

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação de Imunologia Básica e Aplicada

Letícia de Aquino Penteadó

**Reprogramação metabólica de células dendríticas após
fagocitose de células apoptóticas**

Ribeirão Preto – SP

Julho – 2023

Letícia de Aquino Penteado

**Reprogramação metabólica de células dendríticas após
fagocitose de células apoptóticas**

Versão Simplificada

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Imunologia Básica
e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de
Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel
Mendes de Moraes Vieira

Ribeirão Preto - SP

2023

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.

Penteado, Letícia de Aquino

Reprogramação metabólica de células dendríticas após eferocitose de células apoptóticas. Ribeirão Preto, 2023.

113 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Medeiros, Alexandra Ivo.

1. Eferocitose. 2. Célula dendrítica. 3. Metabolismo. 4. Glicólise. 5. Infecção.

Folha de Aprovação

Nome: Letícia de Aquino Penteado

Título: Reprogramação metabólica de células dendríticas após eferocitose de células apoptóticas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

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: _____

Essa tese recebeu fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2018/19638-9, 2017/19870-6, 2017/21629-5, 2021/02506-5; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 134444/2017 e recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP de Araraquara e no Laboratório do Dr. C. Henrique Serezani na Vanderbilt University Medical Center, Nashville, EUA.

Agradecimentos

A meus pais, pelo suporte e apoio em todas as decisões acadêmicas que tomei. A meu irmão, por ter sido meu exemplo.

À professora Alexandra, por todos esses anos de confiança, parceria e aprendizado. Vou ter sempre como inspiração sua humanidade e paixão pela pesquisa e pelo ensino. Obrigada pelo aceite em fazer parte de seu grupo de pesquisa 10 anos atrás. Espero tê-la deixado orgulhosa.

Ao professor Pedro Vieira, que nos ajudou na construção desse trabalho e que sempre esteve disponível para discussão de resultados e elaboração de experimentos.

Ao professor Henrique Serezani, que tornou possível a realização do sonho de ser pesquisadora no exterior. Sempre serei grata pela sua orientação, ensinamentos e generosidade.

Aos professores Vânia Luiza Deperon Bonato, Diego Luis Costa e Daniela Carlos pelas discussões de trabalho no Progress Report. Um agradecimento especial à Profa. Vânia, cujas dicas e conselhos contribuíram para minha formação profissional durante a pós-graduação

Aos meus amigos e colegas de laboratório atuais: Breno, Karen, Diego, Fernanda, Victor e Mariana. Agradeço a ajuda na realização deste trabalho e os momentos de descontração, leveza e paciência, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos que já passaram pelo Imunolab e permanecem no coração: Allan (Marga), Ludmilla, Ana Salina, Bruna, Júlia (Cisne), Naiara, Mandy, Matheus (Pudico) e Valéria (Vavá).

Um agradecimento especial para minha querida amiga Ludmilla, que foi minha parceira de trabalho e permanece meu exemplo de cientista e de ser humano! É um privilégio poder partilhar a vida com ela!

E um agradecimento também à Ana S., que participou da minha formação desde a iniciação científica e que foi também meu apoio pessoal e profissional nos meses de doutorado sanduíche. Sou grata pelo fortalecimento de nossa amizade, que sei que seguirá pela vida toda.

A minhas amigas da faculdade, Taísa e Maria Júlia, por estarem presentes em absolutamente todos os melhores momentos e lembranças – acadêmicas ou não – que guardo no coração.

À Bruna (Bruni) e Mariane, minhas irmãs de coração, pelos anos de amizade, companheirismo, carinho e por sempre se fazerem presentes no meu dia-a-dia, mesmo que à distância.

À Ana Cristina S. Ferreira, secretária da Pós-Graduação em Imunologia na FMRP-USP, por toda a orientação, apoio e disponibilidade para me ajudar nas dúvidas e procedimentos. Esse programa não seria de excelência se não fosse pela Ana.

À Denise Ferraz, técnica de citometria da FMRP/USP pela excelência na aquisição de amostras.

Aos funcionários da FCFAr, que cuidam com tanto carinho de nossa Universidade.

À FCFAr/UNESP, à FMRP/USP e à UNICAMP, pelo apoio institucional;

À FAPESP (PROCESSO 2018/19638-9), pelo auxílio financeiro oferecido ao meu projeto de doutorado.

À CAPES, pelo apoio financeiro e institucional durante o desenvolvimento desse trabalho.

AO CNPQ, pelo apoio financeiro e institucional durante o desenvolvimento desse trabalho.

PENTEADO, L.A. **Reprogramação metabólica de células dendríticas após eferocitose de células apoptóticas**. 2023. 113 f. Tese (doutorado). – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Resumo

A ativação celular requer a integração de vias metabólicas para sustentar o fenótipo e a função celular. A remoção de células apoptóticas (ACs), denominada eferocitose, ativa a glicólise ou a β -oxidação para reparo tecidual. Já o estímulo de receptores tipo Toll (TLR) ativa a glicólise, síntese de ácidos graxos (FAS) e um perfil celular inflamatório. A eferocitose de ACs infectadas com *Escherichia coli*, por células dendríticas (DCs), resulta em DCs imunogênicas. Entretanto, pouco se sabe sobre a modulação das vias metabólicas de DCs na presença dos componentes oriundos da degradação da AC e de produtos bacterianos. A hipótese deste estudo é de que a fagocitose de ACs levaria a um aumento da β -oxidação e da fosforilação oxidativa, resultando em DCs tolerogênicas e a eferocitose de ACs infectadas com *Staphylococcus aureus* (iACs) favorecia a interação com TLR e ativação da via glicolítica e FAS enquanto o elevado conteúdo lipídico oriundo da AC permitiria a ativação da via de β -oxidação. O sinergismo dessas vias colaboraria para a função de DCs. Nossos resultados mostraram que a eferocitose de ACs promoveu aumento da via glicolítica sem alterar fenótipo de DCs. Por outro lado, a eferocitose de iAC promoveu uma rápida ativação celular com aumento na expressão de moléculas de MHC-II e CD86 e produção de mediadores inflamatórios e IL-10. Essa ativação foi acompanhada da redução da respiração mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais e mitocôndrias disfuncionais. A eferocitose de iAC aumentou a glicólise pela ativação do fator de transcrição Hif-1 α . A inibição de vias metabólicas demonstrou que tanto a glicólise quanto a FAS são importantes para produção de IL-6, IL-1 β , nitrito e IL-10 nesse contexto. Em camundongos diabéticos, as DCs cutâneas tornam-se disfuncionais e incapazes de recrutar a resposta de linfócitos Th17 para resolver a infecção cutânea pela *S. aureus*. O transcriptoma da população CD11c⁺ isolada da pele de camundongos diabéticos infectados mostrou uma regulação negativa da expressão de *Hif1a* e de genes associados à glicólise e produção de citocinas inflamatórias. Os dados evidenciam a importância dessas vias na ativação de DCs e sugerem possíveis alvos terapêuticos para formulação de tratamentos tópicos que beneficiem indivíduos diabéticos, que são susceptíveis a infecções cutâneas.

Palavras-chave: Eferocitose. Célula dendrítica. Metabolismo. Glicólise. Infecção.

PENTEADO, L.A. **Metabolic rewiring of dendritic cells during the efferocytosis of apoptotic cells.** 2023. 113 f. Tese (doutorado). – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Abstract

Cellular activation integrates metabolic pathways to sustain cell function. The clearance of apoptotic cells (ACs), termed efferocytosis, activates glycolysis or β -oxidation for tissue repair. Toll-like receptors (TLR) stimulation activates glycolysis, fatty acid synthesis (FAS) and an inflammatory cell phenotype. Efferocytosis of *Escherichia coli*-infected ACs by dendritic cells (DCs) results in immunogenic DCs. However, little is known about the modulation of DC metabolic pathways in the presence of components derived from AC degradation and bacterial recognition. This study hypothesized that the phagocytosis of ACs would increase in β -oxidation and oxidative phosphorylation, resulting in tolerogenic DCs and the efferocytosis of ACs infected with *Staphylococcus aureus* (iACs) would favor activation of TLR, glycolysis and FAS, while the high lipid content from AC would allow activation of the β -oxidation pathway. The synergism of these pathways would contribute to DCs function. Our results showed that efferocytosis of AC promoted an increase in the glycolytic pathway without altering DC phenotype. On the other hand, iAC efferocytosis promoted rapid cell activation with increased expression of MHC-II and CD86 molecules and production of inflammatory mediators and IL-10. This activation was followed by reduced mitochondrial respiration and increased production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and dysfunctional mitochondria. Efferocytosis of iAC also enhanced glycolysis by activating the transcription factor Hif-1 α . The inhibition of metabolic pathways demonstrated that glycolysis and FAS are important to produce IL-6, IL-1 β , nitrite and IL-10 in this context. In diabetic mice, cutaneous DCs become dysfunctional and unable to recruit Th17 cell response to resolve the cutaneous *S. aureus* infection. The transcriptome of the CD11c+ population isolated from the skin of infected diabetic mice showed a downregulation of *Hif1a*, glycolysis, and production of inflammatory cytokines genes. These data shed light on the contribution of these metabolic pathways in the activation of DCs and suggest possible therapeutic targets for the formulation of topical skin treatments that benefit diabetic individuals susceptible to skin infections.

Keywords: Efferocytosis. Dendritic cell. Metabolism. Glycolysis. Infection.