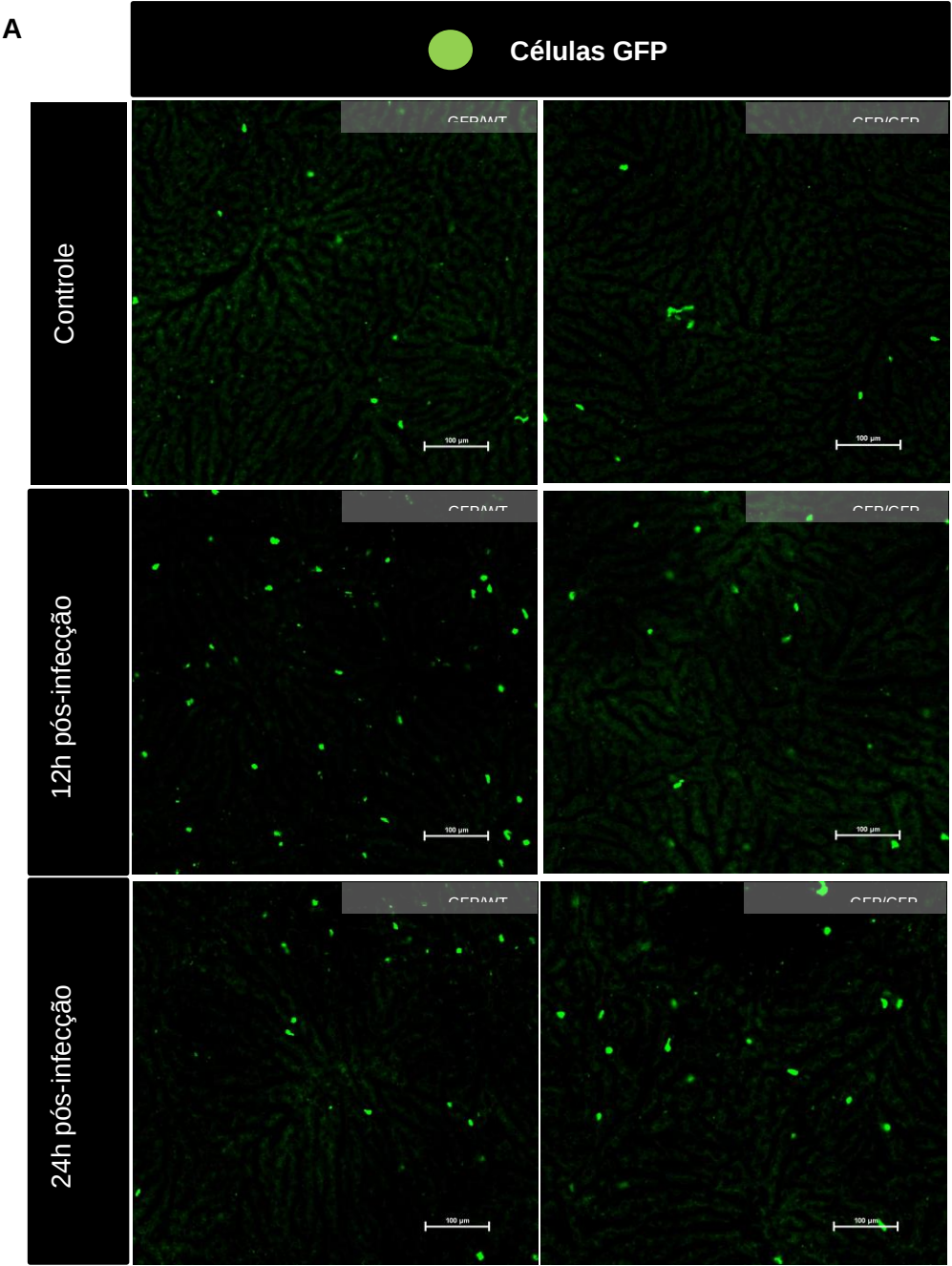


Figura 6. Comparação entre apresentação de células CXCR6+ em camundongos CXCR6^{GFP/WT} sem infecção, e 12 e 24 horas após a infecção por *E.coli*. (A) Microscopia intravital confocal evidenciando células CXCR6+ (verde; GFP) e fluxo sanguíneo (roxo; azul de Evans). **(B)** Contagem de células CXCR6+ por campo. **(C)** Velocidade média de deslocamento das células CXCR6+ pelo campo ao longo de 30 minutos. Pi: Pós-infecção. Objetiva 20x.

4.7 A ausência de CXCR6 resultou na menor contagem de células GFP após infecção por *E.coli*

Para entender o papel do receptor CXCR6 na resposta imune hepática, foram avaliados animais com depleção de CXCR6 (CXCR6^{GFP/GFP}). Realizou-se microscopia intravital (IVM) em diferentes grupos para comparar as células GFP em animais CXCR6+ (heterozigotos, CXCR6^{GFP/WT}) e CXCR6- (homozigotos, CXCR6^{GFP/GFP}). Os grupos foram os mesmos: controle (não infectado); 12 horas após a infecção por *E. coli*; e 24 horas após a infecção. Nos animais com depleção de CXCR6, foi possível observar que o número de células GFP aumentou levemente somente após 24 horas da infecção e em menor proporção, sugerindo um estado menos inflamatório em comparação com os animais CXCR6+. A velocidade de deslocamento dessas células não teve variação significativa entre nenhum dos grupos. O aumento tardio e brando do número de células contrasta com o aumento abrupto observado nas células CXCR6+ após 12 horas de infecção. Esses achados acompanharam as observações clínicas apresentadas previamente, onde os animais homozigotos (CXCR6^{GFP/GFP}) apresentaram efeitos mais suaves frente à infecção por *E. coli*, quando comparados aos grupos heterozigotos e, principalmente, selvagens (WT).



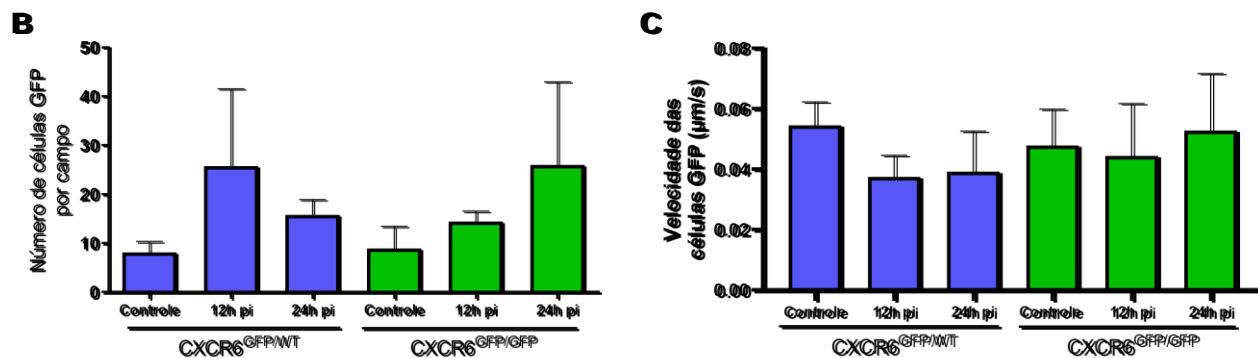


Figura 7. Comparação entre apresentação de células em camundongos adultos CXCR6^{GFP/WT} e CXCR6^{GFP/GFP} sem infecção, e 12 e 24 horas após a infecção por *E.coli*. (A) Microscopia intravital confocal evidenciando células GFP⁺ (verde). (B) Contagem de células GFP por campo. (C) Velocidade de células GFP em ao longo de 30 minutos. Objetiva 20x.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi utilizada a microscopia confocal intravital para observar o comportamento das células CXCR6⁺ ao longo da vida em animais portadores do genótipo CXCR6^{GFP/WT}. Nos animais adultos, foram detectadas aproximadamente oito células CXCR6⁺ por campo, que migraram ao longo dos sinusoides hepáticos a uma velocidade média de 0,06 $\mu\text{m/s}$. Esses achados corroboram o estudo de Geissmann et al. (2005), que também relatou a mobilidade das células CXCR6⁺ no ambiente hepático. Esses autores encontraram que as células NKT CXCR6⁺ patrulham os sinusoides hepáticos, e que o receptor CXCR6 contribui para as respostas imunológicas no fígado regulando sua abundância, sugerindo sua função na vigilância imunológica (GEISSMANN et al., 2005).

Os animais neonatos foram submetidos à microscopia confocal intravital exatamente entre cinco e seis dias de vida e, nesse período, já foram observadas em média 63 células CXCR6⁺ por campo, um número significativamente maior em comparação aos adultos, significando que à luz da microscopia intravital confocal, as células CXCR6⁺ apresentam uma distribuição geográfica e quantificação e comportamento diferente ao longo da vida. Considerando que no fígado grande parte das células CXCR6⁺ são NKT (GEISSMANN et al., 2005; SLAUENWHITE; JOHNSTON, 2015), os achados da literatura vão na contramão dessa observação. Segundo Slauenwhite e Johnston (2015), em camundongos, as células NKT são detectadas pela primeira vez no timo entre o quinto e o sexto dia após o nascimento e na periferia após o oitavo dia. Outro estudo indica que as células NKT atingem níveis estáveis em múltiplos tecidos por volta de cinco a seis semanas de idade, com a frequência mais alta no fígado dos camundongos adultos (PELLICCI et al., 2002). O presente estudo sugere que a população de células CXCR6⁺ no fígado neonatal é não apenas presente desde cedo, mas também mais abundante em relação ao fígado adulto, fornecendo percepções inéditas sobre a complexa interação das células imunes no ambiente hepático neonatal. Vale ressaltar que mais estudos são necessários para determinar a caracterização das células CXCR6⁺ hepáticas nesse período da vida.

Além disso, observou-se que as células CXCR6⁺ permaneceram agrupadas nos fígados de neonatos e praticamente imóveis, com uma velocidade média de 0,01 $\mu\text{m/s}$. Esses resultados podem ser comparados a achados prévios do presente grupo

de pesquisa, onde Silva-Junior et al. (2024) observaram mobilidade reduzida e formação de clusters em neutrófilos neonatais. Esse comportamento foi mantido mesmo em situações de insulto inflamatório, quando foi provocada necrose hepática focal em neonatos, e os neutrófilos exibiram uma resposta migratória reduzida, compensada por uma maior liberação de espécies reativas de oxigênio. Esses achados podem indicar um estado de prontidão ou adaptação funcional ao ambiente hepático neonatal, que se repete em mais de uma população imune. O número elevado dessas células no fígado neonatal pode desempenhar um papel importante na imunidade do início da vida. Estudos adicionais são necessários para compreender completamente o desenvolvimento e a funcionalidade das células imunes durante as diferentes fases da vida.

Além da descrição, para entender a função e os mecanismos envolvidos na atividade das células com o receptor CXCR6 no contexto hepático, foi necessário criar um desafio inflamatório e observar a dinâmica celular na presença e ausência desse receptor. Para isso, utilizaram-se animais com depleção genética de CXCR6 e inserção de GFP em seu alelo como ferramentas fundamentais no estudo. Através da microscopia confocal intravital, comparou-se o número de células GFP em animais adultos com genótipo heterozigoto (CXCR6^{GFP/WT}) e homozigoto (CXCR6^{GFP/GFP}), observando semelhança entre eles, sugerindo que o direcionamento de linfócitos para órgão não-linfoide parece não ser exclusivamente o papel do CXCR6. Dessa forma, no presente estudo, utilizou-se o animal homozigoto, considerado-o *knockout* para CXCR6 e não para a célula portadora desse receptor que tudo indica ser NKT. Observação relevante, pois outros estudos, que empregaram citometria de fluxo, encontraram um número reduzido de células GFP+ no fígado de animais homozigotos, diferentemente do achado nesse estudo que utilizou IVM (GEISSMANN et al., 2005; SLAUENWHITE; GERMANOV et al., 2008).

Quando os animais adultos foram desafiados com uma infecção por *E. coli*, aqueles com depleção de CXCR6 exibiram menores taxas de mortalidade, menor variação de peso e escores clínicos menos graves ao longo do período de observação de 24 horas. Além disso, esses animais apresentaram uma menor contagem de bactérias no fígado, medida por unidades formadoras de colônias (CFU). Curiosamente, a microscopia confocal intravital indicou um estado menos inflamatório nesses animais,

refletido pela menor contagem de células GFP+. Em conjunto, esses resultados sugerem que a ausência do receptor CXCR6 está associada a uma resposta inflamatória menos intensa, resultando em uma resposta imune mais controlada e menos prejudicial ao fígado durante a infecção bacteriana. Estudos futuros devem investigar se essa observação se mantém em infecções de natureza viral, avaliando o comportamento do fígado sob diferentes agentes infecciosos.

De forma semelhante, um estudo em pulmões mostrou que a deficiência de CXCR6 resultou em uma carga bacteriana reduzida após a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e em menor perda de peso após a infecção por vírus da gripe A recombinante expressando o peptídeo P25 (rIAV-P25) em comparação com os controles selvagens (ASHHURST et al, 2019). Ambos os tecidos, hepático e pulmonar, apresentam número expressivo de células CXCR6 (SLAUENWHITE; GERMANOV et al., 2008) e sua ausência parece estar associada a uma redução na carga de patógenos e a uma melhora nos desfechos clínicos. Isso é particularmente interessante, pois indica que CXCR6 pode ser um alvo terapêutico potencial em diversos contextos.

6 CONCLUSÕES

A utilização da microscopia confocal intravital neste estudo proporcionou uma análise detalhada do comportamento das células CXCR6+. Além disso, sua avaliação ao longo da vida de camundongos, demonstrou que a quantidade, a distribuição geográfica e o comportamento dessas células são diferentes em adultos e neonatos.

Os animais com depleção genética de CXCR6 e inserção de GFP em seu alelo foram ferramentas fundamentais no estudo e, através da microscopia confocal intravital, o número de células GFP em animais adultos com genótipo heterozigoto (CXCR6^{GFP/WT}) e homozigoto (CXCR6^{GFP/GFP}) foi semelhante, sugerindo que o direcionamento de linfócitos para órgão não-linfóides parece não ser exclusivamente o papel do CXCR6.

O estudo também revelou que animais com depleção de CXCR6 apresentaram respostas menos inflamatórias durante a infecção por *E. coli*, caracterizadas por menor mortalidade, variação de peso reduzida, escores clínicos menos graves e menor número de bactérias no fígado. Esses resultados indicam que a ausência de CXCR6 pode estar associada a uma resposta imune mais controlada e menos prejudicial ao fígado durante a infecção bacteriana.

Portanto, este estudo contribui, não apenas para o entendimento do papel do CXCR6 na dinâmica das células imunes no fígado ao longo da vida, mas também sugere que modulações na expressão deste receptor podem influenciar significativamente a resposta imunológica e a susceptibilidade a infecções hepáticas. Novos estudos são necessários para elucidar completamente os mecanismos subjacentes e explorar o potencial terapêutico de intervenções direcionadas ao receptor de quimiocina CXCR6 em condições hepáticas.

REFERÊNCIAS

ASHHURST, A. S. ET AL. CXCR6-Deficiency Improves the Control of Pulmonary Mycobacterium tuberculosis and Influenza Infection Independent of T-Lymphocyte Recruitment to the Lungs. **Frontiers in Immunology**, Sidney, v. 10, n.339, p.1-16, mar. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6416161/>. Acesso em: 05 ago. 2024

DONG, Z.; WEI, H.; SUN, R.; TIAN, Z. The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. **Cellular & molecular immunology**, Hefei, v. 4, n. 4, p. 241-252, ago. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17764614/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

DOHERTY, D. G.; O'FARRELLY, C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. **Immunological Reviews**, Dublin, v. 174, n. 1, p. 5-20, abr. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10807503/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

EBERL, G.; LEES, R.; SMILEY, S. T.; TANIGUCHI, M.; GRUSBY, M. J.; MACDONALD, H. R. Tissue-Specific Segregation of CD1d-Dependent and CD1d-Independent NK T Cells. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 11, p. 6410–6419, jun. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10352254/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

FREITAS-LOPES, M. A. ET AL. Differential Location and distribution of hepatic immune cells. **Cells**, Belo Horizonte, v. 6, n. 4, p. 48, dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5755505/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

GEISSMANN, F. ET AL. Intravascular Immune Surveillance by CXCR6+ NKT Cells Patrolling Liver Sinusoids. **PLOS Biology**, New York, v. 3, n. 4, p. e113-e113, abr. 2005. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030113>. Acesso em: 05 ago. 2024.

GERMANOV, E. ET AL. Critical Role for the Chemokine Receptor CXCR6 in Homeostasis and Activation of CD1d-Restricted NKT Cells. **The Journal of Immunology**, Halifax, v. 181, n. 1, p. 81-91, jun. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18566372/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

GU, X. ET AL. New insights into iNKT cells and their roles in liver diseases. **Frontiers in Immunology**, Hangzhou, v. 13, n. 1, p. 1-17, out. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.1035950/full>. Acesso em: 05 ago. 2024.

HEYMANN, F.; TACKE, F. Immunology in the liver - from homeostasis to disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Aachen, v. 13, n. 2, p. 88-110, jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26758786/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, Calgary, v. 14, n. 10, p. 996-1006, out. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24048121/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

LOPES, M. E.; NAKAGAKI, B. N.; MATTOS, M. S.; et al. Susceptibility to Infections During Acute Liver Injury Depends on Transient Disruption of Liver Macrophage Niche. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 892114, jul. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35967353/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

MALAVOLTA, M. ET AL. Recovery from mild Escherichia coli O157:H7 infection in young and aged C57BL/6 mice with intact flora estimated by fecal shedding, locomotor activity and grip strength. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, Ancona, v. 63, p.1-9, abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30961802/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

MARQUES, P. ET AL. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nature Protocols**, Belo Horizonte, v. 10, n. 2, p. 258-268, jan. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2015.006>. Acesso em: 05 ago. 2024.

NAKAGAKI, B. N.; MAFRA, K.; DE CARVALHO, É.; et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294-1307, 2018. doi: 10.1016/j.jhep.2018.08.018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30171870/> Acesso em: 05 ago. 2024.

PELLICCI, D. G. ET AL. A Natural Killer T (NKT) Cell Developmental Pathway Involving a Thymus-dependent NK1.1-CD4⁺ CD1d-dependent Precursor Stage. **Journal of Experimental Medicine**, Melbourne, v. 195, n. 7, p. 835-844, mar. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11927628/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

JÚNIOR, S. ET AL. The neonatal liver hosts a spontaneously occurring neutrophil population, exhibiting distinct spatial and functional characteristics from adults. **Journal of Leukocyte Biology**, Belo Horizonte, mar. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38552209/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

SLAUENWHITE, D.; JOHNSTON, B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. **Frontiers in Immunology**, Halifax, v. 6, maio 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445310/>. Acesso em: 05 ago. 2024.

ZHENG, M.; TIAN, Z. Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2525, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02525/full> Acesso em: 05 ago. 2024.

WEILER-NORMANN, C.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, dez. 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1746.2004.03687>. Acesso em: 05 ago. 2024.