

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

Wanderson Ferreira da Silva Júnior

O FÍGADO NEONATAL COMO RESERVATÓRIO DE NEUTRÓFILOS

Belo Horizonte
2024

WANDERSON FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

O FÍGADO NEONATAL COMO RESERVATÓRIO DE NEUTRÓFILOS

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr. Gustavo Batista
Menezes

Belo Horizonte
2024

- 043 Silva Júnior, Wanderson Ferreira da.
O fígado neonatal como reservatório de neutrófilos [manuscrito] / Wanderson Ferreira da Silva Júnior. – 2024.
76 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador(a): Dr. Gustavo Batista Menezes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.
1. Biologia Celular. 2. Neutrófilos. 3. Recém-Nascido /crescimento & desenvolvimento. 4. Fígado. I. Menezes, Gustavo Batista. 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 WANDERSON FERREIRA DA SILVA
JÚNIOR**

Às **quatorze horas** do dia **16 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: "**O FÍGADO NEONATAL COMO RESERVATÓRIO DE NEUTRÓFILOS**", 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 ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADO
Dr. Aristóbolo Mendes da Silva	UFMG	APROVADO
Dra. Lucíola da Silva Barcelos	UFMG	APROVADO
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

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

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva _____

Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos _____

Dr^a. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda _____

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Aristobolo Mendes da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2024, às 10:02, 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 **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 **Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda, Professora do Magistério Superior**, em 26/08/2024, às 09:54, 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 **Luciola da Silva Barcelos, Professora do Magistério Superior**, em 06/09/2024, às 16:48, 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 3483426 e o código CRC 02E84B50.

Referência: Processo nº 23072.205385/2024-37

SEI nº 3483426

AGRADECIMENTOS

Saí de casa aos 17 anos de idade. Fui cursar Odontologia. Tenho conservada na memória, com toda a clareza, o dia em que se decidiu, por ventura da aprovação da bolsa integral, que seria aquele o meu futuro. Era uma tarde, comum como todas as outras, mas, ainda assim, eu me lembro de caminhar da casa da minha avó até a casa dos meus pais – que ficam na mesma rua em Pitangui. Caminhei como quem buscasse digerir a novidade. E, decerto pela primeira vez, eu chorei de orgulho. No entanto, absolutamente nada daquela caminhada me prepararia para o porvir. O futuro me exigiu bastante: perdi o cotidiano delicioso dos dias ao lado da minha família, perdi as observações do crescimento do meu irmão caçula – quando saí, era ainda pequeno, e hoje tem a minha altura –, perdi o nascimento da minha primeira prima Isabela, perdi as lentas observações da passagem do tempo refletidas nos rostos dos meus pais e avó. Perdi toda a possibilidade de acompanhar as delícias do tempo, do convívio diário, com os seres que mais amo na vida. É duro. Aperta, espreme, é pontiagudo.

Por outro lado, esses quase 7 anos me deram a imposição da solidão, da determinação de muito trabalho, do querer de se fazer um nome só com o suor. E erreí muitas vezes. Por vezes, me cobreí de menos; ora, me cobreí extenuadamente, até ferir. Mas o tempo não faz vítimas. O tempo é o equilíbrio de todas as coisas. A vida, enquanto obra do tempo, é um pêndulo.

Para além do que me foi tirado, tive para sempre o amor incondicional dos meus pais, Andrezza e Wanderson, avó Leila, irmãos Gustavo e Rafael, meus tios Marcelo e Juninho, minha tia Raimunda, minhas primas, Michele, Cris e Júlia. Meus pais me criaram com puro amor, apoio perene, confiança e força. Sou metade e metade o retrato

deles: tenho a força do nome, o rosto e a razão do meu pai; o olhar atento e a paixão da minha mãe. Minha avó me entregou para sempre o seu coração e as palavras de força e carinho dela são a oração que sei rezar de côr. Meus irmãos são a nostalgia da infância e a propulsão de buscar ser alguém que lhes orgulhe no futuro. Meus tios são presenças sinceras sempre que preciso. Minha tia Raimunda foi o abrigo quando parti de casa, foi o gosto sincero da família quando estive longe. Minhas primas foram o conforto familiar que marca. E mais recentemente floresceu Larissa, que tem o olhar e a voz do amor, que reforçou meus sonhos e dividiu comigo o peso da luta diária por cada conquista, sendo minha parceira no peito e na vida. Digo cada um desses nomes com o coração mais vivo possível, como um rito de fortalecimento, porque me embalsamaram nos momentos difíceis, me levantaram quando caí, me alimentaram, me fizeram dormir quando precisava e me fizeram acordar para ver a vida. A eles, por eles, sempre foi e sempre será. Cada um desses nomes vivo, por todo o meu tempo, aqui no peito.

E ao longo do caminho, surgiram companheiros de caminhada: aos meus dois únicos bons e verdadeiros amigos desde a infância, que conservo por toda a vida apesar da distância e rotina, Sávio e Guto, meu também eterno obrigado; aos amigos do CGB, Pedro, Sarah, Júlia Megale, Hortência, Cris, Maísa, Maria Luíza, Júlia, agradeço a amizade, o companheirismo dos dias. Aos professores que contribuíram, com apoio e inspiração para que eu esteja aqui, Prof. Aécio Abner, Prof. Filipe Jaeger, Prof. Carlos Cordeiro, Profa. Lorenza Carvalhaes, meus sinceros agradecimentos! Pela confiança e carinho da Profa. Annamaria Ravara Vago, agradeço de coração! Ao meu orientador e amigo, Prof. Gustavo Menezes, pela orientação do fazer científico e das

lutas da vida, pelo investimento em minha formação e progresso, o sinal indelével da minha gratidão.

Por fim, sobretudo, ausente de qualquer culpa, agradeço a mim: foram realmente madrugadas de laboratório. Houve período em que eu chegasse no laboratório na quinta e voltasse para a casa na manhã de segunda, extenuado, observando os raios de sol contra as árvores do campus e com o peito cheio de propósito. Houve período em que eu deixasse minha mala próxima do escaninho, certo de só ir embora com resultados. Houve período em que eu sempre passasse a noite no laboratório e estivesse acostumado ao sofá preto de dois lugares da sala do Professor para deitar o corpo e o banco branco de madeira para comportar as pernas. A verdade é que eu sempre quis alcançar um algo-sem-nome, um ardor de existência, um senso de construção. Até aqui, desde a graduação, foram dezenas de apresentações em congresso, dois livros – coautoria em outros quatro. Enquanto escrevo, um paper de primeiro autor aceito no Journal of Leukocyte Biology; outro, também de primeiro autor, no Journal of Lipid Research. Professor Voluntário da disciplina de Citologia e Histologia Geral para o Curso de Radiologia da Faculdade de Medicina aceito pelo Departamento de Morfologia já há três semestres. Valeu o peso? Valeu a dor? Porque doeu. Deveria ter feito mais? Deveria ter feito menos? Me poupado? Neste ponto, já não importa.

O amor das minhas pessoas, as minhas pessoas, o caminho, isto basta. E, Wanderson, reserve um momento para chorar de orgulho outra vez. A última oportunidade já faz algum tempo. Tire uma semana, talvez duas. Guarde a paixão. Lembre-se sempre: amanhã é outro dia. O mundo está aqui assistindo. E como marcamos em muitas páginas de suas anotações, de escritas truncadas, experimentos

ousados, não raramente manchadas de café: *Keep going!*

“Slow down you crazy child
You’re so ambitious for a juvenile
But then if you’re so smart tell me
Why are you still so afraid?”

RESUMO

A resposta imune neonatal é um tópico de absoluta importância e influência em terapêuticas que possam ser aplicadas neste período crítico do desenvolvimento. O seu entendimento pode fomentar progressos significativos no cuidado e na prevenção de patologias em neonatos. Neste trabalho, por meio do uso de Microscopia Confocal Intravital, pudemos descrever uma população considerável de granulócitos dispostos no parênquima hepático de fetos e camundongos neonatos. Pela imunofenotipagem, foram identificadas alterações principalmente nos granulócitos no período neonatal. Com o emprego da Microscopia Confocal Intravital em fígados do modelo animal desde o nascimento até a fase adulta, observamos a presença bastante expressiva de células Ly6G⁺ neste microambiente tecidual até a segunda semana de vida. Com CyTOF, estas células foram caracterizadas como neutrófilos – o que se reafirmou pela morfologia e a técnica de imunohistoquímica. Neste sentido, mesmo o fígado fetal pôde ser percebido como um sítio para esta população de neutrófilos por volta da segunda semana gestacional, levantando questões sobre sua origem e estabelecimento. De maneira geral, estas células estão dispostas majoritariamente no espaço extravascular e manifestam comportamentos muito pontuais nos períodos analisados: estes neutrófilos hepáticos formam aglomerados celulares em fetos e neonatos, que persistem pelos primeiros dias de vida, além de terem limitada capacidade migratória que parece ser contrabalanceada pela liberação aumentada de espécies reativas de oxigênio em neonatos sob estímulo quando comparados a qualquer outra fase do modelo animal. Este trabalho descreve, de maneira inédita, uma população de neutrófilos presente no fígado fetal e neonatal, com características espaciais e

funcionais muito distintas daquelas observadas na fase adulta.

Palavras-chave: Neutrófilos. Desenvolvimento neonatal. Fígado.

ABSTRACT

The neonatal immune response is a topic of importance and influence in therapeutics that may be applied during this critical period of development. Understanding it can foster significant progress in the care and prevention of diseases in neonates. In this study, using Intravital Confocal Microscopy, we were able to describe a considerable population of granulocytes located in the hepatic parenchyma of fetuses and neonatal mice. Through immunophenotyping, changes were identified mainly in granulocytes during the neonatal period. By employing Intravital Confocal Microscopy in liver tissues from the animal model from birth to adulthood, we observed a very significant presence of Ly6G⁺ cells in this tissue microenvironment up to the second week of life. With CyTOF, these cells were characterized as neutrophils – which was confirmed by morphology and immunohistochemistry techniques. In this sense, even the fetal liver was perceived as a site for this population of neutrophils around the second gestational week, raising questions about their origin and establishment. Generally, these cells are predominantly located in the extravascular space and exhibit very specific behaviors during the analyzed periods: these hepatic neutrophils form cellular clusters in fetuses and neonates, which persist for the first few days of life, and have limited migratory capacity that seems to be counterbalanced by increased release of reactive oxygen species in neonates under stimulation when compared to any other phase of the animal model. This work uniquely describes a population of neutrophils present in the fetal and neonatal liver, with spatial and functional characteristics very distinct from those observed in the adult phase.

Keywords: Neonatal Development. Neutrophils. Liver.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A complexidade do sítio imune hepático investigada a partir da Microscopia Confocal Intravital.....	19
FIGURA 2: Neutrófilos como protagonistas da resposta imune.....	21
FIGURA 3: Escolha dos animais experimentais em relação aos seus períodos de desenvolvimento.....	24
FIGURA 4: Método para o ensaio de estresse oxidativo das células hepáticas não-parenquimais isoladas.....	29
FIGURA 5: Imagens de Microscopia Confocal Intravital hepática para células Ly6G+ e análises quantitativas.....	33
FIGURA 6: Caracterização dos granulócitos neonatais.....	35
FIGURA 7: Migração de neutrófilos hepáticos do parênquima para os sinusoides em camundongos ao longo da vida.....	39
FIGURA 8: Neutrófilos já estão presentes no fígado de camundongos na segunda semana gestacional.....	42
FIGURA 9: Aglomerados de neutrófilos hepáticos identificados no início da vida em camundongos.....	44
FIGURA 10: Padrão de movimentação dos neutrófilos hepáticos durante o desenvolvimento dos camundongos e produção de ROS.....	47
FIGURA 11: A responsividade de neutrófilos no estabelecimento da resposta inflamatória.....	49

LISTA DE ABREVIACÕES

ROS: Reactive Oxygen Species

DNA: Deoxyribonucleic Acid

NETs: Neutrophil Extracellular Traps

CyTOF: Time-of-Flight Mass Cytometry

MPO: Mieloperoxidase

WT: Wild-Type

E: Dia embrionário

D: Dias

S: Semanas

PE: Phycoerythrin

APC: Allophycocyanin

SEM: Standard Error of the Mean

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Microscopia Confocal Intravital	24
3.3 Modelo de Quimiotaxia <i>In Vivo</i>	25
3.4 Isolamento de Células Não-Parenquimais Hepáticas	26
3.5 Purificação de Neutrófilos	27
3.6 Ensaios de Estresse Oxidativo	28
3.7 Processamento de Amostras e Ensaios de Mieloperoxidase (MPO)	29
3.8 Análises Estatísticas	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Uma significativa população de granulócitos pode ser identificada no parênquima hepático de fetos e camundongos neonatos	31
4.2 Neutrófilos migram, de maneira sincronizada, do parênquima hepático para o lúmen dos sinusoides durante o desenvolvimento pós-natal	36

4.3 O fígado fetal já abriga uma significativa população de neutrófilos.....	40
4.4 Neutrófilos fetais e neonatais formam clusters que se mantêm durante os primeiros dias de vida.....	43
4.5 Neutrófilos neonatais exibem padrões reduzidos de velocidade e migração comparados a adultos.....	44
4.6 Neutrófilos em neonatos produzem volumes significativos de MPO e são mais capazes de liberação de ROS quando induzidos por PMA comparados a outros períodos.....	48
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	63
PUBLICAÇÃO.....	64

1. INTRODUÇÃO

O fígado já é classicamente descrito como órgão fundamental para o metabolismo e detoxificação. No entanto, principalmente nas últimas décadas, esta mesma estrutura passou a ser descrita como um importante sítio imune em todas as fases da vida (JENNE; KUBES, 2013; LICHANSKA; HUME, 2000; NAKAGAKI et al., 2018). Ainda no desenvolvimento embrionário, o fígado se forma muito inicialmente considerando os demais órgãos, da mesma maneira que seu protagonismo nas funções imunes (HOEFFEL; GINHOUX, 2018). O estabelecimento da tolerância fetal imune durante a gestação, por exemplo, é também resultado da contribuição de células imunes hepáticas, como as células de Kupffer, que se originam a partir de progenitores hematopoiéticos derivados do saco vitelino (GOMEZ PERDIGUERO et al., 2015; MOORE; METCALF, 1970). E esta contribuição não é limitada ao período fetal, mas se dá continuamente ao longo da vida, com a regulação das interações imunes no microambiente hepático (KUBES; JENNE, 2018; RACANELLI; REHERMANN, 2006). Neste sentido, mesmo células parenquimais hepáticas, os hepatócitos, são capazes de coordenar respostas imunes com a síntese de proteínas de fase aguda e citocinas (EHLTING; WOLF; BODE, 2021; WOLF et al., 2023). Em suma, o microambiente hepático é um sítio de constante interação entre suas células hepáticas e componentes de resposta imune, fundamentando a regulação precisa entre a tolerância e a ativação (ZHOU; XU; GAO, 2015). Esta regulação é uma condição hepática terminantemente necessária pela exposição deste tecido a produtos da microbiota intestinal ou mesmo a antígenos circulantes no fluxo

sanguíneo (DOHERTY, 2016). É natural, portanto, que a compreensão do equilíbrio mencionado seja um objeto tão caro para a literatura do campo – caracterizada, inclusive, como uma possibilidade para investigações de aplicação terapêutica.

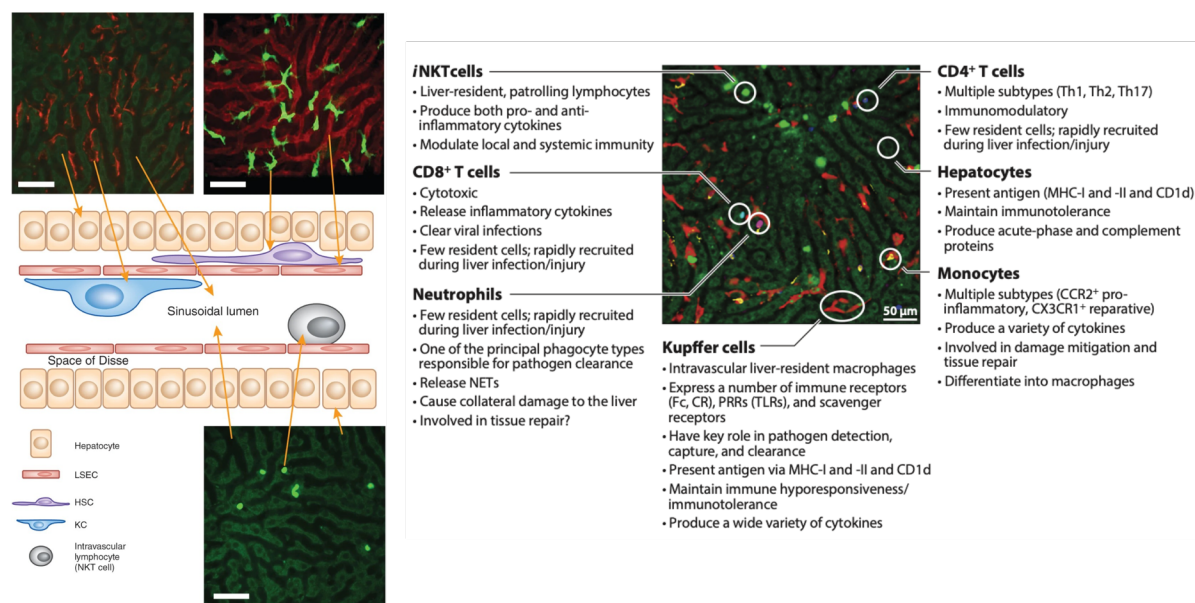


Figura 1: A complexidade do sítio imune hepático investigada a partir da Microscopia Confocal Intravital, adaptado de outros trabalhos (JENNE; KUBES, 2013; KUBES; JENNE, 2018). Diferentes populações imunes contribuem para homeostase imune dispostas no interior dos sinusoides e espaço de Disse no fígado, em constante contato com potenciais estímulos imunológicos no fluxo sanguíneo. Esta diversidade de células imunes é capaz de estimular e modular a resposta inflamatória por múltiplas vias.

Mais profundamente, investigações direcionadas a compreender a participação pontual de populações celulares hepáticas nos processos imunes pode corresponder ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas para condições como infecções hepáticas, doenças autoimunes e câncer (DE MARTIN et al., 2018; HERCUN et al., 2022). A modulação dessas interações imunes é, não por acaso, uma possibilidade considerável de aplicação enquanto terapia (OSEI-BORDOM;

BOZWARD; OO, 2020). Essa afirmativa é reforçada com o aprofundamento dos achados celulares e moleculares da imunologia hepática, que expandem as possibilidades de intervenções que modulem e impactem positivamente a progressão de patologias causadas pela disfunção da resposta imune (DOHERTY, 2016; HERCUN et al., 2022). E dentre as populações celulares imunológicas, os leucócitos, especialmente os neutrófilos, são agentes críticos do estabelecimento da resposta imune por constituírem a sua linha de frente (MANTOVANI et al., 2011). Células guiadas por gradientes quimiotáticos, os neutrófilos rapidamente migram para sítios de infecção ou lesões estéreis (MANTOVANI et al., 2011; MCDONALD et al., 2010). Fagócitos muito ativos, são ainda capazes de neutralizar agentes infecciosos pela liberação de compostos como proteínas antimicrobianas e espécies reativas de oxigênio (ROS) (BURN et al., 2021). Além disso, são importantes indutores de respostas inflamatórias, promovendo o recrutamento de outras células imunes, pela liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, como o leucotrieno B4 (MANTOVANI et al., 2011). Especialmente, os neutrófilos são células especializadas na liberação, no meio extracelular, do próprio DNA em associação com histonas e enzimas que combatem os agentes infecciosos – processo intrincado chamado de netose ou, do inglês, *neutrophil extracellular traps* (NETs), armadilhas extracelulares de neutrófilos (BURN et al., 2021). Apesar de serem úteis na manutenção da saúde, em condições de desregulação em sua ativação, estas células viabilizariam o estabelecimento e progressão de doenças autoimunes, inflamatórias e lesões teciduais (SEGEL; HALTERMAN; LICHTMAN, 2011).

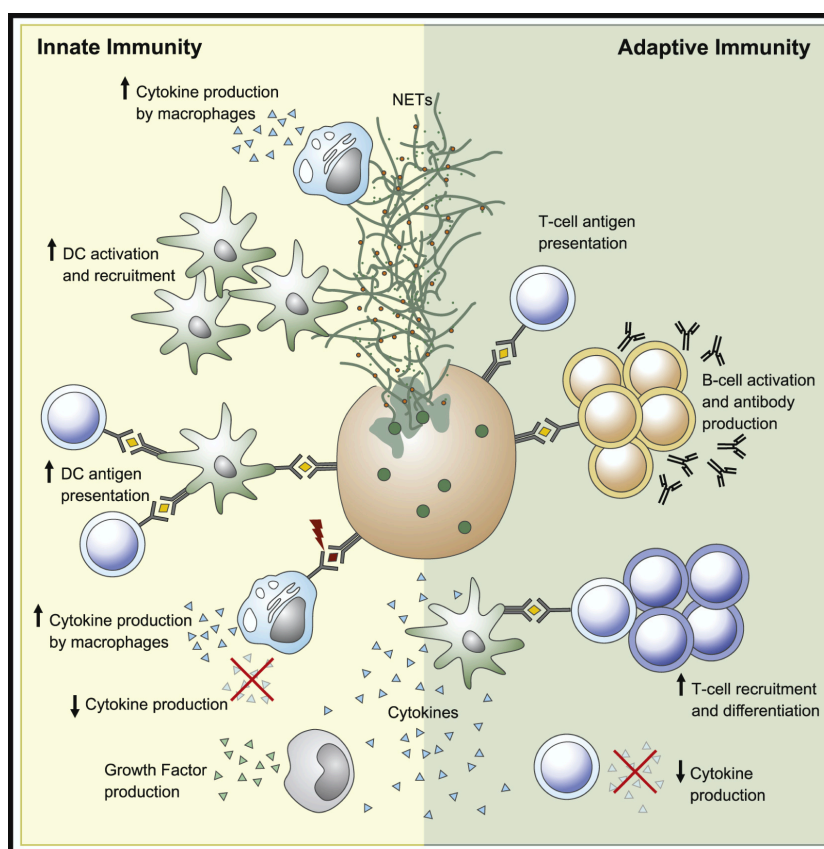


Figura 2: Neutrófilos como protagonistas da resposta imune (BURN et al., 2021). Os neutrófilos são células da linha de frente do sistema imune, capazes da ativação e modulação da participação de outras populações no estabelecimento da resposta inflamatória, além de combater diretamente infecções com o uso de seu armamentário intracelular: a produção de mieloperoxidases, espécies reativas de oxigênio e a liberação de redes extracelulares compostas por DNA, histonas e enzimas.

Neutrófilos, assim como as demais células envolvidas em respostas imunes, são constante e previsivelmente avaliadas no contexto de patologias (MANTOVANI et al., 2011). Por outro lado, há uma lacuna significativa no entendimento do comportamento e função dessas populações em condições homeostáticas. A significativa maior parte da literatura posta fez progredir a compreensão da atuação dos neutrófilos em cenários infecciosos e de disfunção inflamatória, sedimentando o

seu papel intrinsecamente, neste nível, relacionado a um contexto patológico (BURN et al., 2021; MANTOVANI et al., 2011; SEGEL; HALTERMAN; LICHTMAN, 2011). A ausência de investigações que busquem analisar a cinética de neutrófilos não estimulados por desafios que levem ao ponto da resposta inflamatória impossibilita o entendimento mais geral dessas células e de suas potenciais contribuições para a homeostase imune (SHIM; DENISET; KUBES, 2022; SILVESTRE-ROIG et al., 2019). A complexidade deste potencial duplo papel dos neutrófilos é acrescida na fase neonatal, em que seu protagonismo no estabelecimento das respostas imunes no início da vida ainda está sob investigação (LAWRENCE; CORRIDEN; NIZET, 2018). Não suficiente, o entendimento das interações granulocíticas neste período é fundamental para descrição de potenciais vulnerabilidades imunológicas ou mesmo de mecanismos que sejam inerentes a neonatos, fase tão crítica (RAYMOND et al., 2017).

Como resultado deste trabalho, descrevemos uma nova população de neutrófilos conservadamente presente no fígado fetal e neonatal de camundongos, que manifestam distribuição espacial e reações quimiotáticas muito distintas daquelas já descritas em adultos. Estes achados ressaltam características diferenciais, até então desconhecidas, do sistema imune hepático entre neonatos e adultos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho busca descrever a presença e o comportamento de neutrófilos no fígado neonatal comparado aos demais tempos analisados.

2.2 Objetivos Específicos

1- Estabelecer a cinética de células Ly6G+ por Microscopia Confocal Intravital ao longo da vida de camundongos;

2- Quantificar as células Ly6G+ por campo nas imagens de Microscopia Confocal Intravital;

3- Mensurar características espaciais individuais de células Ly6G+ nas imagens de Microscopia Confocal Intravital;

4- Isolar células não-parenquimais hepáticas por beads anti-Ly6G em neonatos;

5- Descrever, por CyTOF, os demais marcadores celulares de células Ly6G+ em neonatos;

6- Descrever a morfologia de células Ly6G+ por microscopia óptica;

7- Comparar a motilidade de células Ly6G+ estimuladas por modelos de lesão estéril em Microscopia Confocal Intravital ao longo da vida;

8- Comparar por ensaios imunes a produção de mieloperoxidase (MPO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) de células Ly6G+ ao longo da vida.

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1 Animais

Camundongos adultos de ambos os sexos, C57/BL6 WT, foram obtidos a partir do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brasil). Matrizes, compostas por 2 fêmeas por macho por caixa, geraram animais de diferentes idades (0 e 4 dias; 1, 2, 3 e 4 semanas) empregados no trabalho. Os animais foram mantidos em microisoladores de acrílico com sistema de ar filtrado (Alesco), com 5 camundongos cada, em um ambiente na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), providos com água e ração autoclavada (Nuvilab) *ad libitum*, com ciclo claro/escuro (12/12 h) digitalmente controlado. Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) seguindo as normas internacionais de manejo e cuidado animal (034/2017).

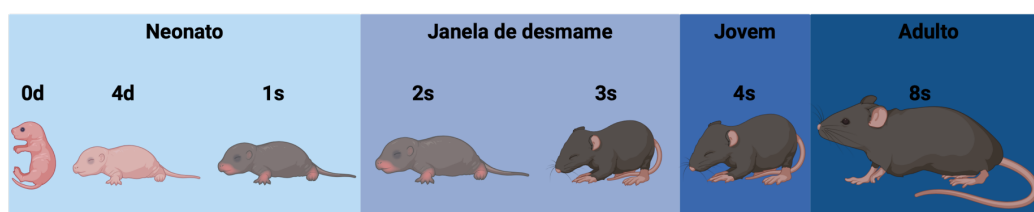


Figura 3: Ilustração da escolha dos animais experimentais em relação aos seus períodos de desenvolvimento para compreensão da cinética da presença neutrofílica hepática.

3.2 Microscopia Confocal Intravital

As imagens de Microscopia Confocal Intravital foram realizadas conforme padronização do grupo (MARQUES et al., 2015). Foi empregado o microscópio Nikon Eclipse Ti invertido acoplado a um cabeçote de escaneamento A1R (Nikon)

sem alterações. Os camundongos receberam, por via intravenosa, antes da aquisição das imagens, um mix de anticorpos fluorescentes aplicados para a visualização de populações celulares específicas como as descritas: anti-Ly6G ficoeritrina (PE – *phycoerythrin*) (0.35 μ L/g, clone 1A8; BD Biosciences) para a marcação de neutrófilos e anti-CD31 alofococianina (APC – *allophycocyanin*) (0.66 μ L/g, clone 390; BioLegend) para a marcação das células endoteliais, ambos diluídos em salina estéril. As análises das imagens foram executadas nos softwares Volocity (6.3; PerkinElmer) e NIS-Elements (Nikon Instruments).

3.3 Modelo de Quimiotaxia *In Vivo*

Foi executado um modelo de quimiotaxia *in vivo* induzida por lesão estéril conforme a descrição do protocolo de microscopia confocal hepática do grupo (MARQUES et al., 2015). Neste caso, empregada uma agulha adaptada a um cauterizador que, pela condução da alta temperatura, teria sua ponta capaz de causar uma lesão estéril termal pontual quando em contato com a superfície do fígado. Aos 40 minutos antes da aplicação anestésica (solução composta de 400 μ L de cetamina e 150 μ L de xilazina diluídas em 450 μ L de salina estéril, 5 μ L/g) e procedimento cirúrgico, o anticorpo anti-Ly6G era administrado via intravenosa para marcação dos neutrófilos. Pequenas doses anestésicas foram necessárias durante as aquisições de imagens com gravações de vídeos em torno de 2 a 4 horas, além de pequenos volumes de salina para manutenção da hidratação do fígado exposto. A temperatura do animal também foi controlada durante os procedimentos com o uso

de uma manta de papel alumínio. As análises dos vídeos obtidos foram executadas no software NIS-Elements Viewer 4.50, para as métricas de mobilidade dos neutrófilos em resposta ao modelo de quimiotaxia, como deslocamento, distâncias percorridas até o foco da lesão e velocidade.

3.4 Isolamento de Células Não-Parenquimais Hepáticas

Após anestesia e exsanguinação dos animais pela incisão simultânea da aorta e veia cava caudal, os fígados foram coletados, processados e digeridos num meio RPMI contendo collagenase (Tipo VIII; 0.25 mg/g/animal; Sigma-Aldrich) sob agitação constante, a 37°C por 1 hora. As células foram separadas por centrifugações diferenciais intercaladas por lavagens. A suspensão final foi centrifugada a 300 g, a 4 °C por 5 minutos, com o sobrenadante descartado e a viabilidade celular testada pelo método de exclusão com azul de tripano. Para os tempos de 0, 4 e 7 dias, células hepáticas totais foram obtidas pela limitação na separação de células não-parenquimais dos hepatócitos com o emprego das centrifugações diferenciais. Portanto, o pellet total foi utilizado para os animais dos grupos de 0, 4 e 7 dias. Para todos os outros tempos de análise, o pellet final de experimentos independentes foi utilizado para Citometria de Massa por Tempo de Voo (*Time-of flight mass cytometry* – CyTOF), purificação de neutrófilos e ensaios de estresse oxidativo. Especificamente para os experimentos de CyTOF, 1×10^6 células foram marcadas com anticorpos conjugados com isótopos como descrito em trabalho do grupo (NAKAGAKI et al., 2018).

3.5 Purificação de Neutrófilos

Após o isolamento de células hepáticas não-parenquimais, essas populações foram incubadas com 1 μ L de anticorpo anti-Ly6G conjugado com PE a 1 mg/mL (2 μ g/mL; BD Pharmingen) por 30 min a 4 °C. Depois do procedimento de incubação, as células foram lavadas em 2 mL de solução de tampão fosfato-salino (PBS) 1 $\times$ suplementada com 2 mM de EDTA e 0,5% de albumina de soro bovino (BSA), seguida de centrifugação a 300 g, 4 °C, por 5 minutos. O pellet foi, então, incubado por 30 minutos em 10 μ L de beads magnéticas anti-PE e lavado como descrito anteriormente. O pellet resultante foi ressuspensionado em 3 mL de PBS 1 $\times$ com 2 mM de EDTA e 0,5% de BSA e, em seguida, transferido para uma coluna de campo magnético (iMag; BD Biosciences) por 15 minutos. Em sequência, os tubos foram decantados e as amostras foram lavadas com 3 mL de PBS 1 $\times$ com 2 mM de EDTA e 0,5% de BSA. A pureza dos neutrófilos foi avaliada em um citômetro Accuri C6. As células isoladas Ly6G⁺ foram centrifugadas em uma centrífuga cytospin (INBRAS) a 500 rpm por 5 minutos e as lâminas foram coradas para imunofluorescência e com Panóptico Rápido. Para imunofluorescência, as células purificadas Ly6G⁺ foram incubadas por 15 minutos com DAPI (10 μ M; cat. no. D3571) para a coloração dos núcleos. As imagens foram adquiridas usando um microscópio invertido Nikon Eclipse Ti acoplado a um cabeçote de escaneamento A1R, utilizando uma objetiva de 63 $\times$. Para a avaliação panóptica, foi utilizada uma objetiva de 40 $\times$ em um microscópio de luz (Olympus).

3.6 Ensaios de Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo em células vivas foi medido pelo ensaio de CellRox. Depois do isolamento de células não-parenquimais, o pellet final foi incubado com apocinina (um inibidor clássico de NADPH oxidase) para o controle negativo, lavado e ressuspendido em 100 μ L de PMA (WAY; CHOU; KING, 2000), composto, por outro lado, capaz de estimular a produção de ROS pela via de NADPH oxidase. Foram empregadas concentrações de 1, 10 e 100 nM por 1.5 hora a -4°C na capela de fluxo laminar. Após, a amostra foi centrifugada a 300 g por 5 minutos, tendo o sobrenadante descartado e adicionada 50 μ L de solução contendo CellROX a 5 μ M em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, incubada por 30 minutos a 37°C . Após a incubação, as células foram novamente centrifugadas a 300 g por 5 minutos e lavadas 3 vezes com PBS 1 $\times$. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo anti-Ly6G PE por 30 minutos a 4°C , lavadas e ressuspendidas em 1 mL de Wash B para o ensaio de estresse oxidativo no citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton Dickinson).

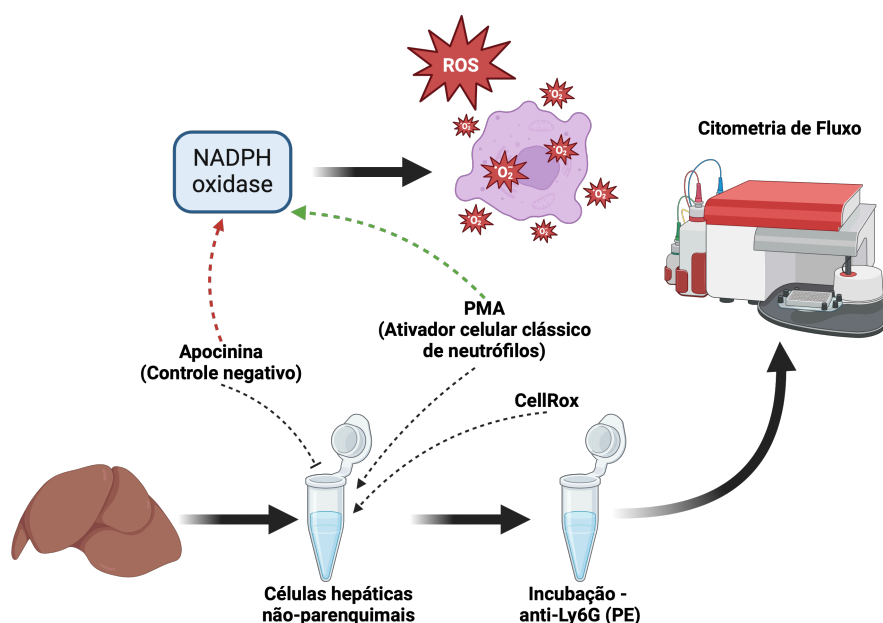


Figura 4: Descrição do método empregado para o ensaio de estresse oxidativo das células hepáticas não-parenquimais isoladas.

3.7 Processamento de Amostras e Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

50 mg de fígado foram dispostos em tubos Eppendorf de 2 mL, com 500 µL de solução de extração de citocina contendo PBS 1×, NaCl, Tween 20, BSA, PMSF diluído em dimetilsulfóxido, EDTA e aprotinina. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 rpm, 4 °C, por 10 minutos, com o descarte do sobrenadante. Em sequência, 950 µL de tampão 1 (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M anidro e Na₂EDTA 0,015 M) foi adicionado ao pellet e centrifugado como o descrito anteriormente. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e o pellet foi ressuspensionado em 750 µL de NaCl 0,2% frio. Após 30 segundos, 750 µL de NaCl 1,6% frio com glicose 5% foi adicionado ao tubo. Nesta etapa, 750 µL do volume foi coletado para o ensaio de

mieloperoxidase (MPO), realizando outra centrifugação com a mesma configuração. O pellet ressuspendido com 475 μ L de tampão 2 (Na_3PO_4 0,05 M anidro e HETAB 0,5%) e homogeneizado. Após 3 ciclos de congelamento e descongelamento usando nitrogênio líquido, o conteúdo foi centrifugado a 10.000 rpm, 4 °C, por 15 minutos. O pellet final foi descartado e o sobrenadante coletado. Para o ensaio, 25 μ L do conteúdo dos tubos foi pipetado em uma placa de 96 poços, usando tampão 2 como branco. Adicionalmente, 25 μ L de substrato TMB foi disposto nos poços e incubado por 5 minutos a 37 °C. Depois, 100 μ L de H_2O_2 (0,002%) foi adicionado à placa e incubado nas mesmas condições. Finalmente, 100 μ L de H_2SO_4 (1 M ou 2N) foi adicionado à placa antes de utilizar o equipamento para sua leitura a 450 nm.

3.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos com o emprego do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software). Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. As comparações entre os grupos foram realizadas usando análise de variância simples (*One-way ANOVA*) com o pós-teste de Dunnett. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Uma significativa população de granulócitos pode ser identificada no parênquima hepático de fetos e camundongos neonatos.

Trabalhos anteriores do grupo já evidenciaram a expressiva contribuição do fígado neonatal como um sítio de desenvolvimento de populações imunes (NAKAGAKI et al., 2018). A identificação de leucócitos neste microambiente revela a frequência considerável, principalmente, de granulócitos (NAKAGAKI et al., 2018). Estes achados motivaram o emprego da técnica de Microscopia Confocal Intravital na investigação do tecido hepático de camundongos desde o seu nascimento, ao 0 dia, até a vida adulta, 8 semanas de idade (Figura 5A). A escolha da técnica é justificada pela necessidade do entendimento da distribuição e comportamento destes granulócitos ao longo do desenvolvimento. E, neste sentido, identificamos marcante presença de células Ly6G+ no fígado de animais neonatos ao 0 dia, com volume que persistiu até a proximidade das 2 semanas de vida (Figura 5). Estas células, presumivelmente neutrófilos, se apresentam arredondadas e distribuídas igualmente por todo o campo analisado (Figuras 5D, 5E). Da mesma maneira, os sinusoides em animais neonatos podem ser percebidos maiores do que aqueles em fígados de animais adultos (Figura 5F). Estas observações contribuem para a identificação de algumas destas células fora do compartimento intravascular, possivelmente infiltrando o parênquima hepático (Figura 5F). Com 3 semanas de vida, os números de neutrófilos são reduzidos, alcançando as menores contagens em animais adultos, com 8 semanas (Figura 5C). As quantificações indicam padrões

conservados da presença dessas células no fígado, que só passam a ter números baixos e estáveis no período adulto (Figura 5C). Em contrapartida, camundongos neonatos e jovens são marcados por uma dinâmica absolutamente diferente, de contagens variáveis aumentadas de neutrófilos (Figuras 5B, 5C). Os dados, portanto, representados nesta cinética longitudinal somam questionamentos e, principalmente, aprofundam a compreensão da dinâmica de neutrófilos presentes no fígado ao longo da vida.

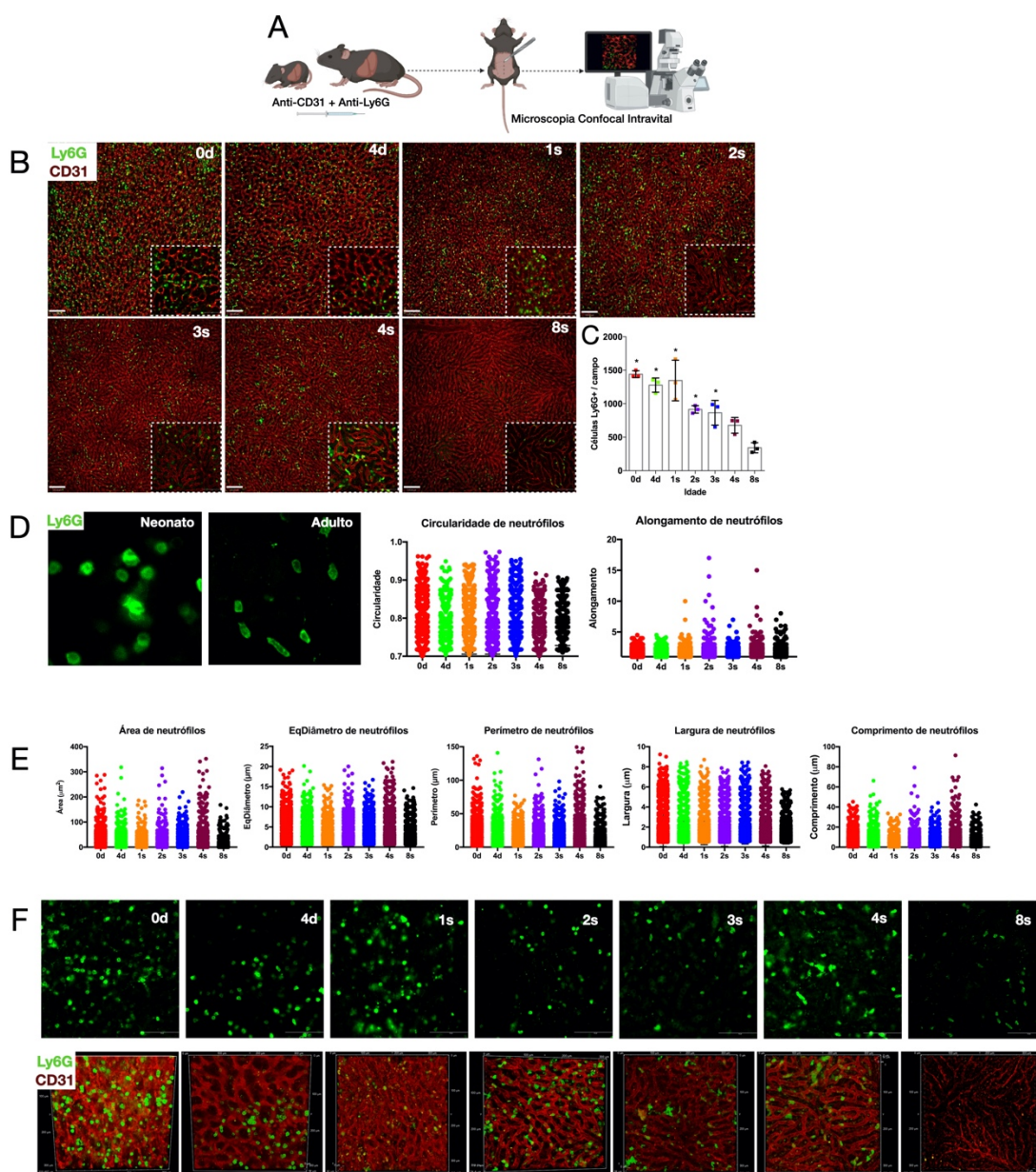


Figura 5: Imagens de Microscopia Confocal Intravital hepática para células Ly6G+ e análises quantitativas. (A) Ilustração descrevendo o método de Microscopia Confocal Intravital de fígados de camundongos de diferentes idades. (B) Imagens de Microscopia Confocal Intravital mostrando a presença de neutrófilos hepáticos durante o desenvolvimento dos camundongos: neutrófilos (verde) marcados com anti-Ly6G PE e sinusoides (vermelho) evidenciados com anti-CD31 APC. (C) Quantificação de células hepáticas Ly6G+ por campo

em camundongos de 0 dias até 8 semanas de idade. (D) Imagens de Microscopia Confocal de neutrófilos hepáticos de camundongos neonatos e adultos com quantificação de medidas individuais de neutrófilos hepáticos durante o desenvolvimento dos camundongos. (E) Paineis de imagens de Microscopia Confocal evidenciando diferenças na presença e no perfil dos neutrófilos durante o desenvolvimento dos camundongos. (F) Reconstruções tridimensionais de microscopia confocal intravital evidenciando a relação entre neutrófilos hepáticos (verde, anti-Ly6G PE) e sinusóides (vermelho, anti-CD31 APC). APC = Allophycocyanin.

Ainda, para certificar a identidade das populações celulares Ly6G⁺ analisadas como realmente neutrófilos, associamos a técnica de CyTOF com o intuito de aprofundar a imunofenotipagem específica com a definição de marcadores classicamente relacionados a neutrófilos ou mesmo aqueles pontualmente ausentes nestas células (Figura 6A). Esta estratégia possibilitou a análise de marcadores-chave em diferentes estágios de desenvolvimento do modelo animal, além de confirmar a natureza neutrofílica das células Ly6G⁺ (Figura 6A). Os resultados da imunofenotipagem por CyTOF permitiram observações muito profundas das expressões moleculares, sedimentando a descrição proposta em nossas investigações no período neonatal. Estas células Ly6G⁺ são caracterizadas pela expressão antecipada de marcadores associados a neutrófilos imaturos, como CD11b e Ly6C, além de, concomitantemente, não expressarem marcadores classicamente associados a outros leucócitos, como CD3, CD4, CD8, CD19 e CX3CR1, entre outros (Figura 6A). Consideramos também positiva, além da análise de marcadores celulares de superfície, a análise da morfologia destas células neonatais para a certificação de que se trata realmente de neutrófilos. Por isso, com a condução do isolamento de células Ly6G⁺ e a marcação histológica e imunohistoquímica, pudemos observar que esta população exibia características

também morfológicas clássicas de neutrófilos, principalmente a presença de núcleo multilobular (Figuras 6B, 6C). Somado a isto, as imagens imunohistoquímicas revelaram a expressão consistente de Ly6G em neutrófilos neonatais assim como em adultos (Figura 6D). Em suma, estes achados confirmam, de maneira ampla, por associação de técnicas diferentes, a identidade da população celular investigada como sendo a de neutrófilos.

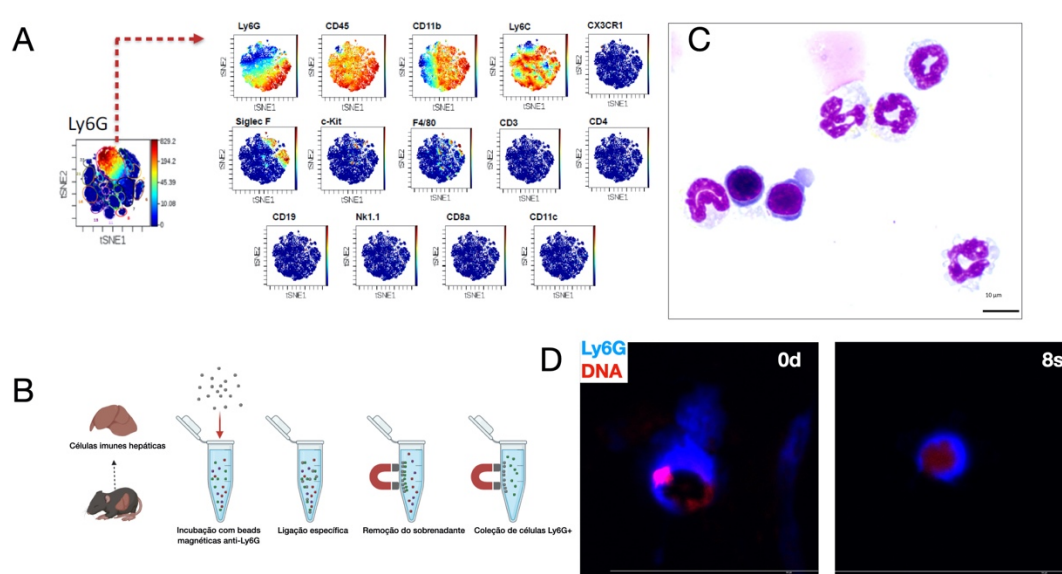


Figura 6: Caracterização dos granulócitos neonatais: durante a fase neonatal, há um perfil aumentado de células Ly6G⁺ no fígado de camundongos. (A) Pelo CyTOF, há a identificação, analisada com gates, de marcadores específicos de granulócitos para células Ly6G⁺. (B) Ilustração representando o método para o isolamento de células Ly6G⁺ do fígado de camundongos utilizando beads magnéticas anti-Ly6G. (C) Morfologia das células hepáticas Ly6G⁺ isoladas de camundongos neonatos sugerindo a presença significativa de neutrófilos. (D) Imunofluorescência das células hepáticas Ly6G⁺ isoladas de camundongos neonatos (0 d) e adultos (8 semanas).

4.2 Neutrófilos migram, de maneira sincronizada, do parênquima hepático para o lúmen dos sinusoides durante o desenvolvimento pós-natal.

A anatomia e organização estrutural hepáticas impõem um desafio arquitetural para a presença de células imunes no parênquima. Isto se deve porque o fígado é composto majoritariamente por hepatócitos dispostos muito próximos uns dos outros, formando cordões de hepatócitos que são interpostos por sinusoides, a malha vascular hepática (BEN-MOSHE; ITZKOVITZ, 2019). Esta organização bastante compacta limita o espaço para a infiltração de células imunes no parênquima. Por consequência, a presença de células imunes neste microambiente é definida em nichos específicos, como a região subcapsular ou o compartimento intravascular (BEN-MOSHE; ITZKOVITZ, 2019; DAVID et al., 2016; FREITAS-LOPES et al., 2017). Os cordões de hepatócitos criam uma barreira física que limita células imunes a estes compartimentos, o que ressalta a distintiva organização hepática no controle também espacial de componentes imunes (DAVID et al., 2016; FREITAS-LOPES et al., 2017; POUYABAHAR et al., 2023). Para tanto, com a necessidade de compreender a disposição espacial da população de neutrófilos naturalmente presente em fígados neonatais, empregamos reconstruções tridimensionais de imagens confocais intravitalis ao longo de períodos de desenvolvimento do modelo animal. Esta técnica permite a visualização precisa, em microescala, das relações espaciais entre os neutrófilos em questão e a malha de sinusoides hepáticos. A aplicação de reconstrução tridimensional neste caso aprofunda, significativamente, a descrição proposta, sedimentando dados espaciais

precisos dos neutrófilos em diferentes fases de desenvolvimento. De fato, a quantificação de neutrófilos hepáticos presentes no compartimento intravascular em camundongos neonatais foi baixa (aproximadamente 25%) se comparada aos demais períodos analisados, além de indicar diretamente um aumento gradual da posição intravascular destas células com o avanço do período pós-natal (Figura 7A). Em 1 semana de idade, os neutrófilos se dividiam quase igualmente entre o parênquima e o ambiente intravascular, com cerca de 50% do número de células em cada, até que gradualmente passaram a ocupar o interior dos sinusoides com 75% de neutrófilos intravasculares nas 3 semanas de idade (Figuras 7A-C). Não somente foi possível distinguir a distribuição destas células ao longo do desenvolvimento, assim como foram também identificadas diferenças morfológicas a depender do microambiente ocupado pelos neutrófilos. Aqueles neutrófilos dispostos fora dos sinusoides, no parênquima, se apresentavam mais arredondados e dispostos mais próximos uns dos outros – manifestando um fenótipo de células imaturas ou progenitoras (Figura 7B). Por outro lado, os neutrófilos intravasculares puderam ser percebidos mais alongados e mais distantes uns dos outros pelo campo – manifestando, por sua vez, um fenótipo bastante próximo de leucócitos ativados (Figura 7B). Estas distinções morfológicas baseadas em localização sugerem potenciais modificações fenotípicas relacionadas ao microambiente, ressaltando, sobretudo, a possibilidade da influência hepática na maturação e ativação destes neutrófilos no tecido. Neste mesmo sentido, é somente nos estágios adultos do modelo animal em que são observadas medidas máximas da disposição

intravascular neutrofílica (Figuras 3A-C). Este padrão temporal bem definido indica que a estabilidade da relação entre neutrófilos e o microambiente hepático é somente alcançada na vida adulta. Estes achados revelam a disposição espacial dinâmica de neutrófilos no fígado em diferentes estágios do desenvolvimento e, sobretudo, reforçam a maturação gradual destas interações no período pós-natal.

desenvolvimento dos camundongos e sua quantificação em diferentes idades: neutrófilos intravasculares hepáticos por campo vão de 25,79% aos 0 dias para 89,69% às 8 semanas de idade em camundongos. APC = Allophycocyanin.

4.3 O fígado fetal já abriga uma significativa população de neutrófilos.

O fígado fetal cumpre com um protagonismo fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento do sistema imune, assumindo o papel enquanto um dos primeiros órgãos imunes no início da vida (MOORE; METCALF, 1970). No entanto, a presença de neutrófilos no fígado neonatal levanta questões importantes sobre sua origem. Há a possibilidade de que estas células tenham sido recrutadas em resposta ao estado inicial de colonização da microbiota ou mesmo ao contexto inicial de exposição extrauterina (BALMER et al., 2014; LAWRENCE; CORRIDEN; NIZET, 2018). De outra forma, é também plausível que estas células tenham sido originadas durante o desenvolvimento embrionário, já bastante relacionado ao fígado nesta fase (LAWRENCE; CORRIDEN; NIZET, 2018; MOORE; METCALF, 1970). Contudo, abordagens de imageamento que busquem responder estes questionamentos são muito dificultadas pela complexidade técnica imposta. Pontualmente, desenvolvemos uma estratégia que pudesse nos auxiliar frente ao desafio. Por meio do procedimento cirúrgico cauteloso conduzido ainda no camundongo fêmea em gestação, com a divulsão de tecidos, foi aplicada uma carga intravenosa de anticorpos fluorescentes diretamente na corrente sanguínea do embrião (Figura 8A). Com este método, poderíamos explorar as análises da presença de neutrófilos também no fígado de um animal ainda em desenvolvimento embrionário. Apesar do obstáculo técnico, esta estratégia, fundamentada pelo uso de anticorpos

fluorescentes, nos possibilitou uma investigação precisa da fase proposta no modelo animal. E, notadamente, foi possível a identificação de neutrófilos no fígado de embriões tão cedo quanto na segunda semana gestacional (aos 14.5 dias embrionários), em números muito próximos daqueles já obtidos em animais imediatamente após o nascimento (Figuras 8B, 8C). Deve-se ressaltar também que estas células ocupavam o ambiente extravascular, o parênquima hepático, significativamente (Figura 8B). Da mesma forma, os neutrófilos embrionários exibiam dimensões individuais maiores do que aquelas mensuradas em adultos, como área, diâmetro, comprimento, perímetro e largura (Figuras 8B, 8C). Estes achados implicam diretamente que estas células compõem uma distinta população de neutrófilos hepáticos residentes durante a fase embrionária, sedimentando ainda o entendimento do estabelecimento bastante antecipado desta população celular imune no fígado.

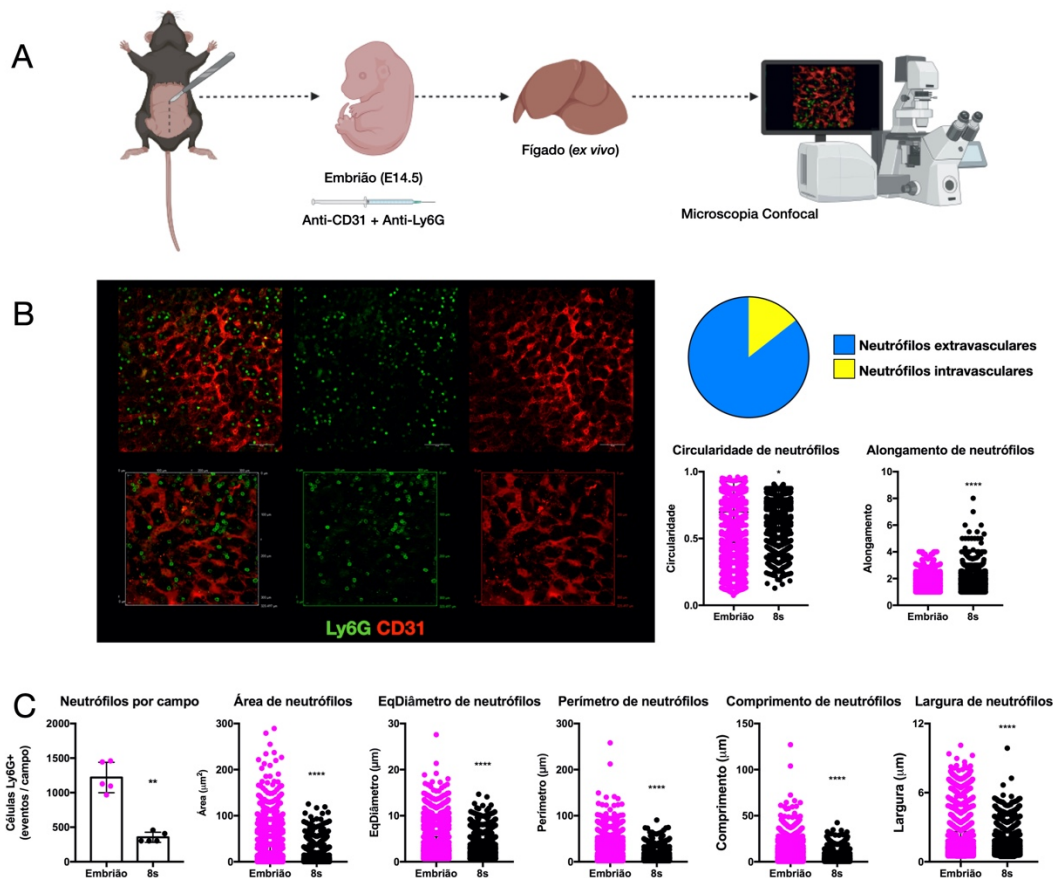


Figura 8: Neutrófilos já estão presentes no fígado de camundongos na segunda semana gestacional. (A) Ilustração descrevendo o método para Microscopia Confocal *ex vivo* de fígados de embriões. (B) Imagens de Microscopia Confocal Intravital e reconstruções tridimensionais descrevendo a presença de neutrófilos hepáticos já na segunda semana gestacional em camundongos: neutrófilos (verde, anti-Ly6G PE) e sinusoides hepáticos (vermelho, anti-CD31 APC). Quantificações descrevendo a principal disposição extravascular de neutrófilos na segunda semana gestacional em camundongos e medidas específicas de neutrófilos hepáticos considerando a circularidade e alongação das células em embriões e camundongos adultos (8 semanas de idade). (C) Medidas específicas de neutrófilos hepáticos comparadas entre embriões e camundongos adultos (8 semanas de idade). APC = Allophycocyanin; E = dia embrionário.

4.4 Neutrófilos fetais e neonatais formam clusters que se mantêm durante os primeiros dias de vida.

Células imunes imaturas ou mesmo ativadas formam agregados celulares em órgãos linfoides, um aspecto fundamental do funcionamento do sistema imune. Este fenômeno, observado notadamente em tecidos linfoides como o baço e linfonodos, sugere um esforço direcionado destas células imunes para o estabelecimento de interações funcionais e potencialmente a viabilização de processos de maturação (GAGO DA GRAÇA; VAN BAARSEN; MEBIUS, 2021). A formação de agregados celulares pode facilitar a comunicação e coordenação entre células imunes imaturas, promovendo a troca de moléculas de sinalização e a construção de um nicho próprio para a progressão de sua maturação (GAGO DA GRAÇA; VAN BAARSEN; MEBIUS, 2021). E dado o papel potencial do fígado como um órgão linfoide, principalmente nos primeiros estágios da vida, foi empregado o imageamento *in vivo* de fígados de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento para análise da presença e de características particulares de clusters de neutrófilos hepáticos. Neste caso, estes neutrófilos se organizam em clusters múltiplos em fígados fetais e neonatais até a proximidade do quarto dia de idade (Figura 9A). As quantificações destes clusters revelam sua frequência máxima nos dias 0 e 4 de idade, com a contagem de células por clusters variando entre 2 a 6 células por agregado (Figura 9B). Ainda que clusters isolados tenham sido identificados na segunda e quarta semanas de vida, nenhum pôde ser identificado em animais adultos (Figura 9B). Estes dados somados indicam que o fenômeno de agregação de neutrófilos no fígado se dá

exclusivamente no estágio embrionário e até a segunda semana pós-natal.

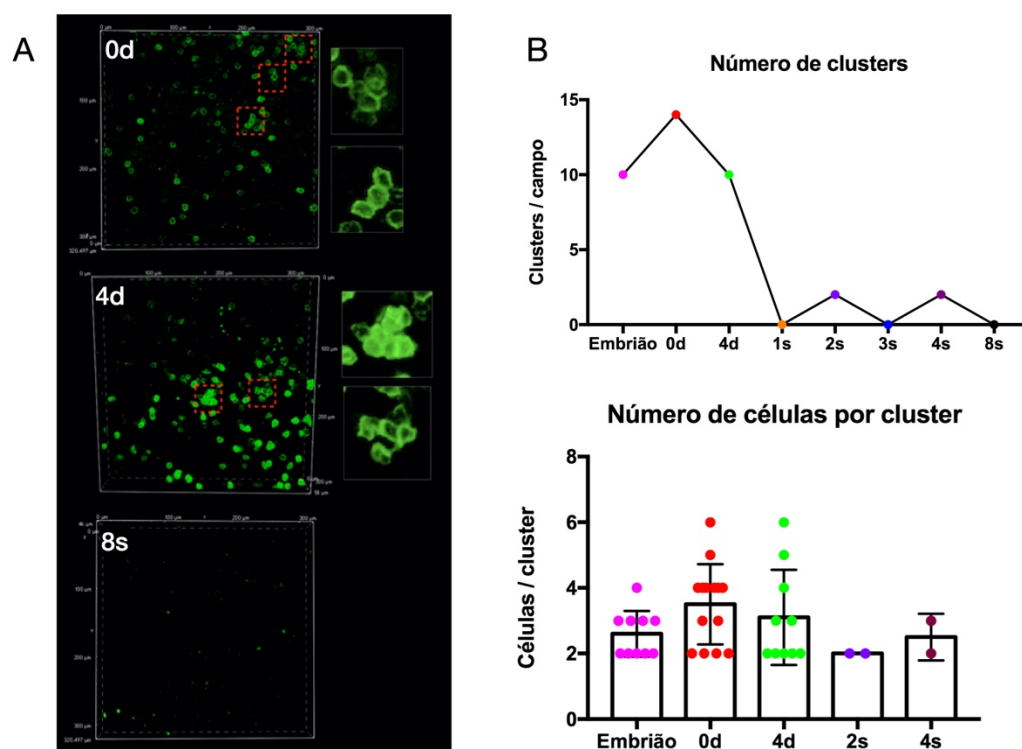


Figura 9: Aglomerados de neutrófilos hepáticos identificados no início da vida em camundongos. (A) Reconstruções tridimensionais de Microscopia Confocal Intravital representando a identificação de aglomerados de neutrófilos hepáticos (verde, anti-Ly6G PE), sendo mais comuns no início da vida em camundongos. (B) Quantificação do número de aglomerados e do número de células por aglomerado durante o desenvolvimento dos camundongos.

4.5 Neutrófilos neonatais exibem padrões reduzidos de velocidade e migração comparados a adultos.

Neutrófilos são uma das mais rápidas células em motilidade do corpo humano. Este comportamento é fundamental no cumprimento de seu papel no estabelecimento de respostas imunes céleres e eficientes na fase aguda da

inflamação (BURN et al., 2021; MANTOVANI et al., 2011). Estas são células especializadas na migração direcionada por gradientes quimiotáticos e sítios de infecção, na garantia de respostas imunológicas efetivas contra patógenos (METZEMAEKERS; GOUWY; PROOST, 2020). Portanto, a investigação das capacidades migratórias de neutrófilos compreende uma importante ferramenta no entendimento do fenótipo dinâmico destas células em diferentes estágios do desenvolvimento (RAYMOND et al., 2017). Sua habilidade de migração rápida não é apenas inerente a seu papel na vigilância imunológica, assim como também reflete sua adaptabilidade e responsividade a um espectro de sinalizações do microambiente (METZEMAEKERS; GOUWY; PROOST, 2020). Esta ênfase na migração de neutrófilos permite a compreensão de nuances dinâmicas destas células imunes ao longo de diferentes fases do modelo animal, contribuindo para o entendimento mais profundo de seu papel no sistema imune como um todo.

O grupo já desenvolveu anteriormente um modelo de necrose hepática focal induzida por uma lesão termal precisa na superfície do tecido (MARQUES et al., 2015). Com o emprego desta abordagem, foi possível, pela primeira vez, observar a responsividade de neutrófilos em fígados de camundongos neonatos *in vivo* (Figura 10A). E, surpreendentemente, apesar da significativa presença destas células no período neonatal, elas manifestaram um comportamento quase que séssil, com mínima reação ao modelo de lesão estéril focal (Figura 10B). Em absoluto contraponto ao que se pode observar em animais adultos, com o emprego do mesmo modelo, em que neutrófilos são vistos em considerável e rápida migração, em

minutos, para o foco de células mortas (Figura 10B; Vídeo Suplementar 5). Com a primeira semana de idade, com o imageamento *in vivo* por cerca de 4 horas, os mesmos neutrófilos hepáticos começaram a manifestar baixos níveis de deslocamento, velocidade, aceleração e comprimento de trajetória, confirmando que, nesta fase, esta população é realmente limitada em sua capacidade migratória (Figura 10C; Vídeos Suplementares 1, 2 e 3). No ponto das três semanas pós-natal, os neutrófilos adquiriram uma resposta extremamente eficiente até a necrose, manifestando um comportamento de deslocamento ainda mais rápido e direcionado até a lesão, como mensurado pelas quantificações de padrões de células individuais em vídeos de Microscopia Confocal (Figura 10D; Vídeos Suplementares 4 e 5). Estes dados contribuem profundamente para o entendimento da evolução temporal do comportamento de neutrófilos em resposta a lesões hepáticas, apesar do número de células abrigadas por este órgão, ressaltando a natureza dinâmica da resposta imune ao longo do desenvolvimento.

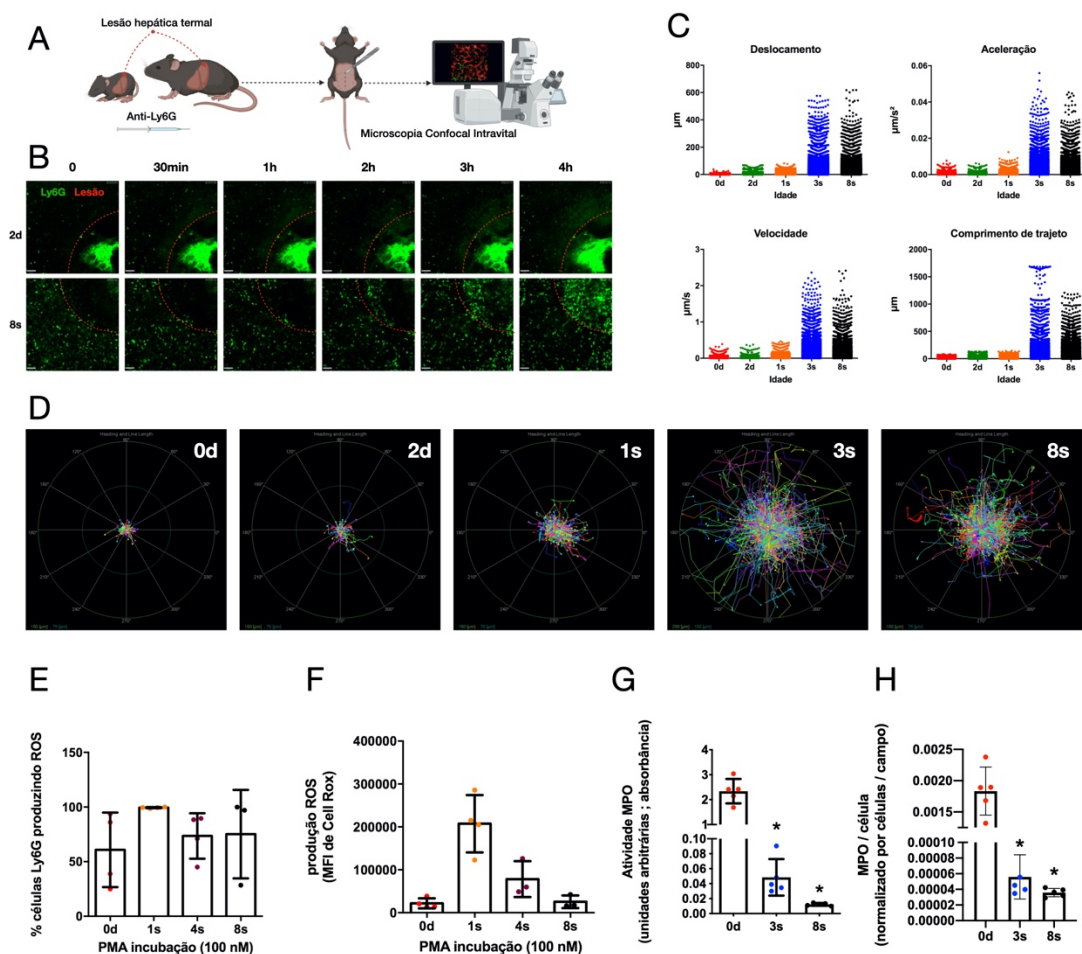


Figura 10: Padrão de movimentação dos neutrófilos hepáticos durante o desenvolvimento dos camundongos e produção de ROS. (A) Ilustração representando o método para analisar o padrão de movimento dos neutrófilos hepáticos em resposta à dinâmica quimiotática de lesões hepáticas por queimadura através de Microscopia Confocal intravital. (B) Quadros de vídeo de 4 h de gravação de Microscopia Confocal Intravital evidenciando a diferença entre o padrão de movimento em resposta à dinâmica quimiotática dos neutrófilos hepáticos em idade precoce (2 dias) e em camundongos adultos (8 semanas) induzidos por lesão hepática por queimadura: neutrófilos (verde, anti-Ly6G PE) e área da lesão por queimadura (linha vermelha tracejada). (C) Quantificação do deslocamento, aceleração, velocidade e comprimento do trajeto dos neutrófilos hepáticos em diferentes idades de camundongos induzidos pela resposta quimiotática à lesão por queimadura. (D) Gráficos polares descrevendo o deslocamento de cada neutrófilo hepático durante o desenvolvimento dos camundongos. Cada seta colorida representa um neutrófilo específico. (E) Quantificação da porcentagem de células Ly6G produtoras de ROS em diferentes idades no fígado de camundongos. (F) Intensidade de fluorescência mediana (MFI) revelando a produção de

ROS por células hepáticas Ly6G⁺ isoladas. (G) Quantificação da atividade de MPO em amostras de fígado e (H) valores normalizados de unidades arbitrárias por contagem de neutrófilos em estudos de intravital. $P < 0,05$, análise de variância.

4.6 Neutrófilos em neonatos produzem volumes significativos de MPO e são mais capazes de liberação de ROS quando induzidos por PMA comparados a outros períodos.

Neutrófilos possuem uma distintiva habilidade de produção de espécies reativas de oxigênio não só para regulação da homeostase (SIES; JONES, 2020), mas também para composição de seu arsenal antimicrobiano. Este processo, para além de envolver a liberação rápida de ROS, pode incluir o lançamento de superóxido e radicais hidroxila, de óxido nítrico, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito (EL-BENNA et al., 2016). A produção de ROS por neutrófilos cumpre com múltiplas funções cruciais para a resposta imune e pode ser originada pela via de NADPH oxidase ou por vias alternativas, como a de GPD2 (CAO et al., 2022). Primeiramente, ROS são potentes agentes antimicrobianos que auxiliam na destruição de patógenos fagocitados, em fagossomos (EL-BENNA et al., 2016). Em segundo lugar, são também capazes de modular vias de sinalização, influenciando o recrutamento e ativação de outras células imunes (EL-BENNA et al., 2016; SOEHNLEIN; LINDBOM; WEBER, 2009). Enquanto a produção de ROS é fundamental para o combate de patógenos, o desequilíbrio ou sua geração excessiva pode levar a estresse oxidativo e dano tecidual (EL-BENNA et al., 2016). Por consequência, a regulação precisa de ROS por neutrófilos é essencial na manutenção do delicado equilíbrio entre imunidade protetiva e prevenção de danos colaterais aos tecidos do hospedeiro (EL-

BENNA et al., 2016; METZEMAEKERS; GOUWY; PROOST, 2020).

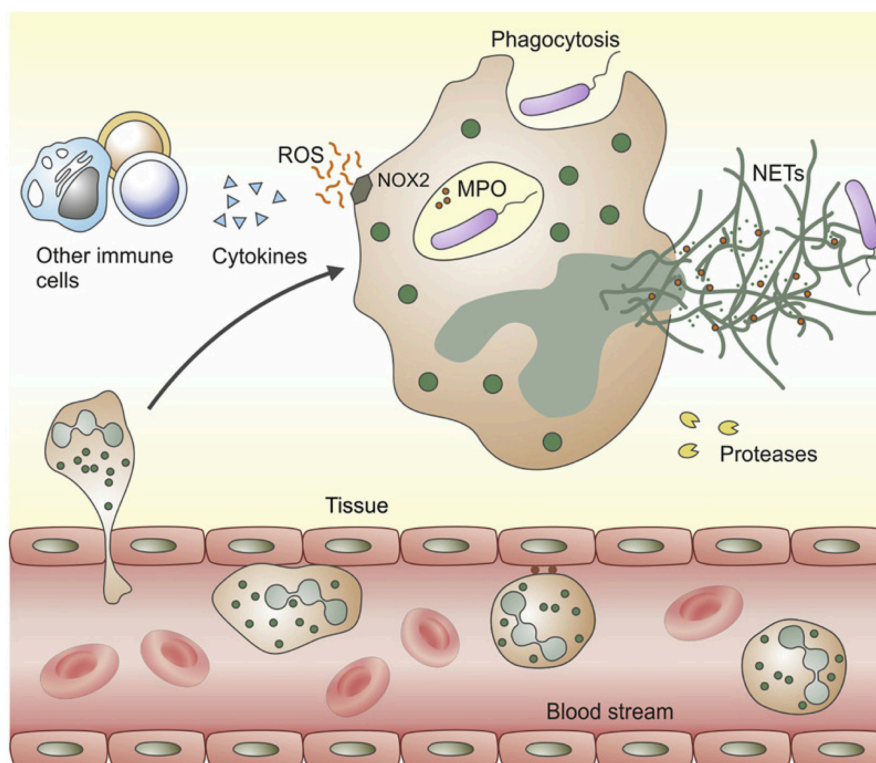


Figura 11: A responsividade de neutrófilos no estabelecimento da resposta inflamatória, adaptado de outro trabalho (BURN et al., 2021). Quando ativados, neutrófilos combatem diretamente os agentes infecciosos pela atuação fagocítica, com a destruição do patógeno em fagossomos, ou mesmo pela liberação de espécies reativas de oxigênio, proteases, netose e citocinas que regulam a atividade de outras células imunes.

Com o objetivo de se observar as diferenças neste sentido de neutrófilos hepáticos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, estas células foram isoladas e incubadas com PMA, molécula capaz de potente ativação celular, para que, posteriormente, fosse quantificada a produção de ROS por citometria de fluxo. Enquanto resultados, a produção de ROS foi identificada nos neutrófilos independentemente da idade do grupo observado (Figura 10E). No entanto, um

achado bastante inesperado foi obtido na quantificação da produção de ROS por média da intensidade de fluorescência de cada célula. Neutrófilos de camundongos de 1 semana manifestaram níveis consideravelmente altos de liberação de ROS por célula, alcançando níveis 7 a 10 vezes mais altos de produção se comparados a adultos ou a qualquer outro grupo analisado (Figura 10F). Isto sugere que, apesar da limitada capacidade de migração, estes neutrófilos neonatais podem compensar esta deficiência pela predisposição ao lançamento de ROS em resposta a estímulos. Em experimentos independentes, amostras hepáticas de neonatos e adultos coletadas foram direcionadas a ensaios da atividade de MPO, mieloperoxidase – um importante marcador da presença e atividade de neutrófilos. E, em consonância com os achados anteriores, identificamos níveis também muito significativos de atividade de MPO em amostras de neonatos se comparadas a camundongos de 3 semanas e adultos (Figura 10G). Notavelmente, mesmo com a normalização de unidades de MPO pela contagem de células das imagens de Microscopia Confocal, consistentemente níveis muito elevados da atividade de MPO foram identificados em amostras de fígados de neonatos (Figura 10H). Apesar da deficiência migratória destas células nas fases iniciais de desenvolvimento do modelo animal, estas células parecem exibir um importante repertório enzimático para lidar com desafios possíveis no período pós-natal.

Unidas, as complexidades das funções neutrofílicas, particularmente a sua produção de ROS, revelam os múltiplos papéis que estas células desempenham na resposta imune. O delicado equilíbrio na produção de ROS é fundamental no

combate efetivo de patógenos nos primeiros momentos da vida extrauterina. Ainda que bastante limitado o seu potencial migratório, os dados sugerem um mecanismo compensatório – o que reforça a adaptabilidade dinâmica destas células imunes em resposta a estímulos.

5. DISCUSSÃO

A trajetória histórica de trabalhos focados em neutrófilos revela uma jornada fascinante de descobertas, do seu reconhecimento inicial como fagócitos até este ponto de exploração contínua de suas intrincadas funções na infecção, inflamação e imunorregulação (BURN et al., 2021; MANTOVANI et al., 2011; SHIM; DENISET; KUBES, 2022). Desde então, progressivamente, são alcançadas mais camadas deste papel crítico que os neutrófilos desempenham como defensores de primeira linha, orquestrando respostas imunes robustas contra infecções, enquanto garante o delicado equilíbrio da homeostase imunológica (SHIM; DENISET; KUBES, 2022). Neste trabalho, nós descrevemos novas características da dinâmica destas células ao longo de estágios de desenvolvimento, focado particularmente nas populações de neutrófilos hepáticos, enriquecendo a compreensão da imunologia no início da vida. Nossos dados demonstram, claramente, que ocorre uma significativa mudança na composição de granulócitos no fígado durante o desenvolvimento pós-natal, expondo alterações progressivas de seus atributos funcionais. A alta frequência de granulócitos no fígado de neonatos, como revelado pela combinação de CyTOF e Microscopia Confocal Intravital, permite a contemplação do quão único é o microambiente hepático imune nos primeiros estágios da vida, sugerindo que – em absoluto contraponto aos conceitos anteriores – os neutrófilos se acumulam em órgãos para exercer funções fisiológicas também. Considerando seus padrões alterados de migração e morfologia particular, estas células podem ser descritas como um estágio intermediário entre células em banda e neutrófilos maduros, já que

podemos identificar a atividade de enzimas como MPO em seus grânulos (HÄGER; COWLAND; BORREGAARD, 2010). Na verdade, foi sugerido na literatura que alterações na expressão de TRAM-1 e baixa expressão de CD177 poderiam estar associadas com contextos de deficiência migratória de neutrófilos – o que poderia, ao menos em parte, consistir em uma nova possibilidade de investigação da ontogenia hepática de neutrófilos (LIN et al., 2020, 2023). Além disso, o uso de Microscopia Confocal Intravital hepática ilumina o comportamento espacial e temporal destes neutrófilos hepáticos neonatais, provendo uma nova perspectiva em tempo real. A presença substancial de células Ly6G⁺ em fígados neonatais, persistindo até a proximidade da segunda semana de vida, desafia a noção do caráter linfóide do microambiente imune hepático, sugerindo que, por um significativo período do desenvolvimento pós-natal, o fígado pode ser governado por células mielóides. Nossos dados também desvelam trajetórias migratórias muito distintas destes neutrófilos no fígado: inicialmente, muito disposta no compartimento extravascular, para, subsequentemente, haver uma coordenada migração do parênquima para o lúmen dos sinusóides (Figura 7). Esta dinâmica guiou nossas observações para o exame dos mecanismos responsáveis pelo fenômeno. Há a possibilidade de que sinusóides mais largos em neonatos podem facilitar a migração celular, permitindo movimentos mais fluidos de neutrófilos entre compartimentos. Adicionalmente, a progressiva arquitetura bastante densa da organização celular hepática consiste em uma limitação para a presença de células imunes no parênquima (DAVID et al., 2016; FREITAS-LOPES et al., 2017). Estas intrincadas

relações de características estruturais com a dinâmica de neutrófilos ressaltam a adaptabilidade destas células ao seu microambiente, além de sua regulação na coordenação de respostas imunes no fígado ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento. A caracterização ampla de células Ly6G⁺ não apenas revela sua identidade como neutrófilos, mas também expõe um perfil molecular particular (XIE et al., 2020). A associação de marcadores indicadores de neutrófilos com a ausência da expressão de marcadores relacionados a outros tipos de leucócitos, confirma a presença espontânea desta população. Para além, a extensão da análise, não considerando apenas marcadores de superfície, com a avaliação da morfologia celular, validada com a purificação de Ly6G e imunohistoquímica, inequivocamente confirma a identidade destas células como neutrófilos sob condições experimentais.

A presença significativa de uma população de neutrófilos no fígado embrionário também desafia conceitos estabelecidos da literatura a respeito de condições temporais do desenvolvimento destas células no fígado (KIEUSSEIAN et al., 2012; PALIS et al., 1999). Classicamente, o acúmulo de neutrófilos no fígado estaria associado exclusivamente a contextos agudos de inflamação e o entendimento vigente considera órgãos linfoides, como o baço e a medula, como os reservatórios primários de neutrófilos sob condições homeostáticas (PETTY et al., 2009; WOLBER et al., 2002). Nossos dados, por outro lado, não só expandem nosso conhecimento sobre a distribuição de neutrófilos, assim como fundamenta a necessidade da reavaliação dos considerados reservatórios de granulócitos pelo corpo. Contrário ao conceito de que neutrófilos poderiam rapidamente migrar para o

fígado em resposta ao início do contato com produtos da colonização da microbiota após o nascimento, nossos dados de fígado embrionário refutam esta hipótese (ZHONG et al., 2023). A evidência convincente da presença de neutrófilos no parênquima hepático durante a vida intrauterina, desafia a discussão de que sua migração é isoladamente estimulada por estímulos externos (Figura 8). Este achado implica em uma relação mais complexa e intrínseca entre neutrófilos e o desenvolvimento do próprio microambiente hepático. Além do mais, nossos dados da limitada movimentação e deslocamento de neutrófilos em resposta ao modelo de lesão termal focal sugere um caráter muito mais fisiológico do que reativo da presença de neutrófilos no fígado de neonatos (Figura 10; Vídeos Suplementares 1-5). A presença de neutrófilos em fígados neonatais parece ser um componente integral e orquestrado de seu próprio desenvolvimento fisiológico. Em suma, nossos dados lançam luz em dimensões ainda inexploradas do comportamento de neutrófilos, enfatizando sua conexão intrínseca aos processos de desenvolvimento do fígado ao invés de ser apenas uma consequência de estímulos externos.

Ademais, o inovativo imageamento *in vivo* da migração de neutrófilos em fígados de neonatos permite um entendimento profundo da dinâmica destas células imunes durante um estágio crítico do desenvolvimento (Figura 5). E, surpreendentemente, mesmo com a presença significativa de neutrófilos no fígado neonatal, estas células foram pouco capazes de reagir ao modelo de lesão estéril, com baixa velocidade e limitada migração em resposta aos gradientes quimiotáticos até o ponto de necrose (Figura 10; Vídeos Suplementares 1-5). Estas observações

desafiam as correlações assumidas entre a presença significativa de neutrófilos e a resposta efetiva a contextos de lesão tecidual (RAYMOND et al., 2017), reforçando a necessidade da compreensão em nuances da dinâmica neonatal imune. Ainda, há registros de que a produção de ROS facilite a migração neutrofílica – o que enfatiza a complexidade de processos imunológicos no início da vida (HATTORI et al., 2010). Somados, nossos dados também reforçam implicações a cerca da suscetibilidade de neonatos a infecções (LI; SHEN; QIAN, 2023). A capacidade migratória comprometida de neutrófilos em fígados de neonatos desvela uma imaturidade geral do sistema imune no período neonatal, em que a eficácia de respostas imunes, naturalmente dependentes de neutrófilos, ainda está evoluindo. Neste mesmo sentido, o grupo já observou anteriormente, a partir do uso de Microscopia Confocal Intravital, que células de Kupffer são relativamente ineficazes no *catching* de bactérias circulantes no fluxo sanguíneo no microambiente hepático, provavelmente pela baixa expressão de genes relacionados a fagocitose, como Crig e CD168 (NAKAGAKI et al., 2018). No geral, a imaturidade da resposta imune hepática pode contribuir para a vulnerabilidade aumentada de neonatos considerando infecções, já que o próprio sistema imune, pontualmente os leucócitos, podem ainda não possuir os mecanismos necessários para os níveis ideais de migração, reconhecimento e eliminação de patógenos. Em contrapartida, apesar da reduzida motilidade destas células, estes dados indicam um tipo de mecanismo potencialmente compensatório em neutrófilos neonatais, já que, em amostras de animais de 1 semana de idade, neutrófilos manifestam aumentada capacidade da liberação de ROS quando

estimulados (Figura 10F). Por consequência, há a sugestão da dinâmica adaptabilidade da resposta imune no período neonatal, em que os parâmetros migratórios de neutrófilos parecem ser contrabalanceados pela considerável produção de agentes antimicrobianos. Aliás, este aparente mecanismo compensatório pode ser fundamental para a resposta imune neonatal, ressaltando a complexidade do equilíbrio de funções inerentemente imunes nas fases iniciais do desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho descreveu, pela primeira vez, uma população de neutrófilos até então desconhecida que coloniza o fígado de camundongos desde a vida intrauterina até a proximidade da terceira semana pós-natal. Além do mais, foi possível identificar a migração coordenada destas células do parênquima para o compartimento intravascular, uma evolução da disposição espacial que se dá concomitantemente com o desenvolvimento do próprio fígado. Apesar da presença significativa destes neutrófilos hepáticos no período analisado, estas células manifestaram limitada capacidade migratória e responsividade, aparentemente compensadas pela aumentada produção de agentes antimicrobianos na primeira semana de vida, como ROS, comparada a todos os demais grupos observados. Além de descrever aspectos inéditos de neutrófilos residentes hepáticos, estes achados também desafiam paradigmas do campo, reforçando a urgente necessidade da reavaliação do entendimento das interações imunes e da imunologia estabelecida no início da vida como um todo, além, naturalmente, das relações complexas entre células imunes e o microambiente hepático nos primeiros estágios de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- BALMER, M. L. et al. Microbiota-Derived Compounds Drive Steady-State Granulopoiesis via MyD88/TICAM Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 10, p. 5273–5283, 15 nov. 2014.
- BEN-MOSHE, S.; ITZKOVITZ, S. **Spatial heterogeneity in the mammalian liver.** **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** Nature Publishing Group, , 1 jul. 2019.
- BURN, G. L. et al. **The Neutrophil.** **Immunity** Cell Press, , 13 jul. 2021.
- CAO, Z. et al. **Roles of mitochondria in neutrophils.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 19 ago. 2022.
- DAVID, B. A. et al. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. **Gastroenterology**, v. 151, n. 6, p. 1176–1191, 1 dez. 2016.
- DE MARTIN, E. et al. Characterization of liver injury induced by cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 6, p. 1181–1190, 1 jun. 2018.
- DOHERTY, D. G. **Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review.** **Journal of Autoimmunity** Academic Press, , 1 jan. 2016.
- EHLTING, C.; WOLF, S. D.; BODE, J. G. **Acute-phase protein synthesis: A key feature of innate immune functions of the liver.** **Biological Chemistry** De Gruyter Open Ltd, , 1 ago. 2021.
- EL-BENNA, J. et al. **Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation.** **Immunological Reviews** Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2016.
- FREITAS-LOPES, M. A. et al. **Differential location and distribution of hepatic immune cells.** **Cells** MDPI, , 1 dez. 2017.
- GAGO DA GRAÇA, C.; VAN BAARSEN, L. G. M.; MEBIUS, R. E. Tertiary Lymphoid Structures: Diversity in Their Development, Composition, and Role. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 2, p. 273–281, 15 jan. 2021.
- GOMEZ PERDIGUERO, E. et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 547–551, 26 fev. 2015.

HÄGER, M.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 1, p. 25–34, 9 jul. 2010.

HATTORI, H. et al. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. **Communicative & Integrative Biology**, v. 107, n. 8, p. 278–381, 23 fev. 2010.

HERCUN, J. et al. **Immune-Mediated Hepatitis During Immune Checkpoint Inhibitor cancer Immunotherapy: Lessons From Autoimmune Hepatitis and Liver Immunology.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 30 jun. 2022.

HOEFFEL, G.; GINHOUX, F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. **Cellular Immunology**, v. 330, p. 5–15, 1 ago. 2018.

JENNE, C. N.; KUBES, P. **Immune surveillance by the liver.** **Nature Immunology**, 2013.

KIEUSSEIAN, A. et al. Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. **Development (Cambridge)**, v. 139, n. 19, p. 3521–3530, 1 out. 2012.

KUBES, P.; JENNE, C. Immune Responses in the Liver. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 247–277, 26 abr. 2018.

LAWRENCE, S. M.; CORRIDEN, R.; NIZET, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 1, mar. 2018.

LI, J.; SHEN, L.; QIAN, K. Global, regional, and national incidence and mortality of neonatal sepsis and other neonatal infections, 1990–2019. **Frontiers in Public Health**, v. 11, 14 mar. 2023.

LICHANSKA, A. M.; HUME, D. A. **Origins and functions of phagocytes in the embryo** **Experimental Hematology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://tbase.jax.org/>>.

LIN, R. C. et al. TICAM2-related pathway mediates neutrophil exhaustion. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

LIN, R. C. et al. Resolving neutrophils due to TRAM deletion renders protection against experimental sepsis. **Inflammation Research**, v. 72, n. 8, p. 1733–1744, 1 ago. 2023.

MANTOVANI, A. et al. **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.** **Nature Reviews Immunology**, ago. 2011.

- MARQUES, P. E. et al. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 2, p. 258–268, 1 jan. 2015.
- MCDONALD, B. et al. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362–366, 15 out. 2010.
- METZEMAEKERS, M.; GOUWY, M.; PROOST, P. **Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. Cellular and Molecular Immunology** Springer Nature, , 1 maio 2020.
- MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **British Journal of Haematology**, v. 18, n. 3, p. 279–296, 12 mar. 1970.
- NAKAGAKI, B. N. et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 1 dez. 2018.
- OSEI-BORDOM, D.; BOZWARD, A. G.; OO, Y. H. **The hepatic microenvironment and regulatory T cells. Cellular Immunology** Academic Press Inc., , 1 nov. 2020.
- PALIS, J. et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. **Development**, v. 126, n. 22, p. 5073–5084, 15 nov. 1999.
- PETTY, J. M. et al. Crosstalk between CXCR4/Stromal Derived Factor-1 and VLA-4/VCAM-1 Pathways Regulates Neutrophil Retention in the Bone Marrow. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 1, p. 604–612, 1 jan. 2009.
- POUYABAHAR, D. et al. A rat liver cell atlas reveals intrahepatic myeloid heterogeneity. **iScience**, v. 26, n. 11, 17 nov. 2023.
- RACANELLI, V.; REHERMANN, B. **The liver as an immunological organ. Hepatology**, fev. 2006.
- RAYMOND, S. L. et al. Neutrophil chemotaxis and transcriptomics in term and preterm neonates. **Translational Research**, v. 190, p. 4–15, 1 dez. 2017.
- SEGEL, G. B.; HALTERMAN, M. W.; LICHTMAN, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 3, p. 359–372, mar. 2011.

SHIM, H. B.; DENISET, J. F.; KUBES, P. **Neutrophils in homeostasis and tissue repair.** *International Immunology* Oxford University Press, , 1 ago. 2022.

SIES, H.; JONES, D. P. **Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Research, , 1 jul. 2020.

SILVESTRE-ROIG, C. et al. **Neutrophil Diversity in Health and Disease.** *Trends in Immunology* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2019.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L.; WEBER, C. **Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment.** *Blood*, 19 nov. 2009.

WAY, K. J.; CHOU, E.; KING, G. L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 21, n. 5, p. 181–187, maio 2000.

WOLBER, F. M. et al. **Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system** *Experimental Hematology*. [s.l: s.n.].

WOLF, S. D. et al. Hepatocytes reprogram liver macrophages involving control of TGF- β activation, influencing liver regeneration and injury. *Hepatology Communications*, v. 7, n. 8, ago. 2023.

XIE, X. et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nature Immunology*, v. 21, n. 9, p. 1119–1133, 1 set. 2020.

ZHONG, D. et al. The microbiota regulates hematopoietic stem and progenitor cell development by mediating inflammatory signals in the niche. *Cell Reports*, v. 42, n. 2, 28 fev. 2023.

ZHOU, Z.; XU, M.-J.; GAO, B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. v. 13, 2015.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Vídeo suplementar 1: Microscopia Confocal Intravital – 0 dia de idade

Vídeo Suplementar 2: Microscopia Confocal Intravital – 2 dias de idade

Vídeo Suplementar 3: Microscopia Confocal Intravital – 1 semana de idade

Vídeo Suplementar 4: Microscopia Confocal Intravital – 3 semanas de idade

Vídeo Suplementar 5: Microscopia Confocal Intravital – 8 semanas de idade

PUBLICAÇÃO

The neonatal liver hosts a spontaneously occurring neutrophil population, exhibiting distinct spatial and functional characteristics from adults.

The neonatal liver hosts a spontaneously occurring neutrophil population, exhibiting distinct spatial and functional characteristics from adults

Wanderson Ferreira da Silva Júnior,¹ Maria Alice de Freitas Lopes,¹ Máisa Mota Antunes,¹ Karen Marques de Oliveira Costa,¹ Ariane Barros Diniz,¹  Brenda Naemi Lanza Nakagaki,¹ Camila Dutra Moreira de Miranda,¹ Hortência Maciel de Castro Oliveira,¹ Alesandra Corte Reis,¹ Stephania Libreros,²  Cristina Maria Pinto de Paula,¹ Rafael Machado Rezende,³ and Gustavo Batista Menezes^{1,*} 

¹Center for Gastrointestinal Biology, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

²Vascular Biology and Therapeutics Program, Department of Pathology, Yale University, 10 Amistad Street, PO Box 208089, New Haven, CT 06520, United States

³Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 75 Francis Street, Boston, MA 02115, United States

*Corresponding author: Center for Gastrointestinal Biology, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Email: menezesgb@gmail.com

Abstract

The elusive nature of the liver immune system in newborns remains an important challenge, casting a shadow over our understanding of how to effectively treat and prevent diseases in children. Therefore, deeper exploration into the intricacies of neonatal immunology might be crucial for improved pediatric healthcare. Using liver intravital microscopy, we unveiled a significant population of granulocytes in the hepatic parenchyma of fetuses and newborns. Utilizing high-dimensional immunophenotyping, we showed dynamic alterations predominantly in granulocytes during neonatal development. Liver intravital microscopy from birth through adulthood captures real-time dynamics, showing a substantial presence of Ly6G+ cells that persisted significantly up to 2 wk of age. Using time-of flight mass cytometry, we characterized neonatal Ly6G+ cells as neutrophils, confirmed by morphology and immunohistochemistry. Surprisingly, the embryonic liver hosts a distinct population of neutrophils established as early as the second gestational week, challenging conventional notions about their origin. Additionally, we observed that embryonic neutrophils occupy preferentially the extravascular space, indicating their early establishment within the liver. Hepatic neutrophils in embryos and neonates form unique cell clusters, persisting during the initial days of life, while reduced migratory capabilities in neonates are observed, potentially compensating with increased reactive oxygen species release in response to stimuli. Finally, in vivo imaging of acute neutrophil behavior in a newborn mouse, subjected to focal liver necrosis, unveils that neonatal neutrophils exhibit a reduced migratory response. The study provides unprecedented insights into the intricate interplay of neutrophils within the liver, shedding light on their functional and dynamic characteristics during development.

Keywords: granulocytes, immunology, liver, neutrophils, newborn

1. Introduction

The liver is traditionally recognized for its vital role in metabolism and detoxification. In the last decades, however, liver has emerged as a complex immunologic organ from embryogenesis to adulthood.^{1–3} During embryonic development, the liver is one of the first organs to develop, and its vital immunologic functions begin early in gestation.⁴ Hepatic immune cells, including Kupffer cells, arise from yolk sac-derived hematopoietic progenitors, contributing to the establishment of immune tolerance in the developing fetus.^{5,6} As the individual matures, the liver continues to play a crucial role in immune regulation.^{7,8} In fact, hepatocytes—the primary parenchymal cells of the liver—are also actively involved in the production of acute-phase proteins and cytokines, contributing to the orchestration of immune responses in all periods of life.^{9,10} Recent discoveries in immunology have unveiled the intricate interplay between liver cells and immune components, highlighting the liver's dual role as a site of immune tolerance and activation.¹¹ The liver's unique microenvironment, characterized by continuous exposure to gut-derived antigens and blood-borne

pathogens, needs a fine-tuned balance between immune activation and suppression.¹² Understanding these mechanisms has become a focal point in the field, with an increasing number of studies supporting this approach as a promising venue for therapeutics.

In fact, targeting specific immune cells within the liver holds promise for the development of novel treatments for autoimmune diseases, liver infections, and even liver cancers.^{13,14} The modulation of immune responses in the liver has become a focal point in the design of therapeutic strategies aimed at restoring immune homeostasis.¹⁵ As we delve deeper into the molecular and cellular aspects of liver immunology, the potential for tailored interventions continues to expand, providing new hope for patients facing a spectrum of diseases which are caused by disorders in immune cells. Among all leukocytes, granulocytes—particularly neutrophils—hold a critical position in the immune response, acting as the frontline defenders against invading pathogens.¹⁶ Rapidly recruited to sites of infection or sterile tissue damage, neutrophils exhibit high mobility guided by chemotactic signals.^{16,17} Their

Received: January 31, 2024. **Revised:** March 19, 2024. **Accepted:** March 21, 2024. **Corrected and Typeset:** April 30, 2024

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of Society for Leukocyte Biology. All rights reserved. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact journals.permissions@oup.com.

principal function lies in phagocytosis, wherein they engulf and neutralize microorganisms through the release of antimicrobial proteins and reactive oxygen species (ROS).¹⁸ Neutrophils also contribute to inflammation by releasing cytokines, chemokines, and lipid mediators (including LTB₄), orchestrating the recruitment of other immune cells.¹⁶ More recently, it has been elucidated that neutrophils possess a sophisticated mechanism for combating infection through the meticulous process of releasing DNA bound to histones and enzymes, known as NETosis or neutrophil extracellular trap release. While their indispensable role in maintaining health is well established, the dual nature of neutrophils poses challenges, as their dysregulation can lead to inflammatory disorders, autoimmune diseases, and tissue injury.¹⁹

Neutrophils, much like the majority of other immune cells, have predominantly been studied in the context of diseases or perturbed conditions.¹⁶ However, there is a significant gap in our understanding of the homeostatic functions of these unique immune cells. The vast body of research has understandably prioritized unraveling the role of neutrophil responses during infections or inflammatory disorders, providing valuable insights into their pathogenic roles.^{16,18,19} Yet, the lack of comprehensive investigations into the baseline behavior and regulatory mechanisms of neutrophils in the absence of external challenges hinders a holistic comprehension of their contributions to immune homeostasis.^{20,21} This dual role becomes even more complex in the context of newborns, in which the precise role of neutrophils in the early immune response is still under investigation.²² Unraveling the intricacies of granulocyte function in neonates is essential for comprehensively understanding the immune landscape during the early stages of life and may shed light on potential vulnerabilities or unique mechanisms that operate in this critical period.²³ In this study, we described a novel population of spontaneously occurring neutrophils within fetal and newborn livers, showcasing distinctive spatial distribution and chemotactic behavior as compared with their adult counterparts. These insightful findings have the potential to highlight previously unrecognized distinctions in the hepatic immune system between newborns and adults.

2. Methods

2.1 Animals

Both male and female C57BL/6 wild-type adult mice were taken from Centro de Bioterismo at the Universidade Federal de Minas Gerais (Brazil). Animals at different ages (0 and 4 d; 1, 2, 3, and 4 wk) were generated by matrixes with 2 female mice per male per cage. All animals were housed in acrylic cages with filtered air system (Alesco; 5 mice/cage) in a conventional specific pathogen-free facility at the Universidade Federal de Minas Gerais with water and food (Nuvilab autoclaved rodent chow) provided ad libitum and a light/dark cycle (12/12 h) digitally controlled. All experiments with mice were approved by Animal Ethics Committee from Universidade Federal de Minas Gerais (register number 034/2017), following international guidelines for animal care.

2.2 Intravital confocal microscopy

Confocal microscopy imaging was performed as described previously.²⁴ Confocal images were acquired using an inverted Nikon Eclipse Ti microscope coupled with an A1R scanning head (Nikon) with no alterations. To visualize specific cell populations, prior to imaging, mice received intravenously a mixture or a single

dose of the fluorescent antibodies anti-Ly6G phycoerythrin (PE) (0.35 μ L/g, clone 1A8; BD Biosciences) for neutrophil staining and anti-CD31 allophycocyanin (APC) (0.66 μ L/g, clone 390; BioLegend) for endothelium staining diluted in sterile saline. Digital quantification was made by Velocity (6.3; PerkinElmer) and NIS-Elements (Nikon Instruments).

2.3 In vivo chemotaxis model

In vivo chemotaxis model was used to induce a sterile tissue lesion in accordance with the hepatic confocal microscopy protocol.²⁴ A heated needle adapted into a cauterizer unit was employed to precisely create a focal thermal lesion upon contacting within liver surface. At 40 min prior to the anesthesia (solution of 400 μ L of ketamine and 150 μ L of xylazine diluted in 450 μ L, 5 μ L/g) and surgery, mice were intravenously injected with Ly6G-PE antibody for neutrophil staining. During a 2- to 4-h filming period, the animals received small doses of anesthesia and saline solution and were maintained at a controlled temperature. Video analysis using NIS-Elements Viewer 4.50 software allowed observation of parameters like neutrophil displacement, distance traveled toward the lesion, and trajectory speed.

2.4 Isolation of liver nonparenchymal cells

Liver nonparenchymal cells from mice were isolated as reported previously.²⁵ The livers were digested in a collagenase solution (Type VIII; 0.25 mg/g animal; Sigma-Aldrich) and the cells were separated by differential centrifugations interspersed with washes. For the time points 0, 4, and 7 d, total hepatic cells were obtained due to a limitation in separating nonparenchymal cells from hepatocytes through differential centrifugation. Briefly, mice were anesthetized and then exsanguinated by simultaneous incision of the aorta and inferior vena cava. The livers were removed, minced, and digested in RPMI medium with collagenase under constant agitation at 37 °C for 1 h. The suspension was centrifuged at 300 g, 4 °C for 5 min, the supernatant was discarded, and cell viability was assessed using the Trypan Blue Exclusion method. The total cell pellet was used for animals in the 0-, 4-, and 7-d groups. For all mice ages, the final cell pellet of independent experiments was used for time-of flight mass cytometry (CyTOF), neutrophil purification and oxidative stress assay. For CyTOF experiments, 1×10^6 cells were stained with isotope-conjugated antibodies as previously described.³

2.5 Neutrophil purification

After liver nonparenchymal cell isolation, cells underwent incubation with 1 μ L of anti-Ly6G antibody conjugated with PE at 1 mg/mL (2 μ g/mL; BD Pharmingen) for 30 min at 4 °C. Following incubation, cells were washed in 2 mL of a solution of phosphate-buffered saline (PBS) 1 $\times$ supplemented with 2 mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin (BSA) followed by a subsequent centrifugation at 300 g, 4 °C, for 5 min. The pellet was incubated for 30 min in 10 μ L of anti-PE magnetic beads and washed as described previously. The resulting pellet was resuspended in 3 mL of PBS 1 $\times$ with 2 mM EDTA and 0.5% BSA and then transferred to a magnetic field column (iMag; BD Biosciences) for 15 min. Subsequently, the tubes were decanted and the samples were washed once with 3 mL of PBS 1 $\times$ with 2 mM EDTA and 0.5% BSA. Neutrophils purity was assessed in an Accury C6 cytometer. Ly6G+ isolated cells were then centrifuged in a cytospin centrifuge (INBRAS) at 500 rpm for 5 min and slides were stained for immunofluorescence and with Rapid Panoptic. For immunofluorescence, purified Ly6G+ cells were incubated for 15 min with DAPI

(10 μ M; cat. no. D3571) for nuclei staining. Images were acquired using an inverted Nikon Eclipse Ti microscope coupled with an A1R scanning head and a 63 $\times$ objective was used. For panoptic analysis, a 40 $\times$ objective on a light microscope (Olympus) was used.

2.6 Oxidative stress

CellROX assay was performed to measure oxidative stress in live cells. After nonparenchymal liver cell isolation, the final pellet was incubated with apocynin (an NADPH oxidase inhibitor) as a negative control, washed, and resuspended in 100 μ L of PMA, a compound stimulating ROS production²⁶ via NADPH oxidase, at concentrations of 1, 10, and 100 nM for 1.5 h at -4°C within the laminar flow hood. After this time, the sample was centrifuged at 300 g for 5 min, the supernatant was removed, and 50 μ L of a solution containing CellROX at 5 μ M in RPMI medium supplemented with fetal bovine serum was added. The sample was incubated for 30 min at 37°C . Following incubation, cells were centrifuged at 300 g for 5 min and then washed 3 times with PBS 1 $\times$. Subsequently, cells were incubated with anti-Ly6G PE antibody for 30 min at 4°C , washed and resuspended in 1 mL of Wash B for oxidative stress assay in a Accuri C6 Flow cytometer (Becton Dickinson).

2.7 Sample processing and myeloperoxidase assay

With 50 mg of liver tissue placed in Eppendorf tubes of 2 mL, 500 μ L of a cytokine extraction solution containing PBS 1 $\times$, NaCl, Tween 20, BSA, PMSF diluted in dimethyl sulfoxide, EDTA, and aprotinin was added. The tube contents were homogenized and centrifuged at 10,000 rpm, 4°C for 10 min, after which the supernatant was discarded. Subsequently, 950 μ L of buffer 1 (consisting of NaCl 0.1 M, Na_3PO_4 0.02 M anhydrous, and Na_2EDTA 0.015 M) was added to the pellet, followed by another round of centrifugation at the same settings. The supernatant was again discarded, and the pellet was resuspended in 750 μ L of cold NaCl 0.2%. After 30 s, 750 μ L of cold NaCl 1.6% with glucose 5% was added to the tube. At this stage, 750 μ L of the volume was collected for the myeloperoxidase (MPO) assay, conducting another centrifugation with the same configuration. The pellet was then resuspended with 475 μ L of buffer 2 (comprising Na_3PO_4 0.05 M anhydrous and HETAB 0.5%) and homogenized. Following 3 cycles of freezing and thawing using liquid nitrogen, the contents were centrifuged at 10,000 rpm, 4°C for 15 min. The pellet could be discharged, and the supernatant was collected. For the assay, 25 μ L of the contents from the tubes was pipetted into a 96-well plate, using buffer 2 as the blank. Additionally, 25 μ L of TMB substrate was added to the wells and incubated for 5 min at 37°C . Subsequently, 100 μ L of H_2O_2 (0.002%) was added to the plate and incubated under the same conditions. Finally, 100 μ L of H_2SO_4 (1 M or 2N) was added to the plate before utilizing the equipment to read the plate at 450 nm.

2.8 Statistical analyses

Graphs and statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software). Results were expressed as the mean $\pm$ SEM. Group comparisons were performed using 1-way analysis of variance with Dunnett's posttest. All groups were compared with the 8-wk group. The significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Liver intravital microscopy reveals a large population of granulocytes in hepatic parenchyma in fetus and newborns

We have previously established that the liver serves as a reservoir for a substantial and diverse population of leukocytes during the distinct phases of neonatal development.³ These leukocytes undergo nuanced changes in their composition and functional attributes, reflecting the intricate interplay between the liver's immunological milieu and the evolving needs of the developing neonate.³ Building on prior observations, our data showed that these dynamic alterations were predominantly observed in granulocytes, as evidenced by their higher frequency in newborn livers during high-dimensional immunophenotyping utilizing CyTOF. To deepen our understanding of this intriguing population, we next conducted liver intravital microscopy in mice from day 0 after birth through adulthood (Fig. 1A). This approach enables us to capture real-time, in vivo dynamics, providing valuable insights into the spatiotemporal behavior of granulocytes within the liver across different developmental stages (Fig. 1B). As shown in Fig. 1, we found a substantial presence of Ly6G+ cells in the livers of newborns at day 0, persisting significantly up to 2 wk of age. These cells, presumably neutrophils, appeared round and distributed throughout the field of view (Fig. 1D, E). Notably, the sinusoids in neonatal livers were observed to be larger than those in adults (Fig. 1F). This structural difference likely contributed to the noteworthy observation of some neutrophils extending beyond the intravascular compartment, possibly infiltrating the parenchymal space (Fig. 1F). Following the third week of life, there was a notable decline in hepatic neutrophil numbers, reaching their lowest values during adulthood at the eighth week of life (Fig. 1C). This observation suggests a protracted schedule of adaptation within the neutrophil population in the liver, with their numbers demonstrating a distinct pattern of lower and stable levels exclusively in the adult stage. In contrast, newborns, infants, and younger mice exhibit a different dynamic, characterized by fluctuating neutrophil counts (Fig. 1C). This longitudinal perspective highlights the intriguing and dynamic nature of neutrophil population dynamics within the liver across various life stages.

To ascertain the identity of neonatal cells expressing Ly6G as bona fide neutrophils, our investigation employed CyTOF technology. Employing this cutting-edge technique, we implemented a gating strategy specifically targeting Ly6G+ cells, allowing us to delve into the intricate landscape of cell markers associated with or distinctively absent in neutrophils. This analytical approach enabled us to explore the expression profiles of key markers, validating and confirming the neutrophilic nature of the Ly6G-expressing cells (Fig. 2A). The utilization of CyTOF not only facilitated the precise identification of neonatal Ly6G+ cells, but also provided a comprehensive molecular insight into the cellular composition, further enhancing the depth and reliability of our findings regarding the specific characterization of these immune cells in neonatal contexts. Illustrated in Fig. 2A, Ly6G+ cells demonstrated the anticipated profile of markers associated with immature neutrophils, including as CD11b and Ly6C, while concurrently displaying a lack of expression for markers indicative of other leukocyte subtypes, including CD3, CD4, CD8, CD19, and CX3CR1, among others. To substantiate the identification of these neonatal cells as neutrophils, we extended our analysis beyond surface markers to include an examination of cellular morphology. Employing Ly6G purification coupled with subsequent histological and immunohistochemistry staining, our

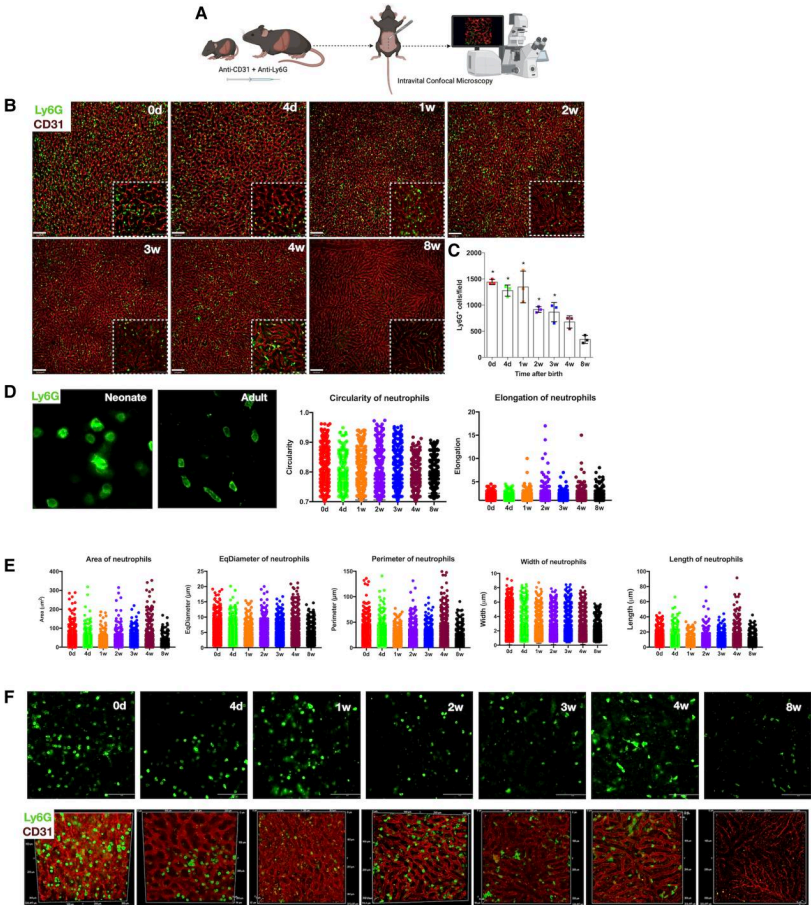


Fig. 1. Hepatic intravital confocal microscopy for Ly6G+ cells. (A) Illustration describing the method for intravital confocal microscopy of livers from mice of different ages. (B) Intravital confocal microscopy images showing the presence of hepatic neutrophils through mice development: neutrophils (green) marked with anti-Ly6G PE and sinusoids (red) evidenced with anti-CD31 APC. (C) Quantification of hepatic Ly6G+ cells per field of mice from 0 d until 8 wk of age. (D) Confocal microscopy images of hepatic neutrophils of neonate and adult mice with quantification of individual measures of hepatic neutrophils through mice development. (E) Panel of confocal microscopy images evidencing differences of presence and profile of neutrophils through mice development. (F) Tridimensional reconstructions of intravital confocal microscopy evidencing the relation between hepatic neutrophils (green, anti-Ly6G PE) and sinusoids (red, Ant-CD31 APC). APC = allophycocyanin.

observations revealed that Ly6G+ cells exhibited all the defining features of neutrophils, notably characterized by the presence of multilobular nuclei, a hallmark of neutrophil morphology (Fig. 2B, C). Furthermore, immunohistochemistry imaging confirmed that neonatal neutrophils expressed Ly6G in a pattern consistent with their adult counterparts (Fig. 2D). Collectively, these comprehensive findings confirm the identity of the imaged cell population under our experimental conditions as neutrophils.

3.2 Neutrophils undergo a synchronized migration from the hepatic parenchyma toward the sinusoidal lumen during the postnatal development

The intricate anatomy and structural organization of the liver pose a unique architectural challenge for the presence of immune cells within the parenchyma. The liver predominantly consists of densely packed hepatocytes, forming organized cords that are

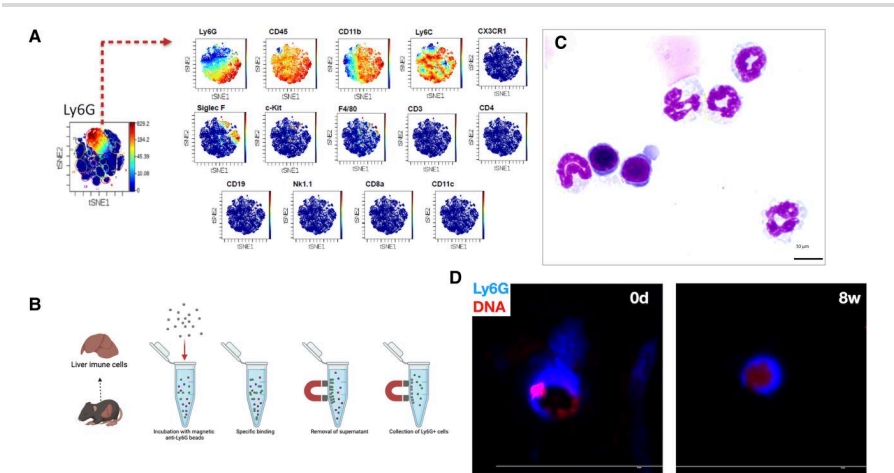


Fig. 2. Characterization of neonatal granulocytosis: during the neonatal phase, there is an augmented profile of Ly6G+ cells within the liver in mice. (A) By CyTOF, there is the identification, analyzed with gates, of specific granulocytes markers for Ly6G+ cells. (B) Illustration representing the method for the isolation of Ly6G+ cells from the liver of mice using magnetic anti-Ly6G beads. (C) Morphology of isolated hepatic Ly6G+ cells from neonatal mice suggesting significant presence of neutrophils. (D) Immunofluorescence of isolated hepatic Ly6G+ cells from neonatal (0 d) and adult (8 wk) mice.

intersected by sinusoids, the specialized blood vessels.²⁷ This compact arrangement limits the physical space available for immune cell infiltration into the hepatic parenchyma. Consequently, immune cells, when present, are compelled to occupy specific niches, primarily located in either the subcapsular region or the intravascular space.^{25,27,28} The hepatocellular cords create a formidable barrier, channeling immune cell localization toward these distinct compartments, emphasizing the liver's distinctive microenvironment that governs the spatial distribution of immune elements.^{25,28,29} In our pursuit to gain a more precise understanding of the specific localization of naturally occurring neutrophil populations throughout developmental stages, we employed 3-dimensional (3D) rendering intravital microscopy to image the liver. This advanced imaging technique enables the accurate visualization of cells and sinusoids at a microscale resolution, providing a detailed and nuanced perspective on the spatial dynamics of neutrophils within the liver. The utilization of 3D rendering intravital microscopy enhances our capacity to discern the intricate relationships between neutrophils and the hepatic microenvironment, offering invaluable insights into the dynamic nature of neutrophil distribution across different developmental phases. Indeed, the percentage of intravascular neutrophils in newborns was notably lower (~25%) compared with other age groups, and our observations revealed a gradual increase in the intravascular localization of these cells throughout postnatal development (Fig. 3A). At 1 wk of age, neutrophils displayed an even distribution between the hepatic parenchyma and the intrasinusoidal lumen (~50% each compartment), with a subsequent increase to 75% intravascular cells by the third week of life (Fig. 3A–C). Our 3D reconstruction not only revealed the spatial distribution of neutrophils, but also provided insights into their morphological characteristics based on their location. Neutrophils found outside the vessels, residing within the parenchyma, exhibited a rounder morphology and were closely positioned to

each other, resembling a progenitor or immature cell phenotype (Fig. 3B). In stark contrast, intravascular neutrophils were typically elongated and spread, indicating characteristics consistent with activated leukocytes (Fig. 3B). This distinction in morphology based on location suggests a potential phenotypic shift related to the microenvironment, highlighting the influence of the hepatic surroundings on the maturation and activation status of neutrophils within the liver. Notably, it is only in adulthood that we observed the percentage of intravascularly located neutrophils reaching peak values (Fig. 3A–C). This clear temporal pattern underscores that a stable and mature relationship between neutrophils and the liver environment is exclusively achieved in adulthood. These findings demonstrate the dynamic nature of neutrophil distribution within the liver across various life stages, emphasizing the progressive maturation of this interaction throughout postnatal development.

3.3 The embryonic liver hosts a substantial population of neutrophils

The embryonic liver assumes a pivotal role in the formative stages of the immune system, acting as one of the primary immune organs in the early phases of life.⁵ In fact, the presence of neutrophils in the neonatal liver prompts intriguing considerations regarding their origin. It raises the possibility that these neutrophils could be swiftly recruited as a responsive measure to the initial colonization of the microbiota and exposure to the uterine environment.^{22,30} Alternatively, an equally plausible scenario is that these cells might have originated during embryonic development, already established within the mouse liver.^{5,22} However, the intricacies of imaging embryonic cells have posed considerable technical challenges. To overcome these hurdles, our study implemented a unique and innovative strategy. Through surgical procedures conducted in pregnant mice and subsequent meticulous dissection of tissues, we

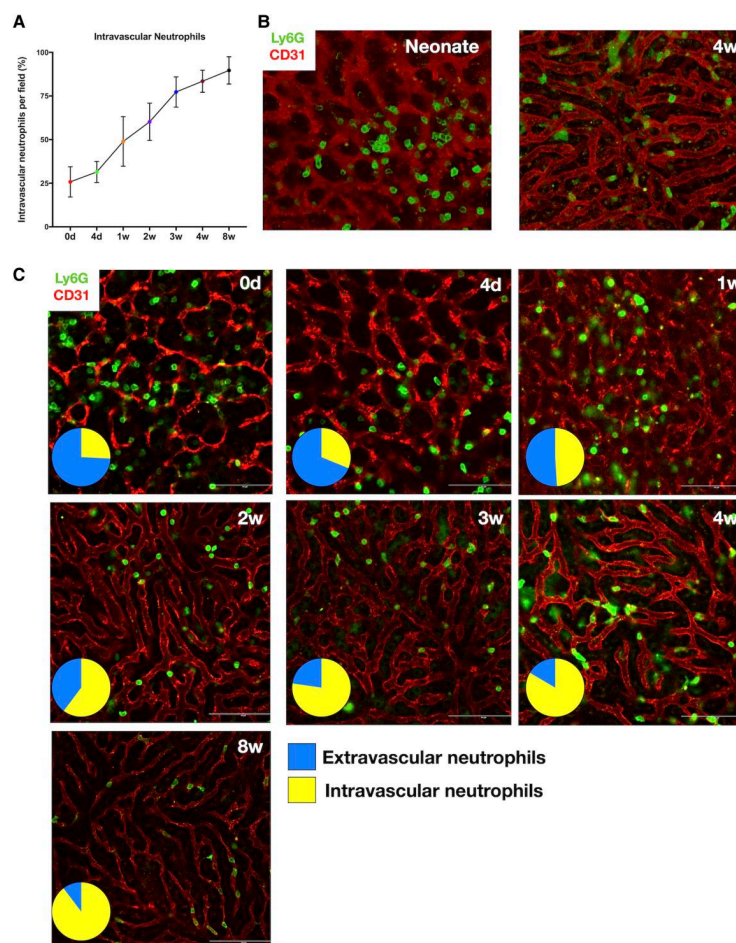


Fig. 3. Migration of hepatic neutrophils from the parenchyma to liver sinusoids in mice during life. (A) Quantification of hepatic intravascular neutrophils per field through mice development. (B) Tridimensional reconstructions of intravital confocal microscopy evidencing the position of hepatic neutrophils in neonate and adult mice: neutrophils (green, anti-Ly6G PE) and sinusoids (red, anti-CD31 APC). (C) Intravital confocal microscopy images revealing the progressive intravascular disposition of hepatic neutrophils within mice development and its quantification at different ages: hepatic intravascular neutrophils per field goes from 25.79% at 0 d to 89.69% at 8 wk of age in mice. APC = allophycocyanin.

performed a targeted delivery of intravenous fluorescent antibodies directly to the embryo systemic circulation (Fig. 4A). This ground-breaking approach enabled us to explore the potential presence of neutrophils in the embryonic liver with enhanced precision. Despite the technical complexities associated with this method, the use of fluorescent antibodies offered a more specific and refined investigative tool. This is particularly noteworthy, as only a select few mouse strains express fluorescence under the control of specific

neutrophil promoters, ensuring the reliability and accuracy of our findings. Remarkably, we revealed the presence of liver neutrophils in embryos as early as the second gestational week (embryonic day 14.5), displaying comparable numbers to mice immediately after birth (Fig. 4B, C). Notably, these embryonic neutrophils were predominantly localized within the extravascular space, occupying a distinct parenchymal niche (Fig. 4B). Embryonic neutrophils exhibited higher dimensions in comparison with their adult counterparts,

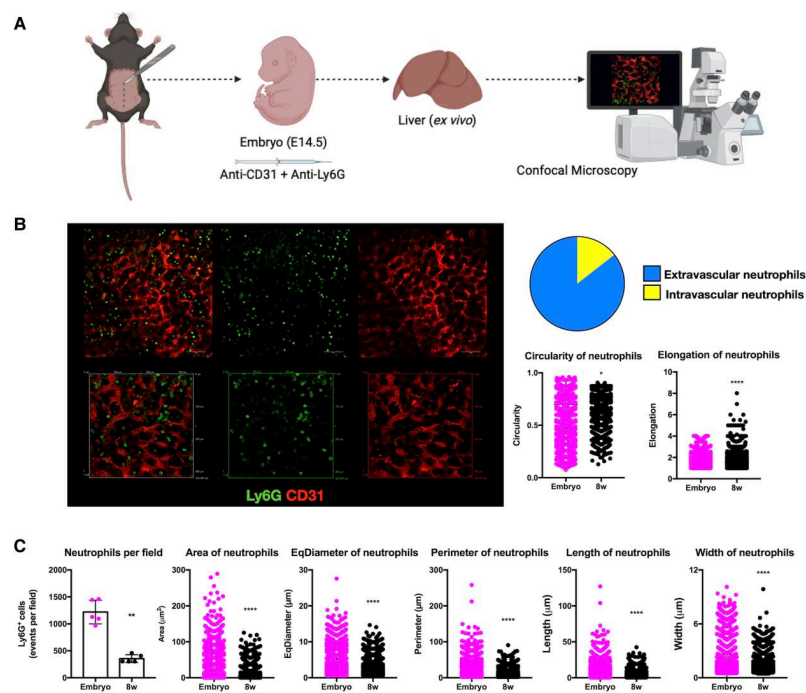


Fig. 4. Neutrophils are already present at mice liver by the second gestational week. (A) Illustration describing the method for ex vivo confocal microscopy of livers from embryo. (B) Intravital confocal microscopy and tridimensional reconstructions describing the presence of hepatic neutrophils already at the second gestational week in mice: neutrophils (green, anti-Ly6G PE) and hepatic sinusoids (red, anti-CD31 APC). Quantifications describing the major extravascular disposition of neutrophils at the second gestational week in mice and specific measures of hepatic neutrophils considering circularity and elongation of cells in embryo and adult mice (8 wk of age). (C) Specific measures of hepatic neutrophils compared between embryo and adult mice (8 wk of age). APC = allophycocyanin; E = embryonic day.

including area, diameter, length, perimeter, and width (Fig. 4B, C). This observation strongly implies that these cells constitute a distinct resident population of hepatic neutrophils during embryonic development, underscoring the early establishment of this unique immune cell population within the liver.

3.4 Embryonic and neonatal neutrophils form cell clusters that persist throughout the initial days of life

Immature or activated immune cells usually form cell aggregates within lymphoid organs, and this is a particular aspect of immune system function. This phenomenon, observed notably in lymphoid tissues such as the spleen and lymph nodes, suggests a concerted effort among these immune cells to establish functional interactions and potentially undergo crucial processes for maturation.³¹ The formation of cell aggregates may facilitate communication and coordination among immature immune cells, promoting the exchange of signaling molecules and fostering an environment conducive to their developmental progression.³¹ Given the potential role of the liver as a lymphoid organ,

particularly in the early stages of life, we employed high-definition in vivo imaging of mouse livers at various developmental ages to investigate the presence and the features of hepatic neutrophil clusters. As shown in Fig. 5A, hepatic neutrophils organized into multiple cell clusters in fetal and neonatal livers, persisting up to the fourth day of life. The numerical analysis of these clusters revealed a peak in their occurrence at days 0 and 4 after birth, ranging from approximately 2 to 6 cells per cluster (Fig. 5B). Although isolated clusters were observed at the second and fourth week of life, a noteworthy absence of neutrophil clusters was noted in adult livers (Fig. 5B). These findings suggest that the clustering phenomenon among neutrophils within the liver is a distinctive feature exclusive to the embryonic stage and the initial 2 wk of postnatal life.

3.5 Neonatal neutrophils exhibit reduced speed and migration patterns compared with their adult counterparts

Neutrophils are one of the most rapidly motile cells within the human body. This behavior is crucial for their role in mounting swift

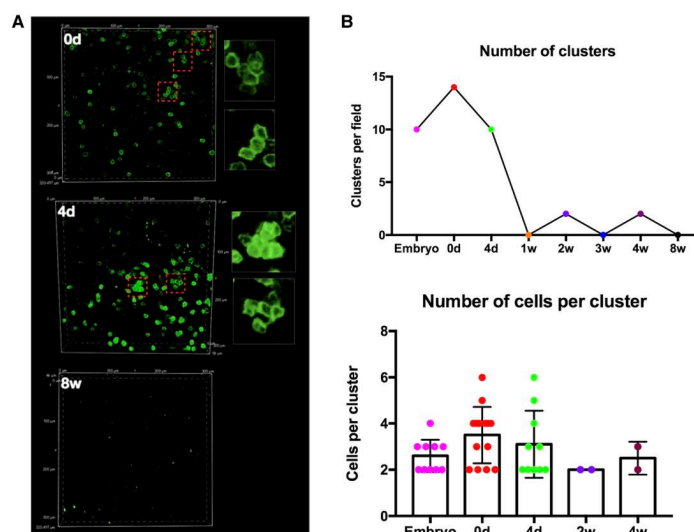


Fig. 5. Clusters of hepatic neutrophils identified at early life in mice. (A) Tridimensional reconstructions of intravital confocal microscopy representing the identification of clusters of hepatic neutrophils (green, anti-Ly6g PE) being more common at early life in mice. (B) Quantification of the number of clusters and the number of cells per cluster through mice development.

and efficient defense responses during the acute inflammatory phase.^{16,18} Neutrophils excel in promptly migrating toward chemokine gradients and sites of infection, ensuring a rapid and effective immune response against pathogens.³² Therefore, investigating the migratory capabilities of neutrophils emerges as a key tool in comprehending the dynamic phenotype of these cells across different developmental phases.²³ The ability to migrate swiftly is not only integral to their function in immune surveillance, but also reflects their adaptability and responsiveness to various environmental cues.³² This emphasis on neutrophil migration provides valuable insights into the nuanced dynamics of these immune cells during different stages of development, contributing to a comprehensive understanding of their role in the immune system.

We have previously developed a focal liver necrosis model involving the induction of a small thermal injury on the liver surface.²⁴ This unique approach enables an unprecedented observation of neutrophil swarming. By employing this model and introducing surgical adaptations, we achieved, for the first time, the *in vivo* imaging of acute neutrophil behavior in a newborn mouse (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, despite the considerable population of liver neutrophils at this age, these cells exhibited an almost sessile nature and displayed minimal reaction or response to focal sterile injury. This starkly contrasts with the behavior observed in adults, in which, within minutes of local injury, these cells exhibit rapid and avid migration toward the focus of dead cells (Fig. 6B; Supplementary Movie 5). Up to the first week of age, we could observe after 4 sequential hours of *in vivo* imaging that hepatic neutrophils displayed lower rates of displacement, speed, acceleration, and path length, confirming that these cells have a reduced migration capacity (Fig. 6C; Supplementary Movies 1, 2, and 3). In contrast, after the third

week of life, neutrophils acquired an extremely efficient response to necrosis, displaying a faster and directed swarming toward the site of injury, as seen by digital quantification of individual cell behavior using movies from intravital microscopy (Fig. 6D; Supplementary Movies 4 and 5). These findings contribute valuable insights into the temporal evolution of neutrophil behavior in response to liver injury—despite the number of cells hosted by the organ—highlighting the dynamic nature of the immune response over development.

3.6 Neutrophils in newborns exhibit an increased amounts of MPO and are more prone to release ROS in response to PMA activation

Neutrophils possess a remarkable ability to produce ROS not only to regulate homeostasis,³³ but also as a tool for their antimicrobial arsenal. This process, known as the respiratory burst, involves the rapid release of ROS, which may include superoxide and hydroxyl radicals, nitric oxide, singlet oxygen, nitrogen dioxide, and peroxynitrite.³⁴ The production of ROS by neutrophils serves multiple crucial functions in the immune response, and can be generated via NADPH oxidase or alternative pathways, including GPD2.³⁵ Firstly, ROS are potent antimicrobial agents that aid in the destruction of engulfed pathogens within phagosomes.³⁴ Second, ROS play a vital role in modulating signaling pathways, influencing the recruitment and activation of other immune cells.^{34,36} While ROS production is fundamental to effective pathogen clearance, an imbalance or excessive ROS generation can lead to oxidative stress and tissue damage.³⁴ Thus, the fine-tuned regulation of ROS by neutrophils is essential for maintaining a delicate equilibrium between protective immunity and preventing collateral

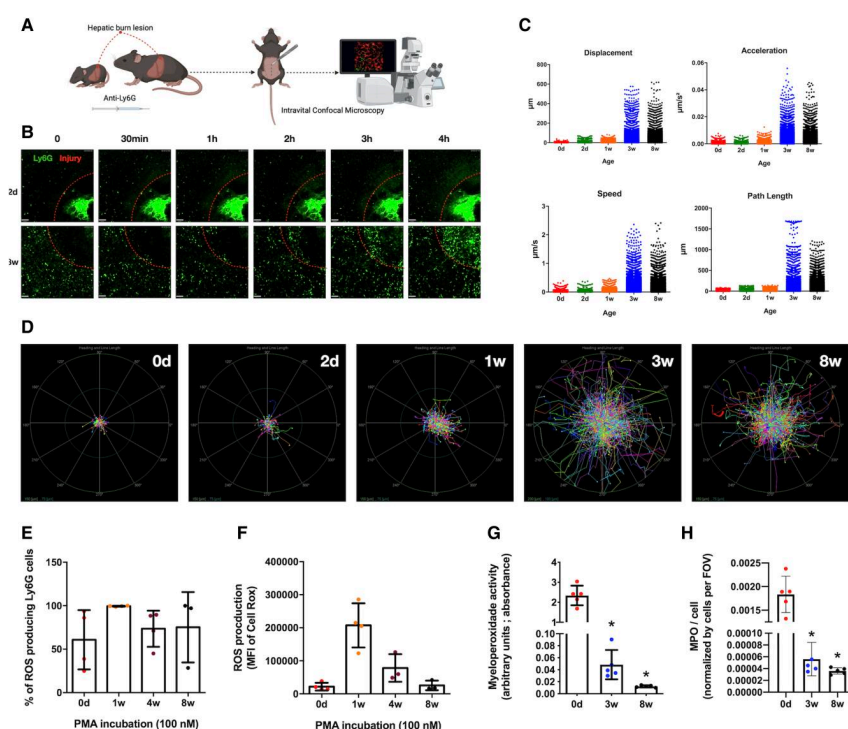


Fig. 6. Movement pattern of hepatic neutrophils through mice development and ROS production. (A) Illustration representing the method to analyze the movement pattern of hepatic neutrophils in response to chemotactic dynamics of hepatic burn injury by intravital confocal microscopy. (B) Video frames of 4 h of recorded intravital confocal microscopy evidencing the difference between the movement pattern responding to chemotactic dynamics of hepatic neutrophils at early age (2 d) and in adult mice (8 wk) induced by hepatic burn injury: neutrophils (green, anti-Ly6G PE) and burn lesion area (red dashed line). (C) Quantification of displacement, acceleration, speed, and path length of hepatic neutrophils at different ages in mice induced by burn injury chemotactic response. (D) Polar graphs describing the displacement of each hepatic neutrophil through mice development. Each colored arrow represents a specific neutrophil. (E) Quantification of the percentage of ROS producing Ly6G cells at different ages in mice liver. (F) Median fluorescence intensity (MFI) revealing the production of ROS by isolated hepatic Ly6G+ cells. (G) MPO activity quantification in liver samples and (H) normalized values of arbitrary units per neutrophil counts in intravital studies. $P < 0.05$, analysis of variance. FOV = field of view.

damage to host tissues.^{32,34} In order to delve deeper into the distinctions among hepatic neutrophils at different postnatal developmental stages, we isolated these cells and subjected them to incubation with the potent cell activator molecule PMA. Subsequently, we quantified ROS production utilizing flow cytometry. As depicted in Fig. 6E, the capacity for ROS production was observed across the majority of neutrophils, regardless of their age. Notably, when evaluating the quantity of ROS produced by measuring the mean fluorescence intensity of each cell, a remarkable finding emerged. Neutrophils from mice at 1 wk of age exhibited a significantly higher ROS release per cell, reaching 7 to 10 times greater production compared with adults or other age groups (Fig. 6F). This suggests that, despite their limited migration potential, neonatal neutrophils may compensate for such deficiency by being more predisposed to releasing ROS in response to stimuli. In a separate series of experiments, liver samples

from both newborns and adults were collected and subjected to MPO activity assays, serving as a marker for neutrophil presence and activity. Consistent with our findings, we noted a notably higher level of MPO activity in neonatal samples compared with those from mice 3 wk of age and adults (Fig. 6G). Remarkably, even upon normalization of MPO units per neutrophil count derived from our intravital experiments, we consistently observed elevated MPO activity in samples from newborn livers (Fig. 6H). This suggests that despite their initially limited crawling ability during early life stages, these cells may possess a significant enzymatic repertoire to confront the challenges of the neonatal period.

Taken together, the intricacies of neutrophil function, particularly their capacity to generate ROS, underscore the multifaceted role these cells play in the immune response. The delicate balance in ROS production is crucial for effective pathogen

clearance in the first moments of extrauterine life. This finding, despite their limited migration potential, suggests a compensatory mechanism, emphasizing the dynamic adaptability of these immune cells in responding to stimuli.

4. Discussion

The historical trajectory of neutrophil science reveals a fascinating journey of discovery, from their initial recognition as phagocytes to an ongoing exploration of their intricate functions in infection, inflammation, and immunoregulation.^{16,18,21} Since then, we have progressively unveiled the critical role played by neutrophils as frontline defenders, orchestrating a robust immune response against infections while ensuring the delicate balance of immune homeostasis.²¹ Here, we described a novel feature of the dynamics of these cells across developmental stages, particularly focusing on hepatic neutrophil populations, that enrich our comprehension of early-life immunology. Our data showed that a significant shift in granulocyte composition within the liver occurs during neonatal development, emphasizing the nuanced changes in their functional attributes. The higher frequency of granulocytes in newborn livers, as revealed by an unprecedented combination of CyTOF and confocal intravital analysis, prompted a contemplation on how unique is the liver immune environment in the early stages of life, suggesting that—in sharp contrast to previous assumptions—that neutrophils also accumulate in organs to exert physiological functions as well. Given their altered migration pattern and distinctive morphology, these cells could be considered as an intermediate stage between band cells and mature neutrophils, as they already harbor active enzymes like MPO within their granules.³⁷ In fact, it has been postulated that alterations in TRAM-1 expression and lower expression of CD177 could be associated with deficient neutrophil migration, which could in part consist in a new venue of investigation in liver neutrophil ontogenesis.^{38,39} The use of liver intravital microscopy further illuminates the spatial and temporal behavior of these newborn hepatic neutrophils, providing a novel real-time perspective. The substantial presence of Ly6G+ cells in neonatal livers, persisting up to 2 wk, challenges the notion about the lymphoid character of liver immune environment, suggesting that for a significant period of postnatal development, liver might be actually governed by myeloid cells. Also, our observations unveil a distinctive migratory trajectory of neutrophils within the liver, initially favoring the extravascular compartment and subsequently orchestrating a coordinated migration from the parenchymal space to the intrasinusoidal lumen (Fig. 3). This observed dynamic shift guided us to a closer examination of the underlying mechanisms driving this phenomenon. The potentially facilitating role of larger sinusoids in newborns might facilitate cell migration, allowing for a more fluid movement of neutrophils between compartments. Additionally, the evolving landscape of the liver's densely packed architecture poses a noteworthy challenge to immune cell presence within the parenchymal space.^{25,28} This intricate interplay between structural features and neutrophil dynamics underscores the adaptability of these immune cells to their microenvironment and highlights the intricate orchestration of immune responses within the liver across developmental stages. The comprehensive characterization of Ly6G+ cells not only establishes their identity as neutrophils, but also unravels a distinctive molecular profile.⁴⁰ The association with markers indicative of bona fide neutrophils, coupled with the absence of markers for other leukocyte subtypes, confirmed the presence of such a spontaneously occurring population. Also, the extension

of analysis beyond surface markers to include cellular morphology, validated through Ly6G purification and immunohistochemistry, unequivocally confirms the identity of these cells as neutrophils under our experimental conditions.

The presence of a significant neutrophil population in the embryonic liver also challenged established timelines regarding the dynamics of hepatic neutrophils.^{41,42} Traditionally, liver neutrophil accumulation was exclusively associated with acute inflammation, and the prevailing understanding considered lymphoid organs, such as the spleen and bone marrow, as the primary reservoirs of neutrophils under homeostatic conditions.^{43,44} Our data, therefore, not only expand our knowledge of neutrophil distribution, but also prompt a re-evaluation of their presumed reservoirs of granulocytes within the body. Contrary to the notion that neutrophils might rapidly populate the neonatal liver in response to initial contact with microbiota products upon birth, our data on embryonic livers decisively refute this hypothesis.⁴⁵ The compelling evidence showcases the presence of neutrophils within the liver parenchymal space during intrauterine life, challenging the prevailing belief that their migration is solely prompted by external stimuli (Fig. 4). This finding implies a more complex and intrinsic relationship between neutrophils and the liver developmental environment. Moreover, our data into the reduced movement and displacement of neutrophils in response to focal thermal injury in newborns suggest a physiological—rather than reactive—nature of the presence of neutrophils in the newborn liver (Fig. 6; Supplementary Movies 1–S5). Therefore, neutrophil presence in the newborn liver is an integral and orchestrated component of its developmental physiology. In essence, our data shed light on a previously unexplored dimension of neutrophil behavior, emphasizing their intrinsic connection to the developmental processes within the liver rather than being solely a consequence of external stimuli.

In addition, our pioneering in vivo imaging of neutrophil migration in newborn livers provides a real-time glimpse into the dynamics of these immune cells during a critical developmental stage (Fig. 1). Surprisingly, even with a substantial neutrophil population, newborns' response to necrosis was characterized by a significant lower velocity and less directed migration toward chemotactic gradients evoked by local sterile injury (Fig. 6; Supplementary Movies 1–S5). This observation challenges the assumed correlation between neutrophil abundance and effective responses to tissue damage,²³ emphasizing the need for a more nuanced understanding of neonatal immune dynamics. Moreover, it has been documented that ROS formation can also facilitate neutrophil migration, further emphasizing the complexity of immune processes in early life.⁴⁶ Together, our data also carry implications for the heightened susceptibility to infections observed in neonates.⁴⁷ The compromised migratory capacity of neutrophils in the newborn liver hints at an overall immaturity in the neonatal immune system, in which the efficacy of immune responses, including those involving key players like neutrophils, is still evolving. In fact, we have previously described—also using high-resolution intravital microscopy—that Kupffer cells are relatively ineffective to arrest blood-borne bacteria in the newborn liver, probably due to their reduced expression of phagocytosis-related genes, including Crig and CD168.³ Collectively, this immaturity of hepatic immune response may contribute to the increased vulnerability of neonates to infections, as their immune system—specially leukocytes—may not yet possess the refined mechanisms required for optimal migration, pathogen recognition, and elimination. Interestingly, despite the observed lower motility, our data reveal a compensatory mechanism within neonatal neutrophils. Neutrophils from 1-wk-old mice

demonstrated an enhanced ability to release ROS upon stimuli (Fig. 6F). This suggests a dynamic adaptability in the neonatal immune response, in which the reduced migratory capacity is potentially counteracted by an increased release of antimicrobial agents. This compensatory mechanism may represent a crucial aspect of neonatal immune defense, highlighting the intricate balance between different facets of immune functionality during the early stages of life.

In summary, our study unveils a previously unrecognized population of neutrophils colonizing the liver from the intrauterine phase, persisting until the third week of extrauterine life. Additionally, we delineate a coordinated migration of these cells from the parenchyma to the intravascular space, indicating an evolution in their localization concurrent with liver development. Despite their numerical abundance, these neutrophils exhibit limited migratory and inflammatory responsiveness, compensating by displaying a heightened release of ROS within the initial week of life. Beyond offering novel insights into the dynamics of liver-resident neutrophils, our findings challenge established paradigms, necessitating a reassessment of our comprehension of early-life immunology and the intricate interactions between immune cells and the hepatic microenvironment throughout diverse developmental stages.

Acknowledgments

The authors thank BD Biosciences, The Chan Zuckerberg Initiative (Bioimaging Brazil) and Nikon for technical support.

Supplementary material

Supplementary materials are available at *Journal of Leukocyte Biology* online.

Funding

This work was supported by FAPEMIG—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (RED-00067-23—Rede Mineira de Imunobiológicos), CAPES—Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and CNPq—Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

Conflict of interest statement. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contributions

W.F.d.S.J. was responsible for conceptualization, investigation, data curation (formal analysis), writing of the original draft, review, and editing; M.A.d.F.L. was responsible for investigation, data curation (formal analysis), review, and editing; M.M.A. was responsible for writing the original draft, review, and editing; K.M.d.O.C. was responsible for investigation and data curation (formal analysis); A.B.D. was responsible for investigation and data curation (formal analysis); B.N.L.N. was responsible for investigation and data curation (formal analysis); C.D.M.d.M. was responsible for investigation and data curation (formal analysis); H.M.d.C.O. was responsible for investigation; A.C.R. was responsible for investigation; S.L. was responsible for review and editing; C.M.P.d.P. was responsible for review and editing; R.M.R. was responsible for investigation, data curation (formal analysis),

review, and editing; G.B.M. was responsible for conceptualization, investigation, oversight, writing the original draft, review, and editing.

References

- Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*. 2013;14(10):996–1006. <https://doi.org/10.1038/ni.2691>
- Lichanska AM, Hume DA. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol*. 2000;28(6):601–611.
- Nakagaki BN, Mafra K, de Carvalho E, Lopes ME, Carvalho-Gontijo R, de Castro-Oliveira HM, Campolina-Silva GH, de Miranda CDM, Antunes MM, Silva ACC, et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. *J Hepatol*. 2018;69(6):1294–1307. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.018>
- Hoeffel G, Ginhoux F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol*. 2018;330:5–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>
- Moore MAS, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol*. 1970;18(3):279–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1970.tb01443.x>
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015;518(7540):547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Kubes P, Jenne C. Immune responses in the liver. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):247–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>
- Racanello V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 Supplement 1):S54–S62. <https://doi.org/10.1002/hep.21060>
- Ehling C, Wolf SD, Bode JG. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biol Chem*. 2021;402(9):1129–1145. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0209>
- Wolf SD, et al. Hepatocytes reprogram liver macrophages involving control of TGF- β activation, influencing liver regeneration and injury. *Hepatol Commun*. 2023;7(8):e0208. <https://doi.org/10.1097/HCS.0000000000000208>
- Zhou Z, Xu M-J, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2015;13(3):301–315.
- Doherty DG. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2016;66:60–75. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.020>
- De Martin E, Michot J-M, Papouin B, Champiat S, Mateus C, Lambotte O, Roche B, Antonini TM, Coilly A, Laghouati S, et al. Characterization of liver injury induced by cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors. *J Hepatol*. 2018;68(6):1181–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.033>
- Hercun J, Vincent C, Bilodeau M, Lapierre P. Immune-mediated hepatitis during immune checkpoint inhibitor cancer immunotherapy: lessons from autoimmune hepatitis and liver immunology. *Front Immunol*. 2022;13:907591. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.907591>
- Osei-Bordom D, Bozward AG, Oo YH. The hepatic microenvironment and regulatory T cells. *Cell Immunol*. 2020;357:104195. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104195>
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>

17. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010;330(6002):362–366. <https://doi.org/10.1126/science.1195491>
18. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The neutrophil. *Immunity*. 2021;54(7):1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>
19. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*. 2011;89(3):359–372. <https://doi.org/10.1189/jlb.0910538>
20. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil diversity in health and disease. *Trends Immunol*. 2019;40(7):565–583. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.012>
21. Shim HB, Deniset JF, Kubes P. Neutrophils in homeostasis and tissue repair. *Int Immunol*. 2022;34(8):399–407. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxac029>
22. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The ontogeny of a neutrophil: mechanisms of granulopoiesis and homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;82(1):e00057–17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00057-17>
23. Raymond SL, Mathias BJ, Murphy TJ, Rincon JC, López MC, Ungaro R, Ellett F, Jorgensen J, Wynn JL, Baker HV, et al. Neutrophil chemotaxis and transcriptomics in term and preterm neonates. *Transl Res*. 2017;190:4–15. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.08.003>
24. Marques PE, Antunes MM, David BA, Pereira RV, Teixeira MM, Menezes GB. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nat Protoc*. 2015;10(2):258–268. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.006>
25. David BA, Rezende RM, Antunes MM, Santos MM, Freitas Lopes MA, Diniz AB, Sousa Pereira RV, Marchesi SC, Alvarenga DM, Nakagaki BN, et al. Combination of mass cytometry and imaging analysis reveals origin, location, and functional repopulation of liver myeloid cells in mice. *Gastroenterology*. 2016;151(6):1176–1191. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.024>
26. Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(5):181–187. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01468-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01468-1)
27. Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(7):395–410. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0134-x>
28. Freitas-Lopes MA, Mafra K, David BA, Carvalho-Gontijo R, Menezes GB. Differential location and distribution of hepatic immune cells. *Cells*. 2017;6(4):48. <https://doi.org/10.3390/cells6040048>
29. Pouyababar D, Chung SW, Pezzutti OI, Perciani CT, Wang X, Ma X-Z, Jiang C, Camat D, Chung T, Sekhon M, et al. A rat liver cell atlas reveals intrahepatic myeloid heterogeneity. *iScience*. 2023;26(11):108213. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108213>
30. Balmer ML, Schürch CM, Saito Y, Geuking MB, Li H, Cuenca M, Kovtonyuk LV, McCoy KD, Hapfelmeier S, Ochsenbein AF, et al. Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J Immunol*. 2014;193(10):5273–5283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400762>
31. Gago da Graça C, van Baarsen LGM, Mebius RE. Tertiary lymphoid structures: diversity in their development, composition, and role. *J Immunol*. 2021;206(2):273–281. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000873>
32. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):433–450. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0412-0>
33. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
34. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidal M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):180–193. <https://doi.org/10.1111/imr.12447>
35. Cao Z, Zhao M, Sun H, Hu L, Chen Y, Fan Z. Roles of mitochondria in neutrophils. *Front Immunol*. 2022;13:934444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.934444>
36. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*. 2009;114(21):4613–4623. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-221630>
37. Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*. 2010;268(1):25–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x>
38. Lin R, Wang J, Wu Y, Yi Z, Zhang Y, Li L. Resolving neutrophils due to TRAM deletion renders protection against experimental sepsis. *Inflamm Res*. 2023;72(8):1733–1744. <https://doi.org/10.1007/s00011-023-01779-z>
39. Lin R, Zhang Y, Pradhan K, Li L. TICAM2-related pathway mediates neutrophil exhaustion. *Sci Rep*. 2020;10(1):14397. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71379-y>
40. Xie X, Shi Q, Wu P, Zhang X, Kambara H, Su J, Yu H, Park S-Y, Guo R, Ren Q, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat Immunol*. 2020;21(9):1119–1133. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0736-z>
41. Kieusseian A, de la Grange PB, Burlen-Defranoux O, Godin I, Cumano A. Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. *Development*. 2012;139(19):3521–3530. <https://doi.org/10.1242/dev.079210>
42. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*. 1999;126(22):5073–5084. <https://doi.org/10.1242/dev.126.22.5073>
43. Petty JM, Lenox CC, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM-1 pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow. *J Immunol*. 2009;182(1):604–612. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.604>
44. Wolber FM, Leonard E, Michael S, Orschell-Traycoff CM, Yoder MC, Srour EF. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol*. 2002;30(9):1010–1019. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00881-0](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00881-0)
45. Zhong D, Jiang H, Zhou C, Ahmed A, Li H, Wei X, Lian Q, Tastemel M, Xin H, Ge M, et al. The microbiota regulates hematopoietic stem and progenitor cell development by mediating inflammatory signals in the niche. *Cell Rep*. 2023;42(2):112116. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112116>
46. Hattori H, Subramanian KK, Sakai J, Luo HR. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Commun Integr Biol*. 2010;3(3):278–281. <https://doi.org/10.4161/cib.3.3.11559>
47. Li J, Shen L, Qian K. Global, regional, and national incidence and mortality of neonatal sepsis and other neonatal infections, 1990–2019. *Front Public Health*. 2023;11:1139832. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1139832>