UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGÊNICOS

DANIEL LEONARDO ALZAMORA TERREL

Investigação do papel de STING na perda da função antiinflamatória em macrófagos deficientes em LAP no contexto da eferocitose

> RIBEIRÃO PRETO 2022

DANIEL LEONARDO ALZAMORA TERREL

Investigação do papel de STING na perda da função antiinflamatória em macrófagos deficientes em LAP no contexto da eferocitose

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.ª Dra. Larissa Dias da Cunha

RIBEIRÃO PRETO 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alzamora Terrel, Daniel Leonardo

Investigação do papel de STING na perda da função anti-inflamatória em macrófagos deficientes em LAP no contexto da eferocitose.

Ribeirão Preto, 2022.

95 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Larissa Dias da Cunha.

1. Autoimunidade. 2. LAP. 3. Eferocitose. 4. STING. 5. Polarização de macrófagos.

Nome: Daniel Leonardo Alzamora Terrel

Título: Investigação do papel de STING na perda da função anti-inflamatória em macrófagos deficientes em LAP no contexto da eferocitose.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a):	
Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:
Prof.(a) Dr.(a):	
Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:
Prof.(a) Dr.(a):	
Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:

APOIO FINANCEIRO

Trabalho realizado no Laboratório Sinalização Celular na Resposta Inflamatória, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro de:

Processo N°: 2019/21465-8, e processo N°: 2018/25559-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

Processo N°: 88882.378765/2019-01, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e

Processo N°: 434538/2018-3, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Ao Leonardo, por ter me apoiado nesta, minha aventura. Te amo pai. À Larissa, pelo acolhimento e jeito apropriado de orientar meu trabalho, fazendo me enxergar a ciência com um novo olhar, que alegoricamente considero a minha viagem para as Ítacas.

AGRADECIMENTOS

Seria muito abrangente e precisaria de muitas páginas para expressar minha gratidão para cada uma das pessoas que estiveram dispostas a me brindar um pouquinho do seu valioso tempo: para resolver uma dúvida, me ajudar com um experimento, compartilhar algum reagente, ou simplesmente, bater um papo e deixar a vida me levar como diz Zeca Pagodinho; em troca, compartilho com eles um poema, simples, porém significativo, quase como um *p*<0.05, garanto!

ÍTACA

Quando partires em viagem para Ítaca faz votos para que seja longo o caminho, pleno de aventuras, pleno de conhecimentos. Os Lestrigões e os Ciclopes, o feroz Poseidon, não os temas, tais seres em teu caminho jamais encontrarás, se teu pensamento é elevado, se rara emoção aflora teu espírito e teu corpo. Os Lestrigões e os Ciclopes, o irascível Poseidon, não os encontrarás, se não os levas em tua alma, se tua alma não os ergue diante de ti.

Faz votos de que seja longo o caminho. Que numerosas sejam as manhãs estivais, nas quais, com que prazer, com que alegria, entrarás em portos vistos pela primeira vez; para em mercados fenícios e adquire as belas mercadorias, nácares e corais, âmbares e ébanos e perfumes voluptuosos de toda espécie, e a maior quantidade possível de voluptuosos aromas; vai a numerosas cidades egípcias, aprende, aprende sem cessar dos instruídos.

Guarda sempre Ítaca em teu pensamento. É teu destino aí chegar. Mas não apresses absolutamente tua viagem. É melhor que dure muitos anos e que, já velho, ancores na ilha, rico com tudo que ganhaste no caminho, sem esperar que Ítaca te dê riqueza.

Ítaca deu-te a bela viagem. Sem ela não te porias a caminho. Nada mais tem a dar-te. Embora a encontres pobre, Ítaca não te enganou. Sábio assim como te tornaste, com tanta experiência, já deves ter compreendido o que significam as Ítacas.

(Konstantinos Kaváfis)

Título: Investigação do papel de STING na perda da função anti-inflamatória em macrófagos deficientes em LAP no contexto da eferocitose.

RESUMO

Defeitos no reconhecimento ou degradação de células mortas estão associados ao desenvolvimento de síndromes autoimunes em modelos murinos, potencialmente relacionado ao acúmulo de debris celular. Neste trabalho nós demonstramos que, animais envelhecidos deficientes RUBCN (Rubcn^{-/-}) e ATG5 (Atg5[#] LysM-Cre⁺), componentes de uma via não canônica da autofagia (LAP) desenvolvem autoanticorpos, ainda que não possuam manifestações severas de autoimunidade. Nesse contexto, nós investigamos a contribuição do sensor de DNA, STING, no desenvolvimento de fenótipos autoimunes em animais envelhecidos deficientes para LAP. STING não é fundamental para a produção de autoanticorpos observada em animais deficientes em LAP, mas sua deleção reduziu a deposição de imunocomplexos nos glomérulos, sugerindo que a ativação de STING na ausência de RUBCN (e possivelmente LAP) podem contribuir para a inflamação local e dano renal associados a processos autoimunes. Mecanisticamente, nós investigamos se STING pode regular a polarização anti-inflamatória de macrófagos com deficiências em LAP de células apoptóticas. Confirmamos que macrófagos primários derivados da medula óssea (BMDM) com defeitos em LAP exibiram uma redução na expressão de marcadores de função anti-inflamatória (como Mrc1, Col1a1, Mgl2, Arg1, Tgfb1) em resposta às células apoptóticas. Também observamos a redução na expressão de Il4ra, subunidade do receptor de IL-4/13, nos macrófagos Rubcn^{-/-} e Atg5^{f/f} LysM-Cre⁺, sugerindo um papel de LAP na regulação da sinalização que polariza a função anti-inflamatória dos macrófagos. No entanto, a deficiência em STING não afetou a redução da expressão de marcadores anti-inflamatórios e *II4ra* na ausência de LAP. BMDM apenas com defeitos em LAP (*Rubcn^{-/-}*) assim como defeitos para as ambas vias: LAP e STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*), mostraram níveis reduzidos de IL-10 em comparação com macrófagos do tipo selvagem (Rubcn+/+). Nossos resultados confirmam que a perda desse perfil anti-inflamatório associado a eferocitose em macrófagos deficientes em componentes de LAP não é causada por um efeito direto da ativação de STING.

Palavras chaves: Autoimunidade, LAP, eferocitose, STING, polarização de macrófagos.

Title: Investigation of the role of STING in the loss of anti-inflammatory function in LAPdeficient macrophages in the context of efferocytosis.

ABSTRACT

Defects in the recognition or degradation of dying and dead cells are associated with the development of autoimmune syndromes in murine models, potentially related to the accumulation of cellular debris. In this work, we demonstrate that aged animals with a deficiency in RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) and ATG5 (*Atg5^{t/t} LysM-Cre*⁺), components of one of the non-canonical autophagy pathways (LAP), develop autoimmune phenotypes without severe manifestations of autoimmune disease. In this context, we investigated the contribution of the DNA sensor STING in the development of autoimmune phenotypes in LAP-deficient aged animals. STING is not essential for producing autoantibodies observed in LAP-deficient animals, but STING deletion reduced the deposition of immune complexes in the glomeruli, which suggests that STING activation in the absence of RUBCN (and possibly LAP) may contribute to local inflammation and kidney damage associated with autoimmune processes. Mechanistically, we investigated whether STING can regulate the anti-inflammatory polarization in LAP-deficient macrophages during efferocytosis. We confirm that primary bone marrow-derived macrophages (BMDM) with LAP defects exhibit a reduction in the expression of markers of anti-inflammatory function (such as Mrc1, Col1a1, Mgl2, Arg1, Tgfb1) in response to apoptotic cells. We also observed a reduction in the expression of *II4ra*, the IL-4/13 receptor subunit, in **Rubcn^{-/-}** and **Atg5**^{f/f} LysM-Cre⁺ macrophages, which suggests that LAP can regulate signaling that polarizes the anti-inflammatory function of macrophages. However, deficiency in STING did not affect the reduction of anti-inflammatory markers expression and *II4ra* in the absence of LAP. BMDM with defects in LAP (*Rubcn^{-/-}*) as well as defects for both pathways (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*), showed reduced levels of IL-10 in comparison to wild type macrophages (Rubcn+/+). Our results confirm that the loss of the antiinflammatory profile associated with efferocytosis in LAP-deficient macrophages is not caused by a direct effect of STING activation.

Keywords: Autoimmunity, LAP, efferocytosis, STING, macrophage polarization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da eferocitose.

Figura 2. Fagocitose associado a LC3 de células apoptóticas.

Figura 3. Polarização de macrófagos.

Figura 4. Ativação canônica de STING.

Figura 5. Estratégia de estudos finais para a avaliação de síndrome autoimune em camundongos.

Figura 6. Padrões de imunofluorescência utilizados para detectar anticorpos antinucleares (ANA) pela marcação em células Hep2.

Figura 7. Camundongos envelhecidos deficientes em RUBCN ou ATG5 produzem autoanticorpos independente de STING.

Figura 8. A deficiência de STING reduz sinais de patologia renal nos camundongos envelhecidos com defeitos em RUBCN.

Figura 9. Camundongos envelhecidos deficientes para RUBCN apresentam redução do peso, contudo, não exibiram esplenomegalia ou leucocitose.

Figura 10. BMDM deficientes em RUBCN apresentam redução de perfil antiinflamatório no contexto da eferocitose.

Figura 11. A fagocitose de células apoptóticas induz uma resposta de IFN do tipo I em BMDM deficientes em RUBCN.

Figura 12. STING não regula a perda da polarização anti-inflamatória no processo de eferocitose nos macrófagos deficientes em RUBCN.

Figura 13. Deficiência em RUBCN reduz os níveis de IL-10 nos BMDM durante a eferocitose.

Figura 14. Deficiência em ATG5 induz redução da resposta anti-inflamatória independente de STING nos BMDM durante a eferocitose.

Figura 15. Resumo gráfico dos principais achados in vivo.

Figura 16. Resumo gráfico dos principais achados in vitro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Requerimentos moleculares da autofagia canônica e LAP.

 Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos para o estudo da expressão de genes

 murino.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC:	Células apoptóticas
AIM2:	Absent in melanoma 2
ANA:	Anticorpos antinucleares
Arg1:	Arginase 1
ATG:	AuTophaGy-related protein
ATP/UTP:	Adenosina / Uridina trifosfato
ATP11A:	Flippase, ATPase phospholipid transporting 11A
AXL:	AXL Receptor Tyrosine Kinase
B6:	Camundongos da cepa C57BL/6
BAFF:	Fator ativador de células B
BAI1:	ADGRB1, adhesion G protein-coupled receptor B1
BMDM:	Macrófagos derivados da medula óssea
BSA:	Albumina sérica bovina
CCD:	Coiled-coil domain
CCL5:	C-C motif chemokine ligand 5
CD:	Cluster de diferenciação
CDN:	Dinucleotídeos cíclicos
cGAMP:	Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate
cGAS:	Cyclic GMP-AMP synthase
CRISPR:	Conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas
CTGF:	Connective tissue growth factor
CX3CL1:	C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1
DAMPs:	Padrões moleculares associados a dano
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA:	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FASL:	Ligante Fas
FcYR:	Receptor Fc (fragmento cristalizável) gama

FIP200:	RB1 Inducible Coiled-Coil 1
GABARAP:	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GAS6:	Growth Arrest-Specific Protein 6
GTP:	Guanosina trifosfato
H&E:	Hematoxilina-eosina
HRP:	Peroxidase de rábano silvestre
IC:	Imunocomplexos
ICAM3:	Intercellular adhesion molecule 3
IFN:	Interferon
IFNAR:	Cadeia alfa do receptor de interferon
IHC:	Imuno-histoquímica
IKK:	Quinase IkB
IL-1R:	Receptor de Interleucina 1
IL:	Interleucina
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível
ISGs:	Genes estimulado por interferon
LAM:	LC3-associated macropinocytosis
LANDO:	LC3-associated endocytosis
LAP:	LC3-associated phagocytosis
LC3:	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
LPC:	Lisofosfatidilcolina
LRP1:	Proteína 1 relacionada ao receptor LDL
LXR:	Receptor X do fígado
LysM-Cre:	Sistema de nocaute condicional específico em células mieloides
M1:	Polarização pró-inflamatória
M2:	Polarização anti-inflamatória
M-CSF:	Fator estimulante de colônias de macrófagos
mDCs:	Células dendríticas mieloides
MERTK:	MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase

MFG-E8:	Milk Fat Globule EGF And Factor V/VIII Domain Containing
NF-kB:	Fator nuclear kappa B
NO:	Óxido nítrico
NOX2:	NADPH oxidase 2
PAMPs:	Padrões moleculares associados a patógenos
PANX1:	Panexina 1
PBS:	Tampão fosfato salino
pDCs:	Célula dendrítica plasmacitoides
PE:	Fosfatidiletanolamina
PGE2:	Prostaglandina E2
PI3KC3:	Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3
PI3P:	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PPAR:	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PS:	Fosfatidilserina
Rab:	Proteínas relacionada a Ras
ROS:	Espécies reativas de oxigênio
RUBCN:	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein, conhecido como Rubicon
RUN:	Run domain
S1P:	Esfingosina 1 fosfato
SLE:	Lúpus eritematoso sistémico
STING:	Stimulator of Interferon Response CGAMP Interactor 1
TAM:	Família de receptores tirosina quinase (TYRO3, AXL, MERTK)
TAMs:	Macrófagos associados ao tumor
TGFβ:	Fator de crescimento transformante beta
Th1:	T helper 1
Th2:	T helper 2
TIM4:	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4
TLR:	Receptor tipo Toll

TMB:	Tetrametilbenzidina
TNF:	Fator de necrose tumoral
TNFR1:	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRAIL:	ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TYRO3:	TYRO3 Protein Tyrosine Kinase
ULK1:	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
UVRAG:	UV radiation resistance-associated gene protein
VPS34:	Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34
WIPI2:	WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 2
XKR8:	Scramblase, XK related 8

 $\alpha V\beta 3$: Integrina alfa V e integrina beta 3

SUMÁRIO

DEDI	CATÓ	RIA6
AGRA	ADECI	MENTOS7
RESU	JMO	8
ABST	RACT	
LISTA	A DE F	IGURAS10
LISTA	A DE T	ABELAS12
LISTA	A DE A	BREVIATURAS E SIGLAS13
SUM	ário	17
1 IN	NTRO	DUÇÃO21
2 A	SPEC	TOS CONCEITUAIS25
2.1	Efero	citose "Minha morte irá te proteger"25
2	.1.1	Procura de células apoptóticas "Flertando com a morte"26
2	.1.2	Reconhecimento de células apoptóticas "Prazer em te conhecer, mas'
2	.1.3	Ligação e internalização de células apoptóticas "Um contato fatal"27
2	.1.4	Degradação de células apoptóticas "Uma sepultura limpa"28
2.2	Uma	via não canônica da autofagia30
2	.2.1	Maquinaria molecular de LAP31
2	.2.2	LAP de células apoptóticas
2.3	Efero	citose e síndromes autoimunes
2.4	Polari	zação de macrófagos
2.5	Ativaç	ção de STING e resposta dependente de IFN do tipo I40
3 C	BJETI	VOS45
3.1	Objet	ivo geral45
3.2	Objet	ivos específicos45
4 N	1ATER	IAL E MÉTODOS48 17

	4.1	Animais de experimentação4	.8
	4.2	Diferenciação de macrófagos a partir de células da medula óssea4	-8
	4.3	Indução de apoptose em células Jurkat T4	.9
	4.4	Co-cultura de Macrófagos e Células Apoptóticas4	.9
	4.5	Extração de RNA4	.9
	4.6	Síntese de cDNA5	0
	4.7	qPCR5	0
	4.8	Quantificação de IL-105	0
	4.9	Estudos em animais envelhecidos5	51
	4.10	Detecção de anticorpos anti-dsDNA5	52
	4.11	Determinação de anticorpos antinucleares (ANA)5	3
	4.12	Marcação de imunocomplexos IgG no rim5	54
	4.13	Determinação da área glomerular5	5
	4.14	Contagem e classificação diferencial de leucócitos5	5
	4.15	Análise Estatística5	6
5	R	ESULTADOS5	8
	5.1 auto	Camundongos envelhecidos deficientes em RUBCN ou ATG5 produzem anticorpos independente de STING5	58
	5.2 defic	A deficiência de STING reduze a patologia renal nos camundongos envelhecidos ientes em RUBCN	51
	5.3 enve	Deficiência em RUBCN está associada a redução de peso nos camundongos Ihecidos	64
	5.4	BMDM com deficiências em RUBCN apresentam redução da resposta anti-	
	inflar	natória no contexto da eferocitose6	57
	5.5 defic	A fagocitose de células apoptóticas induz uma resposta de IFN do tipo I em BMDM ientes em RUBCN6	8
	5.6 de S	A perda da polarização M2 nos BMDM com deficiências em RUBCN é independente TING7	; 0

5.7 Deficiências em RUBCN reduz os níveis de IL-10 nos BMDM durante a eferocitose.72

Ę	5.8 BMDM deficientes para ATG5 exibem redução da resposta anti-inflamatória no	
(contexto eferocítico	73
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	83
8	REFERÊNCIAS	86



1 INTRODUÇÃO

Processos fundamentais para promover a homeostase em animais, como o desenvolvimento, renovação tecidual, inflamação ou resolução induzem morte nas células dos diferentes tecidos do corpo a cada dia (ARYA; WHITE, 2015; PATANKAR; BECKER, 2020; FULLERTON; GILROY, 2016). Desse modo, condições fisiológicas ou patológicas desencadeiam diferentes formas de morte celular programada, sendo necessária a eliminação de células mortas e/ou debris celular a fim de proteger os tecidos de potenciais danos provocados por células necróticas (ROTHLIN; HILLE; GHOSH, 2021; PATANKAR; BECKER, 2020). Nesse cenário, fagócitos professionais, especialmente macrófagos, são capazes de perceber, reconhecer, internalizar e degradar células mortas, processo conhecido como eferocitose (BOADA-ROMERO et al., 2020; DORAN; YURDAGUL; TABAS, 2020).

A fagocitose associada a LC3 (LAP, do inglês *LC3-associated phagocytosis*), uma via não canônica da autofagia, recruta parte dos componentes da autofagia canônica e, junto a proteínas especificamente requeridas para LAP, propiciam a lipidação de proteínas da família LC3 diretamente na membrana do fagossomo (GALLUZZI; GREEN, 2019; SCHAAF et al., 2016). LAP é ativado através de receptores de reconhecimento de padrão (tais como TLR1/2, TLR2/6, TLR4, dectin-1), receptores de imunoglobulinas (FcYR) e receptores de células apoptóticas (TIM4). Além disso, LAP conduz a degradação lisossômica das particulas internalizadas do exterior contribuindo na regulação da função dos macrófagos dependendo do tipo de carga englobada (HECKMANN et al., 2017). Durante a eferocitose de células apoptóticas estéreis, LAP estimula um perfil anti-inflamatório em macrófagos (CUNHA et al., 2018).

Por outro lado, células do sistema imune apresentam diversos receptores de ácidos nucleicos como parte da defesa inata, sendo STING um sensor essencial nas vias de reconhecimento e sinalização da presença citoplasmática de DNA (LI et al., 2013; SCHLEE; HARTMANN, 2016). STING (*stimulator of interferon response cGAMP interactor 1*) é uma proteína transmembrana do retículo endoplasmático que induz respostas importantes na defesa contra patógenos, como a produção de IFN do tipo I e indução de xenofagia. No entanto, respostas exacerbadas dessa via contribuem na

patogênese de diversas doenças inflamatórias ou autoimunes (HOPFNER; HORNUNG, 2020; LI; CHEN, 2018; MCWHIRTER; JEFFERIES, 2020)

Alterações tanto no reconhecimento quanto na degradação das células mortas nos fagócitos provocam o desenvolvimento de processos autoinflamatórios e/ou autoimunes em diferentes modelos murinos (COHEN et al., 2002; LU; LEMKE, 2001; RODRIGUEZ-MANZANET et al., 2010; TONNUS et al., 2022). Nesse contexto, estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos com deficiências em LAP induzem a produção de IFN do tipo I dependente de STING em resposta à eferocitose de células apoptóticas (CUNHA et al., 2018).

Essas evidências sugerem que LAP possui um papel importante na regulação da polarização funcional dos macrófagos no cenário da eferocitose. Diante isso, nossa hipótese é que STING potencialmente pode regular a perda da função anti-inflamatória dos macrófagos com deficiências na maquinaria da degradação de células mortas, além de contribuir no desenvolvimento de um fenótipo autoimune. Por meio de um estudo *in vivo*, avaliamos a ocorrência de respostas autoimunes em camundongos envelhecidos com deficiências em componentes de LAP (especificamente RUBCN e ATG5) e sua dependência de STING. *In vitro,* investigamos uma possível contribuição de STING na perda do perfil anti-inflamatório nos macrófagos deficientes em LAP durante a eferocitose.

Nossos achados indicam que animais com ablação total de RUBCN ou deficiência de ATG5 no compartimento mielóide desenvolvem autoanticorpos e deposição renal de imunocomplexos, mas não desenvolvem manifestações autoimunes severas. Ainda, observamos uma dicotomia no papel de STING nesses animais. Nossos resultados apontam que a produção de autoanticorpos reativos nos animais com defeitos em componentes da via de LAP não é consistentemente revertida na ausência de STING. No entanto, a deficiência em STING reduz a deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais em camundongos deficientes em RUBCN, sugestivo que a ativação de STING na ausência de LAP pode contribuir para a inflamação glomerular e dano tecidual renal associados a processos autoimunes. Ademais, contrariando nossa hipótese inicial, a perda do perfil anti-inflamatório em resposta a eferocitose em macrófagos murinos com deleções na maquinaria de LAP não está associada diretamente à atividade de STING. Em

conjunto, os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que a ablação de STING possivelmente pode contribuir para a redução de danos renais por reduzir os efeitos deletérios do acúmulo de imunocomplexos, e não por causa da perda da função anti-inflamatória e de reparo tecidual associada a eferocitose em macrófagos deficientes em LAP.

Aspectos Conceituais

2 ASPECTOS CONCEITUAIS

2.1 Eferocitose "Minha morte irá te proteger"

Das aproximadamente 30 trilhões de células que conformam o corpo de uma pessoa adulta media, ao redor de 4 milhões de células são renovadas a cada segundo (SENDER; MILO, 2021). Nesse cenário, os fagócitos promovem a captação dos corpos apoptóticos e/ou debris celular, reduzindo ao máximo a exposição de células mortas incluso nos tecidos com alta taxa de renovação (ELLIOTT; RAVICHANDRAN, 2016; RAYMOND et al., 2022).

Eferocitose (do latim, *effere*, "levar ao túmulo"), é o processo pelo qual os fagócitos profissionais como macrófagos, células dendríticas, ou não profissionais, como as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (de origem não-hematopoiética), removem e degradam células mortas do corpo geradas como consequência de processos fisiológicos e/ou patológicos (DORAN; YURDAGUL; TABAS, 2020). Nesse sentido, a eferocitose tem por finalidade a preservação da imunotolerância, ativando os mecanismos de resolução e reparo tecidual a fim de prevenir o desenvolvimento de inflamação crônica ou doenças autoimunes (BOADA-ROMERO et al., 2020; FULLERTON; GILROY, 2016).

Durante o processo eferocítico acontece uma constante comunição e interação entre as células em morte celular e os eferócitos. Se desenvolvem uma série de eventos tais como o chamado de morte por meio de moléculas liberadas pelas células mortas; o reconhecimento e englobamento das células mortas pelos eferócitos, a ativação de diferentes vias de sinalização para facilitar a degradação da carga, e a instauração de uma resposta imunossupressora sob contextos fisiológicos (ELLIOTT; RAVICHANDRAN, 2016). No entanto, esses acontecimentos orquestrados e finamente regulados podem sofrer perturbações sob contextos patológicos, potencialmente exacerbar a resposta imune, contribuindo na patogênese ou evolução de diferentes doenças. As fases da eferocitose de corpos apoptóticos são descritas abaixo e na **Figura 1.**

2.1.1 Procura de células apoptóticas "Flertando com a morte"

A apoptose é um tipo de morte celular programada que pode acontecer através de duas vias de sinalização. Por um lado, a via intrínseca é ativada por eventos que alteram a homeostase celular interna como estresse oxidativo, liberação de proteínas mitocondriais no citoplasma ou danos no DNA. Por outro lado, a via extrínseca, é desencadeada por meio de ligantes (TNF, FASL, TRAIL) além de PAMPs e DAMPs, que ativam receptores de morte na membrana celular. A sinalização dessas vias ativa proteases específicas conhecidas como caspases; assim, sequencialmente as caspases iniciadoras como caspase 8 (via extrínseca) e caspase 9 (via intrínseca) clivam e ativam as caspases executoras (caspases 3 e 7 principalmente). Seguidamente estas últimas, degradam e/ou ativam múltiplas substratos relacionados à fragmentação do DNA, destruição de organelas, demolição do citoesqueleto, exposição de fosfolipídios (fosfatidilserina), e formação de blebs na membrana, além dos corpos apoptóticos (ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020; BEDOUI; HEROLD; STRASSER, 2020, GALLUZZI et al., 2018)

As células apoptóticas anunciam a sua própria presença liberando diversas moléculas solúveis ou sinais "encontre-me" (do inglês, *find-me signals*) que servem como moléculas quimiotáticas, promovendo assim o deslocamento dos fagócitos residentes no tecido ou recrutados da circulação em direção às células mortas (POON et al., 2014). Além disso, durante estágios muito iniciais no apoptose, as caspases ativam substratos envolvidos na liberação seletiva de metabólitos (secretoma metabólico apoptótico) através do canal PANX1 (*Plasma membrane channel pannexin 1*) essencialmente. Esses metabólitos contribuem na ativação de programas transcricionais relacionados com a supressão da inflamação, proliferação e reparo tecidual nos fagócitos (CHEKENI et al., 2010; MEDINA et al., 2020). Dentro dos principais sinais "encontre-me", se destacam os nucleotídeos ATP/UTP, quimiocinas como a fractalquina CX3CL1, e lipídeos complexos como lisofosfatidilcolina (LPC) e esfingosina-1-fosfato (S1P) (LEMKE, 2019; MEDINA; RAVICHANDRAN, 2016).

No entanto, células apoptóticas também podem liberar moléculas para suprimir a migração. Lactoferrina, uma glicoproteína de propriedades anti-inflamatórias é secretada pelas células apoptóticas para inibir seletivamente a migração dos neutrófilos, agindo como um sinal "fique longe ou mantenha-se afastado" (do inglês, *Keep away ou Keep out signal*) (BOURNAZOU et al., 2009).

2.1.2 Reconhecimento de células apoptóticas "Prazer em te conhecer, mas..."

Em condições fisiológicas, a topologia e a distribuição assimétrica dos fosfolipídios nas faces da membrana celular são sustentadas principalmente pelas flipasses ATP11A e ATP11C (translocases dependentes de ATP) (NAGATA, 2018). No entanto, a indução de apoptose estimula a ativação proteolítica das scramblases da família XKR (em especial XKR8), permitindo a constante exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana. Fosfatidilserina é um aminofosfolipídio chave para o reconhecimento das células apoptóticas, atuando como um sinal "me coma" (do inglês, *eat-me signals*) (FADOK et al., 2001^a; SAKURAGI; KOSAKO; NAGATA, 2019). Por outro lado, outras moléculas como as proteínas calreticulina (GARDAI et al., 2005; BIRKLE; BROWN, 2021) ou ICAM-3 (KRISTÓF et al., 2013), podem agir como sinais "me coma" em contextos como estresse celular ou infecções.

Em contraposição aos sinais que favorecem a eferocitose, existem um grupo de mediadores que agem como sinais "não me coma" (do inglês, *don't eat-me signals*), que inibem a fagocitose, prevenindo uma eliminação celular desnecessária ou servindo como mecanismo de evasão imune (LEMKE, 2019; JAISWAL et al., 2009). Alguns dos sinais "não me coma" incluem: CD47 (MORRISSEY; KERN; VALE, 2020; OLDENBORG et al., 2000), CD31 ou PECAM-1 (BROWN et al., 2002; VERNON-WILSON et al., 2007), CD24 (BARKAL et al., 2019), e CD46 (ELWARD et al., 2005).

2.1.3 Ligação e internalização de células apoptóticas "Um contato fatal"

Uma etapa seguinte na eferocitose compreende a ligação direta ou indireta entre os diversos receptores eferocíticos da membrana dos fagócitos e os resíduos de fosfatidilserina ou os outros "sinais me come" exibidos pelas células apoptóticas. Para potenciar a interação parece ser necessário o estabelecimento de uma plataforma de receptores de membrana nos fagócitos que favoreça a subsequente sinalização intracelular e internalização da carga em uma sinapse fagocítica, semelhante a uma sinapse imunológica (BARTH et al., 2017; LI et al., 2020; RAVICHANDRAN, 2010).

Receptores da família TIM (T cell immunoglobulin mucin receptor) 1, 3 e 4, além de BAI1 (Brain-specific angiogenesis inhibitor 1), Stabilin 1, 2, e CD300b/DAP12 podem se ligar diretamente a fosfatidilserina (MURAKAMI et al., 2014). Por outro lado, os receptores tirosina cinase da família TAM (TYRO3, AXL, MERTK) precisam de proteínas acessórias como GAS6 (Growth arrest-specific protein 6) e Proteína S para se ligar ao aminofosfolipídio. Nessa linha, os receptores de integrina $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, necessitam da proteína ponte MFG-E8 (Milk fat globule EGF factor 8) para o mesmo propósito (POON et al., 2014; LEMKE, 2019). Além disso, o receptor LRP1 (LDLreceptor-related protein 1) (GARDAI et al., 2005) e CD91, um receptor endocítico, (OGDEN et al., 2001) podem se ligar a calreticulina; o receptor CD14 se liga a ICAM3 (DEVITT et al., 1998; MOFFATT et al., 1999). Vale ressaltar também a presença de proteínas solúveis como C1q, C3b, Galectin-3, Annexin-1, entre outras, com funções de opsoninas, as quais se ligam às células mortas sob determinados contextos, auxiliando na sua eliminação (COCKRAM et al., 2021). O reconhecimento das células apoptóticas ativa os diversos receptores eferocíticos estimulando vias de sinalização intracelular específicas para o englobamento, convergindo na ativação de pequenas GTPases como RhoA e Rac1. A ativação de Rac1 permite a atividade do complexo Actin-related protein 2/3 (ARP2/3) para polimerizar actina, favorecendo a formação do copo fagocítico e internalização da carga e geração do fagossomo (PARK et al., 2007; KIM et al., 2017).

2.1.4 Degradação de células apoptóticas "Uma sepultura limpa"

No fagolisossomo, as células mortas são processadas, não entanto o destino e função posterior dos componentes degradados precisa ser desvendado. Em resposta a células apoptóticas, macrófagos ativam um programa anti-inflamatório para prevenir resposta imunes contra autoantígenos, estimulando a produção de mediadores anti-inflamatórios (TGF β , IL-10, PAF, PGE2) e suprimindo respostas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-8) (FADOK et al., 2001b; KIM; ELKON; MA, 2004). Na eferocitose, reguladores associados à homeostase de lipídios (PPARY/ δ e LXR), além

da maquinaria para o efluxo de colesterol (ABCA1) são ativados, sugerindo que o metabolismo dos lipídeos, produto da degradação das células apoptóticas no fagolisossomo, tem um papel na imunotolerância, como será melhor explicado no tópico seguinte (A-GONZALEZ et al., 2009).

A sinalização produzida através dos receptores eferocíticos estimula também a ativação de diferentes complexos moleculares que contribuem na maturação do fagossomo e degradação da carga. Esses complexos moleculares envolvem componentes da maquinaria de autofagia, que podem ser recrutados diretamente para a membrana do fagossomo contendo corpos apoptóticos, culminando na lipidação de proteínas da família LC3/GABARAP diretamente na membrana do fagossomo, um processo denominado fagocitose associada a LC3 ou LAP (do inglês, *LC3-associated phagocytosis*) (CUNHA et al., 2018; HOOPER et al., 2022; RAI et al., 2019; FLOREY et al., 2011). LAP medeia a acidificação do compartimento fagolisossomal e degradação das células apoptóticas fagocitadas (RAYMOND et al., 2022). O processo de LAP será abordado em detalhe no ponto 2.2. (FLOREY et al., 2011)



Figura 1. Fases da eferocitose. Sob condições normais, inicialmente, as células apoptóticas (AC) liberam mediadores moleculares (sinais "encontre-me") que estimulam a migração dos eferócitos até o seu microambiente, tais como quimiocinas (CX3CL1), nucleotídeos (ATP/UTP), lipídeos (S1P, LPC) e removê-las. Em seguida, os eferócitos reconhecem e se ancoram direta ou indiretamente às ACs por meio da interação entre os diversos receptores eferocíticos (TIM4, MERTK, AXL) e, fosfatidilserina, um fosfolipídio predominante na membrana das AC (sinal "coma-me"). Posteriormente, a sinalização através desses receptores estimula a internalização das AC, além de ativar outras proteínas (maquinaria para lipidar LC3) que contribuem na maduração do fagossomo. No final, a fusão do fagossomo com os lisossomos provoca a degradação da AC, que por sua vez geram lipídeos específicos que posteriormente ativam receptores nucleares de esteróis (PPARo, PPARY, LXR), induzindo a modulação da resposta imune em direção a um perfil supressor. Adaptado de DORAN; YURDAGUL; TABAS, Nat Rev Immunol, 2020; BOADA-ROMERO et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2020; KAWANO; NAGATA, Int Immunol, 2018. Imagem elaborada no BioRender.com.

2.2 Uma via não canônica da autofagia

A autofagia canônica ou macroautofagia é um processo catabólico ativado sob condições de estresse como privação de nutrientes, depleção de fatores de crescimento, infecção ou hipóxia, para promover a sobrevivência celular. Durante o processo, organelas danificadas, agregados proteicos, além de patógenos intracelulares, são marcados, capturados dentro de uma membrana dupla para sua posterior degradação lisossômica (NAKATOGAWA et al., 2009; KAUR; DEBNATH, 2015). Por outro lado, proteínas relevantes para autofagia participam de outros mecanismos (referidos como autofagia não canônica) envolvidos com funções celulares vinculadas ou não à membrana biológica como a fagocitose (LAP), endocitose (LANDO), ou macropinocitose (LAM) (GALLUZZI; GREEN, 2019; HECKMANN et al., 2019; SØNDER et al., 2021).

Na autofagia, complexos moleculares catalisam a conjugação de moléculas da família LC3/GABARAP (microtubule-associated protein 1 light chain 3α (MAP1LC3A), 3β (MAP1LC3B), 3Υ (MAP1LC3C), GABA type A receptor–associated protein (GABARAP), GABARAP-like 1 (GABARAPL1/gec1), e GABARAP-like 2 (GABARAPL2/GATE16) a resíduos de fosfatidiletanolamina na membrana de compartimentos derivados principalmente do retículo endoplasmático, dando origem

a compartimentos de dupla membrana com carga a ser degradada em seu interior. No entanto, a lipidação de LC3 é essencial para processos que não necessariamente dependem da indução autofagia (SCHAAF et al., 2016).

A fagocitose associada a LC3, emprega componentes da autofagia canônica, além de reguladores específicos da via de LAP, para conjugar LC3 (LC3A, LC3B, GABARAP, GATE16) na face citosólica do fagossomo (HECKMANN et al., 2017; AKOUMIANAKI et al., 2021). A diferença da autofagia canônica, LAP dirige a degradação lisossômica de partículas engolidas do exterior e não é ativada por deficiência de nutrientes (GALLUZZI; GREEN, 2019). Ligantes específicos de receptores de reconhecimento padrão (PRR), tais como TLR1/2, TLR2/6, TLR4, dectin-1, receptor de imunoglobulinas (FcYR) e receptores de células apoptóticas (como TIM4) induzem a ativação de LAP (AKOUMIANAKI et al., 2016; MASUD et al., 2019).

2.2.1 Maquinaria molecular de LAP

Potencialmente, eventos como o reconhecimento, internalização, ou formação do fagossomo levam a ativação dos complexos moleculares iniciais de LAP (PI3KC3), e a subsequente sinalização para a formação do complexo NADPH oxidase-2 (NOX2) e os sistemas de conjugação de LC3 (HECKMANN et al., 2017).

Rubicon (RUBCN), componente de LAP não envolvido em macroautofagia, é requerido para conformar o complexo PI3KC3 (junto a Beclin-1, UVRAG, VPS15 e VPS34), contribuindo na localização e estabilização desse complexo no fagossomo (LAPossomo), onde o lipídeo quinase VPS34 fosforila os fosfoinosítideos na posição 3 para produzir fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P) (FASSY et al., 2017). A constante atividade de PI3KC3, permite decorar com PI3P a face citosólica do fagossomo que serve como plataforma para o recrutamento de componentes subsequentes da via de LAP (HECKMANN et al., 2017).

NOX2 (gp91^{Phox}), associado constitutivamente a subunidade p22^{Phox}, residem geralmente na membrana plasmática ou vesículas intracelulares, as quais se associam às subunidades citoplasmáticas (p40^{Phox}, p47^{Phox} e p67^{Phox}) para estruturar o complexo multiproteico NOX2 (PANDAY et al., 2015). No fagossomo, RUBCN

31

emprega seu domínio rico em serina (567-625aa) para interagir com p22^{Phox}, estabilizando o complexo NOX2, além dos domínios CCD (515-550aa) e RUN, para interagir com Beclin-1 e VPS34 respectivamente, estabilizando PI3KC3. Além disso, a subunidade p40^{Phox} se liga à PI3P através do seu domínio PX, conseguindo-se a estabilização de ambos complexos moleculares no fagossomo, fatos importantes para a contínua produção de PI3P e subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HECKMANN et al., 2017). É possível que o ROS produzido no lume do fagossomo possa difundir para o citoplasma e atuar como agente sinalizador (SIES; JONES, 2020) dos sistemas de conjugação de LC3 (uma das lacunas que precisam ser exploradas).

Semelhante à autofagia, LAP utiliza os sistemas de conjugação tipo ubiquitina, que promove modificações covalentes nas proteínas através de três passos: enzimas com funções tipo E1 (ativação), E2 (conjugação) e E3 (ligação) (DAMGAARD, 2021). No primeiro sistema, ATG7 (E1) e ATG10 (E2) induzem a formação do heterodímero ATG12-ATG5, que em associação com ATG16L estruturam o complexo ATG16L (com propriedade enzimática E3). No segundo sistema, ATG4 (cisteína protease) cliva LC3 para expor o resíduo de glicina no extremo C-terminal requerido para sua posterior lipidação. ATG7 (E1) e ATG3 (E2) contribuem na ativação e transferência de LC3, a qual é covalentemente lipidado na cabeça polar dos resíduos de fosfatidiletanolamina no fagossomo pelo complexo ATG16L (E3) (BOADA-ROMERO et al., 2020). Finalmente, LC3 lipidado no LAPossomo pode interagir com a proteína LAMP1 dos lisossomos, facilitando a fusão e formação do fagolisossomo (FLETCHER et al., 2018). Os componentes moleculares e os processos da fagocitose associado a LC3 são mostrados na **Tabela 1** e **Figura 2**, respectivamente.

Tabela 1. Requerimentos	moleculares d	la autofagia	canônica e LAP.
-------------------------	---------------	--------------	-----------------

Componentes	s requeridos para autofagia canônica e LAP
Componente	Complexo / Função
Beclin-1	Complexo Class III PI3K (PI3KC3)
VPS34	Complexo Class III PI3K (PI3KC3)
UVRAG	Complexo Class III PI3K (PI3KC3), vesicle sorting
ATG5	Estruturação do complexo ATG5-12-16L (função tipo E3)
ATG12	Estruturação do complexo ATG5-12-16L (função tipo E3)
ATG16L	Estruturação do complexo ATG5-12-16L (função tipo E3)
ATG7	Formação do complexo ATG5-12-16L, formação de LC3-PE (função tipo E1)
ATG3	Formação de LC3-PE (função tipo E2)
ATG4	Processamento de LC3
LC3 (LC3A, LC3B, GATE 16, GABARAP)	Maturação e fusão do LAPossomo com os lisossomos
Componentes	s requeridos para autofagia canônica apenas
Componentes Componente	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função
Componentes Componente ULK1	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação
Componentes Componente ULK1 FIP200	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13 Ambra1	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13 Ambra1 ATG14	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complex Class III PI3K (PI3KC3) Complex Class III PI3K (PI3KC3)
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13 Ambra1 ATG14 WIPI2	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complex Class III PI3K (PI3KC3) Complex Class III PI3K (PI3KC3) Recrutamento de ATG5-12-16L
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13 Ambra1 ATG14 WIPI2 Componentes	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complex Class III PI3K (PI3KC3) Complex Class III PI3K (PI3KC3) Recrutamento de ATG5-12-16L requeridos para LAP apenas
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13 Ambra1 ATG14 WIPI2 Componentes Componente	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complexo de Pre-iniciação Complex Class III PI3K (PI3KC3) Complex Class III PI3K (PI3KC3) Recrutamento de ATG5-12-16L requeridos para LAP apenas Complexo / Função
Componentes Componente ULK1 FIP200 ATG13 Ambra1 ATG14 WIPI2 Componentes Rubicon	requeridos para autofagia canônica apenas Complexo / Função Complexo de Pre-iniciação Complexo lass III PI3K (PI3KC3) Complex Class III PI3K (PI3KC3) Recrutamento de ATG5-12-16L requeridos para LAP apenas Complexo / Função Localização e atividade do complex Class III PI3K (PI3KC3), estabilização do complexo NOX2

Alguns componentes do complexo PI3KC3 e os sistemas de conjugação são comuns para autofagia e LAP (verde), não entanto Rubicon e NOX2 participam especificamente de LAP (azul). Proteínas do complexo de pre-iniciação e alguns componentes do complexo PI3CK3 participam especificamente da autofagia (vermelho) Adaptado de GALLUZZI; GREEN, **Cell**, 2019.



Figura 2. Fagocitose associado a LC3 de células apoptóticas. Após a ativação dos receptores para células mortas como conseguência do reconhecimento da fosfatidilserina (PS) nas células apoptóticas, e geração do fagossomo, (1) se inicia o recrutamento e formação do complexo PI3K de classe III (Rubicon - UVRAG -Beclin1 – VPS15 – VPS34) que por meio da atividade kinase da VPS34 fosforila os fosfoinosítideos na posição 3 para produzir fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) na face citosólica da membrana do fagossomo. (2) A formação de PI3P serve como plataforma de sinalização molecular e junto a Rubicon permitem recrutar e estabilizar proteínas do complexo NOX2 para promover a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no interior do fagossomo. (3) A plataforma de PI3P e ROS são necessários para o recrutamento dos componentes dos sistemas de conjugação de LC3. Desse modo a atividade do complexo ATG16L1 (ATG5-ATG12-ATG16L1) junto a ATG4, ATG7 e ATG3, lipidam LC3-II nos resíduos de fosfotidiletanolamina (PE) na membrana do fagossomo. (4) A conjugação de LC3-II contribui na maturação dos LAPossomos, permitindo a sua capacidade de interagir com LAMP1 para se fusionar com os lisossomos, garantindo dessa forma a (5) formação do fagolisossomo e conseguintemente a degradação do carga. Adaptado de BOADA-ROMERO et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2020; HECKMANN et al., J Mol Biol, 2017. Imagem elaborada no BioRender.com.

2.2.2 LAP de células apoptóticas

LAP modula a resposta imune dos macrófagos de acordo com a carga fagocitadas (BOADA-ROMERO et al., 2020). Durante a eferocitose, LAP é requerido para uma eficiente degradação das células mortas (RAYMOND et al., 2022). A indução de LAP em resposta a células apoptóticas promove respostas antiinflamatórias em macrófagos. Nesse sentido, ativação de LAP nos macrófagos associados ao tumor (TAMs), em resposta ao reconhecimento de células apoptóticas tumorais, promove o estabelecimento da imunotolerância no microambiente tumoral suprimindo assim a função de linfócitos T e contribuindo na progressão do câncer. Por outro lado, deficiência em componentes de LAP, como RUBCN, promovem respostas inflamatórias em células mielóides que promovem a eliminação de células tumorais (CUNHA et al., 2018). Além disso, deficiências de LAP estão associados ao desenvolvimento de nefrite crônica espontânea em camundongos envelhecidos (TONNUS et al., 2022).

2.3 Eferocitose e síndromes autoimunes

Desordens como a autoinflamação e autoimunidade caracterizam os extremos de um espectro de síndromes que envolvem a disfunção da resposta imune inata e adaptativa respectivamente (SZEKANECZ et al., 2021). Nesse cenário, doenças autoinflamatórias manifestam inflamação crônica sem alterar a tolerância imune, nem produzir autoanticorpos específicos. Em contraste, doenças autoimunes exibem perda da tolerância imune, reconhecem autoantígenos levando a ativação de células T e B, produção de autoanticorpos e em consequência, dano tecidual local e/ou sistêmico (SZEKANECZ et al., 2021). No entanto, a influência da imunidade induz manifestações mistas, carregando ambas condições que podem coexistir durante o desenvolvimento das diversas patologias (HEDRICH; TSOKOS, 2013). Alterações na eliminação de células mortas parece ser um fator desencadeante para diversas patologias com fundo inflamatório: aterosclerose, diabetes, neurodegeneração, desordens hepáticos, gastrointestinais, pulmonares e autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (BOADA-ROMERO et al., 2020).

A falta de indução e/ou o excesso sustentado de morte celular (O' REILLY et al., 2009; PATANKAR; BECKER, 2020), levam ao acúmulo de DAMPs, que contribuem na inflamação local, enquanto citocinas liberadas das células mortas estimulam a reposta imune (VÉNÉREAU; CERIOTTI; BIANCHI, 2015; ZINDEL; KUBES, 2020). Diante isso, defeitos nas diferentes etapas da eferocitose, tais como o reconhecimento (LU; LEMKE, 2001; COHEN et al., 2002; RODRIGUEZ-MANZANET et al., 2010), ou degradação dos corpos apoptóticos (RAYMOND et al., 2022, AHN et al., 2012), induzem inflamação crônica e eventualmente doenças autoimunes (TONNUS et al., 2022). Diversas evidencias demonstram que, animais com deficiências para os receptores eferocíticos: TIM4, TYRO3, AXL ou MERTK apresentam características comuns de fenótipo autoimune como: hiperativação de células T e B, produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais (LU; LEMKE, 2001; COHEN et al., 2002; RODRIGUEZ-MANZANET et al., 2010). Além disso, a eferocitose é um processo chave na fase da resolução da inflamação (FULLERTON; GILROY, 2016). Nessa linha, a inflamação crônica parece estar associada à desregulação dos mecanismos resolutivos na tentativa de controlar
a resposta aguda inicial, as quais sustentam uma resposta imune e de reparo mal adaptadas (FULLERTON; GILROY, 2016; ZUK; BONVENTRE, 2016).

A indução dessas respostas autoimunes em camundongos deficientes em eferocitose são patologias que remetem ao lupus eritematoso sistêmico (SLE, do inglês *systemic lupus erythematosus*), uma doença autoimune heterogênea (de manifestações cutâneas, renais, artrites, neurológicas e gastrointestinais), e multifatorial (genéticos, imunológicos, hormonais, ambientais). SLE, é caracterizada pela desregulação imune, perda da autotolerância, formação autoanticorpos e deposição de imunocomplexos que desencadeiam inflamação e danos nos diferentes tecidos do corpo (KAUL et al., 2016).

A ineficiente eliminação de células apoptóticas e acumulação de debris celular (DNA, RNA, NETs, proteínas associadas), induzem inflamação, atuando como potentes indutores da imunidade inata, e adaptativa (CHEN; NUÑEZ, 2010; PALUDAN; REINERT; HORNUNG, 2019). O reconhecimento de DNA pelos receptores endossômicos e citoplasmáticos induz a produção e sinalização de respostas dependentes de IFN do tipo I nas células imunes (assinatura IFN), principalmente nas células dendríticas plasmacitoides (pDCs) (SONI et al., 2020). A sinalização de IFN potência as funções das células dendríticas mieloides (mDCs), estimulando a apresentação dos autoantígenos aos linfócitos T, além de produzir BAFF para ativar os linfócitos B. Linfócitos T ativados produzem citocinas: BLyS e IL-21 para potenciar a produção e troca de classe dos autoanticorpos além de amplificar a resposta imune. Esses autoanticorpos reconhecem proteínas nucleares (ANA), ácidos nucleicos (anti-dsDNA) e outras estruturas celulares, estimulando a formação de imunocomplexos, que junto a produção sustentada de IFN do tipo I, contribuem na progressão da doença (KAUL et al., 2016; PISETSKY, 2016; BOSSUYT et al., 2020). A deposição tecidual desses imunocomplexos sustenta a ativação da imunidade inata local e recrutada (células mieloides), como observado nos glomérulos renais, perpetuando o dano para estabelecer a nefrite lúpica (BERGTOLD et al., 2006; KURIAKOSE et al., 2019).

2.4 Polarização de macrófagos

A natureza heterogênea, alta plasticidade e amplo espectro de polarização permitem ao macrófago ter um papel significativo na resposta inflamatória assim como na modulação de respostas subsequentes: resolução e tolerância (XUE et al., 2014; FULLERTON; GILROY, 2016; LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020). O processo de polarização aborda, como sob determinada localização e período específicos o macrófago é ativado, mostrando sua capacidade plástica para integrar diversos sinais diante um contexto particular (MURRAY, 2017). Os extremos desse espectro de polarização se encontram no perfil pró-inflamatório (capacidade de eliminar patógenos, também conhecido como M1) e anti-inflamatório (capacidade de resolução e reparo tecidual, também conhecido como M2) (MURRAY et al., 2014; WYNN; VANNELLA, 2016). A presença da citocina IFN γ (resposta do tipo Th1), assim como a ativação de receptores como TLR, IL-1R, TNFR1 promovem a polarização inflamatória. Isto leva a expressão de genes envolvidos na promoção da quimiotaxia (Ccl1, Cxcl2, Ccl5; Ccl3, Cxcl10, Cxcl11, Ccl25, Cx3cr1 e Ccr7), inflamação (II1a, II1b, 116, 1112, Tnfa) e atividade antimicrobiana (Nos2) (MURRAY, 2017). Na presença de citocinas como IL-4 ou IL-13 (citocinas pleiotrópicas do tipo Th2), que sinalizam pela dimerização da cadeia alfa do receptor de IL-4 (IL-4Ra), os macrófagos desenvolvem um perfil mais anti-inflamatório. Esse perfil anti-inflamatório está associado a expressão de genes da resposta de reparo tecidual, como Arginase-1 (Arg1), Resistinlike a (Retnla), Receptor de manose (Mrc1, CD206), Chitinase 3-like 3 (Chi3l3), Programmed cell death 1 ligand 2 (Pdcd1lg2) e Macrophage galactose N-acetylgalactosamine specific lectin 2 (Mgl2) (WYNN; VANNELLA, 2016, MURRAY, 2017) (Figura 3). Pela sua plasticidade, múltiplos estímulos do microambiente podem promover diversas respostas nos macrófagos, proporcionando uma ampla variação no seu fenótipo (CUDA; POPE; PERLMAN, 2016). Nesse sentido, as populações de macrófagos podem compartilhar e manifestar características entre o perfil M1 e M2, permitindo-lhes atuar em diferentes processos (metabolismo, adaptação ao frio, desenvolvimento), além da defesa contra patógenos ou eliminação de debris celular (OKABE; MEDZHITOV, 2016).

A eferocitose pode induzir um perfil de imunotolerância, prevenindo a inflamação para estimular a resolução. Por exemplo, a ativação do TIM1 bloqueia

fatores associados com as respostas inflamatórias, suprimindo a produção de TNF, IL6 e CCL5 em células epiteliais do rim (YANG et al., 2015). Já os receptores da família TAM (AXL e MERTK principalmente) inibem a cascata de sinalização induzida pelos TLR (do inglês, *Toll-like receptors*) em células dendríticas (ROTHLIN et al., 2007). Por outro lado, a ativação de Stabilin 2 promove a síntese de mediadores da imunossupressão (PARK et al., 2008). A ativação dos receptores nucleares de esteróis, tais como PPARō, PPARY ou LXR, estimulam a produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF β , nos macrófagos em resposta à eferocitose (A-GONZALEZ et al., 2009; MUKUNDAN et al., 2009).



Figura 3. Polarização de macrófagos. Esquema dos fenótipos extremos próinflamatório e anti-inflamatório dentro do espectro de polarização de macrófagos. Arg1: Arginase 1, iNOS: oxido nítrico (NO) sintase induzível. Adaptado de MURRAY et al., *Immunity,* 2014; LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, *Annu Rev Pathol*, 2020. Imagem elaborada no BioRender.com.

2.5 Ativação de STING e resposta dependente de IFN do tipo I

A atividade de diversos sensores endossômicos e intracelulares de ácidos nucleicos (DNA e RNA), como parte da imunidade inata, regula um rol essencial na detecção de patógenos intracelulares, assim como na patogênese de diversas doenças inflamatórias (MCWHIRTER; JEFFERIES, 2020; OKUDE; ORI; KAWAI, 2020). Três principais receptores encontrados nas células de mamífero foram descritos, os quais desencadeiam eventos de sinalização induzidos por DNA citosólico: *Toll-like receptor 9* (TLR9), *absent in melanoma 2* (AIM2) e *cyclic GMP–AMP synthase* (cGAS) (MOTWANI; PESIRIDIS; FITZGERALD, 2019). Dentre desses sensores, a via de sinalização cGAS – cGAMP – STING tem emergido como um mecanismo importante na detecção de DNA intracelular (ISHIKAWA; BARBER, 2008; LI et al., 2013). STING, uma proteína transmembrana do retículo endoplasmático, apresenta principalmente como função canônica a produção de IFN do tipo I, demonstrando um rol considerável em processos como inflamação estéril, autoimunidade, senescência e cancer (LI; CHEN, 2018; HOPFNER; HORNUNG, 2020).

O produto de cGAS (cGAMP) induz a ativação de STING; o qual recruta as kinases TBK1 e I κ B kinase (IKK) para fosforilar o fator de transcrição IRF3 e o inibidor de NF κ B (I κ B α), os quais ativam a transcrição de genes que codificam IFN do tipo I (IFN β) e outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF α), respectivamente (MOTWANI; PESIRIDIS; FITZGERALD, 2019) **(Figura 4).**

A produção e sinalização de IFN do tipo I ativa programas transcricionais para expressar genes estimulados pelo IFN (ISGs), apresentando um rango amplo de funções. ISGs são requeridos frequentemente para o controle direto da infecção por patógenos, reforçar a resposta de IFN, além de mediar a fina regulação negativa da sinalização de IFN para restabelecer a homeostase celular (SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014). Por conseguinte, a exacerbada capacidade de induzir e sustentar a ativação de STING, pode aumentar o risco no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, autoimunes e metabólicas (DECOUT et al., 2021; LI et al., 2022; VILA et al., 2022). Deficiências em LAP induzem a ativação de STING e produção de IFN do tipo I em resposta à fagocitose de células apoptóticas nos macrófagos murinos. Como consequência, animais com defeitos para LAP no compartimento mielóide reduzem a imunossupressão no microambiente tumoral, promovendo a ativação de linfócitos T e eliminação de tumores de diferentes imunogenicidades, de forma dependente de STING e da sinalização de IFN do tipo I (CUNHA et al., 2018). Além da ativação de STING, defeitos em LAP de células apoptóticas induz a expressão de programas pró-inflamatórios (*IL-1\beta e II6*) e aumento de marcadores associados a um perfil anti-inflamatório M2 (como CD206) são regulados negativamente em macrófagos deficientes em RUBCN (CUNHA, et al., 2018).



Figura 4. Ativação canônica de STING. (1) Material genético (DNA principalmente) de diferentes de fontes: exógenas ou endógenas pode ser liberado no meio citoplasmático e reconhecido pelo sensor citoplasmático do DNA de dupla fita, cGAS, iniciando a produção de (2) cGAMP (do inglês, *Cyclic dinucleotide 2',3'-cyclic GMP-AMP*) um tipo de dinucleotídeo com capacidade de ativar (3) STING. (4) STING ativado adquire a capacidade de se deslocar em direção ao complexo ERGIC (do inglês, *ER-Golgi intermediate compartment*), um compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático e Golgi. Em ERGIC, STING pode recrutar TBK1 (TANK-42

binding kinase 1) a qual se autofosforila e pode fosforilar STING na sua vez. TBK1 sob a forma fosforilada induz a ativação de outras proteínas; enquanto fosforila o fator de transcrição IRF3 (Interferon regulatory factor 3) que após dimerizar se transloca para o núcleo (5) onde pode acionar programas de transcrição de IFN do tipo I, também ativa o fator NFkB para induzir a transcrição de um programa pró-inflamatório principalmente. (6) Finalmente STING pode induzir autofagia em resposta ao estímulo de cGAMP e continuar trafegando até os lisossomos onde é degradado. Adaptado de DECOUT et al., *Nat Rev Immunol,* 2021; PALUDAN; REINERT; HORNUNG, *Nat Rev Immunol,* 2019; GUI et al., *Nature,* 2019. Imagem elaborada no BioRender.com.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Explorar um possível papel de STING na perda da função anti-inflamatória em macrófagos com deficiências em LAP durante a eferocitose e no contexto de desenvolvimento espontâneo de manifestações autoimunes em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Caracterizar o desenvolvimento de uma síndrome autoimune em camundongos envelhecidos deficientes em LAP.

Meta 1: Investigar a produção de anticorpos antinucleares (ANA) e anti-dsDNA em animais com deficiências para RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) e ATG5 (*Atg5^{t/f} LysM-Cre*⁺) em comparação a seus controles.

Meta 2: Avaliar a deposição de imunocomplexos IgG e hipercelularidade glomerular nos rins de animais com deficiências em RUBCN (*Rubcn^{-/-}*)

3.2.2. Investigar se o desenvolvimento de autoimunidade em camundongos envelhecidos com deficiências para LAP é dependente de STING.

Meta 1: Medir a produção de autoanticorpos: ANA e anti-dsDNA em animais *Rubcn^{-/-} e Sting1^{-/-}* ou *Atg5^{t/t} LysM-Cre*⁺ *e Sting1^{-/-}* em comparação a seus controles.

Meta 2: Avaliar a deposição de imunocomplexos IgG e hipercelularidade glomerular nos rins de animais deficientes em RUBCN e STING (*Rubcn^{-/-} e Sting1^{-/-}*)

3.2.3. Determinar a contribuição de STING na perda do perfil anti-inflamatório nos macrófagos deficientes em LAP durante a eferocitose.

Meta 1: Confirmar o perfil de ativação de macrófagos deficientes em RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) e ATG5 (*Atg5^{f/f} LysM-Cre*⁺) estimulados com células apoptóticas.

Meta 2: Investigar o papel de STING na redução dos níveis de expressão dos genes assinatura e sinalização da função anti-inflamatória nos macrófagos deficientes em RUBCN e STING (*Rubcn^{-/-} e Sting1^{-/-}*) e ATG5 e STING (*Atg5^{t/f} LysM-Cre*⁺ e *Sting1^{-/-}*)

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Utilizamos camundongos selvagens das linhagens *Rubcn^{+/+}* e *Atg5^{f/f} LysM Cre⁻*, camundongos geneticamente deficientes para RUBCN (*Rubcn^{-/-}*), Atg5 (*Atg5f/f LysM Cre⁺*), e deficientes simultaneamente tanto para RUBCN e STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*) quanto para ATG5 e STING (*Atg5^{f/f} LysM-Cre⁻ Sting1^{-/-}*) fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade. Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, em um ciclo de 12 horas claro / escuro, ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração *ad libitum*. Conduzimos os experimentos de acordo com o Comitê de Ética em pesquisa animal (CETEA) **N° protocolo 001/2021-1** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP.

4.2 Diferenciação de macrófagos a partir de células da medula óssea

Macrófagos derivados a partir de células precursoras da medula óssea (BMDM, *do inglês Bone-marrow-derived macrophages*) foram utilizados como modelo para os experimentos in vitro. Obtivemos BMDMs dos fêmures e tíbias de camundongos que logo cultivamos em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina), 1% de L-glutamina (200 mM) e M-CSF (concentração final 20 ng/mL). Os camundongos foram sacrificados e seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos, seccionados em ambiente estéril e lavados com PBS utilizando uma seringa de 10 mL com agulha hipodérmica 23G x 1 ½ (0.6 x 40 mm) Becton-Dickinson. As células recém-colhidas foram distribuídas em um volume de 10 mL de meio por cada placa não tratada utilizada (100 x 20 mm), sendo incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Um total de 10 mL de meio suplementado contendo M-CSF foi adicionado após três dias de cultura. No sétimo dia de cultura as células foram utilizadas nos experimentos in vitro.

4.3 Indução de apoptose em células Jurkat T

Mantivemos células Jurkat T em meio RPMI1640 1x suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina (200 mM), 1% de piruvato de sódio, 1% de penicilina/estreptomicina,1% de aminoácidos não essenciais e 0.1% de 2- β -mercaptoetanol. Para a indução de apoptose, trocamos o meio para adicionar meio novo na quantidade necessária para obter 2 x 10⁶/mL e colocamos 10 mL da suspensão celular na placa de 100 x 20 mm, em seguida removemos a tampa previamente antes de colocar a placa no equipamento UV Crosslinker Fisher Scientific, e irradiamos com luz UV a 20mJ/cm², depois disso as células foram mantidas durante 6 horas na estufa a 37°C com 5% de CO2.

4.4 Co-cultura de Macrófagos e Células Apoptóticas

Depois do tempo de diferenciação para obter BMDMs, descartamos o meio e lavamos a placa com PBS (Gibco), ato contínuo mantendo a placa com PBS, removemos as células e coletamos a suspensão. As células foram centrifugadas para trocar o PBS e ressuspendidas em DMEM suplementado, após disso semeadas em placas de cultura tratadas de 24 poços na confluência de 1 x 10⁶/poço por 24 horas. Posteriormente, o meio foi removido para seguidamente adicionar as células Jurkat T apoptóticas (AJ) que foram previamente ressuspendidas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino na quantidade necessária para atingir a proporção celular de estímulo (BMDM:AJ de 1:1 até 1:5). As placas foram centrifugadas para garantir a interação das células apoptóticas com os macrófagos e incubadas pelo tempo planejado de avaliação (6, 12 e 20 horas) a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período descartamos o sobrenadante e lavamos as placas três vezes com PBS para remover o máximo possível de células apoptóticas que não foram fagocitadas.

4.5 Extração de RNA.

Adicionamos 350 uL de TRIzol LS (Gibco) em cada poço contendo 1 x 10⁶ células para coletar o homogenato em tubos eppendorf e imediatamente mantivemos

em gelo para iniciar com a extração. O RNA foi extraído empregando colunas de sílica com o kit Direct-zol RNA Miniprep R2052 (Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi eluido em 25 uL de H₂O DNase, RNase free e quantificado através do NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific).

4.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizado empregando oligo-dT 100uM, dNTPs 10uM, o kit First-strand synthesis transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), na presença de inibidor da RNase (RNase OUT Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O protocolo da PCR usado foi 10 min – 25°C, 50 min – 37°C, 15 min – 70°C. Após a síntese o cDNA foi diluído 5 vezes em água ultrapura do tipo Milli-Q.

4.7 qPCR

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no termociclador QuantStudio3 Real-Time (Applied Biosystems), a análise de expressão gênica foi avaliada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Kenneth J. Livak). As condições da PCR foram: Hold estágio de 50°C – 2 min., 95°C – 2 min. e 40 ciclos de 95°C – 1 seg. e 60°C – 30 segs. A expressão de mRNA foi normalizada contra a expressão dos genes Beta 2 microglobulina (*B2m*) e Calreticulina (*Calr*). Os oligonucleotídeos empregados estão listados na **Tabela 2**.

4.8 Quantificação de IL-10

A produção de IL-10 foi quantificada nos sobrenadantes das co-culturas de células Jurkat apoptóticas e BMDMs por ensaio imunoenzimático ELISA utilizando o kit Opteia[™] (BD Biosciences Pharmingen) Cat. No. 555252, seguindo-se as instruções do fabricante.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos para o estudo da expressão de genes murino.

Gene	Nome	Primer	Sequência 5' → 3'	Referência
B2m	Beta-2 microglobulin	Forward	TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA	PMID: 30245008
		Reverse	CAGTATGTTCGGCTTCCCATTC	
Calr	Calreticulin	Forward	GTTTGGTCCGGACATCTGC	HRT Atlas UNICAMP
		Reverse	CCGGATATCCTTGTTGATCAGC	
Mrc1 (CD206)	Mannose receptor, C type 1	Forward	AAGGCTATCCTGGTGGAAGAA	PMID: 25043024
		Reverse	AGGGAAGGGTCAGTCTGTGTT	
ll-4ra	Interleukin 4 receptor alpha	Forward	TCTGCATCCCGTTGTTTTGC	PrimerBank ID 26329959a1
		Reverse	GCACCTGTGCATCCTGAATG	
Arg1	Arginase 1	Forward	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	PMID: 28714978
		Reverse	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	
Col1a1	Collagen type I alpha 1 chain	Forward	TCTGGTCTCCAGGGTCCTC	PMID: 28495878
		Reverse	GTCTTTGCCAGGAGAACCAG	
Mgl2	Macrophage galactose N- acetyl-galactosamine specific lectin2	Forward	TTCAAGAATTGGAGGCCACT	PMID: 25043024
		Reverse	CAGACATCGTCATTCCAACG	
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	Forward	GAGCCCGAAGCGGACTACTA	PMID: 33472955
		Reverse	TGGTTTTCTCATAGATGGCGTTG	
lfit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Forward	GCCTATCGCCAAGATTTAGATGA	PMID: 32123171
		Reverse	TTCTGGATTTAACCGGACAGCC	
Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Forward	TGAAAGCGTTTAGCCAAAAAAGG	PMID: 24523323
		Reverse	AGGGGAGTGATGGAGAGAGG	
Gbp7	Guanylate binding protein 7 (Gbp7)	Forward	TTGAGGAAATGCCAGAGGACCAGT	PMID: 22795875
		Reverse	GTCTCCACTATTGATAGCATCCACG	

4.9 Estudos em animais envelhecidos

Camundongos machos selvagens (*Rubcn^{+/+}* ou *Atg5^{t/f} Cre⁻*), deficientes para os componentes da maquinaria de LAP: RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) ou ATG5 (*Atg5^{t/f} Cre⁺*) e com defeitos simultâneos para RUBCN e STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*), ou ATG5 e STING (*Atg5^{t/f} Cre⁺ Sting1^{-/-}*) envelhecidos até +/- 52 semanas, assim como o seus controles jovens com 8 a 10 semanas de idade, foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, em um ciclo de 12 horas claro / escuro, ambiente com

temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração *ad libitum*. Os animais foram pesados e o sangue total coletado por punção cardíaca no final do experimento. Soro, baço e rim foram coletados para as avaliações subsequentes.



Figura 5. Estratégia de estudos finais para a avaliação de síndrome autoimune em camundongos. O modelo de síndrome autoimune espontâneo em animais com deficiências nos componentes de LAP é desenvolvido durante semanas. A caracterização da doença poderia estar afetada pela variabilidade da síndrome, a penetrância incompleta, além de mudanças do microbioma e no microambiente da gaiola (LEE; CELHAR; FAIRHURST, 2021). Nesse sentido, precisa-se de estudos em novos grupos de animais com o intuito de obter reprodutibilidade de nossos dados. Animais envelhecidos e seus controles novos, foram sacrificados para coleta do sangue, rim e baço. Gráfico elaborado com BioRender.com.

4.10 Detecção de anticorpos anti-dsDNA

Os anticorpos séricos anti-dsDNA IgG foram mensurados por ELISA. DNA tímico de bezerro (Sigma, D4522-1MG) foi revestido em uma placa de 96 poços a 0,5 μ g/mL em PBS1x pH 7,4 durante a noite a 4°C. As placas foram bloqueadas por 1h a

37°C com 4% BSA – PBS1x pH 7.4, depois lavadas com PBS1x 0,05% Tween-20. Amostras de soro dos animais foram diluídas (1:40) e adicionadas às placas em duplicata e incubadas a 37°C por 2h. As placas foram lavadas e posteriormente incubadas por 1 hora a 37°Ccom o anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG(H+L) conjugado a HRP - anticorpos dirigidos contra IgG total, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM de camundongo (Southern Biotech N° Cat. 1036-05). As placas foram lavadas por última vez, adicionamos solução TMB como substrato durante 5 min a temperatura ambiente e paramos a reação com H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram medidas a 405 nm no espectrofotômetro SpectraMax i3 (Molecular Devices) (LIU et al., 2018).

4.11 Determinação de anticorpos antinucleares (ANA)

Os anticorpos antinucleares foram detectados por imunofluorescência indireta. Lâminas revestidas com células Hep-2 (Imuno-COM WAMA Ref: 12100) foram incubadas com amostras de soro diluídas em PBS1x (1:50) por 30 min. As lâminas foram lavadas e seguidamente incubadas com o anticorpo anti-IgG murino diluído em BSA1%-PBS1x pH 7.4 (1:750) (Alexa Fluor 488 Ref: A21202) durante 30 min. Duas imagens de cada amostra foram capturadas usando o microscópio de fluorescência ECLIPSE Ti2 Series com DS-Qi2 câmera (*Nikon Instruments Inc.*) com objetiva 20X, 700 milisegundos de exposição e analisadas com o software ImageJ. A intensidade de fluorescência e o padrão de marcação (Nuclear ou citoplasmático) foram identificados por dois observadores de forma duplo-cego. (BOES et al., 2000; MAYER et al., 2020). Avaliação de imagens (GENTILETTI et al., 2005; ICAP *International Consensus on ANA Patterns*, online desde 19 mai. 2015. Disponível em <u>https://www.anapatterns.org</u>. Acesso em: 25 fev. 2022).



Figura 6. Padrões de imunofluorescência utilizados para detectar anticorpos antinucleares (ANA) pela marcação em células Hep2. Soro dos animais selvagens (*Rubcn*^{+/+} ou *Atg5*^{t/f} *Cre*⁻), com deficiências para LAP (*Rubcn*^{-/-} ou *Atg5*^{t/f} *Cre*⁺) e deficiências simultâneas para LAP e STING (*Rubcn*^{-/-} *Sting1*^{-/-} ou *Atg5*^{t/f} *Cre*⁺) foram incubados com células Hep-2 e avaliados por imunofluorescência. Diversos padrões nucleares e citoplasmáticos foram observados nas diferentes amostras. Padrão nuclear: (A) homogêneo, (B) perinuclear ou anel, (C) nucleolar; padrão citoplasmático: (D) homogêneo ou pontilhado fino, (E) pontilhado, (F) filamentar. Barra escala: 20µm.

4.12 Marcação de imunocomplexos IgG no rim

O rim direito (quatro camundongos por cada genótipo) foi coletado e fixado em uma solução de paraformaldeído 4% pH 7.4 durante 24h, depois processados em etanol e xilol, incluídos em parafina, seccionados com espessura de 6 µm. Realizamos a desparafinização e reidratação dos tecidos e usamos o tampão citrato de sódio (10mM citrato de sódio, 0.05% Tween-20, pH 6.0) para a recuperação antigênica induzida por calor e bloqueamos a peroxidase endógena com a solução 3% H₂O₂ em

metanol absoluto durante 30 min. Para bloquear o tecido, adicionamos a solução BSA2% - PBS1x por 45 min e depois dos lavados, incubamos com o anticorpo biotinilado anti-IgG murino diluído (1:400) em BSA1% - PBS1x (BA-9200-1.5 Vector Laboratories) por 1h. A solução VECTASTAIN Elite ABC-HRP reagent, peroxidase (PK-7100 Vector Laboratories) foi colocada por 30 min em cada tecido e após dos lavados, incubamos com a solução reveladora de diaminobenzidina (DAB) Sigma FAST (D4293). As lâminas foram coradas com hematoxilina e montadas. As imagens dos tecidos foram adquiridas com o microscópio Scanscope Olympus BX61VS com o objetivo de 40x. O software OlyVIA e ImageJ (Tool box IHC) foram empregados para a observação e análise das imagens. Uma avaliação randômica de 80 glomérulos por cada genótipo foi realizada para estimar os níveis de deposição de imunocomplexos IgG.

4.13 Determinação da área glomerular

A partir do rim direito (quatro camundongos por cada genótipo) fixado em uma solução de paraformaldeído 4% pH 7.4 por 24 horas, desidratado em etanol, xilol e embebido em parafina, foram seccionados os tecidos com uma espessura de 6 µm. Realizamos uma coloração com hematoxilina-eosina para facilitar a observação e reconhecimento de estruturas teciduais. Adquirimos as imagens dos tecidos com o microscópio Scanscope Olympus BX61VS sob 40X de aumento. O software OlyVIA e ImageJ foram empregados para a observação e análise das imagens. Uma avaliação randômica de 80 glomérulos por cada genótipo foi realizada para estimar a média da área glomerular.

4.14 Contagem e classificação diferencial de leucócitos

Adicionamos 50 uL de sangue total recém coletados para os tubos K₂EDTA (Becton Dickinson), as amostras anticoaguladas foram diluídas 1:25 em solução lisante (Turk) e mantidas a temperatura ambiente por 5 min. Realizamos uma contagem celular convencional na câmara de Neubauer. Utilizando 4 uL de sangue total, preparamos os esfregaços sanguíneos; as lâminas foram fixadas com metanol

absoluto (100°) por 3 min e seguidamente cobertas com corante Giemsa 10% durante 20 min. Avaliamos 200 células por esfregaço as quais foram classificadas como linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

4.15 Análise Estatística

Utilizamos o programa GraphPad Prism, version 8, fabricado por GraphPad Software Inc. (USA), nas análises dos dados. A análise estatística foi realizada pelo teste T Student não-pareado bilateral ou ANOVA uma via (para n > 2). Diferenças da hipótese nula foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0.05 (*)

Resultados

5 **RESULTADOS**

5.1 Camundongos envelhecidos deficientes em RUBCN ou ATG5 produzem autoanticorpos independente de STING.

O desequilíbrio entre a indução de morte e/ou eliminação de células mortas pode favorecer a disponibilidade de autoantígenos os quais tem capacidade para desencadear a resposta imune (ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020). Ademais, processos celulares como apoptose aberrante e outras formas de morte celular: necroptose, piroptose, NETose, contribuem na exposição de DAMPs, propagando e conduzindo a persistência da inflamação (ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020). Nesse contexto, a incapacidade de exposição de fosfatidilserina das células apoptóticas (KAWANO; NAGATA, 2018a), alterações nos diversos receptores eferocíticos (LU; LEMKE, 2001; COHEN et al., 2002; RODRIGUEZ-MANZANET et al., 2010), assim como na degradação das células mortas pelos fagócitos (RAYMOND et al., 2022), induzem o desenvolvimento de uma síndrome autoimune em modelos murinos. Especificamente, animais deficientes em MERTK, AXL e DNase II, desenvolvem espontaneamente autoanticorpos ao longo do processo de envelhecimento (WATERBORG et al., 2018; AHN et al., 2012).

Baseado nas observações dos estudos in vivo apontadas acima, inicialmente decidimos explorar as consequências das deficiências de LAP, e se, deficiências em componentes da via, especificamente em RUBCN ou ATG5, estão associados ao desenvolvimento espontâneo de autoimunidade (Figura 5). No caso de RUBCN, utilizamos animais com ablação genética global pelo sistema CRISPR/Cas9 (*Rubcn^{-/-}*). Para ATG5, utilizamos animais deficientes no compartimento celular mieloide, pelo sistema de recombinação Cre-LoxP para ATG5 (*Atg5^{i/f} LysM-Cre*⁺, denominado *Cre*⁺ daqui em diante). A partir do soro desses animais envelhecidos até cerca de 56 semanas avaliamos a produção de autoanticorpos.

Análise por detecção de anticorpos antinucleares (ANA) no soro por imunofluorescência indireta revelou que animais idosos *Rubcn^{-/-}* e *Atg5^{f/f} Cre*⁺ exibiram um aumento na produção de anticorpos antinucleares (ANA) em comparação com animais selvagens *Rubcn^{+/+}* e *Atg5^{f/f} Cre*⁻ (Figura 7A e 7B). Além disso, a detecção

de anticorpos contra o DNA (anti-dsDNA) por ELISA revelou que camundongos deficientes para RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) possuíram uma tendência ao aumento dos níveis de anticorpos contra o DNA em comparação a indivíduos controle. Já os camundongos com deficiências para ATG5 (*Atg5^{f/f} Cre*⁺) tiveram um aumento significativo de anti-dsDNA no soro em comparação com camundongos *Atg5^{f/f} Cre*⁻ (Figura 7C e 7D).

Adicionalmente, analisamos se o aumento na produção de autoanticorpos em animais $Rubcn^{-/-}$ e $Atg5^{t/f}$ Cre^+ em camundongos envelhecidos é dependente de STING. Para isso, utilizamos camundongos envelhecidos e duplamente deficientes para ambas vias: LAP e STING ($Rubcn^{-/-}$ $Sting1^{-/-}$ e $Atg5^{t/f}$ Cre^+ $Sting1^{-/-}$), e seus respectivos controles selvagens ($Rubcn^{+/+}$ e $Atg5^{t/f}$ Cre^-). Observamos que animais com deficiência de STING em camundongos $Rubcn^{-/-}$ ($Rubcn^{-/-}$ $Sting1^{-/-}$), apresentaram porcentagem de ANA semelhante aos grupos de camundongos com defeitos para LAP apenas (**Figura 8A**). Contudo, o grupo de camundongos idosos com deficiência dupla em RUBCN e STING ($Rubcn^{-/-}$ $Sting1^{-/-}$), apresentou níveis de anti-dsDNA semelhante aos camundongos selvagens ($Rubcn^{+/+}$) (**Figura 8C**), enquanto os camundongos envelhecidos com defeitos para ATG5 e STING ($Atg5^{t/f}$ Cre^+ $Sting1^{-/-}$), exibiram um perfil de produção de anti-dsDNA parecido com os camundongos idosos com defeitos para ATG5 ($Atg5^{t/f}$ Cre^+) apenas (**Figura 8D**).

Esses resultados demonstram que animais deficientes em componentes da via de LAP (RUBCN e ATG5) produzem autoanticorpos no processo de envelhecimento, e essa produção não é consistentemente dependente de STING.



Figura 7. Camundongos envelhecidos deficientes em RUBCN ou ATG5 produzem autoanticorpos independente de STING. (A - D) detecção de autoanticorpos: ANA e anti-dsDNA em amostras de soro de (A e C) camundongos Rubcn^{+/+}, Rubcn^{-/-} e Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-} envelhecidos até +/-52 semanas, e (**B e D**) camundongos Atg5^{t/f} Cre⁻, Atg5^{t/f} Cre⁺, Atg5^{t/f} Cre⁺ Sting1^{-/-} envelhecidos até +/- 56 semanas e seus respectivos controles: camundongos jovens de +/- 9 semanas, mantidos no biotério da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, USP. (A e B) Os gráficos de barras representam a porcentagem da distribuição dos padrões de anticorpos antinucleares (ANA) detectados por imunofluorescência nos animais com defeitos em RUBCN, além de RUBCN e STING (A), sendo nuclear (vermelho escuro), citoplasmático (vermelho claro) e não específico / negativo (branco); assim como nos animais com defeitos para ATG5, além de ATG5 e STING (B), sendo nuclear (verde escuro), citoplasmático (verde claro) e não específico / negativo (branco) os padrões encontrados. (C e D) quantificação de imuglobulinas (Ig) totais anti-dsDNA por ELISA. Camundongos de +/- 9 semanas foram empregados como controles jovens para todas as avaliações. Dados representativos de um experimento independente são mostrados e expressados como a média ± SEM (erro padrão da média). O nível de significância foi calculado usando o Teste T de Student, comparando as medias de cada genótipo deficiente em relação ao genótipo competente, considerando-se diferença estatística significativa quando p < 0.05.

5.2 A deficiência de STING reduze a patologia renal nos camundongos envelhecidos deficientes em RUBCN

Complicações associadas a SLE envolvem processos inflamatórios em diferentes tecidos, sendo o rim um dos órgãos frequentemente afetados (KAUL et al., 2016). Nefrite lúpica é uma forma de glomerulonefrite produzido pela deposição de autoanticorpos, imunocomplexos e proteínas do complemento, nos glomérulos (ANDERS et al., 2020), induzindo na sua vez infiltração de células imunes e provocando injuria renal.

Como consequência de nosso achado anterior, pressupomos que a geração de autoanticorpos poderia provocar a formação imunocomplexos (IC) e se depositar nos tecidos, principalmente no rim. A vista disso, decidimos investigar a deposição de IC de IgG nos glomérulos dos camundongos *Rubcn^{-/-}* envelhecidos, e se essa deposição poderia ser dependente de STING. Coletamos os rins de animais com aproximadamente 56 semanas, esses tecidos foram processados e imersos em

parafina para ser seccionados. Após prévia desparafinização os tecidos foram submetidos a imunomarcação para detecção de IgG total por imuno-histoquímica.

Constatamos que camundongos com deficiências em LAP (*Rubcn^{-/-}*) apresentaram significativamente maior deposição de IC de IgG nos glomérulos quando comparados com os animais selvagens (*Rubcn^{+/+}*) (**Figura 8A e 8B**). De forma importante, percebemos que os animais com deficiências para ambas vias (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*), apesar de produzirem autoanticorpos (**Figura 7**), exibiram uma menor deposição de IC de IgG, mostrando quantidades de imunomarcação semelhantes aos camundongos selvagens (*Rubcn^{+/+}*) (**Figura 8A e 8B**).

A deposição de imunocomplexos nos glomérulos facilitaria o desenvolvimento de injuria renal, cujo processo está determinado ao local de deposição das imunoglobulinas, especificidade antigênica, ativação do complemento e resposta inflamatória (WEENING et al., 2004). Para avaliar se a deposição de IC estaria associada à evidência de injúria renal, analisamos padrões de hipercelularidade glomerular; característica de injuria renal previamente exploradas em modelos murinos (BOES et al., 2000; KURIAKOSE et al., 2019). Por conseguinte, aplicamos uma coloração de hematoxilina-eosina (H&E) nos tecidos e posteriormente mensuramos a média do tamanho dos glomérulos para cada grupo de animais.

Percebemos que a média de tamanho dos glomérulos dos camundongos com deficiências para RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) foi significativamente maior comparada com a média dos outros grupos: camundongos competentes (*Rubcn^{+/+}*) (**Figura 8A e 8C**). Similar às análises de deposição de IC de IgG camundongos duplamente deficientes (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*) possuíram, na média, tamanho similar aos de camundongos selvagens (**Figura 9A e 9C**). Nosso achado sugere um aumento de hipercelularidade glomerular associada a deficiência de RUBCN dependente de STING.

Em conjunto esses dados demonstram que defeitos em STING associado a deficiência de RUBCN reduzem a deposição de imunocomplexos e hipercelularidade nos glomérulos, o que poderia contribuir na proteção do desenvolvimento de um possível dano tecidual.



Figura 8. A deficiência de STING reduz sinais de patologia renal nos camundongos envelhecidos com defeitos em RUBCN. (A-C) Marcação por imunohistoquímica para avaliação dos depósitos de imunocomplexos IgG total nos 63 glomérulos, e histologia renal baseada na coloração H&E para mensuração da média do tamanho dos glomérulos dos camundongos $Rubcn^{+/+}$, $Rubcn^{-/-}$ e $Rubcn^{-/-}$ Sting1^{-/-} envelhecidos até +/-52 semanas. Imagens representativas dos glomérulos são mostradas (Barra escala: 20µm). Dados representativos de um experimento independente são mostrados e expressados como a média ± SEM (erro padrão da média). O nível de significância foi calculado usando análise de variância ANOVA de uma via, considerando-se diferença estatística significativa quando p<0.05(*).

5.3 Deficiência em RUBCN está associada a redução de peso nos camundongos envelhecidos.

Diversas doenças ou condições de estresse eventualmente podem induzir mudanças no estado de saúde dos animais (PEIXOTO DA SILVA et al., 2020; WANG et al., 2016). Além disso, avaliações da condição física, comportamento, peso, são indicadores uteis no monitoramento da saúde do animal (ULLMAN-CULLERÉ; FOLTZ, 1999). Nesse sentido, o menor consumo de alimento e água sugeriria complicações na saúde, provocando perda de peso nos animais (REDGATE; DEUTSCH; BOGGS, 1991), parâmetro que usamos na avaliação do desenvolvimento da síndrome autoimune.

Observamos que camundongos envelhecidos RUBCN deficientes (*Rubcn^{-/-}*) exibiram um menor ganho de peso comparado com os camundongos selvagens (*Rubcn^{+/+}*). Essa redução foi atenuada em animais com dupla deficiência em RUBCN e STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*) (Figura 9A). No entanto, camundongos com deficiências para ATG5 no compartimento mieloide (*Atg5^{f/f} Cre⁺*) não exibiram diferença no ganho de peso em comparação com os camundongos selvagens (*Atg5^{f/f} Cre⁻*), o que também não foi alterado nos animais com deficiência dupla de ATG5 e STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*) (Figura 9A). Esses resultados sugerem que um defeito sistêmico na autofagia não-canônica dependente de RUBCN possa alterar a condição física dos camundongos envelhecidos, além das suas funções associadas a LAP no compartimento mieloide.

Apesar da redução de peso nos animais deficientes para RUBCN, não observamos diferença no peso do baço – indicador de lúpus ativo (LEE, et al., 2021; SEAVEY, et al., 2011) – ou no número de leucócitos circulantes, o que também não

foi observado nos animais com deficiências para ATG5, nem com deficiência dupla em ATG5 e STING (Figura 9B-9F). Esses achados sugerem que, apesar de detectarmos autoanticorpos, esses animais não desenvolvem um fenótipo autoimune severo.



Figura 9. Camundongos envelhecidos deficientes para RUBCN apresentaram redução do peso, contudo, não exibiram esplenomegalia ou leucocitose. Camundongos Rubcn+/+, Rubcn-/- e Rubcn-/- Sting1-/- envelhecidos até +/-52 semanas e, Atq5^{t/f} Cre⁻, Atq5^{t/f} Cre⁺, Atq5^{t/f} Cre⁺ Sting1^{-/-} envelhecidos até +/- 56 semanas e seus respectivos controles jovens de +/- 9 semanas, foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, em um ciclo de 12 horas claro / escuro, ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração ad libitum no biotério da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, USP. (A) O peso dos animais e (B) o peso do baço foi obtido por meio de uma balança digital. (C-F) A contagem de leucócitos circulantes e classificação diferencial foram realizados por métodos convencionais: câmara de Neubauer e estudo de esfregaço sanguíneo, respectivamente. Dados representativos de um experimento independente são mostrados e expressados como a média ± SEM (erro padrão da média). O nível de significância foi calculado usando análise de variância ANOVA de uma via, considerando-se diferenca estatística significativa quando p < 0.05(*).

Nossos resultados *in vivo* sugerem que STING (e, por consequência, sinalização de IFN do tipo I mediada por esse sensor), não possui uma contribuição predominante para a produção de autoanticorpos em animais deficientes em RUBCN ou ATG5. Ainda assim, é possível que a ativação de STING associada a defeitos em LAP (CUNHA et al., 2018) possa causar a perda do perfil anti-inflamatório dos macrófagos no processo de eferocitose. Uma vez que o excesso de resposta inflamatória por macrófagos pode contribuir para desencadear inflamação crônica e contribuir para o dano tecidual associado ao desenvolvimento de quadros autoinflamatórios e autoimunes. Por isso, nessa segunda parte da dissertação, investigamos se, em um contexto eferocítico, STING contribui para a perda de função anti-inflamatória em macrófagos deficientes em LAP (especificamente, no componente RUBCN).

5.4 BMDM com deficiências em RUBCN apresentam redução da resposta antiinflamatória no contexto da eferocitose.

Inicialmente, buscamos confirmar, como demonstrado anteriormente (CUNHA et al., 2018), que defeitos nos componentes da via de LAP reduzem a capacidade de sinalização que induz uma resposta anti-inflamatória, além de marcadores assinatura M2 nos macrófagos murinos.

Para isso, obtivemos macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) a partir de camundongos selvagens (*Rubcn^{f/f} LysM-Cre⁻*) e com ablação de RUBCN no compartimento mielóide (*Rubcn^{f/f} LysM-Cre⁺*). Preparamos um ensaio de eferocitose; previamente induzimos apoptose em células Jurkat T por meio da irradiação UV (20 mJ/cm²) e conservação até as 6 horas na cultura (5% CO2, 37°C). Depois disso as células apoptóticas foram co-cultivados com os macrófagos murinos durante períodos específicos (6, 12, e 20h). Finalmente, realizamos uma análise de PCR em tempo real (qPCR) para avaliar os níveis de expressão dos genes de interesse.

CD206 (*Mrc1*), um marcador assinatura M2, opera como receptor de eliminação, interagindo com glicoproteínas sulfatadas e manosiladas geradas em certas condições patológicas, prevenindo a inflamação excessiva, e induzindo imunotolerância (SUZUKI et al., 2018). BMDM selvagens (*Rubcn^{f/f} Cre⁻*) exibiram um aumento na expressão, que foi sustentado até as 20 horas do estímulo. Observamos, como demonstrado anteriormente (CUNHA et al., 2018), que macrófagos com deficiências em RUBCN (*Rubcn^{f/f} Cre⁺*) não aumentaram os níveis de expressão para *Mrc1* a partir das 12 horas (**Figura 10A**)

IL4Rα é um receptor que contribui na sinalização do perfil anti-inflamatório, a sua ativação envolve a fosforilação de STAT6, induzindo a transcrição de genes assinatura M2 (*Mrc1, Arg1, Retnla, Chil3*) (GORDON; MARTINEZ, 2010; BOSURGI et al., 2017). Ademais, a integração da sinalização entre eferocitose e IL-4 amplificam a regulação positiva de genes anti-inflamatórios e de reparo, ligando a remoção de células apoptóticas à resolução da inflamação (BOSURGI et al., 2017). Similarmente ao observado para *Mrc1*, BMDM selvagens (*Rubcn^{f/f} Cre⁻*) apresentaram aumento na transcrição de *Il4ra* a partir das 6 horas, sustentado até as 20 horas. Por outro lado, BMDM deficientes (*Rubcn^{f/f} Cre⁺*) mantiveram os níveis basais de expressão

parecidos aos BMDM não estimulados (Figura 10B). Posto que a sinalização em resposta a ativação de IL4Rα controla a polarização anti-inflamatória de macrófagos, esses resultados confirmam que LAP é requerido para modular a função anti-inflamatória de macrófagos em resposta as células apoptóticas.



Figura 10. BMDM com deficiências em RUBCN apresentam redução da resposta anti-inflamatória no contexto da eferocitose. (A e B) Análise de qPCR para avaliar a expressão gênica de *Mrc1* e *II4ra* em BMDM selvagens (*Rubcn^{f/f} Cre*⁻) e deficientes para RUBCN (*Rubcn^{f/f} Cre*⁺) não tratados (Cntrl), ou co-cultivados com células Jurkat T apoptóticas (AC) na proporção de 1:1 (BMDM / AC) durante 6, 12 e 20 horas. Dados representativos de dois experimentos independentes são mostrados e expressados como a média ± SEM (erro padrão da média) de BMDM por triplicata. O nível de significância foi calculado usando o Teste T de Student, considerando-se diferença estatística significativa quando *p*<0.05 (*).

5.5 A fagocitose de células apoptóticas induz uma resposta de IFN do tipo I em BMDM deficientes em RUBCN.

Previamente, foi demonstrado que, em resposta a células apoptóticas, a deficiência de RUBCN causa a produção de IFN do tipo I e expressão de genes de estimulados pelo de IFN (ISG), dependente de STING, nos macrófagos murinos (CUNHA et al., 2018). Para confirmar esses resultados, utilizamos BMDM de animais selvagens (*Rubcn*^{+/+}), deficientes para RUBCN (*Rubcn*^{-/-}) e BMDM com defeitos

simultâneos para LAP e na via de STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*). Realizamos uma análise de expressão gênica por qPCR para avaliar os níveis de expressão de genes induzíveis pelo IFN (*lfit1, Cxcl10, Gbp7*) em resposta a células apoptóticas.

Os nossos dados são consistentes com o que foi achado previamente (CUNHA et al., 2018), confirmando que macrófagos com deficiências em RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) apresentam um aumento significativo na expressão dos genes estimulados pelo IFN (ISG) *lfit1, Cxcl10, Gbp7* (Figura 11A-11C), em resposta ao estímulo com células apoptóticas. A expressão das ISGs foi reduzida nos macrófagos com dupla deficiência em RUBCN e STING (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*). Isso reforça a ideia que defeitos em LAP (RUBCN especificamente) induzem ativação de respostas inflamatórias, como as dependentes de interferon do tipo I, nos BMDM estimulado com células apoptóticas *in vitro*.



Figura 11. A fagocitose de células apoptóticas induz uma resposta de IFN do tipo I em BMDM deficientes em RUBCN. Analise qPCR para avaliar a expressão gênica dos genes estimulados pelo IFN do tipo I (ISGs): (A) *lfit1*, (B) *Cxcl10*, e (C) *Gbp7* em BMDM *Rubcn*^{+/+}, *Rubcn*^{-/-} *e Rubcn*^{-/-} *Sting1*^{-/-} não tratados (Cntrl) ou tratados com células Jurkat apoptóticas (AC) na proporção de 1:3 (BMDM / AC) por 20h. Dados representativos de dois experimentos independentes são mostrados e expressados como a média \pm SEM (erro padrão da média) de BMDM por triplicata. O nível de significância foi calculado usando a análise de variância ANOVA de uma via, considerando-se diferença estatística significativa quando *p*<0.05 (*).

5.6 A perda da polarização M2 nos BMDM com deficiências em RUBCN é independente de STING.

Baseado nos resultados acima, investigamos o papel de STING na regulação da polarização M2 nos BMDM com deficiências específicas em LAP ($Rubcn^{-/-}$). Para isto utilizamos BMDM obtidos a partir de camundongos selvagens ($Rubcn^{+/+}$) e deficientes para LAP ($Rubcn^{-/-}$), além de BMDM duplamente deficientes, em LAP e na via de STING ($Rubcn^{-/-}$ Sting1^{-/-}). Esses macrófagos foram estimulados com células Jurkat T apoptóticas por 20 horas para logo efetuar uma avaliação dos níveis de expressão para os genes associados com a assinatura M2 (Mrc1, Arg1, Mgl2, Col1a1, Tgfb1). Adicionalmente, queríamos entender, se STING podia modular a capacidade de sinalização através do receptor de IL-4 (IL-4R α), por conseguinte, avaliamos os níveis de expressão gênica daquele receptor (II4ra). Os estudos de expressão gênica foram realizados usando PCR em tempo real.

Encontramos que macrófagos com deficiências em RUBCN (*Rubcn^{-/-}*) estimulados com células apoptóticas exibiram uma tendência à diminuição na produção de transcritos *Mrc1* (Figura 12A). Além disso, houve uma diminuição significativa na expressão de outros genes associados com o perfil M2 (*Col1a1, Mgl2, Arg1, Tgfb1*) (Figura 12B-12E). Ademais, observamos também uma propensão à redução nos níveis de transcrição para *Il4ra* (Figura 12F), sugerindo que LAP de células apoptóticas age na regulação da sinalização M2. No entanto, essa modulação foi independente de STING, como é mostrado nos macrófagos com defeitos para ambas vias (*Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}*) (Figura 12A-12F). Esses dados demonstram que a ativação de STING não está associada com a regulação negativa do perfil anti-inflamatório nos macrófagos que apresentam deficiências em LAP (RUBCN especificamente) durante a fagocitose de células apoptóticas.



Figura 12. STING não regula a perda da polarização M2 no processo de eferocitose nos macrófagos deficientes em RUBCN. (A-F) Análise de qPCR para avaliar a expressão de genes associados ao perfil M2 (*Mrc1, Col1a1, Mgl2, Arg1, Tgfb1*) e *Il4ra* em BMDM *Rubcn^{+/+}, Rubcn^{-/-} e Rubcn^{-/-} Sting1^{-/-}* não tratado (Cntrl) ou tratado com células Jurkat apoptóticas (AC) na proporção de 1:3 (BMDM / AC) por 20h. Dados representativos de dois experimentos independentes são mostrados e expressados como a média ± SEM de BMDM por triplicata. O nível de significância foi calculado usando análise de variância ANOVA de uma via, considerando-se diferença estatística significativa quando p<0.05 (*)

5.7 Deficiências em RUBCN reduz os níveis de IL-10 nos BMDM durante a eferocitose.

A produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β também estão associadas com a resposta produzida durante a eferocitose de células apoptóticas estéreis pelos macrófagos sendo dependentes da ativação de LAP (HECKMANN et al., 2017; BOADA-ROMERO et al., 2020)). Além disso, IL-10 auxilia na moderação da gravidade de processos inflamatórios a fim de evitar danos excessivos nos tecidos, limitando a resposta imune, favorecendo a resolução para restabelecer a homeostase (FULLERTON; GILROY, 2016)).

Sob a mesma abordagem experimental aplicado nos nossos experimentos *in vitro* anteriores, nos questionamos se a redução da produção de IL-10 em macrófagos deficientes em RUBCN era dependente de STING. Para isso, coletamos os sobrenadantes das co-culturas mantidas durante 20 horas entre os BMDM e células Jurkat apoptóticas. Depois disso, realizamos um ensaio de ELISA quantitativo para a dosagem de IL-10. Observamos que os macrófagos com deficiências em LAP (*Rubcn^{-/-}*) exibiram níveis reduzidos de IL-10 em comparação aos macrófagos selvagens (*Rubcn^{+/+}*) (Figura 13A). Concordando com os resultados anteriores, a redução na secreção de IL-10 em macrófagos *Rubcn^{-/-}* não foi revertida pela deficiência em STING (Figura 13A).

Coletivamente, nossos dados demonstram que a regulação negativa da polarização anti-inflamatória nos macrófagos deficientes em LAP no contexto da eferocitose ocorre independente da ativação de STING.


Figura 13. Deficiência em RUBCN reduz os níveis de IL-10 nos BMDM durante a eferocitose. (A) Quantificação de IL-10 no sobrenadante dos BMDM $Rubcn^{+/+}$, $Rubcn^{-/-}$ e $Rubcn^{-/-}$ Sting1^{-/-} não tratados (Cntrl) ou tratados com células Jurkat apoptóticas (AC) na proporção de 1:3 (BMDM / AC) por 20h. Dados representativos de dois experimentos independentes são mostrados e expressados como a média ± SEM de BMDM por triplicata. O nível de significância foi calculado usando análise de variância ANOVA de uma via, considerando-se diferença estatística significativa quando p<0.05 (*).

5.8 BMDM deficientes para ATG5 exibem redução da resposta anti-inflamatória no contexto eferocítico.

Além de RUBCN, nos perguntamos se a deficiência em outros componentes da via de LAP também provocam alterações no perfil de polarização M2, e qual seria o papel de STING nesse cenário, na fagocitose de células apoptóticas. Para este propósito utilizamos BMDM obtidos de camundongos selvagens ($Atg5^{t/f}$ Cre⁻) e com deficiências específicas para ATG5 ($Atg5^{t/f}$ Cre⁺) nas células do compartimento mielóide (LysM-Cre), um componente da via de LAP abaixo de RUBCN na cascata de sinalização. Também utilizamos BMDM com defeitos simultâneos para LAP e na via de STING ($Atg5^{t/f}$ Cre⁺ Sting1^{-/-}). Tratamos esses macrófagos em um co-cultura com células Jurkat apoptóticas durante 20 horas para finalmente avaliar a expressão gênica por qPCR para *Mrc1* e *II4ra*.

Constatamos que macrófagos com deficiências em ATG5 (*Atg5^{f/f} Cre*⁺) similarmente exibiram uma redução significativa na expressão dos genes *Mrc1* e *Il4ra* em resposta a células apoptóticas ao ser comparados com os BMDM selvagens (*Atg5^{f/f} Cre*⁻). Da mesma forma como observado para RUBCN, STING não está associado com a perda da polarização anti-inflamatória em macrófagos deficientes em ATG5 evidenciado nos BMDM com defeitos para as duas vias (*Atg5^{f/f} Cre*⁺ *Sting1^{-/-}*) (**Figura 14A e 14B**).

Em conjunto, esses achados confirmam que deficiências isoladas em diferentes componentes na via de LAP (RUBCN ou ATG5 aqui avaliados) alteram a modulação da função anti-inflamatória dos macrófagos primários murinos derivados da medula óssea, processo que na sua vez acontece independentemente da ativação de STING durante a fagocitose de células apoptóticas.



Figura 14. Deficiências em ATG5 induz redução da resposta antiinflamatória independente de STING nos BMDM durante a eferocitose. (A e B) Análise de qPCR para avaliar a expressão dos genes *Mrc1* e *II4ra* em BMDM *Atg5^{t/f} Cre⁻*, *Atg5^{t/f} Cre⁺*, *Atg5^{t/f} Cre⁺ Sting1^{-/-}* não tratados (Cntrl) ou tratados com células Jurkat apoptóticas (AC) na proporção de 1:3 (BMDM / AC) por 20h. Dados representativos de dois experimentos independentes são mostrados e expressados como a média ± SEM de BMDM por triplicata. O nível de significância foi calculado usando análise de variância ANOVA de uma via, considerando-se diferença estatística significativa quando *p*<0.05 (*)

Discussão

6 DISCUSSÃO

A partir de modelos murinos, sabe-se que deficiências em autofagia nãocanônica mediadas por RUBCN provocam patologias de caráter autoinflamatório ou autoimune, como acúmulo de dano hepático e nefrite crônica (TONNUS et al., 2022), desenvolvimento de doenças neurológica similar ao Alzheimer (HECKMANN et al., 2019), dermatites (SIL et al., 2020) e fibrose hepática não-alcóolica (HECKMANN et al., 2019; SIL et al., 2020; WAN et al., 2020). Além disso, deficiência em LAP exacerba a susceptibilidade a infecções (AKOUMIANAKI et al., 2016; M et al., 2020), e favorece a imunidade antitumoral (CUNHA et al., 2018). Nesse estudo demonstramos a deficiência em RUBCN, componente de LAP, causa o aparecimento de fenótipos autoimunes em camundongos envelhecidos, como produção de autoanticorpos, ainda que não haja indícios de desenvolvimento de doença autoimune sistêmica grave. STING não foi essencial na produção de autoanticorpos, no entanto a sua deleção suprimiu o desenvolvimento de dano renal nos camundongos envelhecidos com deficiências para RUBCN. Resultados similares foram obtidos para camundongos deficientes em ATG5, que também participa de LAP, especificamente no compartimento mielóide. Além disso, encontramos que STING não participa na perda da função e sinalização anti-inflamatória nos macrófagos deficientes em RUBCN ou ATG5 em resposta a eferocitose de células apoptóticas.

abordou inicialmente a Nosso estudo participação de STING no desenvolvimento de fenótipos autoimunes em animais deficientes para LAP. A nossa caracterização do modelo de autoimunidade nos camundongos idosos com deleções em RUBCN ou ATG5 identificou um aumento na produção de autoanticorpos, além da deposição de imunocomplexos nos glomérulos (avaliado apenas para RUBCN). Estes dados concordam com avaliações prévias em humanos, indicando que alterações na maquinaria de LAP: NOX2 (RUPEC et al., 2000), RUBCN (ASSOUM et al., 2013), ATG5 (INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS GENETICS (SLEGEN) et al., 2008), estão associadas a doenças autoimunes e neurodegenerativas. Enquanto nossos resultados destacam a importância de RUBCN na supressão de uma síndrome autoimune, um estudo recente aponta o contrário. Empregando animais com propensão a lúpus (B6.Sle1.Yaa e MRL.Fas^(pr) deficientes para RUBCN, ressaltam a função de NOX2, porém

76

desconsideram o requerimento de RUBCN na via de LAP (GORDON et al., 2022). Uma possível explicação seria que o fundo genético com propensão a lúpus como a perda da função do gene *Fas* ou a maior expressão do TLR7 nos animais MRL.Fas^{lpr} e B6.Sle1.Yaa, respectivamente, possa comprometer a função de RUBCN (LEE et al., 2021).

Por outro lado, nossos achados mostram que a função de STING parece não ser relevante para a produção de autoanticorpos nos animais envelhecidos deficientes na maquinaria de LAP. Isso sugere que uma falha na degradação de células mortas e provável sinalização de IFN do tipo I dependente de STING, não está ligada com a hiperativação de linfócitos B e produção de autoanticorpos na autoimunidade. O papel de STING no desenvolvimento de síndromes autoimunes ainda é controverso. Nesse sentido, um estudo constatou que deficiência sistêmica na via cGAS - STING, e IFNAR não afetou a resposta dos linfócitos B auto-reativos, sugerindo que a ativação dos linfócitos B seria através do BCR via endocitose (GREEN et al., 2021). Paradoxalmente, o papel protetor de STING foi provado num modelo de lúpus murino (MRL.Fas^{lor}) apontando aumento dos imunomarcadores ANA, hipertrofia linfoide, nefrite lúpica, assinatura de IFN, nos animais deficientes apenas para STING (SHARMA et al., 2015). Além disso, a deficiência nos componentes da via cGAS -STING, exacerbou a severidade da doença ao invés de resgatá-la num modelo de lúpus induzido por TMPD (pristane) e MRL.Fas^{lpr}. (MOTWANI et al., 2021). Outro estudo demonstrou que a sinalização de STING contribui no desenvolvimento de autoimunidade, mediado pelas células dendríticas em animais com propensão a lúpus (FCGR2B deficientes) (THIM-UAM et al., 2020). Ademais, camundongos com deficiências na DNase II endolisossomal apresentam interferonopatia dependente de STING, sugerindo que o material genético pertencente à célula morta dentro do fagossomo não seja degradado, induzindo ativação de STING. (AHN et al., 2012). A explicação ante esses achados controversos sobre o papel de STING na autoimunidade pode estar voltada aos diversos fundos genéticos nos diferentes modelos de lúpus influenciando de maneira muito específica na patogênese da doenca.

Por outro lado, curiosamente, nossos achados demonstram que a deficiência de STING suprimiu a deposição de imunocomplexos e hipercelularidade nos glomérulos renais apesar da presencia de autoanticorpos, prevenindo um potencial dano renal nos animais idosos deficientes para LAP. Nesse cenário, a produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos nos glomérulos não seriam suficientes para o desenvolvimento de nefrite lúpica (CLYNES; DUMITRU; RAVETCH, 1998; BERGTOLD et al., 2006). É necessário a infiltração glomerular dos monócitos patrulhadores (KURIAKOSE et al., 2019) e/ou o reconhecimento dos imunocomplexos depositados nos glomérulos, pelos fagócitos mononucleares, resultando na indução da glomerulonefrite nos camundongos com propensão a síndrome autoimune (BETHUNAICKAN et al., 2011). Potencialmente os propulsores da inflamação glomerular – (fagócitos mononucleares, importantes em estágios proliferativos iniciais) - dispensariam à geração de autoanticorpos e imunocomplexos - (função dos linfócitos B auto-reativos, necessários em estágios tardios) – na progressão da nefrite (KURIAKOSE et al., 2019). No nosso modelo de autoimunidade, complementarmente à deposição de imunocomplexos, é possível que STING ativado nas populações celulares residentes como macrófagos e células dendríticas, e monócitos patrulhadores favoreça a inflamação glomerular (SAHU et al., 2014; MARIA; DAVIDSON, 2017). Esse cenário pró-inflamatório poderia ser revertido na deficiência de STING, nos animais com defeitos na maguinaria de LAP. Como STING suprime a deposição de imunocomplexos é um evento que precisa ser explorado futuramente. Embora o nosso estudo de hipercelularidade glomerular seja um indicador sugestivo de dano renal (KURIAKOSE et al., 2019; BOES et al., 2000), é essencial um estudo anatomopatológico, além de mensurar marcadores da função (creatinina, ureia sérica) e lesão renal (proteinúria) para validar o desenvolvimento de injuria renal crônica dependente de STING em animais deficientes em RUBCN (TONNUS et al., 2022).

Nossos achados sobre a produção de autoanticorpos e desenvolvimento de patologia renal estão correlacionados com o menor ganho do peso nos camundongos deficientes para RUBCN, condição que foi moderada na deficiência de STING. Nesse contexto, a alteração na condição física atribuída à doença renal poderia ser consequência da ativação de STING associada à ineficiente degradação de células mortas. Esses dados estão alinhados com um recente estudo, revelando que a injuria renal aguda nos animais com defeitos em RUBCN, seria parcialmente revertida na menor disponibilidade de células necroptóticas (TONNUS et al., 2022). Contudo, não observamos diferenças no ganho do peso nos animais com deficiência para ATG5 no compartimento mieloide, nem com deficiências simultâneas (ATG5 e STING),

considerando a hipótese que a falha no ganho de peso não seria causada apenas pela síndrome autoimune.

Esplenomegalia (indicador de lúpus ativo) e aumento de populações mononucleares reativas são indicadores considerados no desenvolvimento de síndrome autoimune murino (LEE; CELHAR; FAIRHURST, 2021; SEAVEY; LU; STUMP, 2011). No nosso modelo de autoimunidade, não observamos hipertrofia do baço, nem linfocitose no sangue periférica em qualquer um dos diferentes genótipos antes já avaliados. Não obstante, um estudo mais rigoroso, incluindo a imunofenotipagem dos esplenócitos assim como nos leucócitos do sangue periférica, permitiria uma melhor caracterização da doença. Interessantemente, foi reportado que camundongos fêmeas com deficiências para RUBCN apresentaram atrofia do baço, porém tiveram aumento de linfócitos no sangue; já os machos, não exibiram diferenças desses parâmetros (TONNUS et al., 2022). Os autores deixaram em aberto as possíveis razões. Portanto, podemos considerar que a inconsistência entre os achados prévios da literatura, assim como entre os nossos, estariam relacionados além dos diversos modelos de autoimunidade; a outros fatores como o sexo, microbiota e ambiente (RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020).

Nossa abordagem seguinte focou na exploração mecanística do papel de STING na perda da função anti-inflamatória nos macrófagos da medula (BMDM) com defeitos na maquinaria de LAP. Sob o contexto da eferocitose, percebemos que STING não participa da regulação negativa do perfil anti-inflamatório dos BMDM deficientes para LAP. Partindo de um sistema *in vitro*, nossos achados comprovaram demonstrando que a maquinaria de LAP estimula dados de estudos prévios, programas relacionados às resposta anti-inflamatórias (CUNHA et al., 2018). Adicionalmente, a sinalização que controla a polarização anti-inflamatória por meio do receptor IL4-Rα (BOSURGI et al., 2017), também foi modulada positivamente por LAP. Em contraste, os BMDM com deleção sistêmica de RUBCN, ou deleção condicional de ATG5 mostraram perda significativa da resposta anti-inflamatória, provavelmente a consequência da ineficiente degradação das células apoptóticas. Portanto, nossos resultados corroboram as evidências do papel da via de LAP (aqui avaliados pelo RUBCN e ATG5 apenas) no estabelecimento da imunotolerância na eferocitose (CUNHA et al., 2018; SIL et al., 2020).

Além disso, nossos resultados expuseram a perda de marcadores associados a função anti-inflamatória nos BMDM LAP-deficientes. Nós observamos que os macrófagos com deficiências para RUBCN apresentaram uma resposta dependente de IFN do tipo I (Ifit1, Cxcl10 e Gbp7) dependente de STING, como demonstrado anteriormente (CUNHA, et al., 2018). Estudos predecessores sobre a eferocitose de células apoptóticas têm estabelecido a característica resposta anti-inflamatória (FADOK et al., 2001b; KIM; ELKON; MA, 2004). Em consonância com esses estudos, deficiências nos componentes de LAP induzem um perfil pró-inflamatório nos macrófagos (CUNHA et al., 2018). A partir de uma análise de transcriptômica, foi revelado que TAMs (macrófagos associados ao tumor) e BMDM deficientes para RUBCN apresentam aumento da expressão de genes do perfil pró-inflamatório e da via de sinalização de IFN do tipo I (STING, IRFs, ISGs) em resposta a células apoptóticas (CUNHA et al., 2018). Portanto, se defeitos na via de LAP provocam degradação ineficiente das células mortas, induzem uma resposta pró-inflamatória, ativam STING e estimulam genes dependentes de IFN do tipo I (CUNHA et al., 2018); potencialmente STING poderia estar regulando a perda da função anti-inflamatória nesses macrófagos. Não obstante, nossos achados refutam tal papel para STING. Conseguimos comprovar que no contexto da eferocitose, BMDM com deficiências em RUBCN perderam o programa anti-inflamatório e de reparo (Mrc1, Col1a1, Mgl2, Arg1, Tgfb1), secretaram menos IL-10, além de perder a capacidade de controlar a sinalização M2 (menor expressão de Il4ra). A regulação negativa desses genes produto do defeito na via de LAP (RUBCN) não foi revertida pela deleção de STING.

Embora tenhamos conseguido atingir os nossos objetivos, nossos dados evidenciam que STING tem um papel diferente ao que nós pensávamos. Portanto, mecanisticamente, durante a eferocitose, a perda da função anti-inflamatória dos BMDM deficientes para LAP (RUBCN ou ATG5) seria regulado por complexos diferentes do STING ou da sinalização dependente de IFN. Nesse cenário, seria importante conhecer os fatores que regulam a via de LAP a fim de poder modular as respostas imune subsequentes, abrindo potenciais panoramas para o tratamento de doenças inflamatórias ou autoimunes. Além da produção de IFN do tipo I, outras funções como indução de autofagia ou morte celular são atribuídas a STING (ZHANG; KANG; TANG, 2021). Ainda que STING não contribua para a redução de perfil anti-inflamatório em macrófagos deficientes em componentes da via de LAP, será

interessante explorar quais defeitos na degradação das células apoptóticas (LAP) levariam a ativação de STING, se essa ativação é dependente ou independente de cGAS (sensor de DNA que produz cGAMP), e sob quais contextos onde existe alterações da eferocitose seria adequado ativar ou inibir STING.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De forma conjunta, nossos estudos revelam que, para nosso modelo de autoimunidade espontânea, STING não é essencial na produção de autoanticorpos, não obstante, a sua deleção pode reduzir a deposição de imunocomplexos e hipercelularidade no glomérulo, protegendo contra um possível dano tecidual (Figura 15). Mecanisticamente, STING não participa da perda do perfil anti-inflamatório nos BMDM deficientes em LAP no contexto da eferocitose in vitro (Figura 16). Nesse sentido, sob a nossa metodologia e desenho experimental avaliado, STING apresentaria funções diferentes ao que nós hipotetizamos no nosso trabalho. Apesar disso, o uso de animais envelhecidos com defeitos na degradação de células mortas (RUBCN e ATG5 aqui avaliados) pode servir como referência para estudos de síndrome autoimune espontâneo. Por outro lado, partindo de um contexto eferocítico, sugerimos explorar qual mecanismo induz a ativação de STING, assim como outros possíveis fatores que restringem a expressão do perfil anti-inflamatório nos macrófagos deficientes em LAP. Conhecer esses mecanismos permitirá identificar potenciais alvos moleculares a fim de modular a resposta inflamatória em cenários específicos.



Figura 15. Resumo gráfico dos principais achados *in vivo*. Deficiências em RUBCN nos animais envelhecidos induzem uma síndrome autoimune caracterizado

pela produção de autoanticorpos séricos e deposição de imunocomplexos IgG nos glomérulos renais. Nesse contexto, a produção de autoanticorpos dispensou da função de STING, no entanto, a sua deleção reduziu os depósitos de imunocomplexos IgG, como mostrado nos animais com deficiências para RUBCN e STING. Imagem elaborada no BioRender.com.



Figura 16. Resumo gráfico dos principais achados *in vitro*. BMDM com deficiências em componentes específicos da via de LAP (RUBCN ou ATG5) apresentam regulação negativa dos marcadores associados com a função e sinalização da resposta anti-inflamatória, além da redução de IL10, processo que acontece de forma independente da ativação de STING no contexto da eferocitose. Imagem elaborada no BioRender.com.

Referências

8 REFERÊNCIAS

A-GONZALEZ, N. et al. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*, v. 31, n. 2, p. 245–258, 21 ago. 2009.

AHN, J. et al. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 47, p. 19386–19391, 20 nov. 2012b.

AKOUMIANAKI, T. et al. Aspergillus Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell Host & Microbe*, v. 19, n. 1, p. 79–90, 13 jan. 2016.

AKOUMIANAKI, T. et al. Uncoupling of IL-6 signaling and LC3-associated phagocytosis drives immunoparalysis during sepsis. *Cell Host & Microbe*, v. 29, n. 8, p. 1277-1293.e6, 11 ago. 2021.

ANA Patterns. Disponível em: <<u>https://www.anapatterns.org/trees-2021.php</u>>. Acesso em: 3 maio. 2022.

ANDERS, H.-J. et al. Lupus nephritis. *Nature Reviews. Disease Primers*, v. 6, n. 1, p. 7, 23 jan. 2020.

ANDERTON, H.; WICKS, I. P.; SILKE, J. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. *Nature Reviews. Rheumatology*, v. 16, n. 9, p. 496–513, set. 2020.

ARYA, R.; WHITE, K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 39, p. 12–19, mar. 2015.

ASSOUM, M. et al. The Salih ataxia mutation impairs Rubicon endosomal localization. *Cerebellum (London, England)*, v. 12, n. 6, p. 835–840, dez. 2013.

ATKIN-SMITH, G. K. Phagocytic clearance of apoptotic, necrotic, necroptotic and pyroptotic cells. *Biochemical Society Transactions*, v. 49, n. 2, p. 793–804, 30 abr. 2021.

BARKAL, A. A. et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*, v. 572, n. 7769, p. 392–396, ago. 2019.

BARTH, N. D. et al. The "Phagocytic Synapse" and Clearance of Apoptotic Cells. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1708, 2017.

BEDOUI, S.; HEROLD, M. J.; STRASSER, A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 11, p. 678–695, nov. 2020.

BERGTOLD, A. et al. FcR-bearing myeloid cells are responsible for triggering murine lupus nephritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 177, n. 10, p. 7287–7295, 15 nov. 2006a.

BETHUNAICKAN, R. et al. A unique hybrid renal mononuclear phagocyte activation phenotype in murine systemic lupus erythematosus nephritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 186, n. 8, p. 4994–5003, 15 abr. 2011.

BIRKLE, T.; BROWN, G. C. I'm Infected, Eat Me! Innate Immunity Mediated by Live, Infected Cells Signaling To Be Phagocytosed. *Infection and Immunity*, v. 89, n. 5, p. e00476-20, 16 abr. 2021.

BOADA-ROMERO, E. et al. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 398–414, jul. 2020.

BOES, M. et al. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 3, p. 1184–1189, 1 fev. 2000.

BOSSUYT, X. et al. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, v. 16, n. 12, p. 715–726, dez. 2020.

BOSURGI, L. et al. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 356, n. 6342, p. 1072–1076, 9 jun. 2017.

BOURNAZOU, I. et al. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 1, p. 20–32, jan. 2009.

BROWN, S. et al. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, v. 418, n. 6894, p. 200–203, 11 jul. 2002.

CHEKENI, F. B. et al. Pannexin 1 channels mediate "find-me" signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, v. 467, n. 7317, p. 863–867, 14 out. 2010.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews. Immunology*, v. 10, n. 12, p. 826–837, dez. 2010.

CLYNES, R.; DUMITRU, C.; RAVETCH, J. V. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science (New York, N.Y.)*, v. 279, n. 5353, p. 1052–1054, 13 fev. 1998.

COCKRAM, T. O. J. et al. The Phagocytic Code Regulating Phagocytosis of Mammalian Cells. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 629979, 2021.

COHEN, P. L. et al. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 196, n. 1, p. 135–140, 1 jul. 2002.

CUDA, C. M.; POPE, R. M.; PERLMAN, H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, v. 12, n. 9, p. 543–558, 23 ago. 2016.

CUNHA, L. D. et al. LC3-Associated Phagocytosis in Myeloid Cells Promotes Tumor Immune Tolerance. *Cell*, v. 175, n. 2, p. 429- 441.e16, 4 out. 2018.

DAMGAARD, R. B. The ubiquitin system: from cell signalling to disease biology and new therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation*, v. 28, n. 2, p. 423–426, fev. 2021.

DECOUT, A. et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews. Immunology*, v. 21, n. 9, p. 548–569, set. 2021.

DEVITT, A. et al. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, v. 392, n. 6675, p. 505–509, 2 abr. 1998.

DORAN, A. C.; YURDAGUL, A.; TABAS, I. Efferocytosis in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, v. 20, n. 4, p. 254–267, abr. 2020.

ELLIOTT, M. R.; RAVICHANDRAN, K. S. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Developmental Cell*, v. 38, n. 2, p. 147–160, 25 jul. 2016.

ELWARD, K. et al. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 43, p. 36342–36354, 28 out. 2005.

FADOK, V. A. et al. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950),* v. 166, n. 11, p. 6847–6854, 1 jun. 2001b.

FADOK, V. A. et al. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 2, p. 1071–1077, 12 jan. 2001a.

FASSY, F. et al. In Vitro Characterization of VPS34 Lipid Kinase Inhibition by Small Molecules. *Methods in Enzymology*, v. 587, p. 447–464, 2017.

FLETCHER, K. et al. The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes. *The EMBO journal*, v. 37, n. 4, p. e97840, 15 fev. 2018.

FLOREY, O. et al. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nature Cell Biology*, v. 13, n. 11, p. 1335–1343, nov. 2011.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 15, n. 8, p. 551–567, ago. 2016.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 486–541, mar. 2018.

GALLUZZI, L.; GREEN, D. R. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*, v. 177, n. 7, p. 1682–1699, 13 jun. 2019.

GARDAI, S. J. et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, v. 123, n. 2, p. 321–334, 21 out. 2005.

GENTILETTI, J. et al. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 175, n. 4, p. 2418–2426, 15 ago. 2005.

GORDON, R. A. et al. Rubicon promotes rather than restricts murine lupus and is not required for LC3-associated phagocytosis. *JCI insight*, v. 7, n. 7, p. e155537, 8 abr. 2022.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, v. 32, n. 5, p. 593–604, 28 maio 2010.

GREEN, K. et al. B Cell Intrinsic STING Signaling Is Not Required for Autoreactive Germinal Center Participation. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 782558, 2021.

GUI, X. et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*, v. 567, n. 7747, p. 262–266, mar. 2019.

HECKMANN, B. L. et al. LC3-Associated Endocytosis Facilitates β-Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell*, v. 178, n. 3, p. 536-551.e14, 25 jul. 2019.

HECKMANN, B. L. et al. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *Journal of Molecular Biology*, v. 429, n. 23, p. 3561–3576, 24 nov. 2017.

HEDRICH, C. M.; TSOKOS, G. C. Bridging the gap between autoinflammation and autoimmunity. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, v. 147, n. 3, p. 151–154, jun. 2013.

HOOPER, K. M. et al. V-ATPase is a universal regulator of LC3-associated phagocytosis and non-canonical autophagy. *Journal of Cell Biology*, v. 221, n. 6, p. e202105112, 5 maio 2022.

HOPFNER, K.-P.; HORNUNG, V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 9, p. 501–521, set. 2020.

INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS GENETICS (SLEGEN) et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXK, KIAA1542 and other loci. *Nature Genetics*, v. 40, n. 2, p. 204–210, fev. 2008.

ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, v. 455, n. 7213, p. 674–678, 2 out. 2008.

JAISWAL, S. et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, v. 138, n. 2, p. 271–285, 23 jul. 2009.

KAUL, A. et al. Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews. Disease Primers*, v. 2, p. 16039, 16 jun. 2016.

KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 8, p. 461–472, ago. 2015.

KAWANO, M.; NAGATA, S. Lupus-like autoimmune disease caused by a lack of Xkr8, a caspase-dependent phospholipid scramblase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 9, p. 2132–2137, 27 fev. 2018a.

KAWANO, M.; NAGATA, S. Efferocytosis and autoimmune disease. *International Immunology*, v. 30, n. 12, p. 551–558, 14 nov. 2018b.

KIM, S.; ELKON, K. B.; MA, X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*, v. 21, n. 5, p. 643–653, nov. 2004.

KIM, S.-Y. et al. Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite. *PloS One*, v. 12, n. 4, p. e0174603, 2017.

KRISTÓF, E. et al. Novel role of ICAM3 and LFA-1 in the clearance of apoptotic neutrophils by human macrophages. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, v. 18, n. 10, p. 1235–1251, out. 2013.

KURIAKOSE, J. et al. Patrolling monocytes promote the pathogenesis of early lupus-like glomerulonephritis. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 129, n. 6, p. 2251–2265, 29 abr. 2019.

LEE, H. Y.; CELHAR, T.; FAIRHURST, A.-M. Assessing Lupus-Like Disease in Murine Model Systems. *Current Protocols*, v. 1, n. 11, p. e272, nov. 2021.

LEMKE, G. How macrophages deal with death. *Nature Reviews. Immunology*, v. 19, n. 9, p. 539–549, set. 2019.

LI, M. et al. Macrophage activation on "phagocytic synapse" arrays: Spacing of nanoclustered ligands directs TLR1/2 signaling with an intrinsic limit. *Science Advances*, v. 6, n. 49, p. eabc8482, dez. 2020.

LI, T. et al. Listeria monocytogenes upregulates mitochondrial calcium signalling to inhibit LC3-associated phagocytosis as a survival strategy. *Nature Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 366–379, mar. 2021.

LI, T. et al. TBK1 recruitment to STING mediates autoinflammatory arthritis caused by defective DNA clearance. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 219, n. 1, p. e20211539, 3 jan. 2022.

LI, T.; CHEN, Z. J. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 215, n. 5, p. 1287–1299, 7 maio 2018.

LI, T.; CHEN, Z. J. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 215, n. 5, p. 1287–1299, 7 maio 2018.

LI, X.-D. et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science (New York, N.Y.)*, v. 341, n. 6152, p. 1390–1394, 20 set. 2013.

LIU, L. et al. Delayed onset of autoreactive antibody production and M2-skewed macrophages contribute to improved survival of TACI deficient MRL-Fas/Lpr mouse. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1308, 22 jan. 2018.

LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology*, v. 15, p. 123–147, 24 jan. 2020.

LU, Q.; LEMKE, G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science (New York, N.Y.)*, v. 293, n. 5528, p. 306–311, 13 jul. 2001.

M, I. et al. Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against Streptococcus pneumoniae that diminishes with host aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* v. 117, n. 52, 29 dez. 2020.

MARIA, N. I.; DAVIDSON, A. Renal Macrophages and Dendritic Cells in SLE Nephritis. *Current Rheumatology Reports*, v. 19, n. 12, p. 81, 9 nov. 2017.

MASUD, S. et al. Macrophages target Salmonella by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy*, v. 15, n. 5, p. 796–812, maio 2019.

MAYER, C. T. et al. An apoptosis-dependent checkpoint for autoimmunity in memory B and plasma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 40, p. 24957–24963, 6 out. 2020.

MCWHIRTER, S. M.; JEFFERIES, C. A. Nucleic Acid Sensors as Therapeutic Targets for Human Disease. *Immunity*, v. 53, n. 1, p. 78–97, 14 jul. 2020.

MEDINA, C. B. et al. Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature*, v. 580, n. 7801, p. 130–135, abr. 2020.

MEDINA, C. B.; RAVICHANDRAN, K. S. Do not let death do us part: "find-me" signals in communication between dying cells and the phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 979–989, jun. 2016.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.

MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. *Science (New York, N.Y.)*, v. 374, n. 6571, p. 1070–1075, 26 nov. 2021.

MOFFATT, O. D. et al. Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 162, n. 11, p. 6800–6810, 1 jun. 1999.

MORRISSEY, M. A.; KERN, N.; VALE, R. D. CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis. *Immunity*, v. 53, n. 2, p. 290-302.e6, 18 ago. 2020.

MOTWANI, M. et al. cGAS-STING Pathway Does Not Promote Autoimmunity in Murine Models of SLE. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 605930, 2021.

MOTWANI, M.; PESIRIDIS, S.; FITZGERALD, K. A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nature Reviews. Genetics*, v. 20, n. 11, p. 657–674, nov. 2019.

MUKUNDAN, L. et al. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nature Medicine*, v. 15, n. 11, p. 1266–1272, nov. 2009.

MURAKAMI, Y. et al. CD300b regulates the phagocytosis of apoptotic cells via phosphatidylserine recognition. *Cell Death and Differentiation*, v. 21, n. 11, p. 1746–1757, nov. 2014.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 14–20, 17 jul. 2014.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, v. 79, p. 541–566, 10 fev. 2017.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 36, p. 489–517, 26 abr. 2018.

NAKATOGAWA, H. et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 7, p. 458–467, jul. 2009.

NEWTON, K. et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, v. 343, n. 6177, p. 1357–1360, 21 mar. 2014.

O' REILLY, L. A. et al. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature*, v. 461, n. 7264, p. 659–663, 1 out. 2009.

OGDEN, C. A. et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 194, n. 6, p. 781–795, 17 set. 2001.

OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology*, v. 17, n. 1, p. 9–17, jan. 2016.

OKUDE, H.; ORI, D.; KAWAI, T. Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 625833, 2020.

OLDENBORG, P. A. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 288, n. 5473, p. 2051–2054, 16 jun. 2000.

PALUDAN, S. R.; REINERT, L. S.; HORNUNG, V. DNA-stimulated cell death: implications for host defence, inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews. Immunology*, v. 19, n. 3, p. 141–153, mar. 2019.

PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 12, n. 1, p. 5–23, jan. 2015.

PARK, D. et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, v. 450, n. 7168, p. 430–434, 15 nov. 2007.

PARK, S.-Y. et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death and Differentiation*, v. 15, n. 1, p. 192–201, jan. 2008.

PATANKAR, J. V.; BECKER, C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 17, n. 9, p. 543–556, set. 2020.

PEIXOTO DA SILVA, S. et al. Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 11, n. 3, p. 619–635, jun. 2020.

PISETSKY, D. S. Anti-DNA antibodies--quintessential biomarkers of SLE. *Nature Reviews. Rheumatology*, v. 12, n. 2, p. 102–110, fev. 2016.

POON, I. K. H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews. Immunology*, v. 14, n. 3, p. 166–180, mar. 2014.

RAI, S. et al. The ATG5-binding and coiled coil domains of ATG16L1 maintain autophagy and tissue homeostasis in mice independently of the WD domain required for LC3-associated phagocytosis. *Autophagy*, v. 15, n. 4, p. 599–612, 3 abr. 2019.

RAVICHANDRAN, K. S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 207, n. 9, p. 1807–1817, 30 ago. 2010.

RAYMOND, M. H. et al. Live cell tracking of macrophage efferocytosis during Drosophila embryo development in vivo. *Science (New York, N.Y.),* v. 375, n. 6585, p. 1182–1187, 11 mar. 2022.

REDGATE, E. S.; DEUTSCH, M.; BOGGS, S. S. Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns. *Laboratory Animal Science*, v. 41, n. 3, p. 269–273, jun. 1991.

RODRIGUEZ-MANZANET, R. et al. T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 19, p. 8706–8711, 11 maio 2010.

ROTHLIN, C. V. et al. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1124–1136, 14 dez. 2007.

ROTHLIN, C. V.; HILLE, T. D.; GHOSH, S. Determining the effector response to cell death. *Nature Reviews. Immunology*, v. 21, n. 5, p. 292–304, maio 2021.

RUFF, W. E.; GREILING, T. M.; KRIEGEL, M. A. Host-microbiota interactions in immunemediated diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 18, n. 9, p. 521–538, set. 2020.

RUPEC, R. A. et al. Lupus erythematosus tumidus and chronic discoid lupus erythematosus in carriers of X-linked chronic granulomatous disease. *European journal of dermatology: EJD*, v. 10, n. 3, p. 184–189, maio 2000.

SAHU, R. et al. Structure and function of renal macrophages and dendritic cells from lupusprone mice. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, v. 66, n. 6, p. 1596–1607, jun. 2014.

SAKURAGI, T.; KOSAKO, H.; NAGATA, S. Phosphorylation-mediated activation of mouse Xkr8 scramblase for phosphatidylserine exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 8, p. 2907–2912, 19 fev. 2019.

SCHAAF, M. B. E. et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 30, n. 12, p. 3961–3978, dez. 2016.

SCHLEE, M.; HARTMANN, G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature Reviews. Immunology*, v. 16, n. 9, p. 566–580, set. 2016.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, v. 32, p. 513–545, 2014.

SEAVEY, M. M.; LU, L. D.; STUMP, K. L. Animal models of systemic lupus erythematosus (SLE) and ex vivo assay design for drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, v. Chapter 5, p. Unit 5.60, jun. 2011.

SENDER, R.; MILO, R. The distribution of cellular turnover in the human body. *Nature Medicine*, v. 27, n. 1, p. 45–48, jan. 2021.

SHARMA, S. et al. Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 7, p. E710-717, 17 fev. 2015.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 363–383, jul. 2020.

SIL, P. et al. Noncanonical autophagy in dermal dendritic cells mediates immunosuppressive effects of UV exposure. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 145, n. 5, p. 1389–1405, maio 2020a.

SØNDER, S. L. et al. Restructuring of the plasma membrane upon damage by LC3-associated macropinocytosis. *Science Advances*, v. 7, n. 27, p. eabg1969, jul. 2021.

SONI, C. et al. Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA. *Immunity*, v. 52, n. 6, p. 1022- 1038.e7, 16 jun. 2020.

SUZUKI, Y. et al. Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 13129, 3 set. 2018.

SZEKANECZ, Z. et al. Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, v. 17, n. 10, p. 585–595, out. 2021.

TANG, P. M.-K.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H.-Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nature Reviews. Nephrology*, v. 15, n. 3, p. 144–158, mar. 2019.

THIM-UAM, A. et al. STING Mediates Lupus via the Activation of Conventional Dendritic Cell Maturation and Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *iScience*, v. 23, n. 9, p. 101530, 25 set. 2020.

TONNUS, W. et al. Rubicon-deficiency sensitizes mice to mixed lineage kinase domain-like (MLKL)-mediated kidney ischemia-reperfusion injury. **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 3, p. 236, 14 mar. 2022.

ULLMAN-CULLERÉ, M. H.; FOLTZ, C. J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science*, v. 49, n. 3, p. 319–323, jun. 1999.

VÉNÉREAU, E.; CERIOTTI, C.; BIANCHI, M. E. DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 422, 2015.

VERNON-WILSON, E. F. et al. CD31 delays phagocyte membrane repolarization to promote efficient binding of apoptotic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 82, n. 5, p. 1278–1288, nov. 2007.

VILA, I. K. et al. STING orchestrates the crosstalk between polyunsaturated fatty acid metabolism and inflammatory responses. *Cell Metabolism*, v. 34, n. 1, p. 125-139.e8, 4 jan. 2022.

WAN, J. et al. LC3-associated phagocytosis protects against inflammation and liver fibrosis via immunoreceptor inhibitory signaling. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 539, p. eaaw8523, 15 abr. 2020.

WANG, A. et al. Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1512-1525.e12, 8 set. 2016.

WEENING, J. J. et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, v. 15, n. 2, p. 241–250, fev. 2004.

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 450–462, 15 mar. 2016.

XUE, J. et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, v. 40, n. 2, p. 274–288, 20 fev. 2014.

YANG, L. et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 4, p. 1620–1636, abr. 2015.

ZHANG, R.; KANG, R.; TANG, D. The STING1 network regulates autophagy and cell death. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, p. 208, 2 jun. 2021.

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology*, v. 15, p. 493–518, 24 jan. 2020.

ZUK, A.; BONVENTRE, J. V. Acute Kidney Injury. *Annual Review of Medicine*, v. 67, p. 293–307, 2016.