THIAGO MAASS STEINER

PAPEL DA PROTEÍNA ALVO DA RAPAMICINA (MTOR) NAS VIAS METABÓLICAS E FUNÇÕES EFETORAS DE CÉLULAS B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

SÃO PAULO
2017

THIAGO MAASS STEINER

PAPEL DA PROTEÍNA ALVO DA RAPAMICINA (MTOR) NAS VIAS METABÓLICAS E FUNÇÕES EFETORAS DE CÉLULAS B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão original

SÃO PAULO
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Steiner, Thiago Maass
/ Thiago Maass Steiner; orientador Niels Olsen Saraiva Câmara. -- São Paulo, 2017.
97 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. mTOR. 2. Célula B. 3. Plasmablasto. 4. Plasmócito. 5. Vias metabólicas . I. Câmara, Niels Olsen Saraiva , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thiago Maass Steiner

Titulo da Dissertação/Tese: Papel da proteína alvo da Rapamicina (mTOR) nas vias metabólicas e funções efetoras de células B

Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Ativação e regulação de células B e de vias metabólicas no transplante experimental de órgãos***", registrado sob o protocolo nº ***8/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***28/03/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) *Niels Olsen Saraiva Camara***
- Departamento: *Imunologia*
- Membros da Equipe: *Paulo José Basso (Pós-graduando), Thiago Maass Steiner (Pós-graduando), Vinicius de Andrade Oliveira (Pós-doutorando), Claudia da Silva (Técnico de laboratório)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Activation and regulation of B cells and their metabolic pathways in experimental organ transplantation***", protocol nº ***8/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***3/28/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) *Niels Olsen Saraiva Camara***
- Team members: *Paulo José Basso (Graduate Student), Thiago Maass Steiner (Graduate Student), Vinicius de Andrade Oliveira (Postdoctoral Researcher), Claudia da Silva (Laboratory Technician)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*CD19Cre+ - raptorfl/fl*	*Macho/Male*	*6 a 10 semanas/weeks*	*56*
	CD19-Cre+ -rictor-fl/fl	*Macho/Male*	*6 a 10 semanas/weeks*	*56*
	Cd19-Cre+ -TSC1/2-fl/fl	*Macho/Male*	*6 a 10 semanas/weeks*	*56*
	Balb/c	*Macho/Male*	*6 a 10 semanas/weeks*	*30*
	CD19-Cre+ - PRKAA1-fl/fl	*Macho/Male*	*6 a 10 semanas/weeks*	*56*

São Paulo, 30 de março de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Secretário CEUA-ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

SOLICITAÇÃO DE INCLUSÃO DE METODOLOGIA À LICENÇA APROVADA PELA CEUA-ICB/USP

(ATENÇÃO: ESSE FORMULÁRIO SÓ DEVE SER UTILIZADO PARA A INCLUSÃO DE METODOLOGIAS DE PEQUENO PORTE E ESTARÁ SUJEITO À AVALIAÇÃO DA CEUA. ALTERAÇÕES CONSIDERADAS DE GRANDE PORTE DEVERÃO SER ENCAMINHADAS EM UMA NOVA PROPOSTA DE USO DE ANIMAIS)

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - ICB/USP

Solicitamos à CEUA-ICB/USP a inclusão da metodologia e inclusão dos animais abaixo listados ao certificado registrado sob nº **8/2016** intitulado "**Ativação de células B e de vias metabólicas no transplante experimental de órgãos**" e aprovado em **28/03/2016** sob a responsabilidade do Prof.(a) Dr.(a) **Niels Olsen Saraiva Câmara**, do Departamento de **Imunologia**.

(Incluir uma descrição detalhada da metodologia, incluindo delineamento experimental, descrição de quais ações foram tomadas para minimizar o uso de animais, existência de potenciais métodos alternativos, grau de invasividade e anestesia, eutanásia e potenciais substâncias ou microorganismos inoculados, incluindo concentração/dose)

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações na produção de anticorpos nos animais em estudo, nós solicitamos a inclusão da metodologia de sensibilização de camundongos transgênicos e selvagens com esplenócitos provenientes de camundongos da linhagem Balb/c. Em seguida, será realizada a análise de *crossmatch* para detecção dos níveis de anticorpos produzidos. Para isso, animais Balb/c serão eutanasiados, baços e linfonodos removidos e, então, processados para obtenção das células. Após processamento e lise de hemácias, um total de 200µL de uma suspensão de 100.10^6/mL de esplenócitos diluídos em PBS 1x estéril será injetado intraperitonealmente ou subcutaneamente nos animais. Entre 7 e 30 dias após inoculação das células, 100µL de sangue será coletado pela cauda dos animais (com intervalos mínimos de coleta de 5 dias a partir no dia 7 após a sensibilização, de modo que não exceda o número de 3 coletas no período citado por animal), e após este intervalo, os animais serão anestesiados para coleta de 600µL sangue por punção cardíaca e na sequência eutanasiados. Reitero que os procedimentos de anestesia e eutanásia seguirão o que foi proposto em protocolo já aprovado. Desta maneira, solicito aprovação para realização dos procedimentos de **sensibilização, coleta de sangue pela cauda e punção cardíaca**.

Obs.: Os procedimentos aqui descritos envolvem os animais já aprovados em protocolo anterior, além de animais C57Bl-6, BKO (fundo C57Bl-6) e controles (CD19Cre+/-fundo C57Bl/6), cujo pedido de inclusão é como segue:

Proposta(s) implica(m) em inclusão de animais?

Dedico este trabalho à minha mãe, Margaret

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Niels pela constante discussão de resultados e pela liberdade oferecida para a execução do projeto. Sua orientação e sugestões foram fundamentais para o meu amadurecimento científico durante a pós-graduação. Recebi também seu enorme auxílio para a apresentação do meu trabalho em congresso internacional e para participar do LISA na Alemanha, sem seu suporte não seria viável. Garanto que ele não imaginou que ao receber um aluno de mestrado ele estaria também adquirindo um dos melhores *food cleaners* ever known, nem as migalhas dos bolos sobreviveram.

Minha família foi fundamental nestes últimos dois anos, posso afirmar que ela foi meu maior suporte emocional. Minha mãe, Margaret, a quem dedico este trabalho, mesmo distante sempre teve uma participação ativa no meu dia-a-dia por meio de inúmeras conversas. Meu pai, Wanderlei, meu irmão, Daniel, e minhas avós, Terezinha e Amália, sempre estiveram presentes e me apoiaram nas minhas decisões e sempre estão de braços abertos apesar da distância, amo todos vocês. Um *special thanks* também ao Fábio que sempre esteve ao meu lado e ofereceu todo o suporte necessário nestes anos e até se tornou editor de figuras. Agradeço pelo companheirismo de sempre da Flávia, Marcela e Gabi que também vivem e entendem o mundo da pós-graduação, suas conversas me fizeram desligar do mundo real várias vezes. Agradeço também ao pessoal do meu antigo lab em Curitiba, todos sempre muito receptivos e torcendo pela minha carreira. E um obrigado de coração para a Jane Little que por meio das conversas por Skype semanalmente tem atuado como uma ótima psicóloga, *I'll never forget: "just take a deep breath and just be where your hands are".*

Agradeço ao Vinicius que contribuiu ativamente na elaboração do projeto e também na execução dos experimentos iniciais. Infelizmente, nosso tempo de convivência no lab não foi tão longo, mas foi o suficiente para marcar positivamente meu mestrado. Obrigado a Angela, quem sempre se dispôs a discutir os resultados e acompanhar de perto o crescimento do trabalho. Também não esquecerei nossas saídas para comer e nem as inúmeras conversas. Não poderia deixar de agradecer à

Meire pela ajuda prestada em diferentes assuntos burocráticos e por seu empenho para a manutenção do lab.

Um muito obrigado a todos que integram o Programa de Pós-Graduação em Imunologia do ICB, em especial para a Eni que sempre esteve disposta a ajudar da melhor maneira possível.

Não posso deixar de agradecer a todos do Lab LIT que participaram direta ou indiretamente do projeto. A execução de um projeto depende muito do ambiente do lab, o qual posso afirmar sempre ter sido de grande harmonia e companheirismo. Agradeço a todos do lab, em especial ao Paulo que sempre caminhou comigo durante todo o trabalho. A discussão de resultados nunca se limitou ao laboratório, mas esteve presente também durante almoços, viagens e momentos de lazer. Jamais esquecerei de todos os *helps* dentro e fora do laboratório. Além disso, não imaginei que ele pudesse se tornar um amigo em tantas situações. As viagens e as saídas em São Paulo ficarão salvas em HD externo, *you're the best man*. À Fer que eu necessitaria mais páginas do que esta dissertação apresenta para agradecer toda a ajuda em experimentos, discussão de resultados, edição de figuras, *and so on*. A Fer se tornou muito mais do que uma colega de lab, se tornou uma grande amiga, com quem pude contar em todos os momentos no lab, *you're saved in my heart*. À Marina pela amizade durante o mestrado, posso afirmar que você me fez dar boas gargalhadas e que estes dois anos não teriam sido o mesmo sem você. Tenho que agradecer também pelas inúmeras "mini-consultas"! À Naty por todas as risadas durante este período. Ao Rafa pela ajuda na discussão de resultados e também pela leitura crítica do trabalho. À Cris Aguiar por compartilhar seu entusiasmo em todos os eventos oficiais e não-oficiais do lab, já ri muito com você, e prometo não provocar mais nenhuma "chuva de bebida". Ao Tárcio por sempre estar disposto a discutir resultados durante o café. À Amanda pela companhia no café, garanto que ela começou a gostar de café mais forte. Ao Gui pelas conversas no lab e companhia ao *Food truck*. Agradeço também à Tati, Camila, Aline, Cris Naffah e Raquel com quem acabei convivendo menos, mas considero pessoas incríveis e já tive a oportunidade de ter ótimas conversas.

Um muito obrigado para a Professora Eliana Faquim por colaborar com os experimentos de imunização. À Professora Ana Paula Lepique e Ana Flavia Popi por cederem anticorpos para o trabalho. Agradeço também a ajuda do laboratório da Professora Alicia Kowaltowski por permitir e auxiliar no uso do Seahorse, e em especial a Maria Fernanda e a Camille. À toda equipe do CEFAP pelo suporte técnico, um muito obrigado ao Fernando, Mário e Jô. E um obrigado especial ao Mário por ter contribuído com a edição das imagens de microscopia.

ENTIDADES DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2015/26620-0 e 2012/02270-2) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Steiner TM. Papel da proteína alvo da Rapamicina (mTOR) nas vias metabólicas e funções efetoras de células B. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018

As células produtoras de anticorpos desempenham um papel chave na resposta efetora a microrganismos, sendo o foco principal da maioria das vacinas existentes. Entretanto, elas podem ter efeitos deletérios em doenças autoimunes e na rejeição a transplantes. Apesar de grandes avanços no controle da resposta humoral, alguns desafios permanecem e neste contexto, novos alvos terapêuticos têm sido explorados. Sabe-se que alterações metabólicas decorrentes da ativação de células B estão intimamente relacionadas com a função efetora destas células, o que anteriormente se imaginava ser apenas um reflexo de crescimento e proliferação celular. Estas alterações são controladas por sensores metabólicos ativados logo após a ativação de células B, como o mTOR, o qual é componente central de dois complexos: mTORC1 e mTORC2. Estudos anteriores já reportaram o papel positivo exercido por mTOR na via glicolítica em células T, bem como na função efetora destas células. Aqui, nós formulamos a hipótese de que a via do mTOR favorece a via glicolítica em detrimento de OXPHOS em células B, e que estas alterações metabólicas impactam as funções efetoras das mesmas. Desta maneira, para investigarmos alterações nestas vias em decorrência de mTOR, células B foram isoladas de animais controle (CT), ou de animais com células B deficientes de mTORC1 (Raptor$^{\Delta B}$) ou mTORC2 (Rictor$^{\Delta B}$) e então estimuladas com LPS (lipopolissacarídeo) *in vitro*. Nossos dados indicam que a deficiência de mTORC2 beneficia OXPHOS em detrimento da via gicolítica, bem como a ativação de células B e a formação de plasmablastos. Na sequência, confirmamos que a redução nas taxas de glicólise, assim como a elevação da oxidação lipídica e de OXPHOS são cruciais para manter a elevada ativação de células B e formação de plasmablastos a partir de células B Raptor$^{\Delta B}$ e Rictor$^{\Delta B}$. Constatou-se ainda que a produção total de IgM é elevada em células Rictor$^{\Delta B}$ após estímulo com LPS. Entretanto, identificamos que isso é decorrente do aumento de plasmablastos formados e não da capacidade individual de secreção dos mesmos. Diferentemente das células B deficientes, observamos que plasmablastos Raptor$^{\Delta B}$ e Rictor$^{\Delta B}$ reduzem a atividade mitocondrial. Na sequência, confirmamos que a atividade mitocondrial via oxidação lipídica é fundamental para a produção de anticorpos. Além disso, demonstramos que a deficiência de mTORC2 eleva a troca de isotipo, enquanto a de mTORC1 a diminui após estimulo com LPS e IL4. Posteriormente, o impacto da deficiência de mTORC2 em células B foi avaliado *in vivo* em modelo de transplante de pele. Neste caso, não observamos diferenças significativas na sobrevida do enxerto entre CT e Rictor$^{\Delta B}$, mas foi constatado que apesar de ambos apresentarem formação de plasmócitos similares, animais deficientes apresentaram um número significativamente menor de células B na periferia. Assim, concluímos que a deficiência de mTORC1 ou mTORC2 em células B implica em uma maior diferenciação de plasmablastos e em uma maior produção total de anticorpos em Rictor$^{\Delta B}$ *in vitro,* enquanto um papel funcional para essas moléculas no contexto das células B *in vivo* ainda precise ser determinado.

Palavras-chave: Plasmablastos. Plasmócitos. Células B. mTOR. Vias metabólicas.

ABSTRACT

Steiner TM. Role of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) on metabolic pathways and effector function of B cells. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Antibodies are produced by Antibody Secreting Cells (ASCs), which are essential to fight infections. They are also the basis of most successful vaccines available, however they can present deleterious effects in autoimmune diseases and in graft rejection. Even though there have been great improvements in controlling the humoral response, its proper manipulation still remains a challenge, thus new targets need to be explored. It is known that metabolic shifts that occur upon B cell activation are not only essential for cell growth and proliferation, but are also interconnected with these cells effector function. Metabolic shifts are controlled by metabolic sensors, as the mTOR, which is a core component of two complexes, mTORC1 and mTORC2. Previous studies with T cells have already reported that mTOR exerts a positive role on glycolysis, which in turn impacts the effector function of T cells. We then hypothesized that mTOR favors glycolysis over Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) in B cells, and that these metabolic changes impact the effector function of B cells. Thus, to investigate the impact of the mTOR pathway on B cells, we isolated B cells from mice with mTORC1 deficient B cells (Raptor$^{\Delta B}$) or mTORC2 deficient B cells (Rictor $^{\Delta B}$) or Control mice (CT), and stimulated them *in vitro* with lipopolysaccharide (LPS). Our results indicate that the deficiency of mTORC2 favors OXPHOS over glycolysis, as well as B cell activation markers expression and plasmablast formation. Next, we confirmed that the reduced glycolysis levels, improved lipid oxidation and OXPHOS are in fact crucial for the enhanced activation and plasmablast formation observed in Raptor$^{\Delta B}$ and Rictor$^{\Delta B}$ B cells. We also described that IgM secretion was elevated in B cells from Rictor$^{\Delta B}$ after stimuli with LPS, however we found that this increase was due to the overall increase in plasmablasts in this group and not to their individual antibody secretion capacity. Interestingly, Raptor$^{\Delta B}$ and Rictor$^{\Delta B}$ plasmablasts differently from B cells, reduce their mitochondrial activity. Subsequently, we confirmed that the mitochondria via lipid oxidation is actually essential for antibody secretion. In addition, we showed that mTORC2 deficiency increases isotype switching, while mTORC1 deficiency diminishes it when IL4 was added to LPS. We then sought to determine if mTORC2 deficiency in B cells would present an impact *in vivo* in a skin graft model. However, we did not observe a significant difference in graft survival between the CT and Rictor$^{\Delta B}$ mice and in plasmacyte numbers, but we did observe a significant reduction in B cells in the periphery. Thus, we conclude that mTORC1 and mTORC2 deficiency leads to an improved plasmablast differentiation and an overall increase in antibody secretion in the last one *in vitro*, whereas the role of these sensors remains to be determined *in vivo.*

Key words: Plasmablasts. Plasmocytes. B cells. mTOR. Metabolic pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ativação de células B T-dependente.....22

Figura 2 - Ativação da via PI3K-AKT-mTOR em células B.....27

Figura 3 - Representação das principais vias metabólicas para geração de ATP em células B..... 29

Figura 4 - Géis de agarose representativos das reações de genotipagens utilizadas para a geração dos animais Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$.....41

Figura 5 -. Modelo experimental 1.....50

Figura 6 -. Modelo experimental 2.....50

Figura 7 - Modelo experimental 3.....51

Figura 8 - LPS foi capaz de ativar eficientemente células B.....53

Figura 9 - LPS na presença de IL4 ativou eficientemente células B 55

Figura 10 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC2.....57

Figura 11 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam níveis reduzidos de glicólise aeróbica.....60

Figura 12 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam os níveis de OXPHOS.....61

Figura 13 - OXPHOS beneficia a ativação de células B e sua diferenciação em plasmablastos.....60

Figura 14 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam a expressão de IgM.....64

Figura 15 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ possuem diferenciação elevada em plasmablastos e de troca de isotipo.....65

Figura 16 - Redução das taxas de glicólise aeróbica é essencial para o aumento de plasmablastos observado em Rictor$^{\Delta B}$.....66

Figura 17 - Aumento de OXPHOS eleva ainda mais a diferenciação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$.....67

Figura 18 - Inibição da oxidação lipídica inibe o aumento observado em plasmablastos de Rictor$^{\Delta B}$.....68

Figura 19 - Diferenciação de células B em plasmablastos eleva os níveis de glicólise aeróbica e de captação de glicose.....70

Figura 20 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ após diferenciação em plasmablastos reduzem a massa e potencial de membrana.....70

Figura 21 - Plasmablastos apresentam menor massa e potencial de membrana em relação as células B.....71

Figura 22 - Plasmablastos diferenciados de células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam produção de anticorpos afetada.....72

Figura 23 - Inibição da oxidação lipídica reduz a produção de anticorpos.....73

Figura 24 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC1.....73

Figura 25 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ apresentam níveis reduzidos de glicólise aeróbica...74

Figura 26 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ elevam os níveis de OXPHOS.....75

Figura 27 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ são mais ativadas e elevam a diferenciação em plasmablastos, mas reduzem a troca de isotipo.....77

Figura 28 - Inibição da oxidação lipídica inibe o aumento observado em plasmablastos de Raptor$^{\Delta B}$.....78

Figura 29 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ após diferenciação em plasmablastos reduzem a massa e potencial de membrana e elevam a captação de glicose.....79

Figura 30 - Animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentam taxas de rejeição de transplante de pele similares a animais CT.....80

Figura 31 - Animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentam elevada diferenciação em plasmócitos em resposta ao transplante de pele.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers utilizados para a geração dos animais Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$.....41

Tabela 2 - Sequência de primers utilizados para caracterização metabólica de células B.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	Ativação induzida citidina deaminase
ACLY	ATP cytrate lyase
ATP	Adenosina trifosfato
BAFF	B-cell activating factor
BCAP	B-cell PI3K adaptor PI3K
BCR	Receptores de células B
Bp	Pares de bases
Btk	*Bruton's tyrosine kinase*
Células B FO	Células B Foliculares
Células B MZ	Células B da Zona Marginal
CPT1a	Carnitine Palmitoyl Transferase I
CSR	Troca de isotipo
CT	Controle
DAG	Diacilglicerol
Deptor	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DSA	Anticorpos específicos anti-doador
ECAR	Taxas de acidificação extracellular
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
FASN	*Fatty Acid Synthase*
Glut1	Transportador de glicose 1
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HK2	Hexokinase 2
HM-Ser473	C-terminal hydrophobic motif na Serina 473

IL4	Interleucina 4
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
ITAM	Motivo de Ativação do Imunorreceptor Baseado em Tirosina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein8 the proline rich
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase–
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
mTOR	Proteína alvo da rapamicina,
mTORC1	Proteína alvo da rapamicina complexo 1
mTORC2	Proteína alvo da rapamicina complexo 2
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
2NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2 Deoxyglucose
OCR	Taxas de consume de oxigênio
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PDK1(via PI3K-AKT)	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase
PFK1	Fosfofrutoquinase I
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PRAS40	*Proline rich AKT substrate 40 kDa*
Protor-1	protein observed with Rictor-1
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões moleculares

Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Raptor$^{\Delta B}$	Célula B deficiente de mTORC1
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
Rictor$^{\Delta B}$	Célula B deficiente de mTROC2
RNA	Ácido ribonucleico
qPCR	Reação quantitativa da polimerase em cadeia
SBF	Soro Fetal Bovino
SH	hipermutação somática
SRC	Capacidade respiratória reserva
TBS-T	Tris-Buffered Saline na presença de Tween-20
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
T_{FH}	Células T Foliculares
TLR	Receptor do tipo toll
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TSC	Complexo da esclerose tuberosa
WT	Camundongos selvagens

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 Ativação clássica de células B 22
1.2 mTOR como sensor metabólico e seus impactos diretos na função imune de células B 24
1.3 Principais vias metabólicas em células B: glicólise aeróbica versus OXPHOS 27
1.4 Vias metabólicas e seus impactos nas células B 30
1.5 Papel das células B e de vias metabólicas no contexto do transplante 32
1.6 Justificativa 35
1.7 Hipótese 37
2 OBJETIVOS 38
2.1 Objetivo Geral 38
2.2 Objetivos específicos: 38
3 MATERIAL E MÉTODOS 39
3.1 Animais 39
3.2 Geração dos animais deficientes de mTORC1 e mTORC2 e genotipagem 39
3.3 Sorting de células B CD19$^+$ 41
3.4 Estímulo de células B CD19$^+$ e incubação com Etomoxir 42
3.5 Western blot 43
3.6 Captação de glicose 44
3.7 Massa mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial 44
3.8 Citometria de Fluxo 44
3.9 Expressão gênica de células B incubadas com LPS 45
3.10 Avaliação de estresse mitocondrial e glicolítico 46
3.11 Dosagem de lactato e glicose do sobrenadante de cultura 47
3.12 Determinação dos níveis de IgM no sobrenadante de cultura por ELISA. 48
3.13 Microscopia confocal 48
3.14 Transplante de pele 49
3.15 Análises estatísticas: 49
3.16 Síntese dos modelos experimentais 50
4 RESULTADOS 52
4.1 Células B estimuladas com LPS foram eficientemente ativadas 52

4.2 Células B estimuladas com LPS e IL4 foram eficientemente ativadas 54

4.3 Células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC2 56

4.4 Células B deficientes em mTORC2 apresentam redução nos níveis de glicólise aeróbica e aumento em OXPHOS após 72 horas de cultura com LPS..57

4.5 Aumento em OXPHOS beneficia a formação de plasmablastos 62

4.6 Células B Rictor$^{\Delta B}$ são mais ativadas e apresentam níveis de diferenciação em plasmablastos e troca de isotipo aumentados 63

4.7 Redução nas taxas de glicólise aeróbica e aumento de OXPHOS é essencial para o aumento de plasmablastos observado em Rictor$^{\Delta B}$ 65

4.8 Células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ aumentam a atividade glicolítica e diminuem sua massa e função mitocondrial após diferenciação em plasmablastos 68

4.9 Células B reduzem a massa e potencial mitocondrial após diferenciação em plasmablastos 70

4.10 Células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam a produção total de IgM, mas possuem a capacidade de produzir anticorpos reduzida após diferenciação em plasmablastos 71

4.11 Inibição da oxidação lipídica afeta negativamente a produção de anticorpos por plasmablastos 72

4.12 Células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC1 73

4.13 Células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução nos níveis de glicólise aeróbica após 72 horas de cultura com LPS 74

4.14 Células B Raptor$^{\Delta B}$ são mais ativadas e aumentam a diferenciação em plasmablastos, mas reduzem a troca de isotipo 76

4.15 Inibição da oxidação lipídica reduz o aumento da formação de plasmablastos provenientes de células B de Raptor$^{\Delta B}$ 78

4.16 Células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ aumentam a captação de glicose e diminuem sua massa e função mitocondrial após diferenciação em plasmablastos 79

4.17 Animais Rictor$^{\Delta B}$ submetidos a transplante de pele apresentam níveis de rejeição similares a animais CT 80

5. DISCUSSÃO 83

6 CONCLUSÕES 90

REFERÊNCIAS* 93

1 INTRODUÇÃO

A produção de anticorpos é fundamental na resposta a inúmeros microrganismos e mecanismo de ação de grande parte das vacinas existentes. Por outro lado, a resposta humoral pode representar uma ameaça como no contexto de doenças autoimunes, tais como lúpus sistêmico eritematoso e artrite reumatoide, bem como na rejeição a transplantes (1-3) .

Anticorpos são produzidos por células B diferenciadas em células produtoras de anticorpos, sendo estas compostas por plasmablastos e plasmócitos (4). Plasmablastos, assim como células B, apresentam capacidade migratória, bem como de divisão e diferenciação em plasmócitos, os quais são caracterizados pela grande produção de anticorpos e por perderem as demais capacidades citadas (4).

Células B são geradas a partir de células B imaturas na medula óssea e terminam seu processo de maturação no baço, onde adquirem a expressão de IgD em sua membrana (4). As células B podem ser categorizadas em células B1 e células B2, sendo esta última subdividida em células B foliculares (célula B FO) e células B da Zona Marginal (célula B MZ) (4). Células B1 estão localizadas na cavidade pleural e peritoneal e em mucosas, já as células B MZ estão situadas no seio marginal do baço. A localização destas duas populações permite uma resposta rápida a patógenos circulantes (5). Por outro lado, células B FO compõem o subtipo predominante e estão localizadas nos folículos linfoides de linfonodos e baço (5). Estas células respondem predominantemente a antígenos proteicos capazes de ativarem concomitantemente células T $CD4^+$, as quais auxiliam as células B FO em uma resposta conhecida como T-dependente (4). A resposta a antígenos T-dependentes ocorre em dois passos: em um primeiro momento, sem a contribuição de células T $CD4^+$, ocorre a rápida formação de plasmócitos de vida curta e é conhecida como resposta extra-folicular (6). No estágio subsequente, algumas das células previamente ativadas reentram o folículo por meio da orientação de células T Foliculares (T_{FH}), o que leva a ativação da enzima de ativação induzida citidina deaminase (AID, do inglês *activation-induced cytidine deaminase*) nestas células, responsável pela troca de isotipo (CSR, do inglês *Class Switch Recombination*) e hipermutação somática (HS, do inglês *Somatic Hypermutation*). No folículo estas

células passam por intensa proliferação e são constantemente selecionadas para o aumento da afinidade ao antígeno após o processo de HS **(Figura 1)**. Como produto final são gerados plasmócitos de vida longa, capazes de produzirem constantemente altos níveis de anticorpos, e células B de memória, capazes de proliferarem rapidamente e se diferenciarem em plasmócitos após reencontro com seu antígeno cognato (4, 7) **(Figura 1)**.

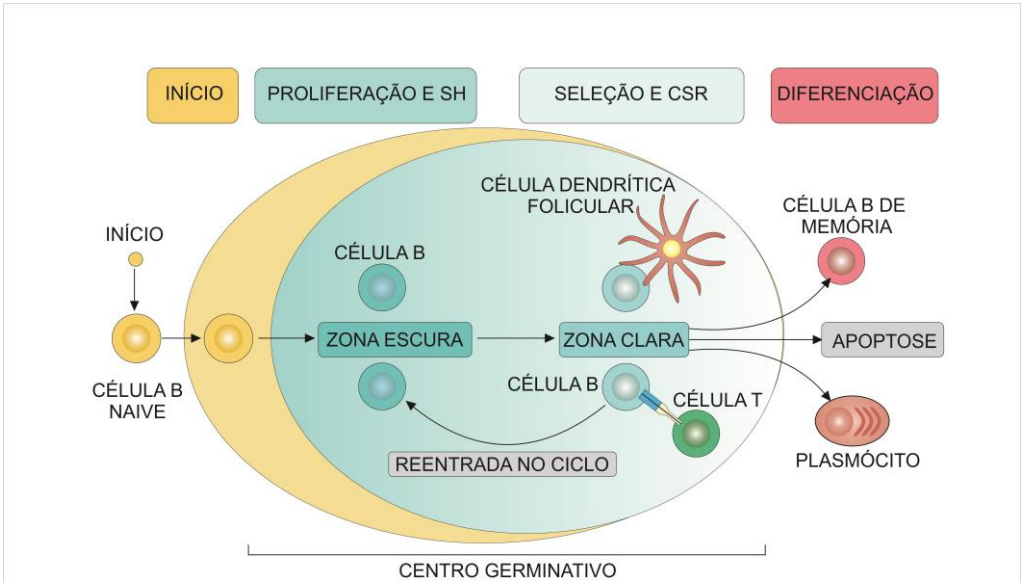


Figura 1 - **Ativação de células B T-dependente.** Após reconhecimento do antígeno, células B são ativadas e migram para fora do folículo, onde podem proliferar rapidamente. Entretanto, algumas das células B recém ativadas podem retornar ao folículo (região azul) por meio do auxílio de células T_{FH}. No folículo, células B passam por intensa proliferação (região azul escura) e pelos processos de HS e CSR, sendo assim selecionadas por afinidade ao antígeno. Desta maneira as células que não foram capazes de aumentar a afinidade ao antígeno entram em apoptose por não conseguirem competir pelos sinais de sobrevivência (região azul claro). Células B com alta afinidade ao antígeno podem então se diferenciar tanto em plasmócitos de vida longa, os quais produzem anticorpos de alta afinidade, como em células B de memória. Adaptado de Basso et al. 2015 (8).

1.1 Ativação clássica de células B

Células B apresentam receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*), pertencentes ao grupo dos Receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like Receptors*), que desempenham um papel crucial na ativação destas células (9). Grande parte dos TLRs sinalizam via a molécula adaptadora *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88). Entretanto TLR3 sinaliza apenas via *TIR-domain-containing adapter-inducing*

interferon-β (TRIF), enquanto que TLR4 sinaliza através de ambas proteínas (9). Em uma resposta T-independente, TLRs desempenham papel essencial na resposta humoral, como na produção de IgM. Por outro lado, em uma resposta T-dependente, TLRs atuam como adjuvantes (10, 11). Além do reconhecimento de patógenos por PRRs, células B apresentam em sua superfície receptores de células B (BCRs, do inglês *B Cell Receptors*), os quais são capazes de se ligarem diretamente a antígenos, promoverem sua endocitose e consequente apresentação para células T.

BCRs estão associados com as cadeias Igα e Igβ, as quais estão também associadas ao Motivo de Ativação do Imunorreceptor Baseado em Tirosina (ITAM, do inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) (12). Quando o BCR se liga a um antígeno multivalente ocorre a ativação de tirosina quinases da família do Src (Fyn, Blk e Lyn), que fosforilam os ITAMs. Os ITAMs fosforilados permitem a ligação da tirosina quinase Syk (12). Após isso, Syk ativada é capaz de fosforilar outros alvos como BLNK que, por sua vez, é capaz de ativar a *Bruton's tyrosine kinase* (Btk) (12). Btk pode então fosforilar a Fosfolipase *C* γ (PLC-γ, do inglês *Phospholipase C*), a qual clivará Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2, do inglês *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) em Diacilglicerol (DAG) e Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3, do inglês *Inositol 1,4,5-triphosphate*) (12). Esta cascata levará a sinalização via cálcio e outras quinases que resultarão na ativação de fatores de transcrição e moléculas de expressão essenciais para proliferação e diferenciação de células B em plasmócitos, tais como Blimp1 e CD138 (12).

Sabe-se que Syk além de ativar BLNK, é também capaz de fosforilar o co-receptor de células B CD19 e o *B-cell PI3K adaptor* (BCAP), o que permite a ligação da quinase fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K, do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*) e sua posterior ativação (13, 14) **(Figura 2)**. A ativação da quinase PI3K também ocorre após ativação de TLRs, embora o mecanismo ainda não esteja completamente elucidado.

A ativação da via PI3K/AKT em células B tem ganhado grande atenção devido ao papel crítico que exerce na atividade metabólica destas células (15). Por exemplo, a inibição de PI3K com o composto Ly294002 ou a deficiência em uma das subunidades de PI3K foi capaz de reduzir significativamente a expressão do transportador de glicose Glut1 e o transporte de glicose em células B após estímulo com anti-IgM (16). Atualmente, sabe-se que a ativação das células do sistema imune,

incluindo as células B, envolve mecanismos muito mais complexos do que a ativação clássica, como aqui anteriormente apresentada. Após a ativação das vias de sinalização de células B ocorrem também profundas alterações metabólicas, as quais são cuidadosamente reguladas por vias específicas como a de PI3K/AKT (15). O metabolismo celular não é apenas essencial para o crescimento e proliferação celular, mas é finamente regulado e capaz de ditar muitas das funções efetoras de células B. Trabalhos sugerem que a atividade mitocondrial e a síntese lipídica de células B, por exemplo, estão diretamente relacionadas à formação de plasmablastos/plasmócitos e produção de anticorpos (17, 18). O impacto das vias metabólicas na função efetora de células do sistema imune e, consequentemente, no desfecho da resposta inflamatória tem ganhado grande relevância atualmente a ponto de ter se tornado uma nova área na Imunologia conhecida como Imunometabolismo.

1.2 mTOR como sensor metabólico e seus impactos diretos na função imune de células B

Como mencionado, a via PI3K/AKT é capaz de modular a atividade metabólica de células do sistema imune, isto ocorre por meio da ação de sensores metabólicos, como a proteína alvo da rapamicina (mTOR, em inglês *Mechanistic Target of Rapamycin)* (19, 20) **(Figura 2)**.

mTOR, é uma serina treonina quinase descoberta após observação dos efeitos imunossupressores de um composto isolado de *Streptomyces hygroscopicus,* mais tarde chamado de rapamicina (21). Os esforços para a compreensão dos mecanismos de ação da rapamicina levaram a descoberta de mTOR, o qual é seu alvo principal (22, 23). mTOR é transcrito de um único gene, cujo produto proteico é componente central de dois complexos distintos, mTORC1 e mTORC2 (24). mTORC1 é composto por cinco subunidades: mTOR (unidade catalítica), *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor); *mammalian lethal with Sec13 protein8* (mLST8); *the proline rich AKT substrate 40 kDa* (PRAS40); *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor). Já mTORC2 é composto por seis subunidades: mTOR, *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor); *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein* (mSIN1); *protein observed with Rictor-1*

(Protor-1); mLST8; Deptor (24). A via do mTOR é capaz de integrar fatores ambientais para regular crescimento, proliferação e sobrevivência celular, tanto por meio do aumento da atividade glicolítica quanto da expressão de transportadores de aminoácidos nas células. (25, 26). Além disso, fatores de crescimento e citocinas podem ativar a molécula, bem como a ativação de células B por meio de TLRs e BCRs, como já mencionado (27) **(Figura 2)**.

A ativação de mTORC1 é conhecida em maiores detalhes, enquanto a de mTORC2 ainda é pouco explorada (27). Com relação a mTORC1, sabe-se que a ativação de PI3K gera o mensageiro secundário PIP3, o qual pode ativar a *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) (28). PDK1 é então capaz de fosforilar AKT em seu sítio catalítico na Treonina 308 (T-loop-Tre308) (28) **(Figura 2)**. A fosforilação de AKT leva a fosforilação e inativação do complexo da esclerose tuberosa (TSC, do inglês T*uberous Sclerosis Complex*), regulador negativo de mTOR (29). Apesar da ativação de mTORC2 ser menos conhecida, o complexo, diferentemente de mTORC1, é também capaz de fosforilar AKT no sítio *C-terminal hydrophobic motif* na Serina 473 (HM-Ser473) (30, 31).

O papel exercido por mTOR, mais especificamente de mTORC1, em células B tem sido estudado desde 1990 com o uso do seu inibidor rapamicina. Os estudos iniciais mostraram que rapamicina é capaz de inibir a ativação de células B e impedir sua proliferação por uma variedade de estímulos, tais como anti-IgM, LPS, Fator ativador de células B (BAFF, do inglês *B-cell-activating factor of the tumour-necrosis-factor Family*) e anti-CD40 (32-35). Além disso, rapamicina foi capaz de inibir a formação de plasmócitos de vida curta, bem como a produção de anticorpos (36, 37). Entretanto, em outro estudo foi observado que células B tratadas com rapamicina e incubadas com LPS ou LPS na presença de IL4, elevaram a frequência de células B IgM^+ (38). Além disso, foi relatado que o uso de rapamicina ou de animais contendo apenas células B deficientes de mTORC1 promoveu proteção contra diferentes cepas letais de Influenza devido a reatividade cruzada dos anticorpos após vacinação (38). Foi observado que estes animais não desenvolviam anticorpos IgG1 de alta afinidade como os animais controle, mas apresentavam altos níveis de anticorpos IgM de baixa afinidade, os quais foram capazes de eficientemente neutralizar cepas letais de Influenza (38). Este último trabalho

destaca o impacto de mTORC1 em atuar negativamente na produção de IgM, cuja inibição da proteína foi capaz de promover proteção.

Há também na literatura estudos que relatam o impacto da redução da atividade de mTORC2 em células B. É descrito que animais contendo células B deficientes de mTORC2 apresentavam capacidade de sobrevivência e de proliferação celular afetadas, bem como uma redução na geração de células produtoras de anticorpos e menores níveis de IgM e IgG após serem imunizados (39). Em contraste, em outro trabalho foi descrito que células B deficientes de mTORC2 não apresentavam alterações na sobrevivência, proliferação e nem na formação de plasmablastos após estímulo *in vitro* com LPS e elevavam a troca de isotipo de IgM para IgG1 (40). Dentre as explicações plausíveis para as diferenças encontras sobre o papel de mTORC2 no processo de ativação das células B estão os diferentes modelos animais utilizados pelos pesquisadores, e os níveis distintos de redução na atividade de mTORC2 em células B.

Como descrito, mTOR é capaz de controlar uma série de funções efetoras de células B, embora o mecanismo de ação nem sempre seja evidenciado. Por outro lado, há na literatura um número significativo de estudos, como os envolvendo células T, que reportam a ação de sensores metabólicos nas funções efetoras destas células por meio de alterações nas vias metabólicas (27, 41, 42). Com base em estudos de células T é plausível levantar a hipótese de que as alterações na função efetora de células B decorrentes da atividade de mTOR sejam consequência de modificações provocadas por este sensor em suas vias metabólicas, uma vez que não há estudos detalhados que relatem o impacto de mTOR diretamente nas vias metabólicas de células B.

De modo geral, mTORC1 e mTORC2 possuem efeitos diretos nas vias metabólicas de células do sistema imune, sendo uma das mais impactadas a via glicolítica (43-45).

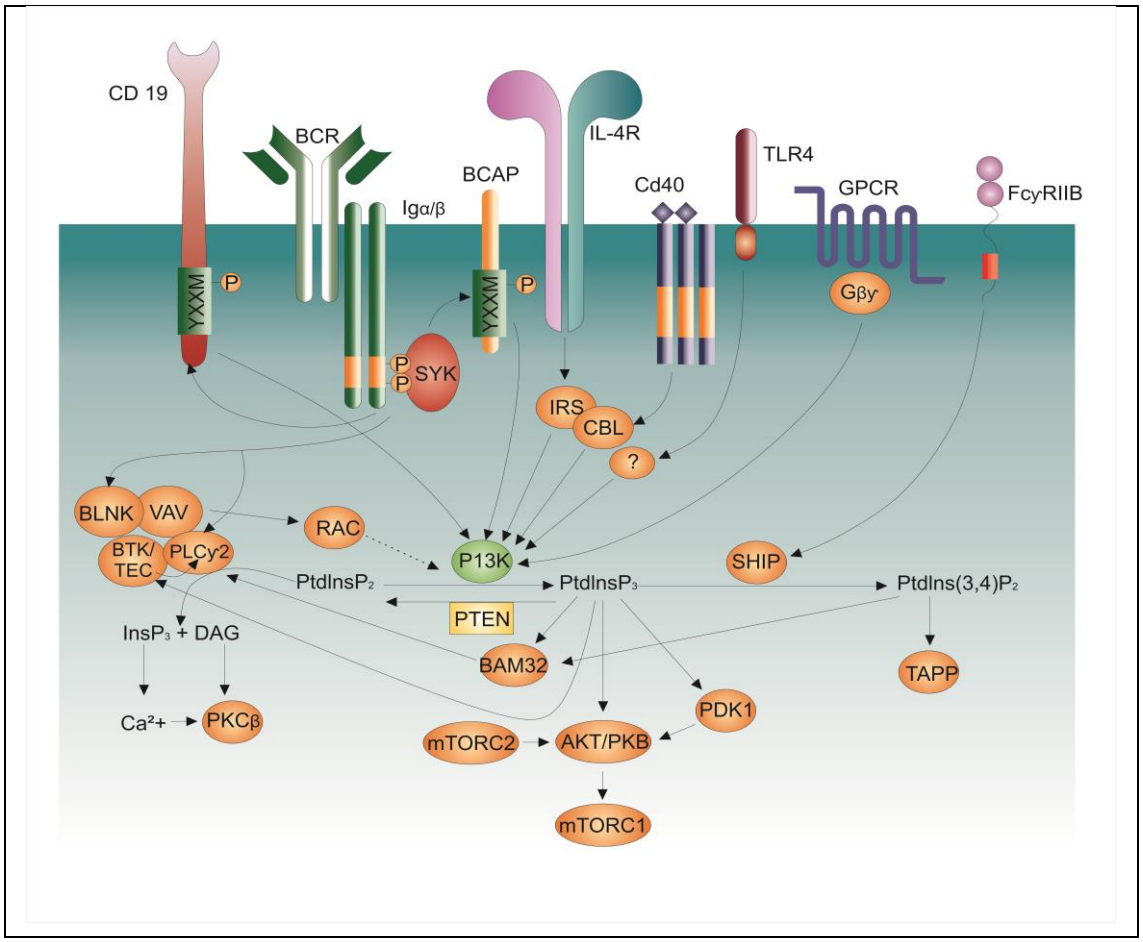


Figura 2 - Ativação da via PI3K-AKT-mTOR em células B. Representação da ativação da via PI3K-AKT em células B. Células B podem ser ativadas de diferentes maneiras, como por meio da ligação de antígenos ao BCR ou reconhecimento de PAMPs por PRRs presentes nestas células. A ativação de PI3K via BCR não é completamente conhecida. Entretanto, sabe-se que pode ocorrer após ativação de BCR/Syk, o que leva a ativação de BLNK, o qual é capaz de fosforilar o co-receptor de células B CD19 e BCAP. A fosforilação de CD19 e BCAP pode ativar a quinase PI3K. Os mecanismos pelos quais PI3K é ativado via TLR4 também não são totalmente conhecidos. Após ativação, PI3K é capaz de gerar o mensageiro secundário PIP3, o qual pode ativar PDK1. PDK1 é, então, capaz de fosforilar AKT em seu sítio catalítico na Treonina 308. AKT pode ainda ser fosforilada por mTORC2 na Serina 473. A ativação de AKT por meio da fosforiação de seus sítios catalíticos é então capaz de ativar mTORC1. Adaptado de: Okkenhaugh & Vanhaesebroeck, 2003 (19).

1.3 Principais vias metabólicas em células B: glicólise aeróbica versus OXPHOS

Várias vias metabólicas são essenciais para manter as atividades e funções das células do sistema imune, sendo que a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) são as mais conhecidas. A glicose é transportada para as células por meio de transportadores de glicose, como o GLUT1, principal transportador em linfócitos (46, 47). Cada molécula de glicose metabolizada pela via glicolítica gera duas moléculas de piruvato e um saldo positivo de duas moléculas de Adenosina trifosfato (ATP) (47). O piruvato pode ser transportado para a mitocôndria e iniciar

o TCA para gerar diferentes fatores, entre eles $NADH^+$ e $FADH_2^+$, os quais podem transferir elétrons para a cadeia transportadora de elétrons e gerar um elevado número de moléculas de ATP pelo processo conhecido como fosforilação oxidativa (OXPHOS) (47). Por outro lado, para manutenção do fluxo glicolítico e de biossíntese, o piruvato pode ser reduzido à lactato, gerando um saldo positivo de duas moléculas de ATP e um elevado número de intermediários metabólicos, essenciais para síntese e proliferação celular. Este processo normalmente ocorre apenas na ausência de oxigênio (uma vez que ele é energeticamente desfavorável), sendo conhecido como fermentação (47, 48). Entretanto, a redução de piruvato a lactato pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio. A escolha da célula em preferencialmente realizar glicólise em detrimento do TCA, mesmo na presença de oxigênio, é chamada de glicólise aeróbica ou *Warburg Effect,* inicialmente descrito em células tumorais (48) **(Figura 3)**.

O TCA pode ainda ser alimentado pela oxidação de lipídeos e pela glutaminólise. Lipídeos de cadeia curta podem acessar passivamente a mitocôndria, enquanto lipídeos de cadeia média e longa necessitam primeiro ser conjugados à carnitina pela enzima mitocondrial *Carnitine Palmitoyl Transferase I* (CPT1a) (49). Uma vez localizados na mitocôndria estes lipídios podem ser oxidados por um processo conhecido como β-oxidação, o que gerará grande quantidade de acetil-CoA, NADH e $FADH_2$ (50) **(Figura 3)**.

Durante o TCA, o citrato é produzido e pode ser utilizado na síntese de lipídeos após seu transporte para o citoplasma. A enzima *ATP cytrate lyase* (ACLY) é a responsável pela conversão do citrato gerado na mitocôndria em acetil-CoA no citoplasma. Acetil-CoA pode então ser carboxilado e gerar malonil-CoA. Na sequência, a enzima *Fatty Acid Synthase* (FASN) pode então catalisar a elongação da crescente cadeia de lipídeos (51) **(Figura 3)**.

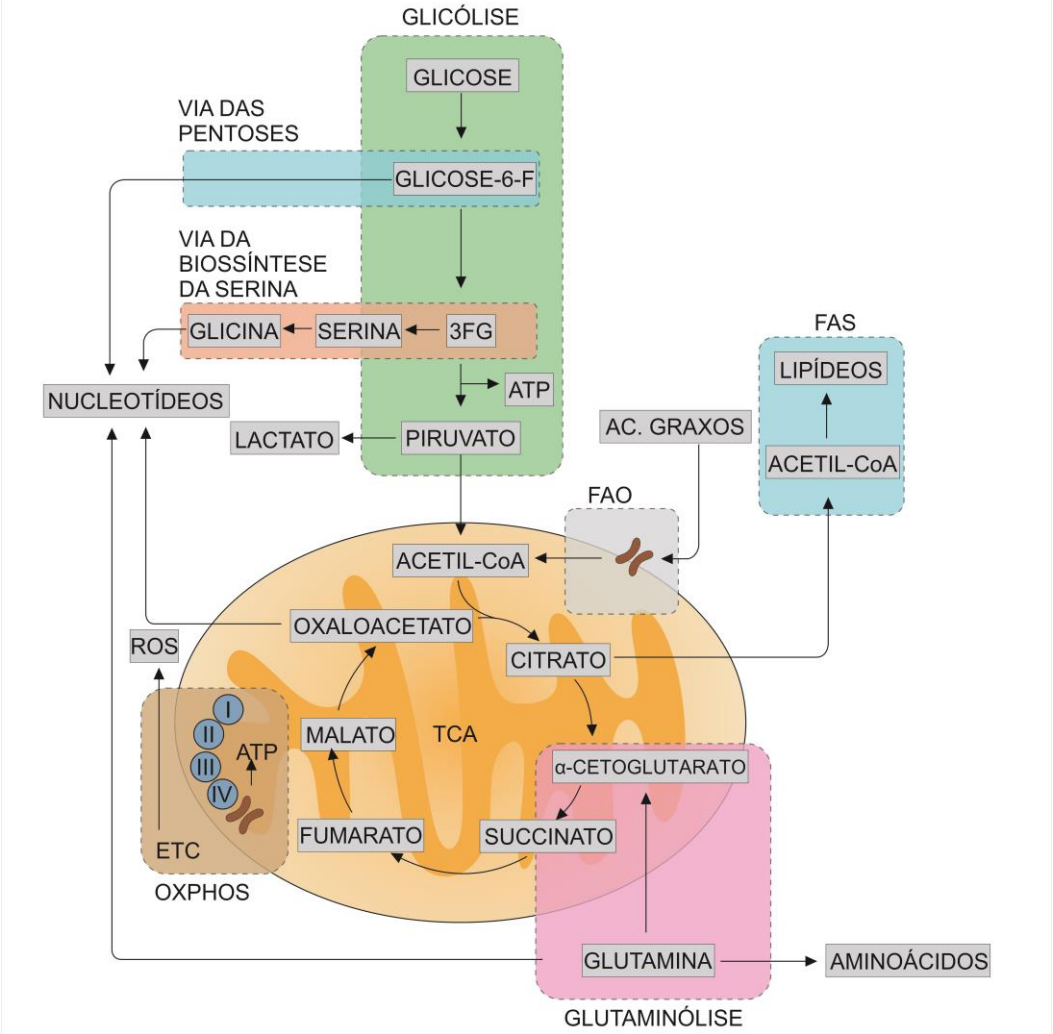


Figura 3 - Representação das principais vias metabólicas para geração de ATP em células B. O ATP pode ser gerado de diferentes formas, uma das mais eficientes é por meio do TCA e da cadeia respiratória de elétrons (OXPHOS) (áreas laranja e marrom, respectivamente). O TCA pode ser alimentado por diferentes vias, uma das mais comuns é por meio da glicólise (verde). A glicose, após capturada pela célula, pode entrar na via glicolítica e ser convertida em lactato, o que gerará um saldo positivo de apenas 2 ATPs. Por outro lado, o piruvato pode ser transportado do citoplasma para a mitocôndria, onde entrará no TCA (laranja) e ser convertido em acetyl-CoA. Durante o TCA será gerado uma série de agentes reduzidos, cujos elétrons serão utilizados para alimentar a OXPHOS (marrom), o que levará a um alto rendimento energético. Alternativamente a glicólise pode produzir uma série de intermediários que auxiliarão no crescimento e proliferação celular, como na produção de nucleotídeos por meio da via das pentoses e da biossíntese de serina, (azul e vermelho, respectivamente). O TCA pode ser alimentado ainda pela glutaminólise (roxo) e pela oxidação lipídica (cinza). Além disso, o TCA também pode suportar a síntese de aminoácidos por meio do oxaloacetato produzido, ou ainda a síntese lipídica (azul) por meio da conversão do citrato produzido no TCA em acetil-CoA no citoplasma. Adaptado de Buck et al. 2015 (41)

1.4 Vias metabólicas e seus impactos nas células B

A ativação de células B leva a alterações metabólicas após interpretação de sinais presentes no meio, tais como citocinas e fatores de crescimento, por sensores metabólicos, como mTOR (27). Estes sinais determinam quais alterações metabólicas devem ocorrer afim de que as demandas das células recém ativadas sejam atendidas (27). Entretanto, os estudos sobre o controle de funções efetoras de células B por meio de alterações metabólicas desencadeadas pelo mTOR ainda são escassos. O impacto de mTOR nas vias metabólicas como causa de alterações na função efetora foi descrito em maiores detalhes em células T. Estas células, após ativação, elevam significativamente os níveis de glicólise aeróbica e de OXPHOS, com especial aumento nas taxas da primeira via (52, 53). Estudos apontam que o aumento da atividade glicolítica nestas células ocorre após ativação dos fatores de transcrição HIF1α e MYC por mTORC1, os quais induzem a transcrição de genes relacionados a transportadores de glicose e da via glicolítica (43, 44). Pollizzi e colaboradores também reportaram que células T $CD8^+$ deficientes de mTORC1 ou mTORC2 aumentam as taxas de OXPHOS, o que mostra que mTOR preferencialmente beneficia a glicólise aeróbica em detrimento da OXPHOS (54). Uma vez tendo ocorrido a eliminação do antígeno, a maior parte das células T efetoras morrem e uma subpopulação de células T de memória permanece. Esta subpopulação sobrevivente é especialmente dependente da atividade mitocondrial, em especial da oxidação lipídica para sua manutenção e não de glicólise aeróbica (55). Quando células T são impedidas de adotarem vias metabólicas específicas, como a glicólise aeróbica, sua diferenciação e função efetora podem ser afetadas, bem como o desfecho da resposta imune (53, 55).

Em células B, sabe-se que essas também passam por significativas alterações metabólicas, muitas das quais essenciais para suas funções efetoras, embora não tenha sido descrito o impacto de mTOR nestas vias. Células B, assim como células T, elevam significativamente os níveis de captação de glicose extracelular após ativação, a qual é metabolizada pela via glicolítica (56). Apesar de células B elevarem significativamente as taxas de glicólise aeróbica, estas células também elevam a OXPHOS a taxas similares, diferentemente de células T efetoras que priorizam apenas a glicólise aeróbica (56). A glicólise aeróbica tem sido apontada como

fundamental para a proliferação e produção de anticorpos (56, 57). Por outro lado, já foi descrito que a diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos é acompanhada por uma redução da atividade glicolítica e aumento no consumo de glutamina (18). Além disso, outro estudo apontou o papel essencial exercido pela glicose para a síntese lipídica, isto é, o aumento da importação de piruvato para a mitocôndria foi descrito como fundamental para a expansão de membranas, expressão de marcadores de plasmócitos, como CD138 e Blimp-1, e produção de anticorpos (17, 56). Estes resultados indicam que a dependência de vias metabólicas específicas antes, durante e após a ativação de células B são alteradas. Estes estudos destacam ainda uma dependência pronunciada da atividade mitocondrial e síntese lipídica para a formação de plasmablastos. Interessantemente, em estudo recente foi possível distinguir plasmócitos de vida curta e de vida longa por meio da definição do perfil metabólico apresentado por estas células. Plasmócitos de vida longa apresentam níveis aumentados de transporte de glicose com relação a plasmócitos de vida curta. (58, 59). Foi demonstrado que 90% da glicose capturada por plasmócitos de vida longa é destinada para glicosilação de anticorpos, por meio da via das hexosaminas (59). A via das hexosaminas é uma pequena ramificação da glicólise, capaz de fornecer açúcares utilizados para a glicosilação de proteínas e lipídeos (60). Entretanto, o restante capturado é crucial para a sobrevivência destas células por meio da geração e importação de piruvato para a mitocôndria (59). Desta maneira, mais estudos são necessários para melhor compreender os papéis exatos da glicólise aeróbica, de outras fontes de alimentação da mitocôndria e mesmo de OXPHOS em cada etapa da ativação de células B, como proliferação, diferenciação de plasmablastos/plasmócitos e produção de anticorpos.

Os estudos recentes de metabolismo em células B aproximaram suas funções efetoras de suas vias metabólicas (61). Desta maneira, alterações específicas nas vias metabólicas ou nas vias que as controlam como a via PI3K/AKT/mTOR podem beneficiar a resposta humoral e sobrevivência de plasmócitos. Com base nos trabalhos anteriormente apresentados é sabido que a deficiência de mTOR em células B beneficia OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica. Sabe-se também que a atividade mitocondrial é essencial para a diferenciação de células B em plasmablastos. Desta maneira, a interferência na via do mTOR pode servir como uma nova estratégia para aumentar a resposta a patógenos e no desenvolvimento de

vacinas por meio do aumento da formação de plasmócitos e produção de anticorpos. Por outro lado, as vias metabólicas também abrem porta para um melhor controle da resposta humoral, como por meio do uso de drogas que interfiram em pontos específicos destas vias, para que assim possam alterar o estado de ativação das células bem como a produção de anticorpos, beneficiando pacientes com doenças autoimunes e também pacientes transplantados. Anticorpos, por exemplo, continuam sendo um dos empecilhos para o sucesso na sobrevida de diversos transplantes (3). Desta maneira, a regulação de vias e de sensores metabólicos podem ser utilizados como uma nova abordagem no contexto de imunossupressão para controle da resposta humoral.

1.5 Papel das células B e de vias metabólicas no contexto do transplante

Transplantes são utilizados como tratamento para pacientes com diferentes complicações, normalmente falência de órgãos em estágio terminal, câncer e doenças autoimunes. O transplante consiste na transferência de células, tecidos ou órgãos de um indivíduo para outro que resulta em significativo aumento da sobrevida e da qualidade de vida do paciente transplantado (62, 63). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2016 o número de pacientes na lista de espera para receber um transplante de órgãos foi superior a 43.500. Além do alto número de pessoas na lista para receber um transplante, altos custos são gerados, especialmente com o uso de drogas imunossupressoras. Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo anual médio em medicamentos prescritos no contexto do transplante está entre 10 e 14 mil dólares por paciente (64).

O processo de rejeição ao transplante pode ser classificado em três categorias, de acordo com a resposta imune efetora prioritária humoral e celular. São elas:

a) **Rejeição hiperaguda**: mediada por anticorpos naturais presentes no receptor. Também é possível que o receptor já tenha sido pré-sensibilizado com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) do doador por doações de sangue, gravidez, infecções ou transplantes anteriores, por exemplo. Essa rejeição pode ser observada em minutos ou horas após o transplante.

b) **Rejeição aguda**: consiste no reconhecimento de tecido do doador como não próprio pelo sistema imune do receptor. Isso se deve principalmente a diferenças entre as moléculas de MHC, as quais são extremamente polimórficas.

c) **Rejeição crônica**: caracterizada por uma perda lenta e gradual da função do órgão, com perda da arquitetura tecidual por fibrose. Uma explicação plausível é a ativação e infiltração de células T $CD4^+$ e células B, as quais ativam macrófagos e os estimulam a secretarem fatores de crescimento ativando e induzindo a diferenciação de miofibroblastos (65).

A falta de métodos apropriados para controlar a rejeição do órgão foi e continua sendo um dos maiores obstáculos para a manutenção dos aloenxertos, especialmente a longo prazo, apesar dos avanços obtidos com novas drogas imunossupressoras (62, 63, 66). Portanto, o retransplante se faz necessário em um número significativo de casos. Grande parte das drogas imunossupressoras atuais visam reduzir a proliferação e atividade efetora de células T de maneira inespecífica, sendo elas as principais responsáveis pela rejeição aguda (67). O uso de drogas com interferência nas vias metabólicas, como a rapamicina, droga que interfere na atividade de mTOR, já são utilizadas na clínica há anos (68). Os maiores sucessos relacionados ao uso da rapamicina estão relacionados à redução de infecções e de câncer nos pacientes transplantados, uma vez que a droga é também capaz de interferir na proliferação de células tumorais (68-71). Entretanto, novas abordagem para diminuir as taxas de rejeição e com enfoque na redução dos efeitos adversos das drogas imunossupressoras clássicas são necessárias, uma nova alternativa consiste em explorar as vias metabólicas e/ou seus sensores de maneira mais específica e eficiente que apenas o uso da rapamicina (72).

Como descrito nas seções anteriores, o controle das vias metabólicas é crucial para modificar o curso das respostas imunes (55). De modo interessante, um estudo recente utilizou uma terapia tripla em modelos experimentais de transplante de pele e de coração, cujo regime de drogas interfere negativamente na via glicolítica e na glutaminólise (73). Constatou-se neste estudo um aumento significativo na sobrevida dos transplantes de pele e de coração, o que esteve relacionado a uma expansão de células T reguladoras e diminuição de células T efetoras (73).

Como citado anteriormente, apesar dos grandes avanços no controle de rejeição aos transplantes, ainda aproximadamente 20% dos pacientes na lista de espera para receber um transplante renal já foram transplantados anteriormente e necessitam de um novo órgão devido à perda do aloenxerto causada por rejeição (74). De modo importante, estes pacientes são sensibilizados por antígenos presentes no doador anterior e apresentam, portanto, anticorpos específicos anti-doador (DAS, do inglês *Donor Specific Antibodies*)(74). Células B apresentam um papel significativo no processo de rejeição, o qual é classicamente associado com a produção de DSA (3, 75, 76). De modo geral, células B são caracterizadas por uma mobilização e ativação não apropriadamente controladas após o transplante (75). É conhecida a especificidade de grande parte dos aloanticorpos produzidos, sendo estes principalmente contra as moléculas do MHC presentes no aloenxerto, ou ainda pela presença de DSA pré-formados nos casos de sensibilização prévia ao antígeno (77). O *National Institute of Health* caracterizou as etapas da rejeição mediada por anticorpos em quatro estágios (78). **Estágio I**, geração *de novo* de anticorpos reativos contra o enxerto. **Estágio II**, fixação e ativação do complemento no enxerto, sem a presença de sinais de danos patológicos e/ou clínicos. **Estágio III**, além da fixação do complemento observado no estágio anterior, ocorre alterações patológicas no enxerto, embora suas funções estejam preservadas. Finalmente, no **estágio IV**, além da fixação do complemento e de danos patológicos observados, ocorre a disfunção do enxerto.

Com o objetivo de melhor avaliar o papel desempenhado por anticorpos no contexto da rejeição, Wasowska et al utilizaram um modelo de transplante cardíaco alogênico em camundongos deficientes para Imunoglobulina (IgKO). Estes apresentaram taxas de sobrevida do enxerto significativamente maiores em relação a animais controle (76). Foi mostrado ainda que a transferência de IgG2b foi capaz de reconstituir a rejeição aguda em animais IgKO (76). Os DSA podem levar a fixação do sistema complemento e elevar desta maneira a probabilidade de rejeição ao aloenxerto (3, 75). Sabe-se que a presença de anticorpos incapazes de fixarem o complemento facilitam a acomodação do enxerto e evitam sua rejeição e que reguladores do complemento são capazes de impedir rejeição hiperaguda mediada por anticorpos (79, 80). Desta maneira, estes resultados indicam o papel crítico desempenhado por anticorpos, por meio da fixação do complemento na rejeição

hiperaguda e aguda mediada por anticorpos, além de representarem um empecilho para realização de retransplantes.

Tendo em vista o papel crucial desempenhado por células B no contexto do transplante, há uma urgente necessidade de se descobrirem novas estratégias terapêuticas, tais como alvos que participem da fisiopatologia da rejeição de modo a promover a aceitação do órgão recém recebido e de controlar a resposta imune humoral. O estudo de Lee e colaboradores, 2015 por meio de uma terapia tripa, cujos alvos foram as vias metabólicas, representou um novo horizonte para o desenvolvimento de drogas imunossupressoras (73). Entretanto, estudos direcionados ao controle de células B e de sua diferenciação em plasmablastos e plasmócitos, a fim de controlar a resposta imune humoral ainda são necessários

1.6 Justificativa

A regulação precisa do estado de ativação de células B é essencial para controlar a produção de anticorpos e, consequentemente, determinar o desfecho da resposta imune. Entretanto, apesar dos avanços obtidos sobre o conhecimento e o controle da resposta humoral, as opções disponíveis para modular efetivamente a resposta de células B em diversas doenças inflamatórias permanecem pouco significativas. Atualmente, a dinâmica das vias metabólicas em células do sistema imune tem sido bastante explorada, sendo o metabolismo em si um potencial alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Sabe-se que as vias metabólicas não estão apenas envolvidas no crescimento e proliferação celular, mas estão intimamente relacionadas com a função efetora das células do sistema imune e que toda esta rede metabólica é amplamente regulada por sensores metabólicos intracelulares. Embora estudos descrevam as alterações metabólicas envolvidas no processo de ativação de células B, existem poucos relatos sobre quais sensores metabólicos coordenam estes processos, bem como suas possíveis implicações na diferenciação destas células em plasmócitos. O sensor metabólico mTOR tem mostrado ser um regulador mestre sobre o metabolismo de células T, promovendo a glicólise aeróbica em detrimento da oxidação lipídica e OXPHOS e é um potencial candidato para atuar em diferentes etapas de ativação de células B. Acredita-se que a compreensão deste processo auxiliará o desenvolvimento de novas estratégias

que visem controlar a resposta imune humoral, auxiliando pacientes com doenças inflamatórias mediadas por células B, como em certas infecções, doenças autoimunes e em pacientes transplantados.

1.7 Hipótese

Acreditamos que mTORC1 e mTORC2 favorecem a glicólise aeróbica em detrimento de OXPHOS, o que reduziria a formação de plasmablastos/plasmócitos e, consequentemente, a produção de anticorpos. Desta maneira, estas alterações nas funções efetoras de células B poderiam apresentar relevância clínica, como na sobrevida de transplantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil metabólico e a função efetora de células B deficientes de mTORC1 ou mTORC2 *in vitro* e em modelo de transplante de pele.

2.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar células B deficientes de mTORC1 ou mTORC2 metabolicamente, bem como seu perfil de ativação, troca de isotipo e diferenciação em plasmablastos *in vitro*;
- Avaliar o impacto da glicólise, oxidação lipídica e OXPHOS no perfil de ativação de células B mTORC1 ou mTORC2 deficientes e em sua capacidade de diferenciação em plasmablastos *in vitro*;
- Diferenciar metabolicamente células B de plasmablastos *in vitro*;
- Caracterizar metabolicamente plasmablastos deficientes de mTORC1 ou mTORC2, bem como sua capacidade de secreção de anticorpos *in vitro*;
- Avaliar o impacto da oxidação lipídica na produção de anticorpos por plasmablastos *in vitro*;
- Comparar a sobrevida do transplante de pele de animais que apresentam exclusivamente células B deficientes de mTORC1 ou mTORC2 com animais controle, bem como as populações de células B e plasmócitos no baço e linfonodos drenantes do enxerto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos foram utilizados animais selvagens (WT, do inglês *wild type*) C57BL/6 e animais de fundo C57BL/6 com deficiência de mTORC1 (Raptor$^{\Delta B}$) ou mTORC2 (Rictor$^{\Delta B}$) exclusivamente em células B. e animais controle (CT) (detalhado na seção 3.2). Os animais foram gerados pela *The Jackson Laboratory* e mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo, com exceção dos animais WT que foram mantidos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina da Universidade Federal de São Paulo. Para os experimentos *in vitro* foram utilizados animais machos e fêmeas de idade entre 6 e 8 semanas e para os experimentos *in vivo* apenas animais machos de mesma idade. Os animais foram mantidos em condições livre de patógenos, em gaiolas com microisoladores autoclavados (no máximo 5 animais por caixa). Temperatura e fotoperíodo foram controlados, e ração e água esterilizados. Os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo n° 8/2016) e adendo aprovado em 28 de março de 2017 e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (protocolo n° 5811280716).

3.2 Geração dos animais deficientes de mTORC1 e mTORC2 e genotipagem

Com o objetivo de gerar os animais Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$ foi feito uso da técnica de Cre/lox. Para isso, animais contendo a enzima Cre, a qual expressa uma DNA recombinase sob o promotor CD19 (expresso majoritariamente por células B) foram cruzados com animais Raptor-flox ou Rictor-flox, componentes essenciais para a função de mTORC1 e mTORC2, respectivamente (24, 81). A enzima Cre é capaz de reconhecer a sequência flox, realizando assim a excisão destes genes apenas em células que expressam o gene CD19. Para geração destes animais foram mantidas as

sequências flox de Raptor e Rictor em homozigose **(Figura 4 A e B)** e a sequência de Cre nas células CD19 em heterozigose **(Figura 4 C e D)**, uma vez que sua manutenção em homozigose leva a efeitos deletérios nas células B (82). Os animais CT foram gerados de modo a não apresentarem sequências flox, mas apenas a enzima Cre em heterozigose. Desta maneira, podemos assegurar que as respostas observadas não são devido a efeitos *off-target* da enzima Cre recombinase.

Para a caracterização do genótipo dos animais, foram coletados fragmentos de orelha, os quais tiveram o DNA extraído. Em seguida, foram realizadas reações de PCR com o uso do Kit *RED Extract-N-Amp™ Tissue PCR* (Sigma, EUA) conforme instruções do fornecedor. A sequência de *primers* utilizadas para Rictor-flox e Raptor-flox foram as mesmas daquelas disponibilizadas pela *Jackson Laboratory* (JAX, Bar Harbor, EUA) **(Tabela 1)**. Resumidamente, avaliou-se a presença da sequência gênica mutante (com a presença do gene da enzima cre recombinase) e/ou WT (sem a presença do gene da enzima cre recombinase) no DNA dos animais em estudo por reações de PCR seguido de eletroforese em gel de agarose**.** O tamanho dos fragmentos de DNA observados em gel de agarose 3 % foram os seguintes: Rictor mutante: 554 pares de base (pb); Rictor WT: 466 pb **(Figura 4 A)**; Raptor mutante: 180 pb; Raptor WT: 141 pb **(Figura 4 B)**; CD19 WT: 477 pb **(Figura 4 C)** ; Cre recombinase: 100 pb **(Figura 4 D).** Conforme mencionado anteriormente, os animais estudados apresentaram Raptor e Rictor-flox em homozigose e a enzima Cre recombinase em heterozigose, isto é, foram detectadas em cada animal fragmentos gênicos na reação da Cre recombinase, CD19 WT e fragmentos únicos localizados na região de 554 pb ou 180 pb nas reações de Rcitor-flox e Raptor-flox, respectivamente **(Figura 4 C e D)**. Para determinação da massa molecular foi utilizado o padão de massa molecular *100 base pairs DNA Ladder* (Sinapse, Brasil). Animais CT não apresentam sequências Rictor ou Raptor mutantes, apenas a enzima Cre recombinase em heterozigose.

Genes	Sequência Sense (5' – 3')	Sequência Anti-sense (5' – 3')
Rictor-flox	ACTGAATATGTTCATGGTTGT	GAAGTTATTCAGATGGCCCAGC
Raptor-flox	CTCAGTAGTGGTATGTGCTCAG	GGGTACAGTATGTCAGCACAG
Cre genérico	GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
WT	CCTCTCCCTGTCTCCTTCCT	TGGTCTGAGACATTGACAATCA

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados para a geração dos animais Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$. Sequência dos *primers* sense e anti-sense para a genotipagem dos genes Rictor flox, Raptor flox, Cre genérico e CD19 WT.

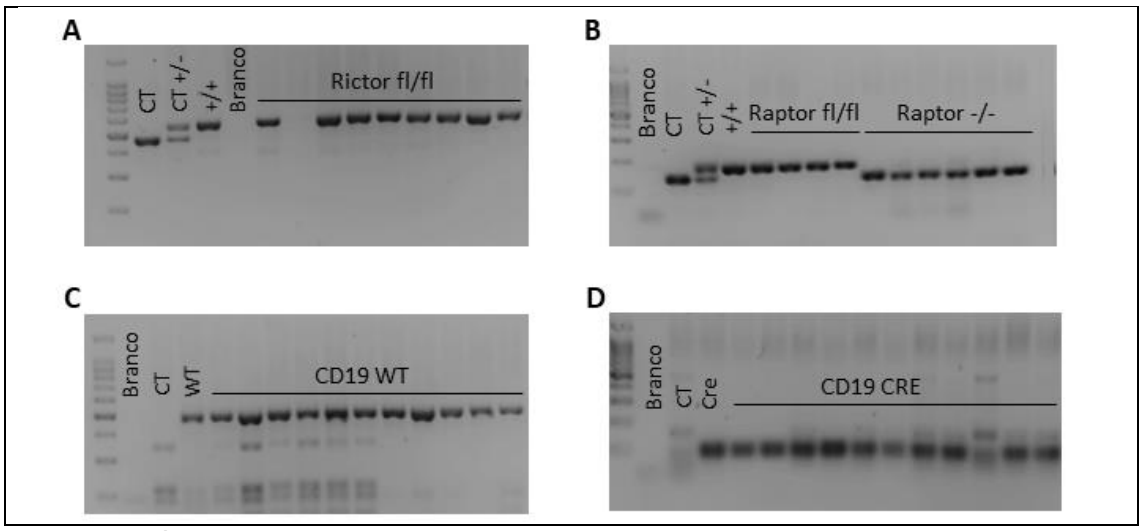


Figura 4 - Géis de agarose representativos das reações de genotipagens utilizadas para a geração dos animais Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$. Após extração de DNA proveniente de fragmentos de orelha dos animais CD19-Cre cruzados com Rictor-flox ou Raptor-flox, esses foram genotipados para avaliação posterior da expressão, em gel de agarose, dos seguintes alvos: **(A)** Rictor flox, **(B)** Raptor flox, **(C)** CD19 WT e **(D)** Cre genérico. Os tamanhos das bandas foram comparados ao *Ladder* padrão de 100 pb utilizado (localizado na esquerda dos géis). O tamanho das bandas são: **(A)** Rictor mutante: 554 pb; Rictor WT: 466 pb, **(B)** Raptor mutante: 180 pb; Raptor WT: 141 pb **(C)** CD19 WT: 477 pb e **(D)** Cre genérico: 100 pb.

3.3 Sorting de células B CD19^{+}

Animais WT, CT, Rictor$^{\Delta B}$, e Raptor$^{\Delta B}$ foram eutanasiados e tiveram seus baços removidos assepticamente. Meio RPMI1640 (Gibco-Invitrogen, EUA), com pH ajustado entre 7,2 e 7,4, foi utilizado durante o processamento dos baços e durante a técnica de *cell sorting*. O meio foi suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB), 25 mM de aminoácidos não essenciais (*MEM non-essential amino acid solution,* Sigma-Aldrich), 10,9 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de

piruvato de sódio, 500 µM de β-mercaptoetanol, 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de streptomicina (Gibco-Invitrogen, EUA). Após remoção, baços foram macerados com o uso de *cell strainer* (40 µM ou 70 µM), hemácias lisadas com tampão de lise e contagem realizada em hemôcitometro, com o uso de Azul de Tripan 0,4% para exclusão de células mortas. 10^8 células/mL foram incubadas com anti-CD19 (1D3-AF647) por 30 minutos a 4 °C e lavadas na sequência. Células foram então resuspendidas em uma concentração de 10^7 células/mL para separação das células $CD19^+$ pela técnica de *cell sorting* em BD FACSAria™ III (BD Bioscience, EUA).

Para isolamento de B células $CD19^+$ por beads magnéticas foi seguido o mesmo protocolo inicial para o processamento dos baços. Após a contagem de esplenócitos, células foram lavadas com tampão contendo BSA (0,5 %) e EDTA (200 mM) diluídos em PBS 1x, e então resuspendidas em 90 µL de tampão para cada 10^7 células, sendo adicionado 10 µL de CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec) para cada 10^7 células. Células foram incubadas entre 15 e 30 minutos a 4 °C, e então resuspendidas em tampão (até 10^8 em 500 µL). Na sequência, células foram positivamente selecionadas por coluna magnética (MACS) e lavadas com tampão (seleção de células $CD19^+$). Pureza das células foi verificada após separação por citometria de fluxo.

3.4 Estímulo de células B $CD19^+$ e incubação com Etomoxir

Células B $CD19^+$ obtidas por *cell sorting* ou por *beads* magnéticas foram incubadas com LPS (10 µg/mL) (proveniente de *Escherichia Coli*, O111:B4 , Sigma, EUA) e/ou LPS na presença de IL4 (50 ng/mL) em placas de 6, 12 ou 24 poços, por 72 horas na concentração de 10^6 células/mL, em condições apropriadas de cultura celular (5 % CO_2, 37 °C). Para os experimentos de forçamento de OXPHOS foi feito uso de meio de cultura sem glicose, com todos os outros suplementos anteriormente descritos. Todos os estímulos foram adicionados no momento de incubação e mantidos por todo o período, sem troca de meio. Por fim, para inibição da oxidação lipídica foi utilizado Etomoxir sodium salt hydrate (200 µM) (Sigma Aldrich, EUA), o qual é capaz de inibir a enzima CPT1a, durante todo o período de cultura.

3.5 *Western blot*

Células B $CD19^+$ obtidas por *cell sorting* foram incubadas na concentração de 10^6 células/mL com LPS por uma hora em condições apropriadas de cultura celular (5 % CO_2, 37 °C). Na sequência, para obtenção de proteínas, células foram lisadas com tampão de extração proteica na presença de inibidores de fosfatases (Roche, Alemanha) e proteases (Roche, Alemanha). Foi então realizada a quantificação de proteínas pelo método de biureto (LabTest, Brasil) sendo que 40 µg de proteínas totais por amostra (diluídas em lemille com dTT) foram desnaturadas por aquecimento por 5 minutos a 95 °C, e então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose, seguido de bloqueio da membrana com leite em pó 5 % diluído em *Tris-Buffered Saline* na presença de 0,5 % de *Tween-20* (TBS-T), para posterior incubação com anticorpos primários *overnight*. Os anticorpos primários utilizados foram anti-pSer473, anti-pTre308, anti-AKT (total), anti-pS6, anti-S6 (total). Todos os anticorpos primários foram utilizados na diluição de 1 : 1000 e foram obtidos da empresa *Cell Signaling Technology* (EUA), enquanto que a diluição para o anticorpo anti-β-actina foi utilizado na diluição de 1 : 5000 (Sigma-Aldrich, EUA).

Após incubação com os anticorpos primários, as membanas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários biotinilados na diluição de 1 : 10000, sendo eles: anti-rabbit (Cell Signaling Technology, EUA) para as membanas previamente incubadas com anti-pSer473, anti-pTre308, anti-AKT, anti-pS6 e anti-S6; e com anti-mouse para as membranas previamente incubadas com anti-β-actina. Para determinação da massa molecular foi utilizado o padão de massa molecular *Rainbow* (BioRad Laboratories, EUA). A detecção das proteínas nas membranas foi realizada com o uso dos reveladores *West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, EUA) ou *West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e quimiluminescência detectada com o uso do Image Quant LAS500 (GE Healthcare Life Science, EUA).

3.6 Captação de glicose

Células B mantidas em cultura, foram lavadas com PBS 1x e incubadas com PBS 1x contendo 50 μM do análogo fluorescente de glicose, 2-(*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 500 μM de β-mercaptoetanol, por 45 minutos em condições de cultura. Células foram então lavadas com tampão PBS 1x contendo 2 % de SFB. Na sequência, as células foram incubadas com outros anticorpos, especificados na seção 3.9.

3.7 Massa mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial

Células B mantidas em cultura foram lavadas com meio RPMI1640 sem soro e suplementos e, então, incubadas com 200 nM de MitoTracker Deep Red FM (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 200 nM de *Mitocondrial Membrane Potential Assay Kit,* TMRE (Abcam, Inglaterra) diluído em meio RPMI, por 20 minutos em condições de cultura, para detecção de massa e potencial mitocondrial, respectivamente. Células foram então lavadas com tampão PBS contendo 2 % de SFB. Para os experimentos em que foram também utilizados anticorpos e ou corante de viabilidade, a incubação com estes foi realizada à 4 °C antes da incubação com as sondas.

3.8 Citometria de Fluxo

Células B $CD19^+$ obtidas por *cell sorting* ou por seleção positiva por *beads* magnéticas foram marcadas com anticorpos para imunofenotipagem e caracterização celular. Para isso, utilizaram-se os seguintes anticorpos: CD19 (1D3-AF647, PE ou FITC), B220 (RA3-6B2-FITC), CD138 (281-2-PeCy7), IgM (RMM-1-APCCy7), IgG1 (HIG-632-FITC), CD21/CD35 (7E9-APC), CD23 (B3B4-FITC). Também foram utilizados marcadores específicos para moléculas co-estimuladoras, CD40 (3//23-PE ou PERCP) e CD86 (GL-1- PE ou PerCP-Cy5.5). Para exclusão de

células mortas foi utilizado Live&Dead (Aqua Dead Cell Stain, 405 nm Thermo Fischer Scientific). Para os experimentos consideramos plasmablastos como células $CD19^{+}CD138^{+}$ ou alternativamente $B220^{+}CD138^{+}$. Sempre que possível excluímos a população de plasmablastos quando o objetivo era avaliar especificamente células B. Nestes casos, consideramos células B como $CD19^{+}CD138^{-}$ ou alternativamente $B220^{+}CD138^{-}$. Para auxiliar na definição das *gates* utilizamos a estratégia "fluorescência menos uma" (FMO, do inglês *Fluorescence minus one*) para CD138.

3.9 Expressão gênica de células B incubadas com LPS

Células B $CD19^{+}$ isoladas por *cell sorting* ou *beads* magnéticas estimuladas ou não com LPS tiveram seu RNA extraído e purificado com o uso do RNA minikit (Qiagen, Alemanha), segundo instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop® ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). cDNA foi então sintetizado a partir de 1 µg de RNA purificado. Para a reação foi utilizado, a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*– MMLV (Promega, Madison, WI, EUA) e primer oligo-dT. Syber *Real time PCR* foi utilizado com os seguintes primers: ACLY, CPT1a, Hexokinase 2 (HK2), *Pyruvate dehydrogenase kinase* (PDK1), Fosfofrutoquinase I (PFKI) e SLC2A1 **(Tabela 2)**. A amplificação para qPCR foi realizada no equipamento Quant Studio 12K Flex (Life Technologies), e a expressão relativa de todos os genes foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

	Sequência Sense (5' – 3')	**Sequência Anti-sense (5' – 3')**
ACLY	CTCCAAGAAGCCAAATCTTATC	ATATTCATCAGCTTCCTCCC
CPT1a	GGGAGGAATACATCTACCTG	GAAGACGAATAGGTTTGAGTTC
HK2	CAAGCTACAGATCAAAGAGAAG	CATGAGACCAAGAAACTCTC
PDK1	AGGATCTGACTGTGAAGATG	TGGAAGTACTGTGCATAGAG
PFK1	AAGAGACTGATTTTGAGCAC	CTCAGAAACCCTTGTCTATG
SLC2A1	AAGTCCAGGAGGATATTCAG	CTACAGTGTGGAGATAGGAG

Tabela 2 - Sequência de *primers* utilizados para caracterização metabólica de células B por qPCR. Sequência dos *primers* para as regiões sense e anti-sense dos seguintes genes: ACLY, CPT1a, HK2, PDK1, PFK1 e SLC2A1.

3.10 *Avaliação de estresse mitocondrial e glicolítico*

Células B mantidas em cultura por 72 horas na presença de LPS foram submetidas a contagem em câmara de Neubauer para plaqueamento em placas de 24 poços apropriadas para a técnica de Seahorse (XF24-Bioscience, EUA) em meio de cultura RPMI1640 na ausência de bicarbonato. Duas horas antes do plaqueamento, foi realizado o *coating* das placas com Poli-D lisina (100 µg/ml) para que as células pudessem aderir ao fundo da placa. Um total de $2{,}5x10^5$ células foram utilizadas por poço para o experimento de estresse mitocondrial e um total de $5x10^5$ para o experimento de estresse glicolítico para a formação de uma monocamada de células no fundo da placa. Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37 °C na ausência de CO_2 por pelo menos 30 minutos antes da análise.

Para avaliarmos as taxas de consumo de oxigênio (OCR, do inglês *Oxygen Consumption Rates*) por meio do teste de estresse mitocondrial foram utilizadas as drogas seguindo as respectivas ordem de injeção: oligomicina (1mM), cianeto de carbonilo p-trifluorometoxi-fenil-hidrazona (FCCP) (1.5mM) e rotenona (100 µM) juntamente com antimicina A (1mM) (Sigma, EUA). Na sequência foi realizada a leitura pelo analisador XF24 (XF24-Bioscience, EUA). Para realização desta técnica foram seguidas as recomendações sugeridas no protocolo de van der Windt, 2016 (83).

O estresse mitocondrial realizado consistiu no seguinte racional: inicialmente foram realizadas quatro leituras para avaliação do OCR basal das células B. Na sequência foi injetada a oligomicina, a qual é capaz de inibir o complexo V (ATP sintase) da cadeia respiratória mitocondrial. Desta maneira é possível indicar quanto do OCR está relacionado com a produção de ATP. A adição de FCCP após a oligomicina é utilizada para determinar o OCR máximo da célula. Ela permite que os prótons movam do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial de maneira independente da atividade da ATP sintase. Para manutenção do potencial

de membrana mitocondrial, a ATP sintase eleva, então, ao máximo o transporte de elétrons afim de permitir que os prótons retornem para a região intermembranar. A relação entre o OCR máximo e mínimo é conhecido como capacidade respiratória reserva (SRC, do inglês *Spare Respiratory Capacity*) da célula, a qual é utilizada em situação de intenso trabalho ou estresse celular (84-86). Por fim, a adição da Rotenona e Antimicina A inibem os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons (ETC, do inglês *Electron Transport Chain*), respectivamente, abolindo assim completamente a atividade de ETC e, consequentemente, o consumo de oxigênio. A detecção de consumo de oxigênio após a adição de rotenona e antimicina A é proveniente de atividade não-mitocondrial.

Para interrogarmos a capacidade glicolítica das células B foi utilizado o ensaio de detecção de taxas de acidificação extracelular (ECAR, do inglês *Extracellular Acidification Rates*) por meio do teste de estresse glicolítico. Para isso foram utilizadas drogas na respectiva ordem: Glicose (10 mM) oligomicina (1 mM) e 2-deoxiglicose (2-DG). O protocolo seguido foi o mesmo ao realizado para o estresse mitocondrial, porém foi utilizado meio RPMI 1640 sem a presença de glicose.

O estresse glicolítico consistiu no seguinte racional: quatro leituras iniciais foram realizadas para detecção do ECAR basal em meio com glicose (10 mM) para verificar o quanto as células direcionam o substrato para a glicólise aeróbica. Quanto maior a produção de lactato liberado pelas células, maior a taxa de acidificação extracelular do meio, que pode ser detectado por meio de sensores específicos. Na sequência, foi utilizada a oligomicina, inibidor da ATP sintase. Isso faz com que a célula eleve ao máximo sua atividade glicolítica, pois esta passará a ser a principal via para obtenção de energia pela célula, o que nos permite determinar o ECAR máximo das células (capacidade glicolítica máxima).

3.11 Dosagem de lactato e glicose do sobrenadante de cultura

Sobrenadante do meio de cultura das células B após diferentes tempos de estimulação foi coletado após centrifugação das células e armazenado a -80 °C. Para

os testes foram utilizados os seguintes kits específicos (Glicose Liquiform e Lactato Liquiform, Labtest), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram incubadas com reagentes fornecidos pelos kits e deixados por 5 minutos (lactato) ou 10 minutos (glicose) em banho-maria a 37 ˚C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Synergy™ Mx Microplate Reader; BioTek) acoplado ao software Gen5™ (BioTek) nos comprimentos de onda de 550 nm (lactato) e 505 nm (glicose). Os cálculos para determinação das concentrações foram os seguintes: [Glicose] = (absorbância da amostra/ absorbância do padrão) x 100; [Lactato] = (absorbância da amostra/absorbância do padrão) x 40. A relação lactato liberado no meio/ glicose consumida do meio também foi calculada pois o resultado da razão é sugestivo de maior atividade glicolítica pelas células.

3.12 Determinação dos níveis de IgM no sobrenadante de cultura por ELISA:

Após incubação das células B $CD19^+$ com LPS por 72 horas, o sobrenadante de cultura foi coletado e utilizado para determinação dos níveis de IgM por ELISA (Invitrogen, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração de IgM foi determinada em μg/mL a partir da diluição seriada do padrão (fornecido pelo fabricante). A leitura das placas foi realizada a 550 nM em espectrofotômetro (Synergy™ Mx Microplate Reader; BioTek) acoplado ao software Gen5™ (BioTek).

3.13 Microscopia confocal

Células B após 72 horas de cultura com LPS foram incubadas com as sondas TMRE e MitoTracker. Além disso, foi utilizado o marcador de DNA Hoechst (10 μg/mL) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após incubação, imagens das células foram obtidas com o uso do sistema confocal Zeiss LSM-780 (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram coletadas em objetiva de 63x/1.4 NA Oil e o zoom de 3 x em imagens de 1024 x 1024 pixels.

3.14 Transplante de pele:

Animais Balb/c foram eutanasiados e tiveram sua cauda removida e dividida em pedações similares (aproximadamente 1 cm de diâmetro). A pele foi mantida em PBS 1x gelado até o momento do transplante. Em paralelo, camundongos receptores (fundo C57BL/6) foram anestesiados e tiveram o dorso depilado, com assepsia do local realizada. Na sequência, uma área de derme e epiderme, até o músculo intrínseco, equivalente ao tamanho da pele do doador foi cortada no receptor, formando assim, uma "cama" para receber o enxerto. Os enxertos foram então suturados na "cama" com fio de nylon e cobertos com gaze. O aceite do enxerto foi considerado após sua incorporação ao camundongo receptor. Por outro lado, a rejeição do transplante foi considerada quando a proporção de necrose foi superior a 90 % (>90 %). Os transplantes foram avaliados todos os dias após a cirurgia até o dia 10, momento em que os animais foram eutanasiados. Após eutanásia, baços e linfonodos axilares e braquiais (linfonodos drenantes do enxerto) foram removidos, sendo as células de ambos submetidas à captação de glicose e marcadas para moléculas presentes em células B e plasmócitos.

3.15 Análises estatísticas:

A análise estatística foi realizada por meio do programa Graphpad Prism®. Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste T Two-Tailed. Para mais de dois grupos foi utilizado o One-Way ANOVA seguido por Bonferroni's multiple comparisons tests. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p<0,05$ (5 %).

3.16 Síntese dos modelos experimentais

Três modelos experimentais principais foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. O objetivo do modelo experimental 1 foi avaliar alterações metabólicas e na função efetora de células B provenientes de CT, Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$ após estímulo com LPS ou LPS na presença de IL- 4 por 72 horas *in vitro*, para isso foram utilizadas as técnicas de qPCR, citometria de fluxo, Seahorse, Elisa e dosagem de glicose e lactato no sobrenadante de cultura. **(Figura 5).** O modelo experimental 2 consistiu em melhor avaliar os impactos da OXPHOS na função efetora de células B provenientes de de CT, Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$. Para isso, células foram forçadas a respirar com o uso de meio sem glicose e estimuladas com LPS por 72 horas *in vitro*. Na sequência, foi avaliado por citometria de fluxo alterações na função efetora destas células por citometria de fluxo, bem como mudanças metabólicas por meio da dosagem de glicose e lactato no sobrenadante de cultura **(Figura 6)**. Por fim, com o modelo experimental três buscamos avaliar os possíveis impactos clínicos da deficiência de mTORC2 em células B. Para isso realizou-se transplante de pele nos animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$,e na sequência as taxas de sobrevida do enxerto, bem como as populações de células B e plasmócitos foram então avaliadas por citometria de fluxo **(Figura 7)**.

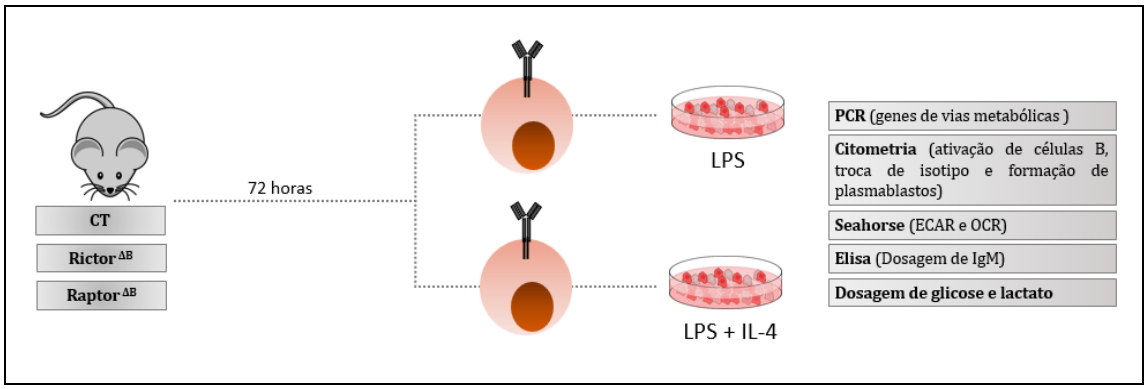


Figura 5 - Modelo experimental 1. Células B CD19^{+} foram isoladas de animais CT, Rictor$^{\Delta B}$ ou Raptor$^{\Delta B}$ e mantidas em cultura por 72 horas na presença de LPS apenas ou LPS na presença de IL4. Após incubação foram realizadas as técnicas de PCR para avaliação de genes relacionados as vias metabólicas, Seahorse para detecção de ECAR e OCR, citometria de fluxo para avaliação de

marcadores de ativação, troca de isotipo e de plasmablastos, Elisa para dosagem de IgM e por fim foram mensurados os níveis de lactato e de glicose no sobrenadante de cultura.

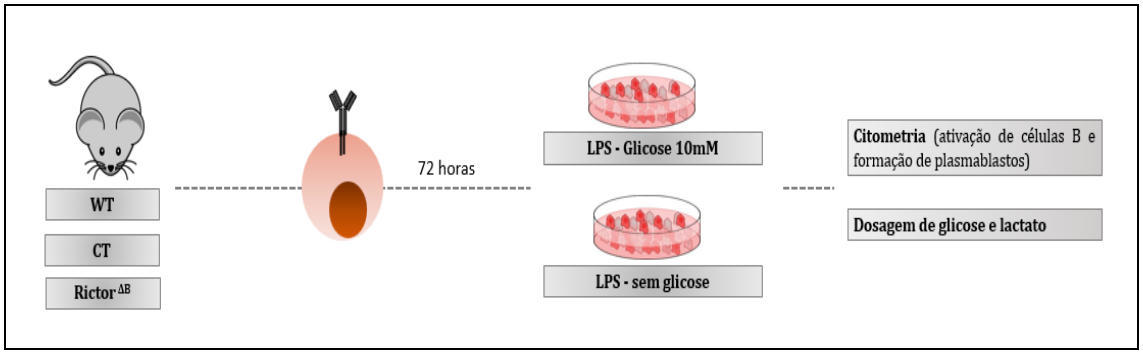


Figura 6 - Modelo experimental 2. Células CD19⁺ isoladas de animais WT, CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram estimuladas com LPS e mantidas em cultura por 72 horas em meio de cultura com glicose (10mM) ou na ausência de glicose. Após a cultura, as células foram submetidas à citometria de fluxo para avaliação de moléculas de ativação e de plasmablastos e no sobrenadante de cultura foram mensurados os níveis de glicose e lactato.

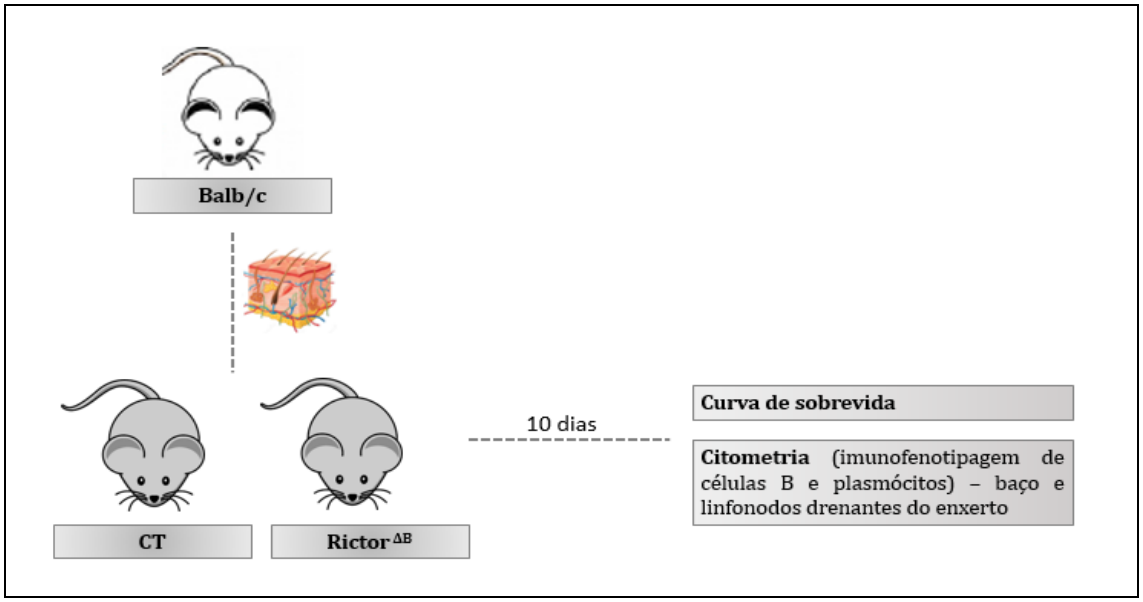


Figura 7 - Modelo experimental 3. Animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram transplantados com pele proveniente de animais Balb/c e tiveram a curva de sobrevida do enxerto avaliada durante os 10 dias após o transplante. Após este período, foi realizada citometria para avaliação das populações de células B e de plasmócitos no baço e linfonodos drenantes do enxerto.

4 RESULTADOS

4.1 Células B estimuladas com LPS foram eficientemente ativadas

O objetivo central do nosso trabalho foi avaliar como alterações metabólicas em células B alteram sua função efetora, como na expressão de moléculas de ativação e sua diferenciação em plasmablastos. Desta maneira, nós incialmente definimos o estímulo para nossos modelos experimentais *in vitro*. Optamos pelo uso de LPS, pelo fato deste estímulo ter sido empregado na avaliação de alterações metabólicas em células B em outros estudos, e principalmente por ativar a via que possuímos interesse em estudar, a PI3K/AKT/mTOR (17, 56). Conforme já descrito na literatura, LPS é capaz de ser reconhecido pelo TLR4 e levar à ativação de células B e da via PI3K/AKT/mTOR, tendo como resultados da ativação a indução da proliferação e diferenciação destas em plasmablastos. Desta forma, inicialmente avaliamos se o LPS na concentração de 10 µg/mL seria eficiente em ativar células B isoladas do baço de animais CT por meio da técnica de *cell sorting* ou beads magnéticas. Para isto, células estimuladas ou não com LPS foram avaliadas por citometria de fluxo e a análise foi realizada conforme ilustrado na **Figura 8 A e B**. Dentro da população de células B $CD19^+$ observamos que houve aumento na expressão dos marcadores de ativação por meio de histogramas, tais como CD86, CD40 e IgM de membrana após estímulo com LPS **(Figura 8 C, D e E)**. Foi constatado ainda que células ativadas aumentam a captação de glicose por meio do uso do análogo de glicose, 2NBDG em comparação com as células não-estimuladas. Aumento na massa mitocondrial também foi observado, após avaliação com a sonda MitoTracker **(Figura 8 F e G)**. Uma população de plasmablastos também pôde ser definida após estímulo de células B por 72 horas com LPS **(Figura 8 H).** Por fim, também foi possível observar por microscopia óptica que as células B proliferaram e aumentaram o tamanho celular após estímulo **(Figura 8 I)**. Em conjunto, esses resultados sugerem que LPS foi capaz de ativar células B em nossos experimentos e promover sua diferenciação em plasmablastos, bem como de levar a alterações metabólicas, tais como aumento na captação de glicose e de massa mitocondrial.

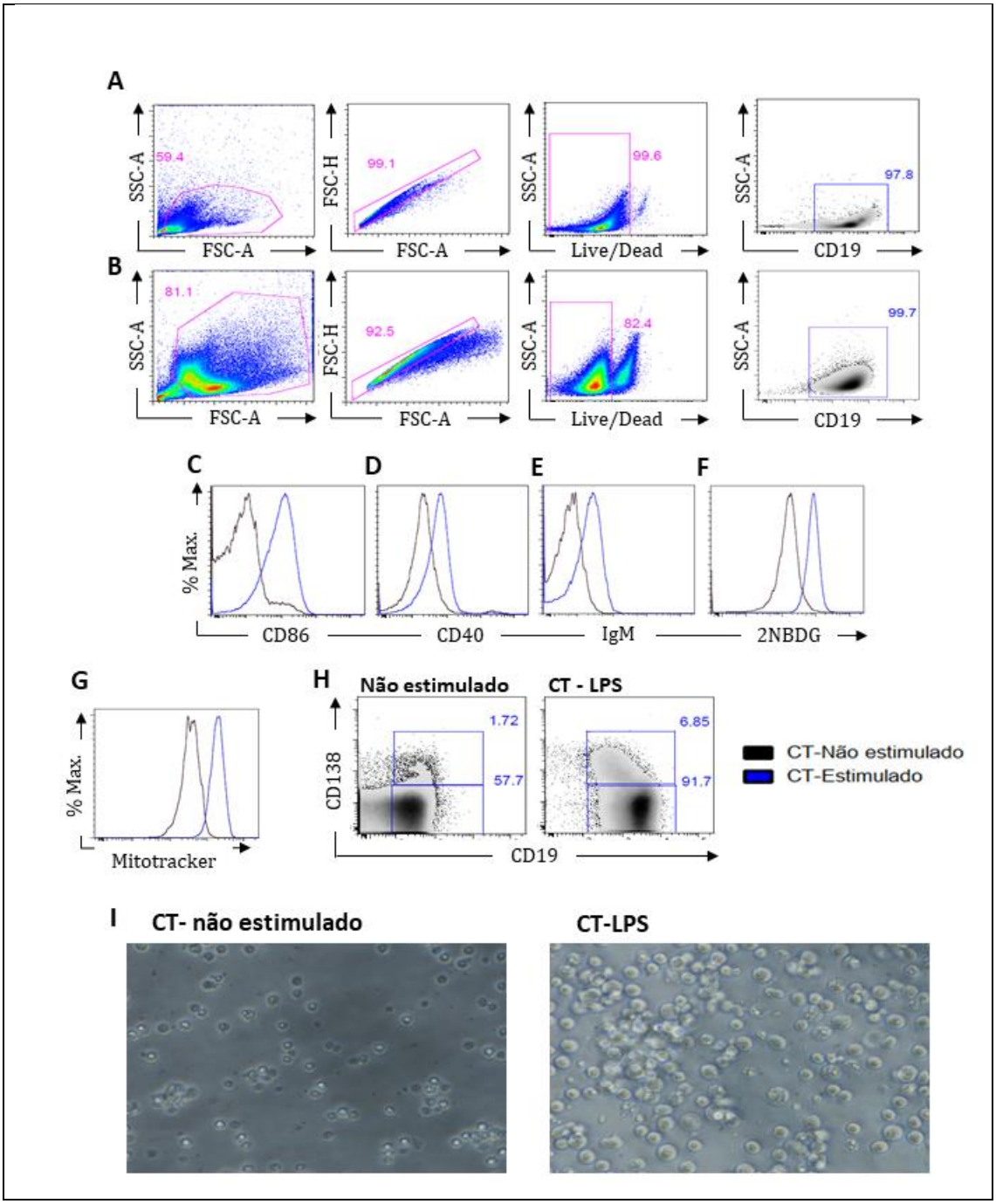


Figura 8 - LPS foi capaz de ativar eficientemente células B. Estratégia de *gating* adotada para **(A)** células não estimuladas e **(B)** estimuladas com LPS na seguinte ordem:da esquerda para direita: *gate* englobando células, *single cells*, exclusão de células mortas e *gate* definindo células B $CD19^{+}$. Histograma representativo de **(C)** CD86, **(D)** CD40, **(E)** IgM, **(F)** 2NBDG e **(G)** Mitotracker em células B $CD19^{+}$ não estimuladas (preto) e de células estimuladas com LPS (azul) provenientes de CT. **(H).** Dot plot ilustrativo de células B $CD19^{+}CD138^{-}$ e de plasmablastos $CD19^{+}CD138^{+}$ em células não estimuladas (painel esquerdo) e estimuladas com LPS (painel direito) provenientes de CT. **I.** Imagem obtida por microscopia óptica obtida de células $CD19^{+}$ não estimuladas após 72 horas de cultura (esquerda) e de células $CD19^{+}$ estimuladas com LPS (direita) após 72 horas de cultura, ambas provenientes de CT (aumento de 400 x).

4.2 Células B estimuladas com LPS e IL4 foram eficientemente ativadas

Dado o fato da estimulação com LPS induzir a diferenciação em plasmablastos e alterações metabólicas, e nós querermos também avaliar a troca de isotipo, nós adicionamos IL4 ao LPS, uma vez que a combinação destes é capaz de promover a troca de isotipo de IgM para IgG1 (38). Sabe-se que a IL4 sozinha, diferentemente do LPS, não leva à proliferação de células B, mas é capaz de promover sobrevivência e levar ao aumento do tamanho celular (15). Entretanto, LPS em combinação com IL4 é capaz de promover proliferação e a troca de isotipo (38). Além disso, a IL4 já foi descrita como capaz de elevar a glicólise de maneira independente de PI3K, e dependente de STAT6 (87). Desta maneira, as combinações destes estímulos além de terem sido utilizadas para induzir troca de isotipo, também foram aplicados para elevar os níveis de atividade glicolítica de células B.

Antes de realizarmos experimentos para avaliação de alterações nas vias metabólicas e na função efetora destas células, nós avaliamos se a combinação de LPS na concentração de 10 μg/mL de LPS com 50 ng/mL de IL4 após 72 horas de estímulo era capaz de eficientemente ativar células B. A estratégia de *gating* adotada está representada na figura F**igura 9 A e B**. Na sequência, avaliamos por meio de histogramas obtidos por citometria de fluxo que a expressão de moléculas de ativação, como CD86, CD40 e IgM, em células B $CD19^+$ após incubação com LPS e IL4 por 72 horas estava significativamente elevada em comparação a células não-estimuladas **(Figura 9 C, D e E)**. Houve também aumento na captação de glicose e da massa mitocondrial em células estimuladas com LPS+IL4 em comparação com células não estimuladas **(Figura 9 F e G)**. A combinação destes dois estímulos também foi capaz de elevar a troca de isotipo para IgG1 em nossos experimentos, como observado por meio do aumento na frequência de células B $CD19^+$ expressando IgG1 em sua superfície, o mesmo não podendo ser observado em células ativadas apenas com LPS, como já esperado **(Figura 9 H)**. Constatou-se ainda por microscopia óptica que após estimulo de LPS e IL4 por 72 horas as células B proliferaram e elevaram o tamanho celular em comparação as células não estimuladas **(Figura 9 I).** Esses dados sugerem que LPS na presença de IL4 em

nossos experimentos foi capaz de eficientemente ativar células B e induzir a troca de isotipo.

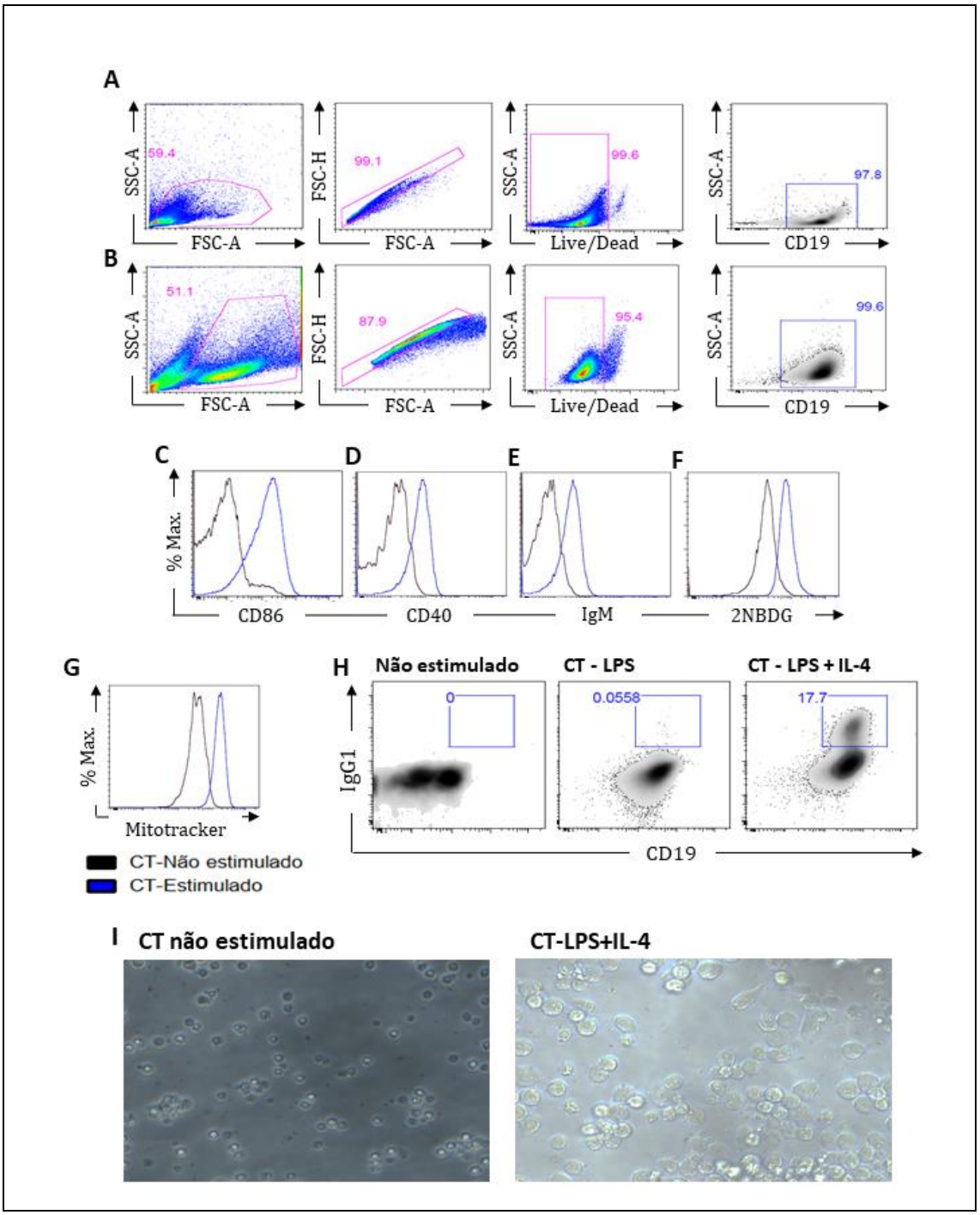


Figura 9 - LPS na presença de IL4 ativou eficientemente células B. Estratégia de gating adotada para **(A)** células não estimuladas e **(B)** estimuladas com LPS e IL4 na seguinte ordem:da esquerda para direita: *gate* englobando células, *single cells*, exclusão de células mortas e *gate* definindo células B $CD19^+$. Histograma representativo de **(C)** CD86, **(D)** CD40, **(E)** IgM, **(F)** 2NBDG e **(G)** Mitotracker em células B $CD19^+$ não estimuladas (preto) e de células estimuladas com LPS e IL4 (azul) provenientes de CT. **(H).** Dot plot ilustrativo de células $CD19^+IgG^+$ não estimuladas (painel esquerdo), estimuladas com LPS (painel central) e estimuladas com LPS e IL4 (painel direito) provenientes de CT. **(I)** Imagem de microscopia óptica de células B $CD19^+$ não estimuladas após 72 horas de cultura (esquerda) e de células estimuladas com LPS e IL4 (direita) após 72 horas de cultura, ambas provenientes de CT (aumento de 400x).

4.3 Células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC2

Nossos resultados até aqui demonstraram que a ativação de células B por LPS e LPS+IL4 promoveram modificações metabólicas nessas células, tais como aumento na massa mitocondrial e aumento na captação de glicose. Portanto, procuramos entender qual seria o impacto das proteínas mTORC1 e mTORC2, sabidamente envolvidas no controle de vias metabólicas, sobre a função efetora de células do sistema imune. Inicialmente, confirmamos se a atividade de mTORC2 estava reduzida nas células B destes animais. Para isso, células B de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram isoladas por *cell sorting* ou beads magnéticas e estimuladas ou não com LPS. Avaliamos por *Western blot* os níveis de fosforilação de AKT na Ser 473, sítio alvo de mTORC2. Confirmamos que a fosforilação de AKT na Ser 473 estava reduzida em células B Rictor$^{\Delta B}$ quando comparadas a células de animais CT após estímulo **(Figura 10 A)**. E como esperado, as fosforilações de AKT na Ser 473 estavam reduzidas em células não-estimuladas tanto de CT quanto de Rictor$^{\Delta B}$ em relação a células de animais CT estimuladas **(Figura 10 A)**. Estes dados indicam uma redução da atividade de mTORC2 em células B Rictor$^{\Delta B}$ após ativação. Entretanto, também foi observado uma redução nos níveis de AKT total em animais Rictor$^{\Delta B}$, mas não nos níveis de β-actina, o que indica que quantidades similares de proteína foram usadas **(Figura 10 C e D)**. A redução em AKT total não nos permite garantir uma redução exclusiva da atividade de mTORC2, para isso foi avaliado se o outro sítio de fosforilação de AKT, a Tre308, cuja fosforilação é independente de mTORC2 também estava diminuída. E assim, observamos que a fosforilação na Tre308 não estava reduzida como na Ser473 em células B Rictor$^{\Delta B}$ **(Figura 10B)**, o que indica que apesar de AKT total estar reduzida, sua atividade está sendo controlada principalmente por mTORC2 por meio da diminuição na fosforilação da Ser473.

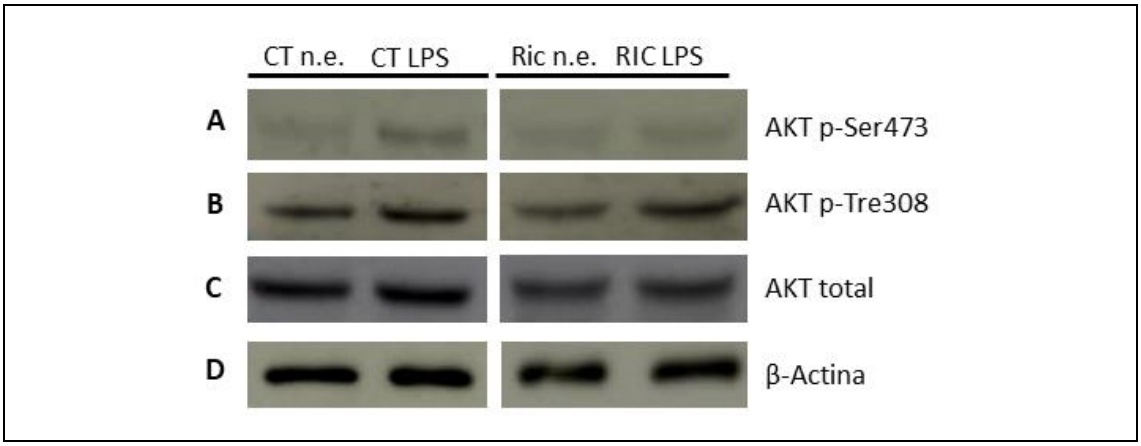


Figura 10 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC2. Análise de Western blot realizado com o uso de proteínas extraídas de células B CT (esquerda) ou Rictor$^{\Delta B}$ (direita) após estimulação ou não com LPS por duas horas. Marcação para **(A)** AKT p-Ser473, **(B)** AKT p-Tre308, **(C)** AKT total e **(D)** β- actina. Dados representativos de 2 experimentos independentes. n.e.: não estimulado

4.4 Células B deficientes em mTORC2 apresentam redução nos níveis de glicólise aeróbica e aumento em OXPHOS após 72 horas de cultura com LPS

Nossa observação de que células B Rictor$^{\Delta B}$ estimuladas com LPS apresentavam menor fosforilação de AKT na Serina 473 sugeriu que mTORC2 poderia participar na ativação de células B ao controlar suas funções metabólicas. Portanto, antes de avaliarmos qualquer alteração na função efetora em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$, verificamos se nossa hipótese de que OXPHOS estaria elevada em detrimento da glicólise aeróbica em células B na deficiência de mTORC2 estava correta. Com este objetivo, células B CD19^{+} foram isoladas de animais Rictor$^{\Delta B}$ ou CT e, então, mantidas por 72 horas na presença de LPS em condições de cultura. Após incubação, a expressão de genes relacionados a atividade glicolítica foi avaliada, tais como o transportador de glicose Glut1 (Slc2a1) e enzimas envolvidas na glicólise, tais como HK2 e PFK1 **(Figura 11 A, B e C)**. Observou-se que as expressões de todos os genes estavam elevadas após 72 horas em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ em comparação ao CT. Sabe-se que ao final da glicólise, a glicose consumida pela célula é convertida em piruvato, o qual pode ser transportado para a mitocôndria ou reduzido a lactato, sendo este último um indicativo de glicólise aeróbica. Deste modo, nós verificamos se o piruvato estaria indo preferencialmente para o TCA ou glicólise aeróbica. Obtivemos um indicativo

de que menos piruvato era importado para a mitocôndria em Rictor$^{\Delta B}$, uma vez que foi observado um aumento da expressão de PDK1 **(Figura 11 D)**, o qual é um regulador negativo de PDH (enzima responsável pelo transporte do piruvato do citoplasma para a mitocôndria). Desta maneira, fomos avaliar se a glicólise aeróbica estaria sendo então elevada nas células B Rictor$^{\Delta B}$, o que contrariaria nossa hipótese inicial de redução da atividade da via. Para isso, os níveis de glicose e lactato no sobrenadante da cultura celular foram avaliados. De modo interessante, observou-se que após as 72 horas de cultura, as células B obtidas de Rictor$^{\Delta B}$ consumiram menos glicose do meio e produziram menores níveis de lactato quando comparadas com aquelas provenientes de animais CT **(Figura 11 E e F)**. Além disso, a relação glicose consumida/lactato liberado no sobrenadante, outro indicativo de glicólise aeróbica, também estava diminuído em Rictor$^{\Delta B}$ **(Figura 11 G)**.

Para então confirmar se as taxas de glicólise aeróbica estavam diminuídas em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ após as 72 horas de cultura com LPS, nós avaliamos as taxas de ECAR ao longo do tempo com o uso da técnica de *Seahorse*. Confirmou-se desta maneira que o ECAR de Rictor$^{\Delta B}$ é inferior ao de CT **(Figura 11 H e I)**, bem como o ECAR máximo avaliado após a adição de oligomicina **(Figura 11 H e J)**, um inibidor da ATP sintase, forçando a célula a aumentar sua atividade glicolítica. Estes dados indicam que há uma diminuição das taxas de glicólise aeróbica em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ em comparação ao CT após 72 horas de cultura com LPS.

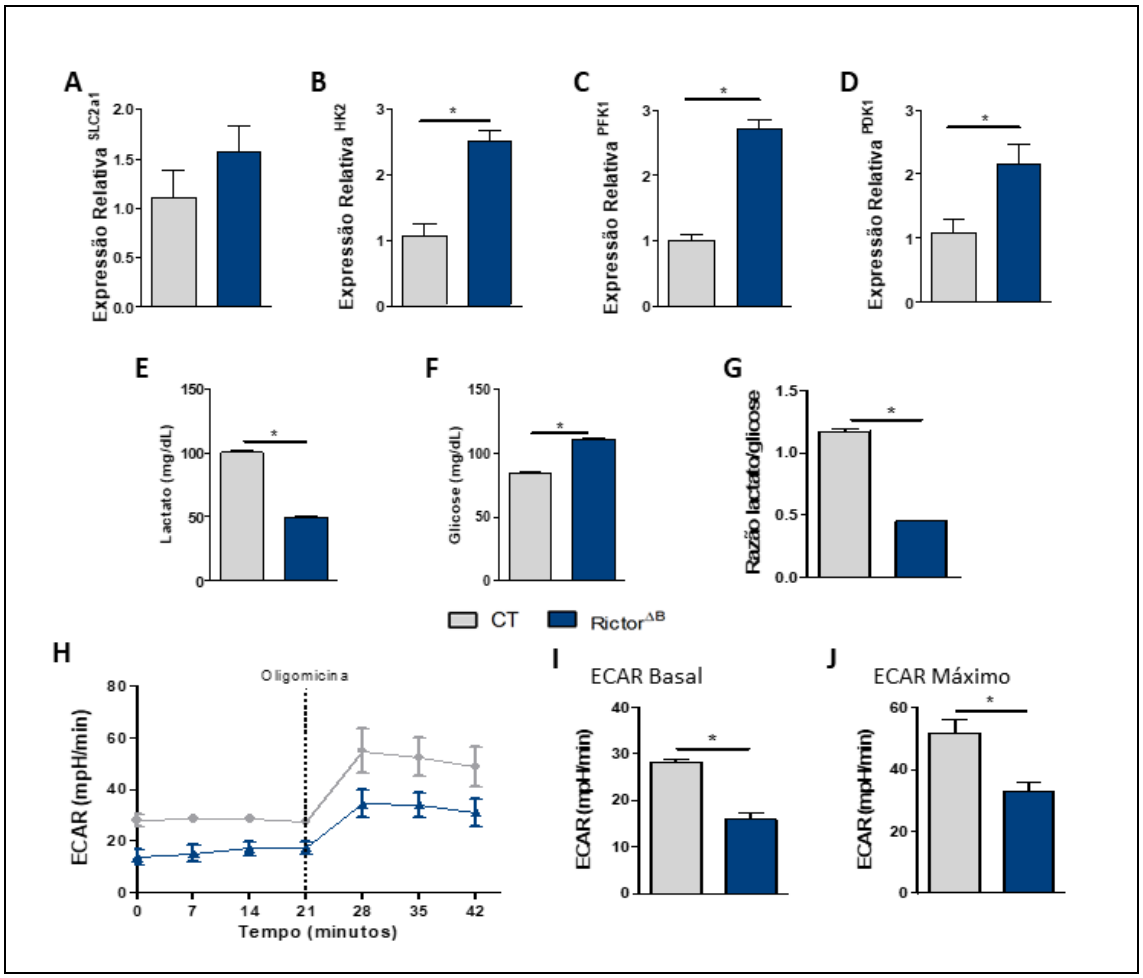


Figura 11 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam níveis reduzidos de glicólise aeróbica. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. Expressão relativa de **(A)** Slc2a1, **(B)** PFK1, **(C)** HK2 e **(D)** PDK1. Dosagem de **(E)** lactato e **(F)** glicose no sobrenadante de cultura após 72 horas de cultura, e **(G)** relação lactato liberado no meio / glicose consumida do meio. **(H)** gráfico representativo das taxas de acidificação extracelular ECAR (indicador de glicólise aeróbica) obtido por *Seahorse* antes e após adição de oligomicina, **(I)** ECAR basal e **(J)** ECAR máximo (obtido após injeção de oligomicina). n=2 amostras por grupo. Dados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0,05.

Na sequência fomos avaliar se OXPHOS estaria sendo beneficiada em células B na deficiência de mTORC2. Uma vez que é sugerido que o abastecimento da mitocôndria pela glicólise está diminuído, devido ao aumento de PDK1 **(Figura 11 D)**, nós resolvemos avaliar a expressão de genes relacionados a outras fontes de alimentação da mitocôndria em células B de CT e Rictor$^{\Delta B}$ após 72 horas de cultura em LPS. Para isso, avaliamos a participação da β-oxidação lipídica, por meio da expressão de CPT1a, que se mostrou aumentada nas células de animais Rictor$^{\Delta B}$ em comparação ao CT **(Figura 12 A)**. Além disso, foi observado aumento da expressão de ACLY, o que sugere elevação da síntese lipídica **(Figura 12 B)**. Sabe-se que alterações na expressão gênica podem não refletir a atividade metabólica da célula

naquele momento. Portanto, nós propomos assim avaliar a atividade mitocondrial de células B deficientes de Rictor$^{\Delta B}$ de modo a observar se ela estava aumentada. Para tais fins, foram utilizados ensaios que melhor refletissem a atividade da célula naquele momento. Após 72 horas de cultura com LPS, avaliamos parâmetros como OXPHOS por *Seahorse* e modificações de massa e potencial de membrana por citometria de fluxo e microscopia confocal. Observou-se que as taxas de OXPHOS em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ eram maiores em relação as de CT, conforme mensurado pelo OCR com o uso do *Seahorse* **(Figura 12 C e D)**. Também foi observado um aumento na capacidade respiratória reserva, SRC, obtida pela técnica de *Seahorse* **(Figura 12 C e F)**. SRC é uma capacidade extra disponível na mitocôndria em caso de necessidade como em situações de estresse celular, sendo mensurada após o uso do desacoplador de elétrons FCCP (84-86). Entretanto, não foram observadas diferenças na massa mitocondrial e nem no potencial de membrana após o uso das sondas Mitotracker e TMRE, respectivamente, nem por citometria de fluxo e nem por microscopia confocal **(Figura 12 F, G e H)**. Para a construção dos histogramas e avaliação do MFI de Mitotracker e TMRE pela técnica de citometria de fluxo, foram excluídos plasmablastos (CD19^{+}CD138^{+}), uma vez que o uso desta técnica permitiu realizarmos a distinção entre as populações de células B e plasmablastos. Desta maneira, eliminamos qualquer possível interferência de plasmablastos na análise. Em conjunto, nossos dados sugerem que a deficiência de mTORC2 em células B eleva as taxas de OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica, sendo a β-oxidação lipídica uma provável fonte de alimentação da mitocôndria para o aumento de OXPHOS.

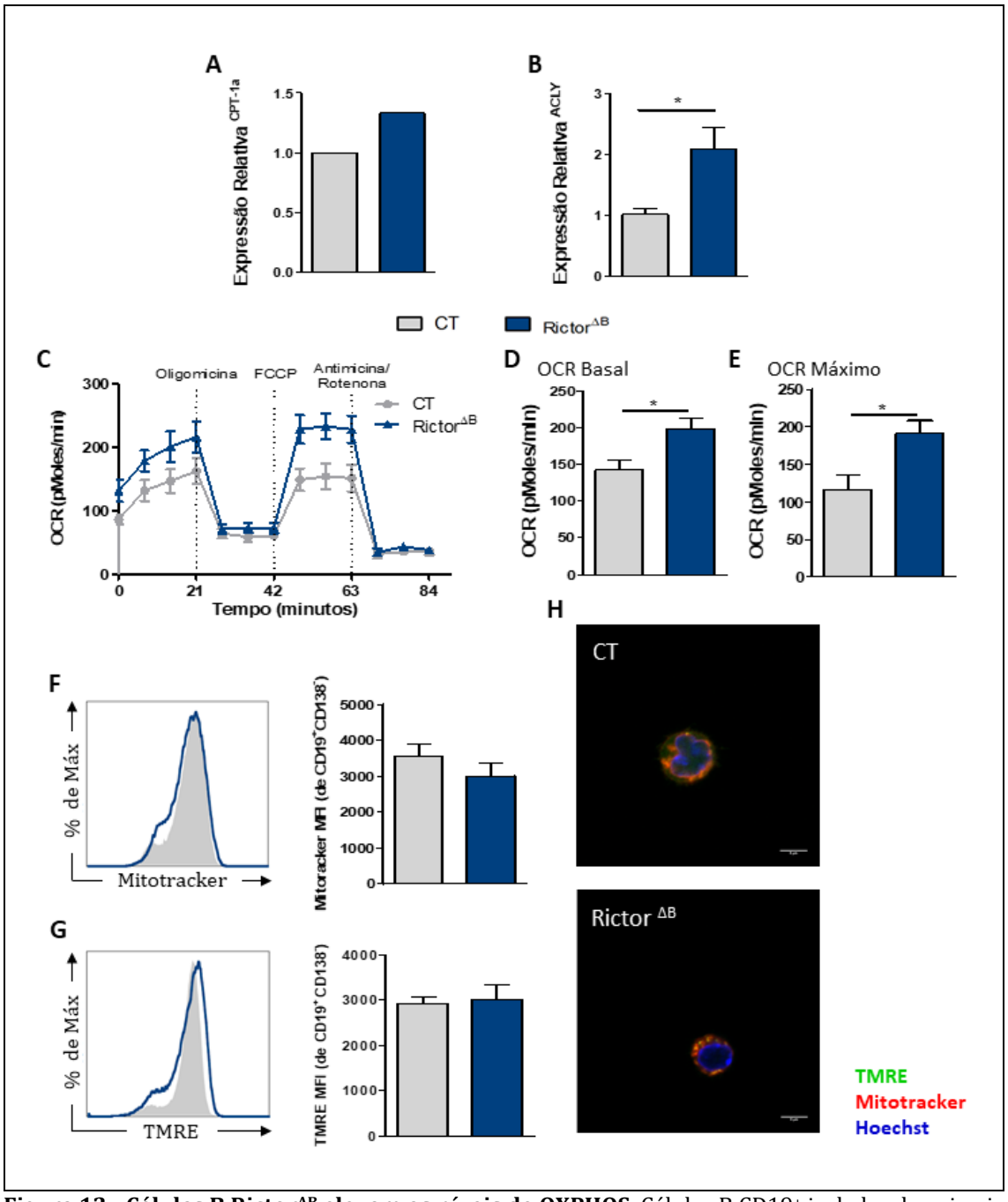


Figura 12 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam os níveis de OXPHOS. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. Expressão relativa de (A) CPT1a e (B) ACLY. (C) Taxas de consumo de oxigênio (OCR) basal de células B, e após injeção de Oligomicina, FCCP e rotenona na presença de antimicina. (D) ECAR basal e (E) ECAR máximo (obtido após adição de FCCP e subtraído do consumo de oxigênio não mitocondrial após a adição de rotenona e antimicina). Histograma representativo (esquerda) e MFI (direita) de (F) Mitotracker e (G) TMRE obtidos por citometria de fluxo. (I) Imagens obtidas por microscopia confocal: Mitotracker (vermelho), TMRE (verde) e Hoechst (azul). Dados representativos de 2 ou 3 experimentos independentes. *p<0,05.

4.5 Aumento em OXPHOS beneficia a formação de plasmablastos

Uma vez que observamos que células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica, nós fomos inicialmente observar se OXPHOS exerceria um papel na ativação de células B WT e em sua diferenciação em plasmablastos. Sabe-se que OXPHOS não é essencial para a proliferação de células B, entretanto não há estudos que reportem o efeito direto de OXPHOS no processo de diferenciação de células B em plasmablastos. Para avaliarmos o impacto de OXPHOS na ativação de células B e na formação de plasmablastos, células B CD19^{+} foram isoladas de animais WT, e forçadas a respirarem durante 72 horas de cultura na presença de LPS. Para isso, as células foram mantidas em meio de cultura na presença ou ausência de glicose. Sabe-se que a ausência de glicose ou a presença de galactose na ausência de glicose forçam OXPHOS (53). Foi observado que células B B220^{+}CD138^{-} **(Figura 13 A)** após incubação em meio sem glicose estavam mais ativadas quando comparadas às incubadas em meio com glicose, uma vez que aumentaram em maior grau a expressão de CD40 e IgM, e em menor grau a de CD86, com base no MFI obtido por citometria de fluxo **(Figura 13 A, B e C)**. Também foi observado que as células em meio sem glicose elevaram sua diferenciação em plasmablastos (B220^{+}CD138^{+}), em relação à incubação em meio com glicose **(Figura 13 D)**. Entretanto, o uso do inibidor glicolítico, 2DG, impediu o aumento da expressão de moléculas de ativação por células B e sua diferenciação em plasmablastos **(Figura 13)**. Para confirmarmos se os efeitos observados eram exclusivos do uso do 2DG, utilizamos 2DG em meio sem glicose e a ativação das células B e diferenciação em plasmablastos foi inibida novamente **(Figura 13)**. Estes dados sugerem que a elevação de OXPHOS exerce um papel na formação de plasmablastos, embora não possamos afirmar os impactos diretos da via glicolítica neste processo.

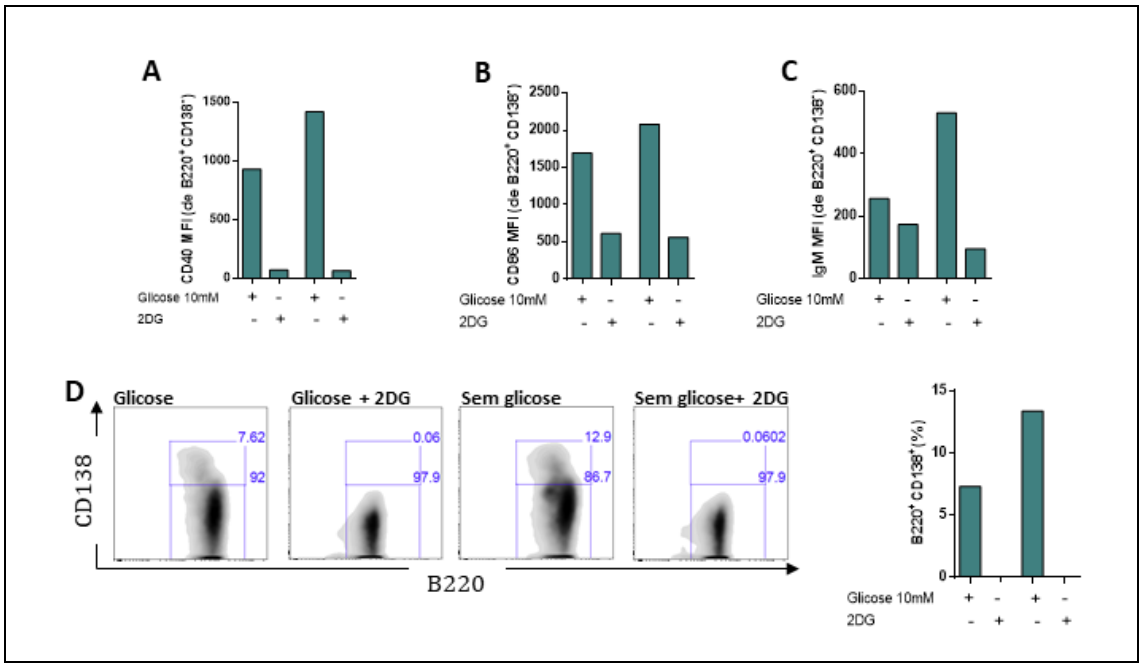


Figura 13 - OXPHOS beneficia a ativação de células B e sua diferenciação em plasmablastos. Células B CD19⁺ foram isoladas de animais WT e mantidas em cultura na presença de LPS por 72 horas na presença ou ausência de glicose e/ou de 2DG. MFI de **(A)** CD40, **(B)**, CD86 e **(C)** IgM em células B B220⁺CD138⁻, e **(D)** density plot representativo de plasmablastos B220⁺CD138⁺ (esquerda) e frequência de plasmablastos (direita). n=1 amostra por grupo. Dados representativos de 1 experimento. *p<0,05.

4.6 Células B Rictor$^{\Delta B}$ são mais ativadas e apresentam níveis de diferenciação em plasmablastos e troca de isotipo aumentados

Nosso experimento realizado com células B provenientes de animais WT demonstrou que OXPHOS beneficia a ativação de células B e a formação de plasmablastos. Desta maneira, nós formulamos a hipótese que o aumento de OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica em Rictor$^{\Delta B}$ beneficiaria a maior ativação de células B e sua diferenciação em plasmablastos. Para verificarmos esta hipótese, células B provenientes de CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS para avaliação da expressão de moléculas de ativação e de plasmablastos por citometria. Observou-se que células B CD19⁺ CD138⁻ de Rictor$^{\Delta B}$ após incubação expressavam níveis elevados de IgM e expressões similares de CD40 **(Figura 14 A e C)**. Entretanto, estas mesmas células apresentavam níveis reduzidos de CD86 em relação ao CT, com base em histogramas e MFI obtidos por citometria de fluxo **(Figura 14 B)**.

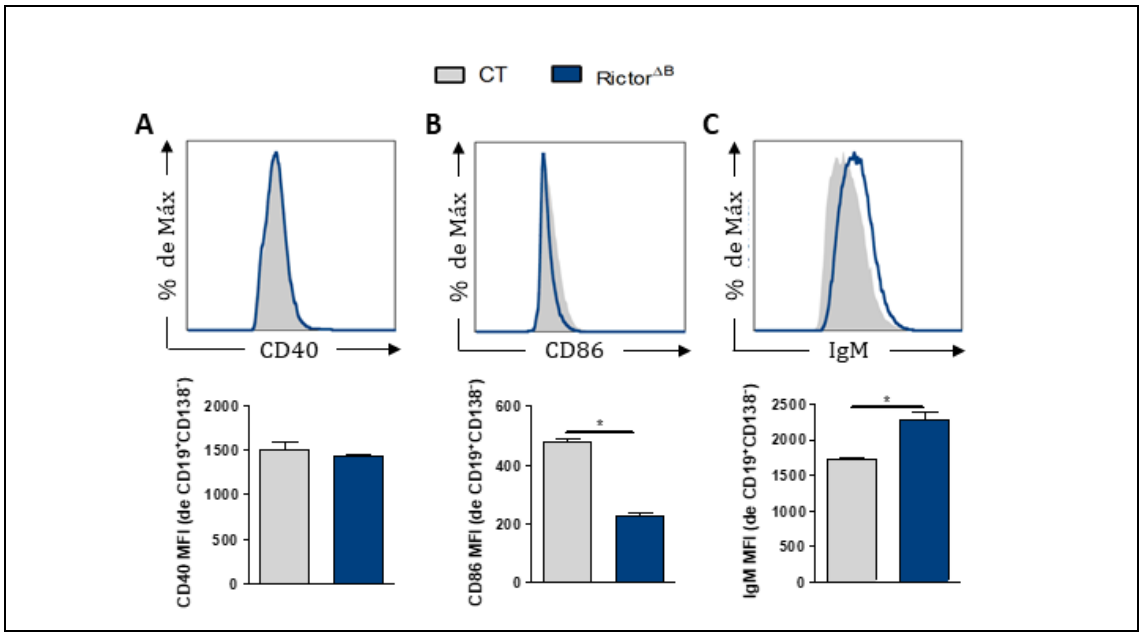


Figura 14 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam a expressão de IgM. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. Histograma (superior) e MFI (inferior) de (A) CD40, (B) CD86 e (C) IgM obtidos de células B CD19^{+}CD138^{-} por citometria de fluxo. Dados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0,05.

Após 72 horas de cultura com LPS, verificou-se também que células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ apresentam maior diferenciação em plasmablastos (CD19^{+}CD138^{+}) em comparação ao CT tanto na frequência quanto no número absoluto **(Figura 15 A)**. Para avaliar se a troca de isotipo também estaria sendo beneficiada nas células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$, estas foram incubadas com LPS na presença de IL4, estímulos que, como mencionado, são conhecidos por induzirem troca de isotipo de IgM para IgG1. Observou-se que a frequência de células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$, CD19^{+}CD138^{-}, expressando IgG1 em sua membrana era significativamente maior com relação ao CT **(Figura 15 B)**. Nossos resultados sugerem que a deficiência de mTORC2 regula positivamente OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica, facilitando a formação de plasmablastos e a troca de isotipo de IgM para IgG1.

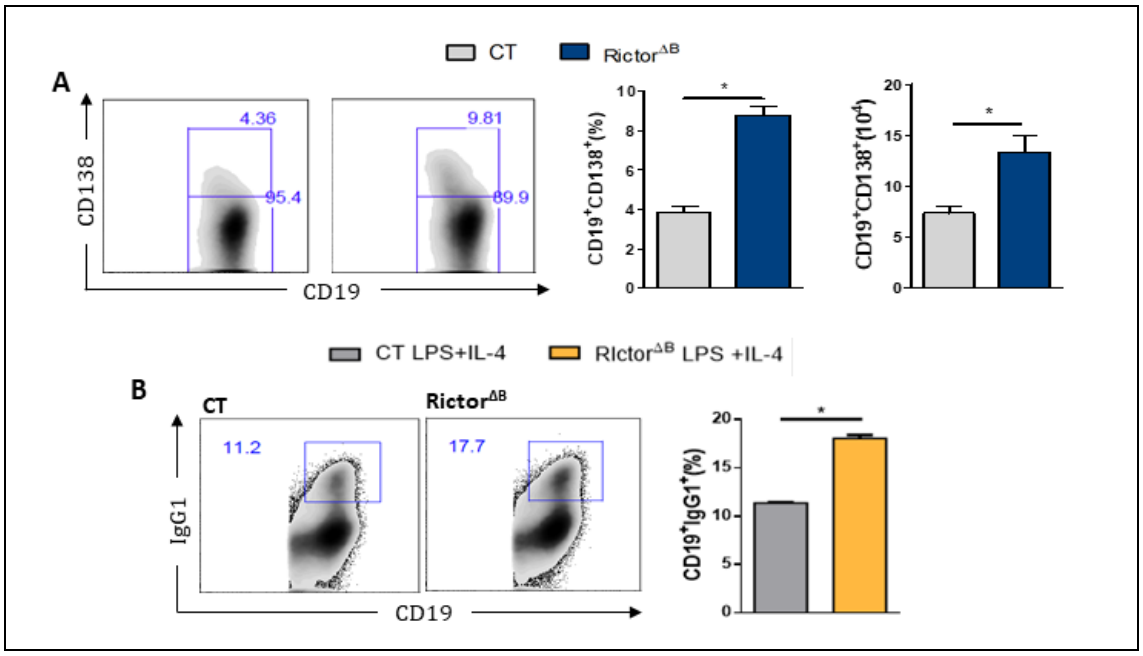


Figura 15 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ possuem diferenciação elevada em plasmablastos e de troca de isotipo. Células B CD19$^+$ isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. **(A)** Density plot representativo (esquerda), frequência (centro) e número absoluto (direita) de plasmablastos CD19$^+$CD138$^+$ obtidos por citometria de fluxo. Células B CD19$^+$ isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS e IL4. **(B)** Density plot (esquerda) e frequência (direita) de células B CD19$^+$CD138$^-$IgG1$^+$ obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 5 ou 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.7 Redução nas taxas de glicólise aeróbica e aumento de OXPHOS é essencial para o aumento de plasmablastos observado em Rictor$^{\Delta B}$

Para verificarmos se o aumento nos níveis de glicólise aeróbica em Rictor$^{\Delta B}$ estão relacionados com o aumento na formação de plasmablastos, nós elevamos os níveis da atividade glicolítica de células B obtidas de Rictor$^{\Delta B}$ com o uso de LPS na presença de IL4. Sabe-se por meio de outros estudos que a IL4 é capaz de elevar a atividade glicolítica de células B (87), o que também pode ser observado por meio da maior produção de lactato por Rictor$^{\Delta B}$ após incubação com LPS e IL4 em comparação com LPS apenas **(Figura 16 A)**. Além disso, observou-se que a razão glicose consumida/lactato liberado no sobrenadante foi equivalente entre células B de Rictor$^{\Delta B}$ e CT incubadas com LPS e IL4 **(Figura 16 B)**. Verificou-se então que o aumento na formação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$ presente quando estas células eram incubadas apenas com LPS foi perdido, sendo que na presença de LPS e IL4 os níveis de diferenciação em plasmablastos foram equivalentes entre CT e Rictor$^{\Delta B}$ após 72 horas de incubação **(Figura 16 C)**.

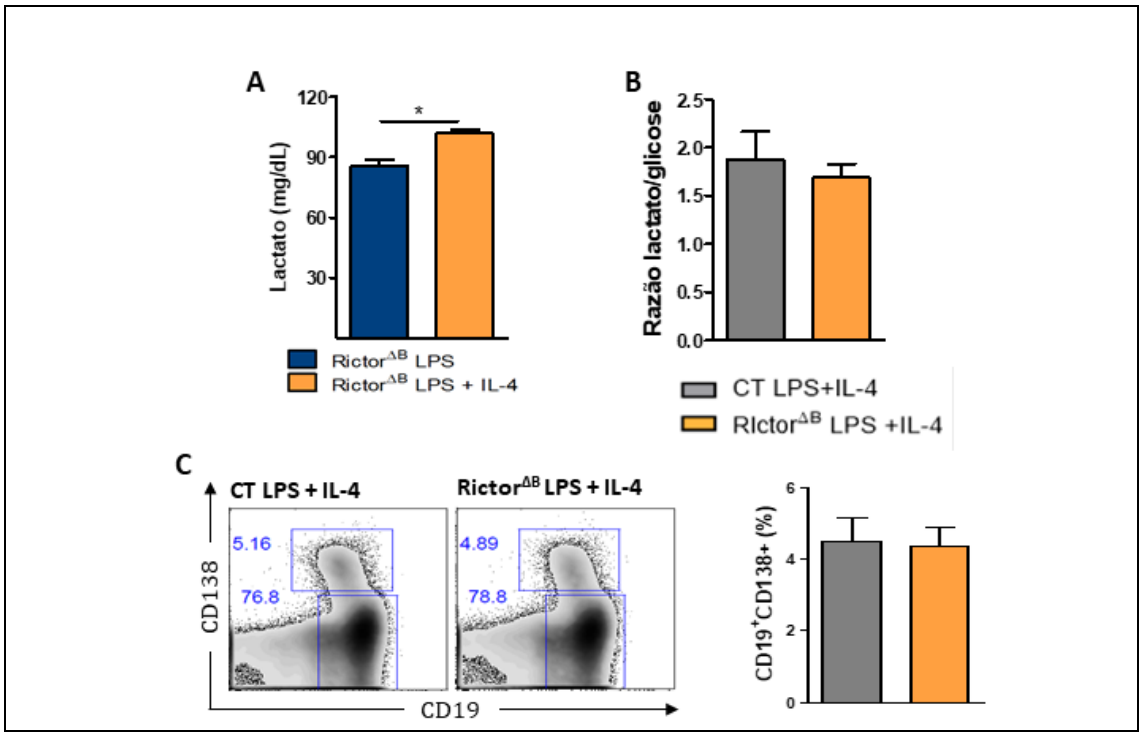


Figura 16 - Aumento nas taxas de glicólise aeróbica é essencial para o aumento de plasmablastos observado em Rictor$^{\Delta B}$ .Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS ou LPS e IL4. **(A)** lactato no sobrenadante de células Rictor$^{\Delta B}$ incubadas na presença de LPS ou LPS e IL4. **(B)** Razão lactato/glicose no sobrenadante de células B CT ou Rictor$^{\Delta B}$ após incubação com LPS e IL4. **(C)** Plasmablastos de CT e Rictor$^{\Delta B}$ CD19^{+}CD138^{+} gerados após 72 horas de incubação com LPS e IL4. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

Na sequência, interrogamos se OXPHOS estaria diretamente relacionada com o aumento na formação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$. Para isso nós mantivemos células B provenientes de CT ou Rictor$^{\Delta B}$ em cultura por 72 horas na presença de LPS e na presença ou ausência de glicose no meio de cultura. A ausência de glicose, como já mencionado anteriormente, é capaz de forçar OXPHOS. Para confirmarmos se a ausência de glicose foi eficiente na elevação da atividade mitocondrial, estas células foram incubadas com as sondas Mitotracker e TMRE, as quais são capazes de detectar a massa e potencial de membrana mitocondrial, respectivamente. Os resultados obtidos por MFI após a citometria de fluxo confirmam que ambos estavam elevados em células cultivadas em meio sem glicose, o que indica que OXPHOS deve ter sido elevada **(Figura 17 A e B)**. Desta forma, constatou-se que o aumento de OXPHOS é capaz de elevar ainda mais a diferenciação de células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ em plasmablastos. Estes resultados corroboram nossa

hipótese inicial, apesar da diferença na população de plasmablastos não ser significativa entre Rictor$^{\Delta B}$ com e sem glicose **(Figura 17 C)**.

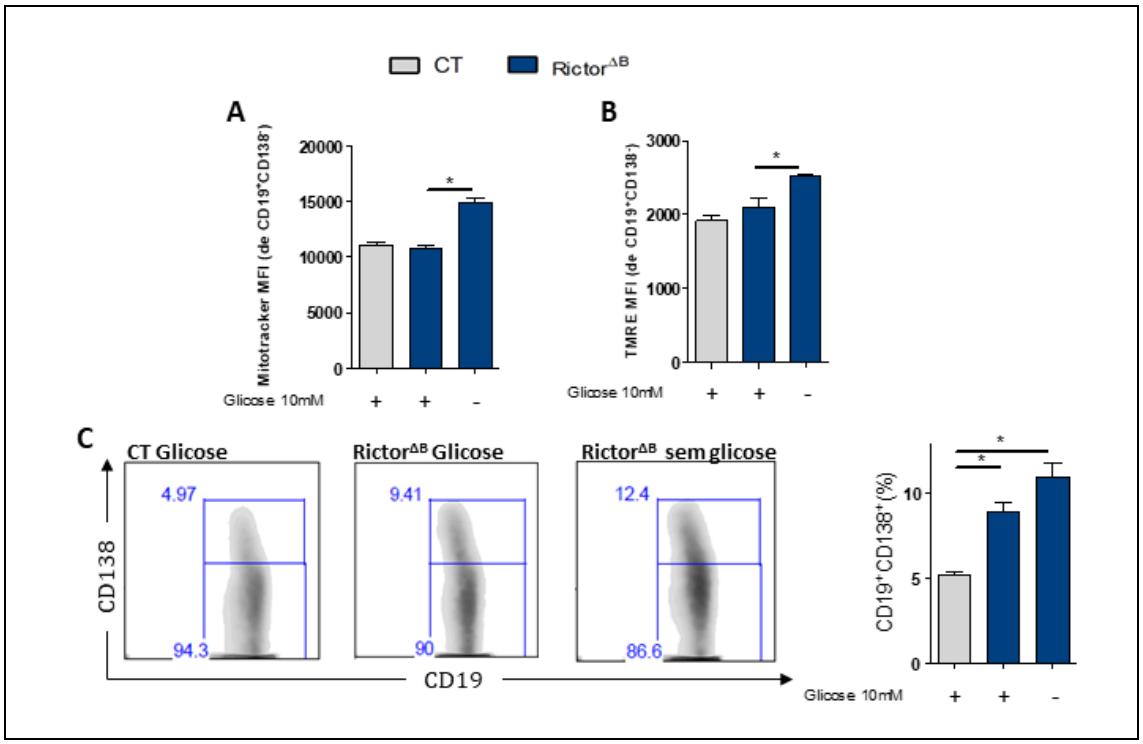


Figura 17 - Aumento de OXPHOS eleva ainda mais a diferenciação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$. Células B CD19$^+$ isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas na presença ou ausência de glicose. MFI de (A) Mitotracker e (B) TMRE de células B CD19$^+$CD138$^-$ obtidos por citometria de fluxo. Density plot ilustrativo (esquerda) e frequência (direita) de plasmablastos CD19$^+$CD138$^+$. Dados representativos de 1 experimento. *p<0,05.

Na sequência, nós nos questionamos qual seria a fonte energética que estaria abastecendo OXPHOS e contribuindo para o aumento na formação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$. Como após 72 horas de cultura com LPS a expressão de PDK1 estava elevada em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ **(Figura 12 D)**, o que indicaria uma redução na importação de piruvato do citosol para a mitocôndria e que a expressão de CPT1a também estava elevada **(Figura 13 A)**, o que indica um aumento de oxidação lipídica, nós resolvemos investigar se a β-oxidação seria importante para o ciclo do TCA e OXPHOS. Para isso, foi utilizada uma droga que inibe a atividade de CPT1a chamada etomoxir. Os resultados mostraram que a inibição da oxidação lipídica foi capaz de diminuir significativamente a frequência e o número de plasmablastos formados após 72 horas de cultura com LPS em Rictor$^{\Delta B}$ a níveis comparáveis ao CT **(Figura 18)**. Estes resultados sugerem que β-oxidação é

essencial para o aumento de plasmablastos observado em Rictor$^{\Delta B}$, e que a elevação de OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica beneficiam a diferenciação.

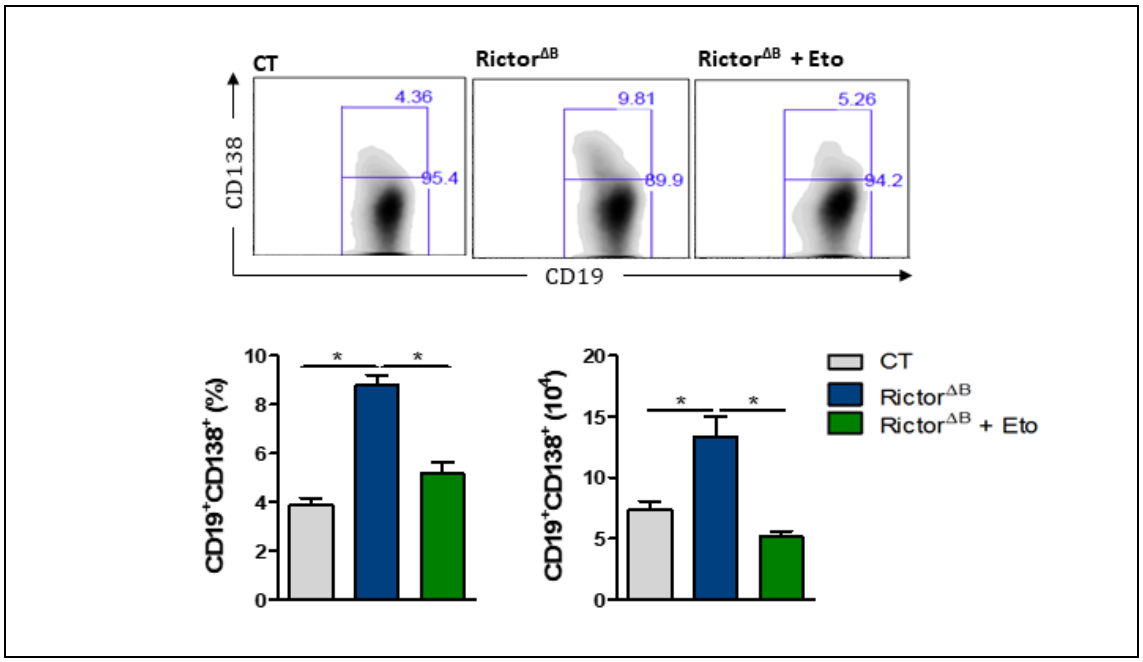


Figura 18 - Inibição da oxidação lipídica inibe o aumento observado em plasmablastos de Rictor$^{\Delta B}$. Células B CD19$^+$ isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas na presença ou ausência do inibidor de CPT1a, Etomoxir. Density plot (superior), frequência (inferior esquerda) e número (inferior direita) de plasmablastos CD19$^+$CD138$^+$ obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.8 Células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ aumentam a atividade glicolítica e diminuem sua massa e função mitocondrial após diferenciação em plasmablastos

Tendo formulado anteriormente a hipótese de que o aumento na expressão de genes relacionados à via glicolítica após 72 horas de cultura com LPS não estaria representando a atividade das células B naquele momento, nós suspeitamos que estas células poderiam alterar seu perfil metabólico a medida que a diferenciação em plasmablastos se tornasse mais acentuada. Desta maneira, após as 72 horas de cultura em LPS, o meio de cultura das células, tanto de CT quanto de Rictor$^{\Delta B}$, foi trocado por novo e mantido por mais 48 horas na presença de LPS e então o lactato foi mensurado no sobrenadante (totalizando 120 horas em cultura com uma troca de meio após 72 horas). Após as 72 horas, foram observadas as mesmas alterações descritas anteriormente: células B obtidas de Rictor$^{\Delta B}$ reduziram as taxas de

glicólise aeróbica, como indicado pela redução nos níveis de lactato no sobrenadante de Rictor$^{\Delta B}$ **(Figura 19 A)**. Entretanto, nas 48 horas subsequentes (120 horas após estímulo inicial) a produção de lactato liberado no sobrenadante foi equivalente entre os grupos **(Figura 19 A)**, indicando que o aumento inicial de genes relacionados à glicólise em Rictor$^{\Delta B}$ após 72h de estímulo estejam refletindo alterações metabólicas ocorrendo após este período, ou seja, a glicólise aeróbica (inicialmente diminuída) é restaurada após 72h de estímulo. Corroborando estes resultados, a captação de glicose, avaliada com o uso do análogo fluorescente da glicose 2NBDG, estava aumentada em plasmablastos de Rictor$^{\Delta B}$ após 72 horas de cultura, embora a diferença não seja estatisticamente significativa. **(Figura 19 B)**.

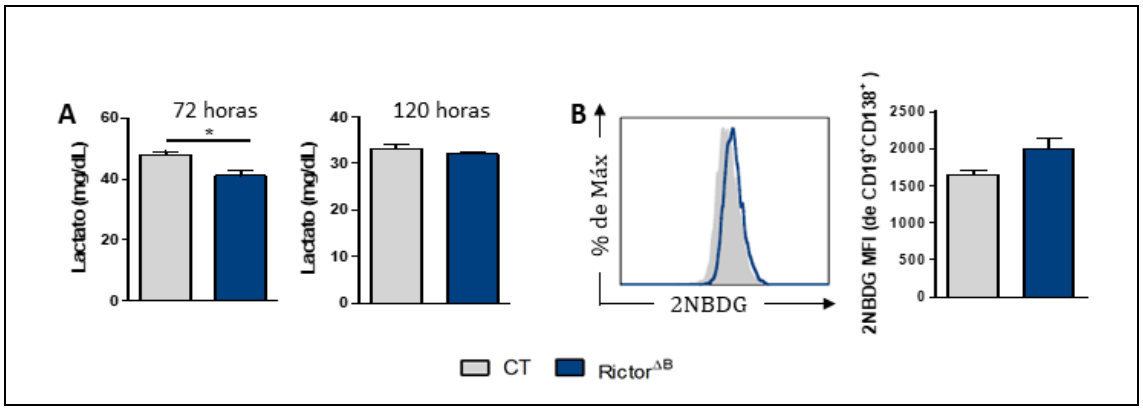


Figura 19 -. Diferenciação de células B em plasmablastos eleva os níveis de glicólise aeróbica e de captação de glicose. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas ou 120 horas. **(A)** Lactato mensurado no sobrenadante de cultura após 72 horas (esquerda) ou 120 horas de cultura, após troca de meio após 72 horas de cultura (direita). **(B)** Histograma representativo (esquerda) e MFI (direita) da captação de glicose com o uso do análogo fluorescente de glicose 2NBDG em plasmablastos CD19^{+}CD138^{+} obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

Estes dados nos levaram a interrogar como estaria a atividade mitocondrial de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$ CD19^{+}CD138^{+}, uma vez que é provável que estas células estejam modulando vias metabólicas após diferenciação, de acordo com os dados obtidos pela dosagem de lactato **(Figura 19 A)**. Para isso, avaliamos plasmablastos diferenciados a partir de células B Rictor$^{\Delta B}$ e CT incubados por 72 horas com LPS, com as sondas Mitotracker e TMRE, respectivamente. Foi observado que os plasmablastos de Rictor$^{\Delta B}$ reduzem tanto a massa quanto o potencial de membrana **(Figura 20 A e B)**. Estes resultados indicam que mTORC2 aparentemente exerce papel oposto em plasmablastos em comparação com células

B, pois a atividade mitocondrial é beneficiada sobre a glicólise aeróbica em plasmablastos Rictor$^{\Delta B}$.

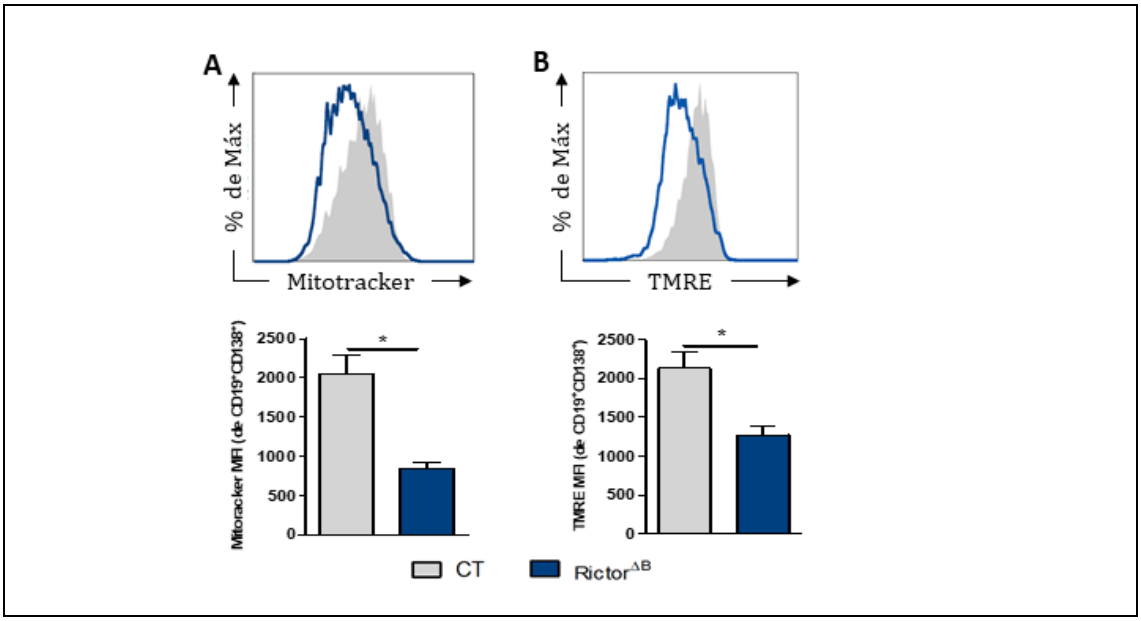


Figura 20 - Células B Rictor$^{\Delta B}$ reduzem a massa e potencial de membrana após diferenciação em plasmablastos. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas. Histograma representativo (superior) e MFI (inferior) de **(A)** Mitotracker e **(B)** TMRE em plasmablastos CD19^{+}CD138^{+} obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.9 Células B reduzem a massa e potencial mitocondrial após diferenciação em plasmablastos

O fato de células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ alterarem o seu perfil metabólico após diferenciação em plasmablastos nos levou a questionar se plasmablastos em si diferem metabolicamente das células B CT. Para isso, avaliamos a massa e o potencial de membrana mitocondrial de células B (CD19^{+}CD138^{-}) e plasmablastos (CD19^{+}CD138^{+}) provenientes de CT. Os resultados obtidos por histogramas e MFI após citometria de fluxo revelam que plasmablastos reduzem significativamente a massa e potencial de membrana mitocondrial após este período em comparação as células B **(Figura 22 A e B)**. Estes resultados sugerem que naturalmente ocorre uma alteração metabólica após diferenciação de células B em plasmablastos, com uma significativa redução na massa e função mitocondrial, sendo que está redução é mais acentuada na deficiência de mTORC2.

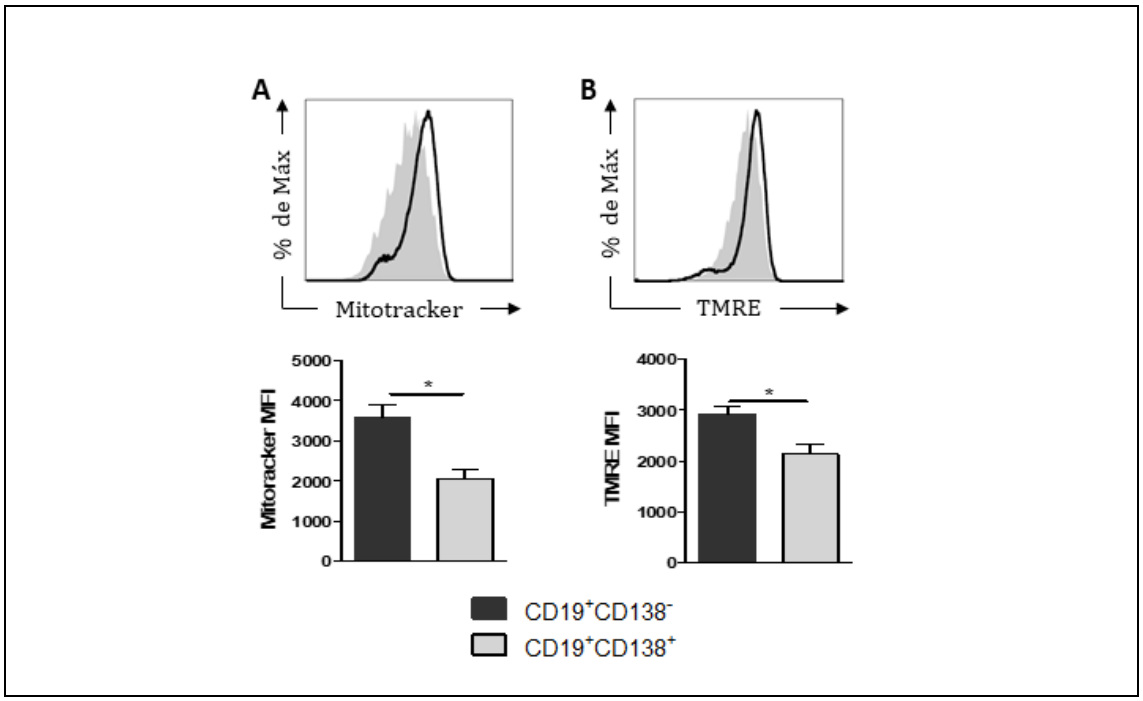


Figura 21 - Plasmablastos apresentam menor massa e potencial de membrana em relação as células B. Células B CD19+ isoladas de animais CT foram incubadas com LPS por 72 horas. Histograma representativo (superior) e MFI (inferior) de **(A)** Mitotracker e **(B)** TMRE em células B (preto) e plasmablastos (cinza) obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.10 Células B Rictor$^{\Delta B}$ elevam a produção total de IgM, mas possuem a capacidade de produzir anticorpos reduzida após diferenciação em plasmablastos

Considerando que a formação de plasmablastos é elevada em células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ em comparação ao CT, nós avaliamos se a produção de anticorpos estaria sendo também beneficiada ou não, uma vez que após diferenciação de Rictor$^{\Delta B}$ em plasmablastos ocorrem alterações sólidas no perfil metabólico destas células. Constatou-se que a produção total de IgM detectada no sobrenadante de células B provenientes de Rictor após 72 horas de cultura com LPS foi maior em comparação ao CT **(Figura 21 A)**. Entretanto, quando a razão da média de anticorpos produzidos por plasmablasto foi realizada, é possível observar que a capacidade individual de produção de anticorpos por cada plasmablasto proveniente de célula B isoladas de Rictor$^{\Delta B}$ é reduzida em relação ao CT **(Figura 21 B)**. Estes resultados indicam que o aumento na produção de anticorpos totais em

Rictor$^{\Delta B}$ é reflexo direto do aumento no número de plasmablastos neste grupo e não da maior capacidade de produção individual dos plasmablastos.

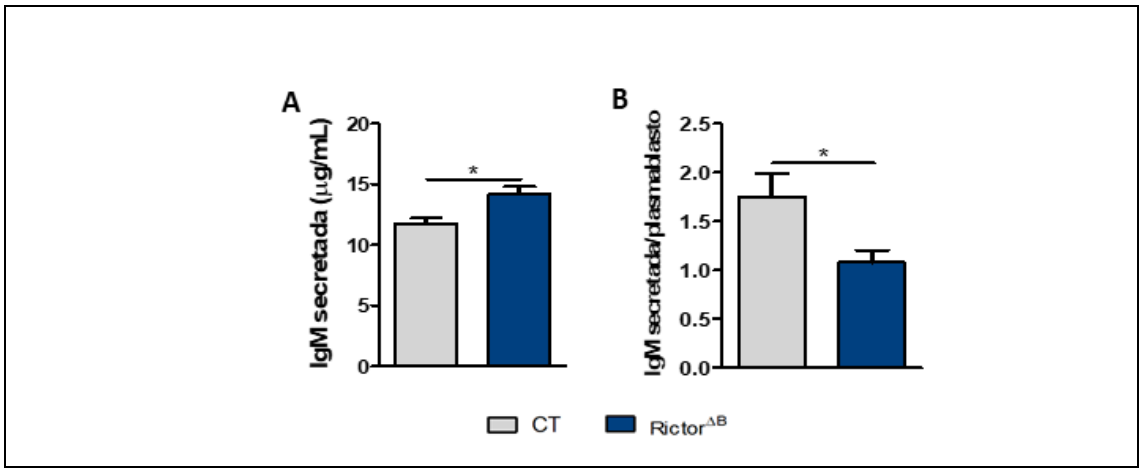


Figura 22 - Plasmablastos diferenciados de células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam produção de anticorpos afetada. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas**. (A)** IgM secretada (µg/mL) e **(B)** IgM secretada por plasmablasto no sobrenadante de cultura detectado por Elisa. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.11 Inibição da oxidação lipídica afeta negativamente a produção de anticorpos por plasmablastos

Uma vez que plasmablastos são os responsáveis pela secreção de anticorpos e ao se diferenciarem reduzem a massa e função mitocondrial, nós poderíamos formular a hipótese que a mitocôndria exerce um papel crítico apenas antes ou durante a diferenciação e não para a secreção de anticorpos por plasmablastos. Entretanto, como plasmablastos diferenciados de células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$ apresentam aumento na atividade glicolítica e redução na massa e função mitocondrial e, concomitantemente, possuem menor capacidade de produção de anticorpos por plasmablasto **(Figura 21 B)**, nós nos questionamos se a atividade mitocondrial continuaria sendo fundamental, desta vez, para a produção de anticorpos. Desta maneira, a produção de anticorpos após incubação de células B provenientes de CT com LPS por 72 horas na presença de etomoxir foi avaliada. Como esperado a produção de IgM total foi reduzida **(Figura 23 A)**, uma vez que como já mostrado o inibidor reduz significativamente a formação de plasmablastos **(Figura 18 A)**. Entretanto, a capacidade individual de produção de anticorpos por plasmablasto também foi afetada **(Figura 23 B)**. Estes resultados sugerem que a

atividade mitocondrial não é somente fundamental para a formação de plasmablastos, mas também para a secreção de anticorpos.

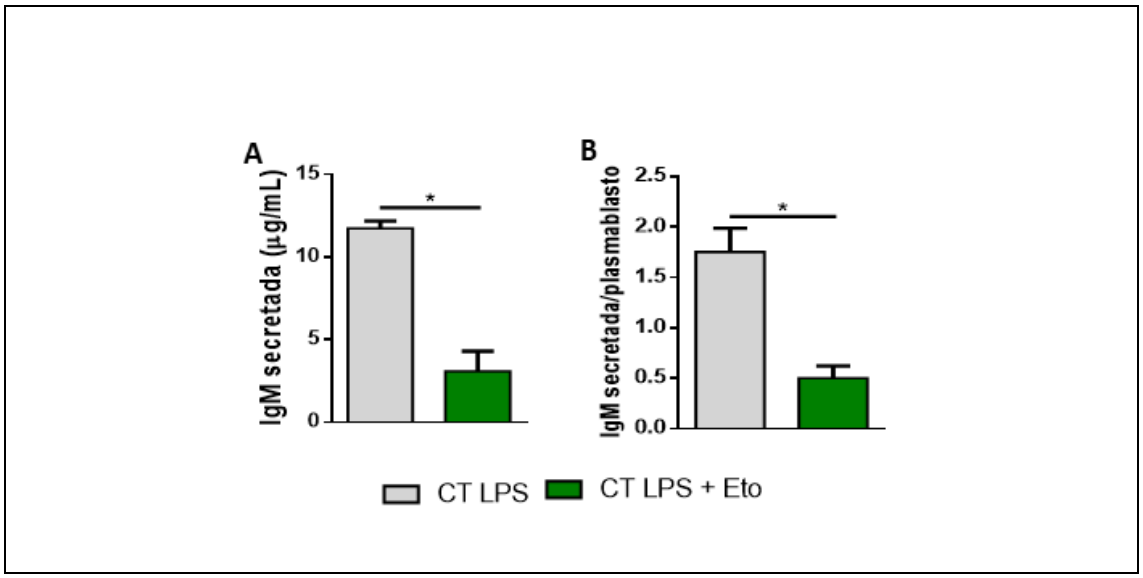


Figura 23 - Inibição da oxidação lipídica reduz a produção de anticorpos. Células B CD19⁺ isoladas de animais CT foram incubadas com LPS por 72 horas. **(A)** IgM secretada (µg/mL) e **(B)** Relação de IgM secretada por plasmablasto no sobrenadante de cultura detectado por Elisa. Dados representativos de 1 experimento. *p<0,05.

4.12 Células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC1

Nós nos questionamos se as alterações observadas na deficiência de mTORC2 também seriam observadas na deficiência de mTORC1, tanto metabólicas quanto na função efetora destas células. Para isso, realizamos testes similares aos realizados com mTORC2. Inicialmente observamos que a atividade de mTORC1 estava reduzida nos animais Raptor$^{\Delta B}$ por meio da avaliação da fosforilação do alvo *downstream* de mTORC1, S6, com o uso da técnica de *western blot*. Desta maneira, confirmamos redução na atividade de mTORC1, por meio da redução na fosforilação de S6 **(Figura 24)**.

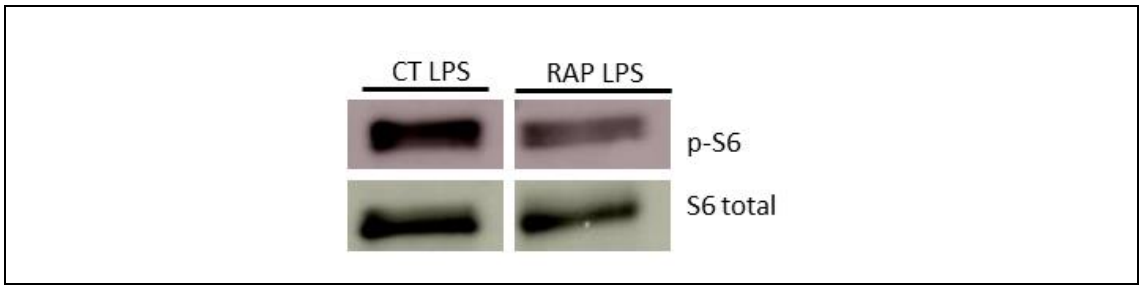


Figura 24 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade de mTORC1. Análise de Western blot realizado com o uso de proteínas extraídas de células B CT (esquerda) ou Raptor$^{\Delta B}$ (direita) após estímulo com LPS por duas horas, após marcação para p-S6 (superior) e S6 total (inferior). Dados representativos de 2 experimentos independentes.

4.13 Células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução nos níveis de glicólise aeróbica após 72 horas de cultura com LPS

Na sequência, avaliamos se as células B Raptor$^{\Delta B}$ beneficiam OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica assim como células B Rictor$^{\Delta B}$. Com este objetivo, avaliamos os níveis de glicose e lactato no sobrenadante de células B deficientes de mTORC1 para verificarmos se os níveis de glicólise aeróbica poderiam estar alterados. Constatou-se que após 72 horas de cultura, as células B obtidas de Raptor$^{\Delta B}$ estimuladas com LPS consumiram níveis menores de glicose do meio e produziram níveis menores de lactato quando comparadas às células B de animais CT **(Figura 25 A e B)**. Esta redução também é evidente quando a relação lactato liberado no meio/glicose consumida do meio é avaliada **(Figura 25 C)**, o que nos indica que a glicólise aeróbica durante o período de incubação é reduzida em células B de Raptor$^{\Delta B}$ assim como observado em Rictor$^{\Delta B}$ **(Figura 12)**. Na sequência, assim como realizamos com células B provenientes de Rictor$^{\Delta B}$, para confirmarmos de uma maneira direta se as taxas de glicólise aeróbica estavam diminuídas, as taxas de ECAR ao longo do tempo foram avaliadas após 72 horas de cultura com LPS. Confirmou-se desta maneira que o ECAR de Raptor$^{\Delta B}$ é inferior ao de CT, bem como o ECAR máximo avaliado após a adição de oligomicina **(Figura 25 D, E e F)**.

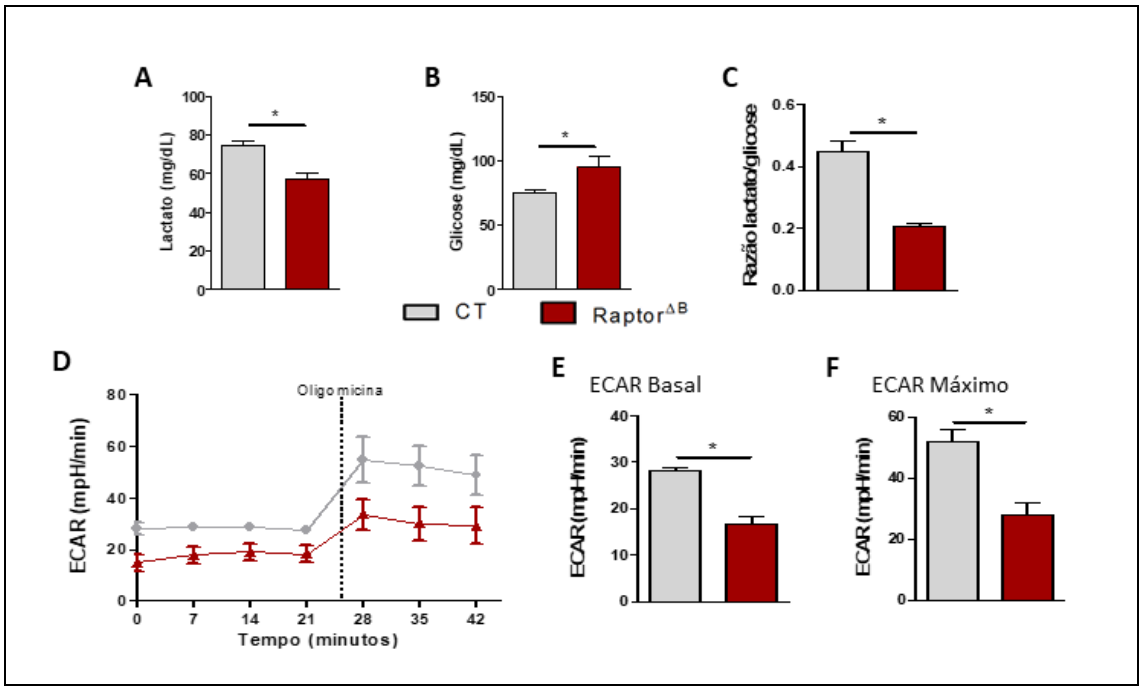


Figura 25 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ apresentam níveis reduzidos de glicólise aeróbica. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Raptor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. Dosagem de **(A)** lactato e **(B)** glicose no sobrenanadante de cultura e **(C)** relação de lactato liberado e glicose consumida do sobrenadante de cultura. **(D)** Taxas de acidificação extracelular ECAR (indicador de glicólise aeróbica) obtido por *Seahorse* antes a após adição de oligomicina, **(E)** ECAR basal e **(F)** ECAR máximo (ECAR máximo obtido após injeção de oligomicina). Dados representativos de 1 ou 2 experimentos independentes. *p<0,05.

Além disso, assim como em células B derivadas de Rictor$^{\Delta B}$, as células B originadas de Raptor$^{\Delta B}$ não apresentaram diferenças na massa mitocondrial e nem no potencial de membrana **(Figura 26 A e B)**. Para avaliação do MFI de MitoTracker e TMRE por citometria de fluxo foram excluídos plasmablastos da análise (CD19^{+}CD138^{+}). Nossos resultados apontam que tanto na deficiência de mTORC2 quanto de mTORC1 ocorre uma redução nas taxas de glicólise aeróbica em células B.

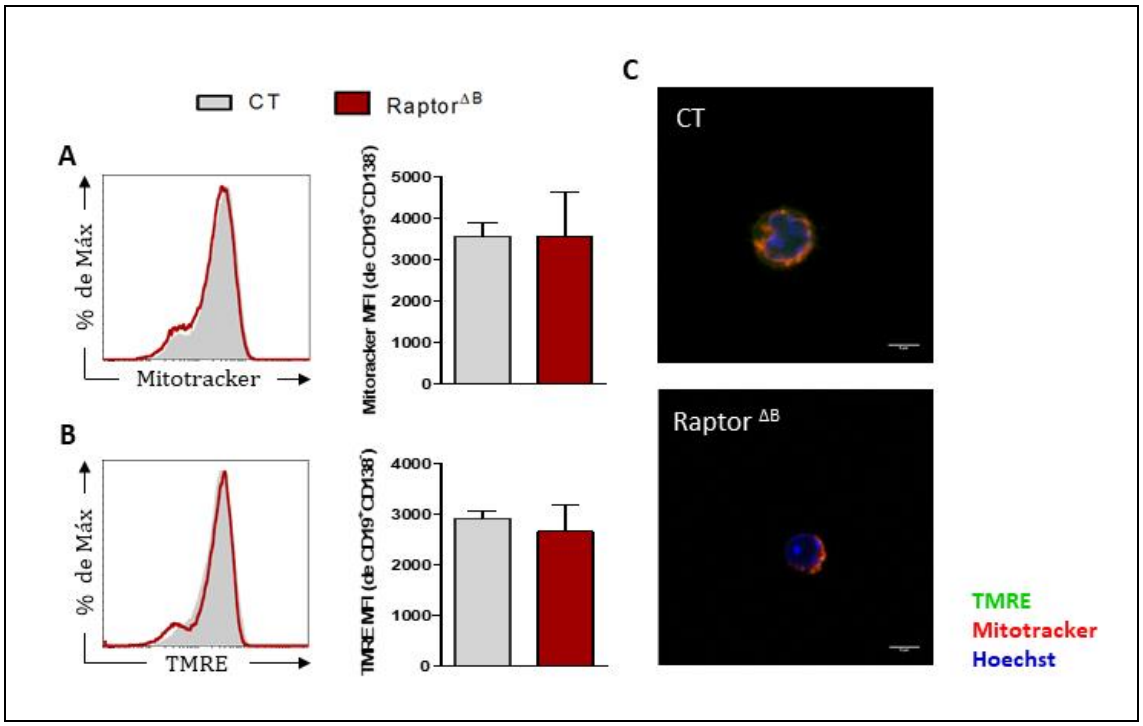


Figura 26 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ não alteram massa e potencial mitocondrial. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Raptor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. Histograma representativo (esquerda) e MFI (direita) de **(A)** Mitotracker e **(B)** TMRE obtidos por citometria de fluxo. **(C)** Imagens de microscopia confocal marcadas com Mitotracker (vermelho), TMRE (verde) e DAPI (azul). Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.14 Células B Raptor$^{\Delta B}$ são mais ativadas e aumentam a diferenciação em plasmablastos, mas reduzem a troca de isotipo

Até o momento, nós observamos que a deficiência de mTORC1 em células B traz os mesmos efeitos que a deleção de mTORC2, uma vez que as alterações metabólicas foram similares entre os dois grupos. Para observar se Raptor$^{\Delta B}$ também exerce efeitos sobre a ativação como em Rictor$^{\Delta B}$, células B provenientes de CT ou Raptor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS para avaliação da expressão de moléculas de ativação e de plasmablastos por citometria. Observou-se que células B, CD19^{+}CD138^{-} (células B com exclusão de plasmablastos) de Raptor$^{\Delta B}$ expressavam níveis elevados de IgM e de CD40 após incubação, embora os aumentos não tenham sido significativos **(Figura 27 A e B)**. Observamos ainda que células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ apresentam maior diferenciação em plasmablastos (CD19^{+}CD138^{+}) em comparação ao CT, tanto a frequência quanto o número absoluto

estavam elevados **(Figura 27 C)**. Para avaliarmos os impactos na troca isotipo nas células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$, estas foram incubadas com LPS na presença de IL4. Observou-se que a frequência de células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$, CD19^{+}CD138^{-}, expressando IgG1 em sua membrana era significativamente menor com relação ao CT **(Figura 27 D)**. Nossos resultados sugerem que tanto a deficiência de mTORC2 quanto de mTORC1 elevam a ativação e diferenciação de células B em plasmablastos, provavelmente devido a alterações metabólicas similares entre os dois grupos, entretanto atuam de maneiras opostas na troca de isotipo.

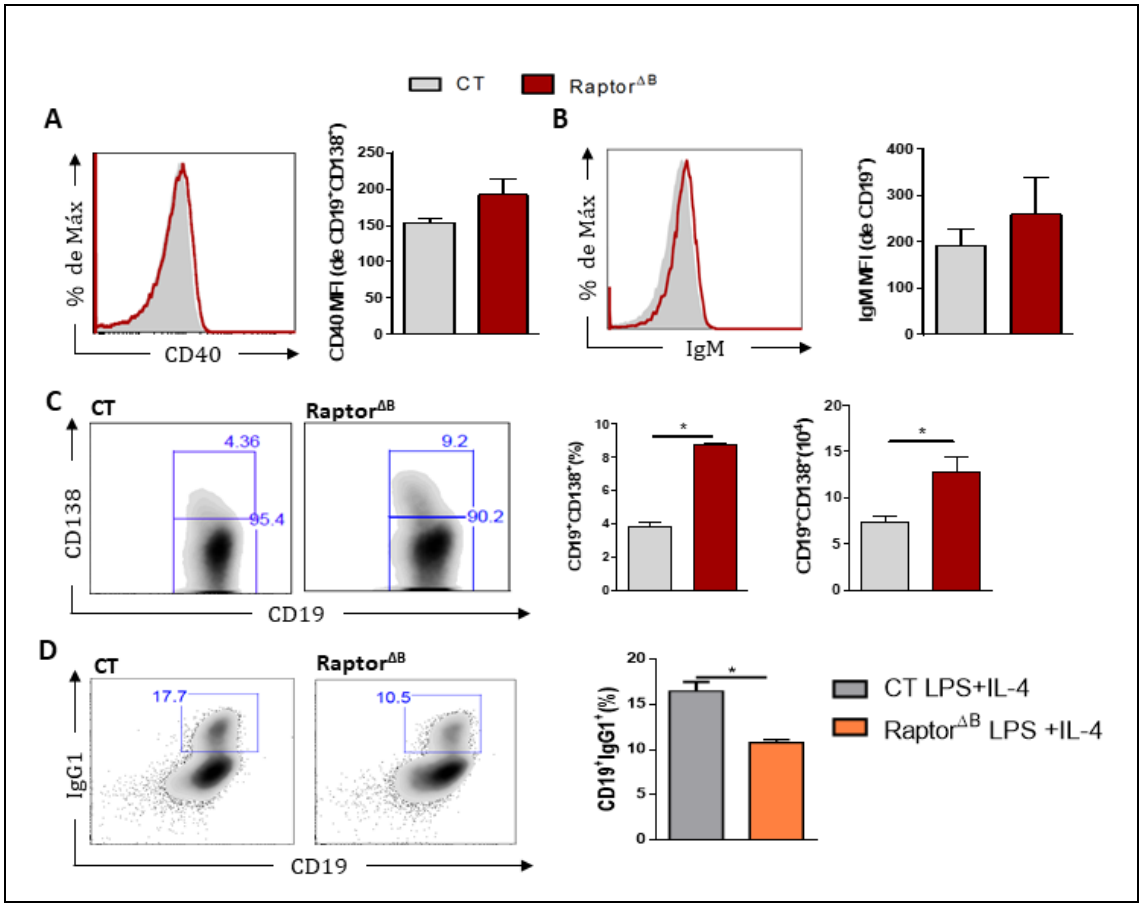


Figura 27 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ são mais ativadas e elevam a diferenciação em plasmablastos, mas reduzem a troca de isotipo. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Raptor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS. Histograma (esquerda) e MFI (direita) de **(A)** CD40 e **(B)** IgM obtidos de células B CD19^{+}CD138^{-} por citometria de fluxo. **(C)** Density plot representativo (esquerda), frequência (centro) e número absoluto (direita) de plasmablastos CD19^{+}CD138^{+} obtidos por citometria de fluxo. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Rictor$^{\Delta B}$ foram incubadas por 72 horas na presença de LPS e IL4. Density plot (esquerda) e frequência (direita) de **(D)** células B CD19^{+}IgG1^{+} obtidas por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.15 Inibição da oxidação lipídica reduz o aumento da formação de plasmablastos provenientes de células B de Raptor$^{\Delta B}$

Assim como foi questionado anteriormente sobre o papel da oxidação lipídica como fonte de alimentação da mitocôndria e como a responsável pelo aumento de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$, o mesmo foi feito para Raptor$^{\Delta B}$. Ao bloquear a oxidação lipídica com etomoxir, inibidor de CPT1a, a frequência e o número de plasmablastos formados após 72 horas de cultura com LPS em Raptor$^{\Delta B}$ foi reduzido à níveis comparáveis ao CT **(Figura 28)**. Estes resultados sugerem que o aumento na formação de plasmablastos a partir de células B deficientes tanto em mTORC2 quanto em mTORC1 está relacionado a β-oxidação lipídica.

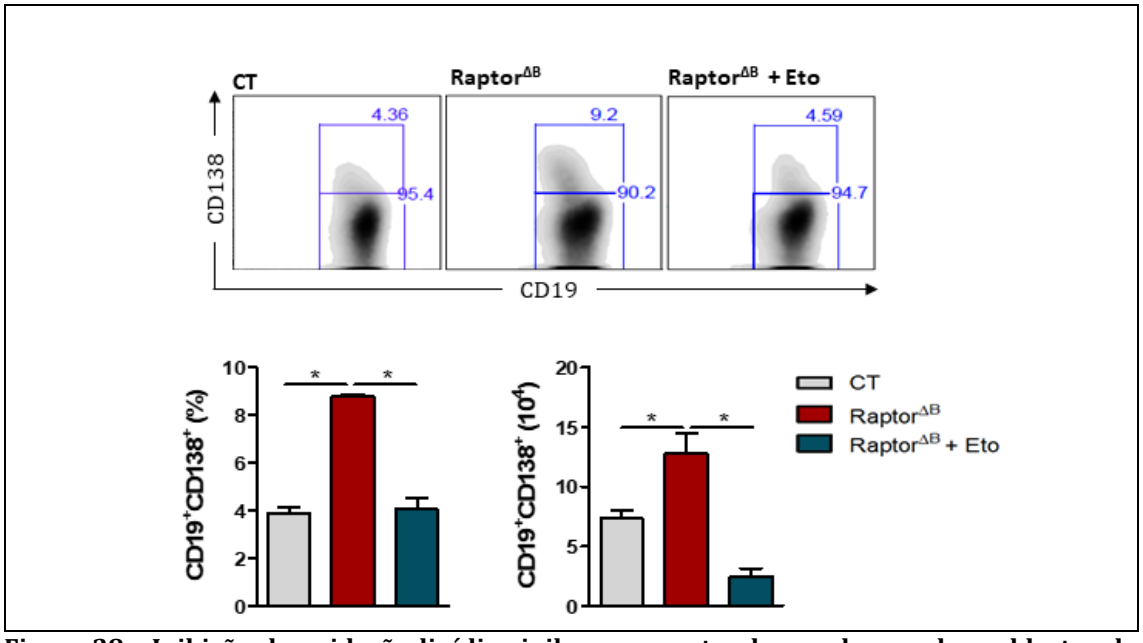


Figura 28 - Inibição da oxidação lipídica inibe o aumento observado em plasmablastos de Raptor$^{\Delta B}$. Células B CD19$^+$ isoladas de animais CT ou Raptor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas na presença ou ausência do inibidor de CPT1a, etomoxir. Density plot (superior), frequência (inferior esquerda) e número (inferior direita) de plasmablastos CD19$^+$CD138$^+$ obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.16 Células B provenientes de Raptor$^{\Delta B}$ aumentam a captação de glicose e diminuem sua massa e função mitocondrial após diferenciação em plasmablastos

Para avaliar se o perfil metabólico de células B Raptor$^{\Delta B}$ após diferenciação em plasmablastos, assim como de Rictor$^{\Delta B}$, beneficiam a via glicolítica em detrimento da atividade mitocondrial, nós avaliamos a captação de glicose nestas células, bem como a massa e potencial de membrana mitocondrial. Para isso, células B Raptor$^{\Delta B}$ e CT foram incubados por 72 horas com LPS e, após este período, avaliados a captação de glicose, massa e potencial mitocondrial. Foi observado que os plasmablastos de Raptor$^{\Delta B}$ possuem captação de 2NBDG elevada e apresentam redução tanto na massa quanto no potencial de membrana em relação ao CT, embora os valores não sejam estatisticamente significativos **(Figura 29 A, B e C)**. Estes resultados indicam que os plasmablastos de células B deficientes de mTORC2 e mTORC1 passam por alterações metabólicas similares, isto é, priorizam a via glicolítica ao invés de OXPHOS, embora já tenhamos mostrado que a oxidação lipídica é crucial para a produção de anticorpos.

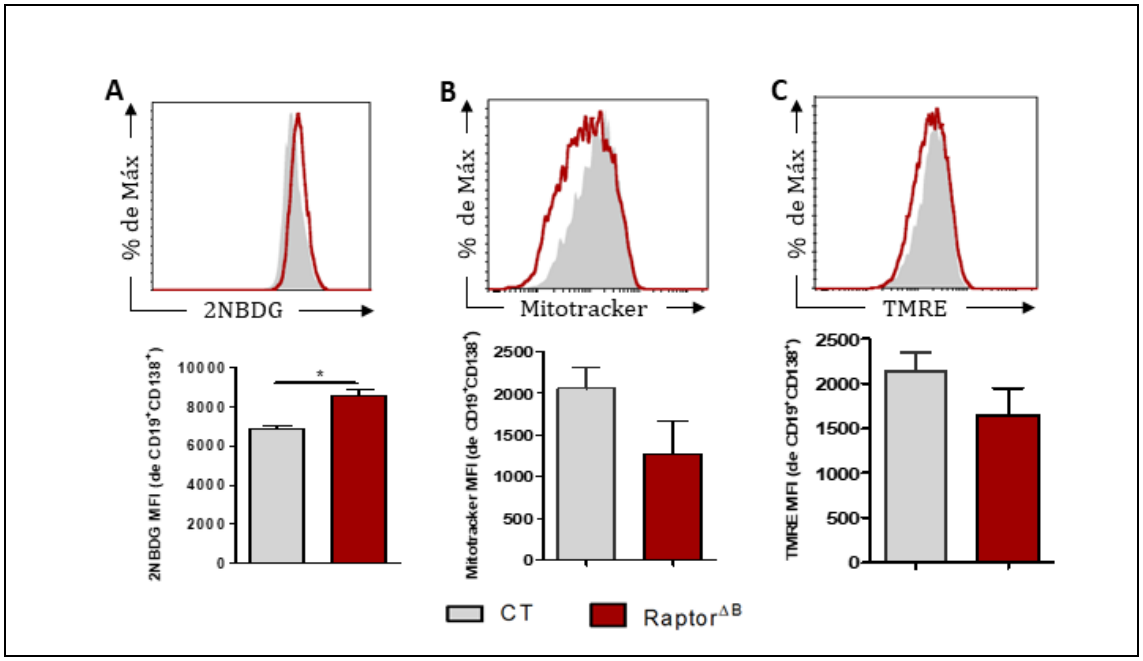


Figura 29 - Células B Raptor$^{\Delta B}$ após diferenciação em plasmablastos reduzem a massa e potencial de membrana e elevam a captação de glicose. Células B CD19^{+} isoladas de animais CT ou Raptor$^{\Delta B}$ foram incubadas com LPS por 72 horas. Histograma representativo (superior) e MFI (inferior) de **(A)** 2NBDG, **(B)** Mitotracker e **(C)** TMRE em plasmablastos CD19^{+}CD138^{+} obtidos por citometria de fluxo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

4.17 Animais Rictor$^{\Delta B}$ submetidos a transplante de pele apresentam níveis de rejeição similares a animais CT

Uma vez que a deficiência de mTORC2 em células B elevou sua diferenciação em plasmablastos e a produção total de anticorpos *in vitro*, apesar da capacidade reduzida de produção de anticorpos por plasmablasto, nós levantamos a hipótese de que a maior produção de anticorpos poderia apresentar relevância clínica. Desta maneira, nós utilizamos o modelo de transplante de pele para avaliarmos se os animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentariam uma redução na sobrevida do enxerto devido a uma maior produção de anticorpos. Para isso, animais CT e Rictor$^{\Delta B}$ de fundo C57Bl6 foram transplantados com pele de animais Balb/c, realizando assim um transplante alogênico. Entretanto, ambos os grupos, Rictor$^{\Delta B}$ e CT, apresentaram níveis de rejeição similares, (necrose >90%) por volta do dia 7 (**Figura 30 A e B**). Desta maneira, fomos avaliar em maior profundidade as células B nestes animais, uma vez que é possível que mTORC2 também interfira no desenvolvimento e na manutenção destas células na periferia. Observamos que animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentavam uma redução significativa em frequência e número de células B CD19^{+} no baço após o transplante, bem como na população de células B FO, embora as células B ZM estejam inalteradas (**Figura 30 C e D**). Estes dados indicam que possivelmente mTORC2 esteja negativamente interferindo no desenvolvimento e ou manutenção destas células na periferia, uma vez que a redução em células B no baço também foi observado em animais não-transplantados (não mostrado).

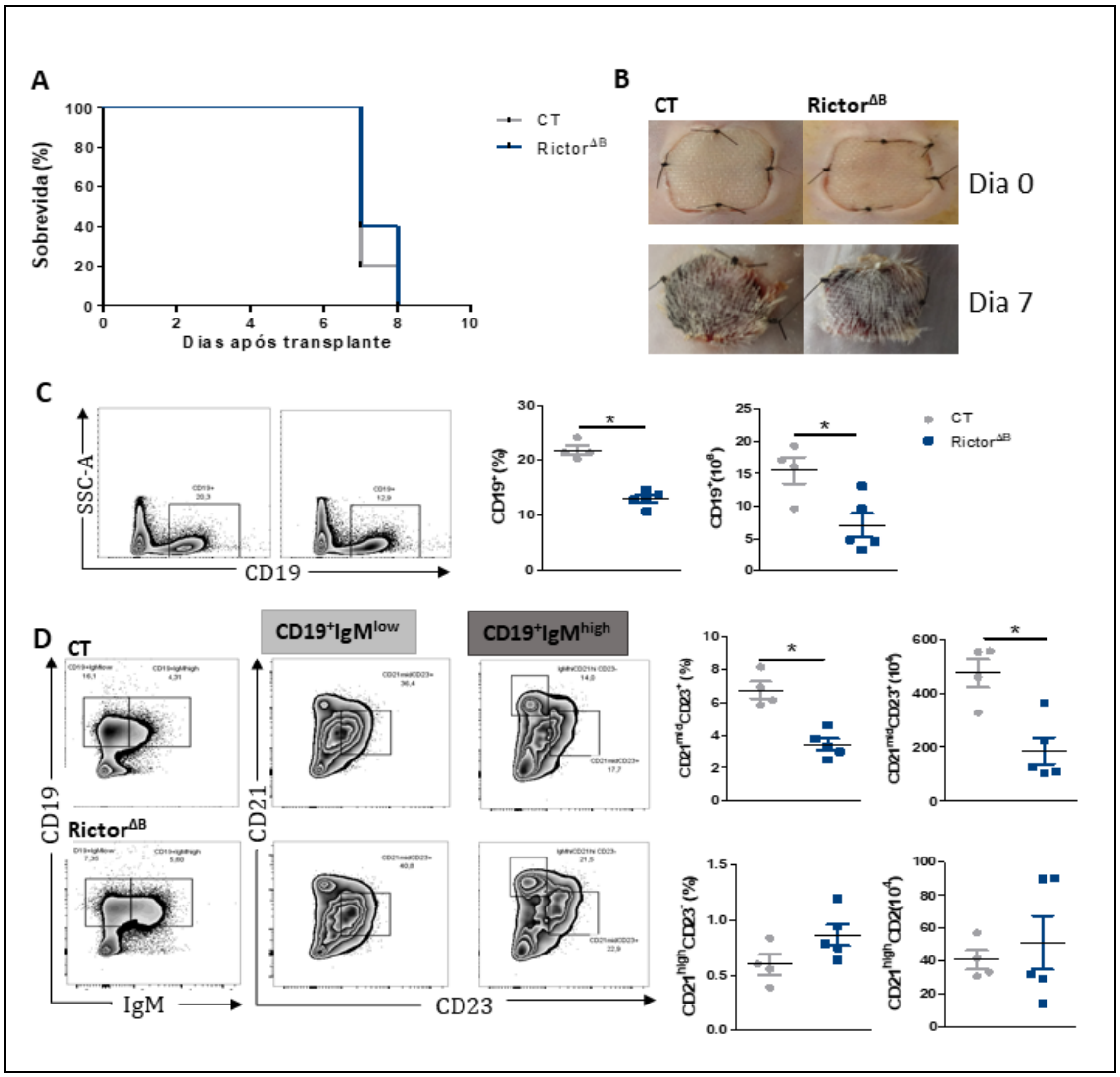


Figura 30 - Animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentam taxas de rejeição de transplante de pele similares a animais CT. Animais CT e Rictor$^{\Delta B}$ foram transplantados com pele proveniente de animais BAlb/c. **(A)** Curva de sobrevida de animais CT e Rictor$^{\Delta B}$ transplantados. **(B).** Fotos representativas dos transplantes de pele em animais CT (esquerda) e Rictor$^{\Delta B}$ (Direita) nos dias 0 (superior) e no dia 7 (inferior) após serem transplantados com pele de animais Balb/c. **(C)** Density plot representativo (esquerda), frequência (centro). e número absoluto (direita); de células B (CD19^{+}) no baço de animais CT e Rictor$^{\Delta B}$ 10 dias após serem transplantados com pele de animais Balb/c. **(C)** Frequência (esquerda) e número absoluto (direita) de células B foliculares (CD19^{+}IgM^{low}CD21^{mid}CD23^{+}) (superior) e células B da zona marginal (CD19^{+}IgM^{high}CD21^{high}CD23^{-}) (inferior) no baço de animais CT e Rictor$^{\Delta B}$ 10 dias após serem transplantados com pele de animais Balb/c. n=4 ou 5 animais por grupo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. *p<0,05.

Na sequência, nós decidimos interrogar as populações de células B e de plasmócitos nos linfonodos drenantes do enxerto de pele (linfonodos braquiais e axilares) em animais Rictor$^{\Delta B}$ após 10 dias da cirurgia. Constatou-se que a frequência de células B esteva reduzida também nestes linfonodos em Rictor$^{\Delta B}$ (**Figura 31 B)**. Para avaliação dos plasmócitos foram utilizadas duas populações distintas, uma descrita como CD19^{mid}CD138^{-} e outra como CD19^{-}CD138^{+} (**Figura 31**

A). Observou-se que a população de plasmócitos CD19^{mid}CD138^{+} estava reduzida, entretanto a população de plasmócitos CD19^{-}CD138^{+} era comparável aos dos CT **(Figura 31 C e D)**. Nossos dados sugerem que *in vivo* assim como *in vitro* a diferenciação de plasmablastos e plasmócitos, respectivamente é elevada na deficiência de mTORC2. Entretanto, nosso modelo experimental devido a limitações como redução de células B na periferia, não foi satisfatório em avaliar impactos clínicos.

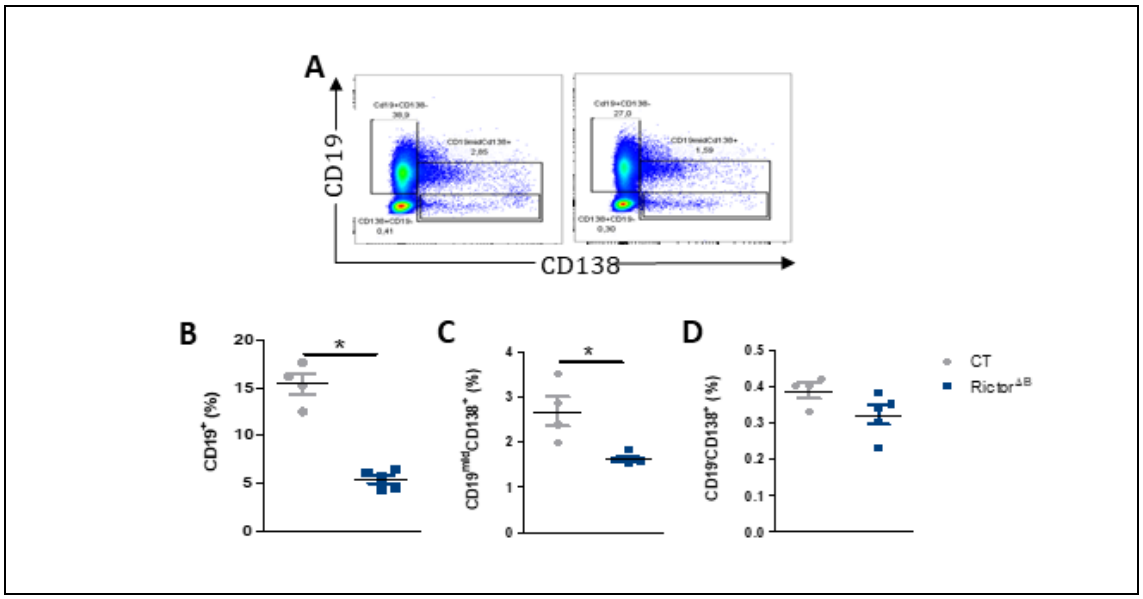


Figura 31 - Animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentam elevada diferenciação em plasmócitos em resposta ao transplante de pele. (A) Dot plot representativo das populações de plasmócitos avaliados nos linfonodos drenantes do transplante (CD19^{mid}CD138^{+} e CD19^{-}CD138^{+}) de animais CT (esquerda) e Rictor$^{\Delta B}$ (direita) 10 dias após serem transplantados com pele de animais Balb/c. **(B)** Frequência de células B (CD19^{+}) **(C)** plasmócitos (CD19^{mid}CD138^{+}) e **(D)** plasmócitos (CD19^{-}CD138^{+}) nos linfonodos drenantes do transplante de animais CT e Rictor$^{\Delta B}$ 10 dias após serem transplantados com pele de animais Balb/c. Dados representativos de um experimento. *p<0,05.

5. DISCUSSÃO

A imunidade humoral desempenha um papel crucial no combate a infecções e é a base de inúmeras vacinas. Por outro lado, ela pode representar uma ameaça, como no contexto de doenças autoimunes e no processo de rejeição ao transplante. Sabe-se que a função efetora de células B é definida logo após sua ativação, momento crítico para expansão clonal e para sua diferenciação em células produtoras de anticorpos. Este processo é guiado via sinalização por receptores de superfície e intracelulares, tais como BCR, TLRs, CD40 e IL4R (61).

Atualmente é sabido que os mecanismos envolvidos após a ativação de células B são muito mais complexos do que se tinha conhecimento (15, 41, 42). Sabe-se que as vias metabólicas não estão apenas relacionadas com sobrevivência, crescimento e proliferação celular em células B, mas estão intimamente ligadas com a ativação e função efetora destas células (15, 42). Os processos metabólicos são controlados por sensores intracelulares específicos, tais como o mTORC1 e mTORC2. Neste estudo, nós reportamos que a deficiência do complexo mTORC2 em células B prejudica a via glicolítica e aumenta a OXPHOS em células B ativadas por LPS. Ainda, observamos que a deficiência de mTORC1 também prejudica a glicólise nestas células. No entanto, se mTORC1 possui ação sobre a OXPHOS, ainda necessita ser investigado. Nossos resultados corroboram as alterações metabólicas observadas em estudos de células T deficientes de mTORC2 e mTORC1 (45, 54, 56). Como mencionado, alterações metabólicas modificam tanto a diferenciação como as funções efetoras das células do sistema imune (42). De fato, nós verificamos que a diferenciação de plasmablastos foi elevada a partir de células B provenientes de camundongos Raptor$^{\Delta B}$ e Rictor$^{\Delta B}$, bem como a produção de IgM total. Alterações como estas impactam a resposta imune contra diferentes patógenos, bem como influenciam em doenças autoimunes e na rejeição a transplantes. Desta maneira, buscamos compreender quais alterações metabólicas decorrentes da atividade de mTOR foram as responsáveis pelas modificações nas funções efetoras observadas nas células B deficientes de mTORC1 e mTORC2.

Para confirmarmos se OXPHOS possui impacto direto no aumento da formação de plasmablastos, células B Rictor$^{\Delta B}$ foram forçadas a respirar com o uso

de meio sem glicose. A indução de OXPHOS elevou ainda mais a formação de plasmablatos em células B Rictor$^{\Delta B}$, o que sugere um impacto positivo direto de OXPHOS no processo de diferenciação. Suportando nossa hipótese, nós também observamos a elevação da atividade mitocondrial em células B Rictor$^{\Delta B}$ em detrimento da glicólise aeróbica e esta alteração metabólica mostrou-se responsável pelo aumento da diferenciação de plasmablastos observado nestas células. Outros estudos já apontaram que a atividade mitocondrial está relacionada com a formação de plasmablastos. Foi reportado que células B, ao se diferenciarem em plasmablastos/plasmócitos, passam por uma reprogramação metabólica, com redução da glicólise aeróbica e aumento do metabolismo da glutamina (18). Além disso, Dufort et al. descreveram que a síntese lipídica também é essencial para o sucesso na diferenciação de plasmablastos (55). Foi descrito que a maior parte do citrato gerado no TCA e utilizado na síntese lipídica provém do piruvato gerado na glicólise (55). Estes dois trabalhos sugerem que a alimentação do TCA, tanto pela glutaminólise quanto pela glicólise desempenham um papel na formação de plasmablastos e/ou na própria função dos plamablastos.

Desta maneira, nossa próxima pergunta foi qual fonte de alimentação da mitocôndria seria a principal responsável pelo aumento da OXPHOS e maior formação de plamablastos em Rictor$^{\Delta B}$. Nossos dados sugerem que a importação de piruvato gerado pela glicólise para a mitocôndria estava reduzida, uma vez que a expressão da enzima PDK1 foi aumentada, o qual é um regulador negativo de PDH, uma das enzimas do complexo piruvato quinase responsável pela conversão do piruvato em acetil-CoA. Por outro lado, como foi observado um aumento na expressão de CPT1a nas células B deficientes de mTORC2, um indicativo de maior oxidação lipídica, e somado ao fato de que sabidamente a deficiência de mTORC1 ou mTORC2 em células T CD8^{+} também elevarem a expressão de CPT1a, cuja inibição de mTORC2 beneficia a formação de células TCD8^{+} de memória (54), nos fizeram levantar a hipótese de que esta via poderia estar relacionada ao aumento de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$. De fato, os resultados subsequentes demonstraram o envolvimento da via da β-oxidação lipídica, uma vez que a sua inibição levou a diminuição da formação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$ a níveis comparáveis ao CT.

Além disso, nós observamos que tanto a redução da atividade glicolítica como o aumento de OXPHOS em células B deficientes de mTORC2 é imprescindível para a elevação da formação plasmablastos. Para elevarmos a atividade glicolítica em células B Rictor$^{\Delta B}$, foi utilizado LPS na presença de IL4. A IL4 é capaz de induzir o aumento na captação de glicose, expressão de Glut1 e da atividade glicolítica por meio de uma via independente de PI3K/AKT e dependente de STAT6 (82). Com o aumento da atividade glicolítica após adição de IL4, as células B Rictor$^{\Delta B}$ efetivamente diminuíram a frequência de plasmablastos, confirmando nossa hipótese considerada inicialmente.

Na sequência, fomos avaliar em mais detalhes a necessidade de cada via para a produção de anticorpos por plasmablasto. O fato de termos observado que o aumento de OXPHOS em detrimento da glicólise aeróbica em células B Rictor$^{\Delta B}$ estaria relacionado a um aumento na formação de plasmablastos e maior produção de anticorpos, nos levou a questionar se a produção de anticorpos era apenas decorrente da maior formação de plasmablastos no grupo ou se eles também teriam maior capacidade de secretar anticorpos. Nós observamos que a capacidade individual de secreção de anticorpos por plasmablasto originados de células B Rictor$^{\Delta B}$ foi afetada em relação ao CT. Inesperadamente, observamos que tanto a massa como atividade mitocondrial em plasmócitos originados de Raptor$^{\Delta B}$ e Rictor$^{\Delta B}$, estavam diminuídas nestes grupos. Desta maneira, acreditamos que a redução na massa e função mitocondrial em plasmablastos Rictor$^{\Delta B}$ possa ter afetado sua capacidade de produção de anticorpos. Estudos já apontaram que plasmablastos, diferentemente de células B, utilizam predominantemente a via mitocondrial sobre a glicólise (18), entretanto nenhum estudo avaliou esta dependência em maiores detalhes. Ainda, nós mostramos que a inibição da oxidação lipídica reduziu significativamente a produção de anticorpos por plasmablasto originados de células B CT, o que mostra que a alimentação da mitocôndria por esta via é fundamental para a secreção de anticorpos. Portanto, acreditamos que a diminuição da massa e função mitocondrial em Rictor$^{\Delta B}$ esteja diretamente relacionada a sua menor capacidade de produção de anticorpos, possivelmente por uma diminuição da alimentação da mitocôndria pela β-oxidação lipídica.

Nós não exploramos em detalhes as vias metabólicas necessárias para a manutenção de células B naive e nem para a proliferação após encontro com um antígeno, momentos anteriores a sua diferenciação em plasmablastos e secreção de anticorpos. Entretanto, observamos que o uso de 2DG foi capaz de eficientemente inibir a ativação de células B, bem como a formação de plasmablastos, o que mostra uma possível dependência de células B na via glicolítica em um momento anterior a sua diferenciação em plasmablastos. De acordo com estes resultados está o de Caro. Maldonado et al. que revelou que a glicólise aeróbica, mas não a atividade mitocondrial, é a principal rota metabólica utilizada para a proliferação de células B e secreção de anticorpos, embora não fique claro se a menor produção de anticorpos é resultado de uma menor proliferação ou menor capacidade de produção de anticorpos (56). Entretanto, quando incubamos células B em meio sem glicose, com o objetivo inicial de forçar OXPHOS, estas foram eficientemente ativadas e se diferenciaram em plasmablastos. Nós esperaríamos que o 2DG e o uso de meio sem glicose apresentassem resultados similares, caso a glicose fosse realmente essencial para a ativação e proliferação de células B, uma vez que o meio sem glicose seria incapaz de diretamente alimentar a via glicolítica. Uma hipótese plausível para estes resultados é que a célula, na ausência de glicose, consiga realizar gliconeogênese, como já reportado ocorrer em macrófagos, e assim manter uma produção satisfatória de glicose para permitir ativação e proliferação celular (88). A gliconeogênese permitiria a formação de glicose a partir de outros compostos que não são açúcares, desta maneira células B na ausência de glicose poderiam alimentar a glicólise, enquanto as incubadas com o inibidor 2DG não. Além disso, não podemos descartar que 2DG esteja exercendo efeitos *off-target,* o que já foi descrito ocorrer com o uso desta droga (89). Por outro lado, OXPHOS não mostrou exercer impacto no desenvolvimento ou sobrevivência de células B, ao contrário de células T que são dependentes de OXPHOS (57). Estes estudos iniciais relatam que a glicólise parece desempenhar um papel chave em um momento inicial, como no desenvolvimento, sobrevivência e proliferação de células B. Entretanto, com base no nosso estudo e em trabalhos publicados acreditamos que os processos de diferenciação de células B em plasmablastos, bem como a produção de anticorpos são majoritariamente dependentes da atividade mitocondrial. Além disso, descrevemos que a via de mTORC2 possa ser utilizada no futuro como um possível alvo terapêutico em células

B para aprimorar a diferenciação em plasmablastos por meio de um aumento da função mitocondrial, entretanto mTORC2 exerce um papel oposto em plasmablastos, reduzindo a atividade mitocondrial e prejudicando a sua capacidade de produção de anticorpos. Desta maneira, estudos *in vivo* ainda precisam avaliar os impactos desta deleção em células específicas e acompanhar o desfecho de respostas humorais.

Para avaliarmos a troca de isotipo em células B, incubamos estas células na presença de LPS e IL4, os quais, em combinação, são conhecidos por induzirem esse fenômeno. Observamos que a deficiência de mTORC2 elevou a troca de isotipo de IgM para IgG1 e a de mTORC1 a reduziu. Nossos resultados corroboram com os estudos presentes na literatura, os quais descrevem o mesmo fenômeno (38, 40). Há também descrições que a via PI3K-AKT está diretamente relacionada com a troca de isotipo e hipermutação somática (90). Como já mencionado, AKT pode ser ativada por meio da fosforilação em dois sítios, sendo o sítio HM (Ser473) fosforilado por mTORC2 (30, 31). Estudos relataram que quando a hiperativação de AKT é induzida, como por meio da deleção de PTEN (fosfatase que desfosforila PIP3) em células B, ocorre uma redução na troca de isotipo, bem como redução nos níveis da enzima AID (90). A atividade de AID está diretamente relacionada com a troca de isotipo e hipermutação somática (91). A diminuição da atividade de AID no núcleo, por sua vez, é resultado da inativação de um dos alvos de AKT, FOXO1, cuja fosforilação o torna inativo e capaz de sequestrar AID para o citoplasma, onde ambos podem ser degradados (92). Portanto, sugere-se que a hiperativação de AKT pode levar a hiperfoforilação de FOXO1, o qual ao se tornar inativo, sequestra AID para degradação no citoplasma, o que resulta em redução na troca de isotipo e hipermutação somática (92). Além disso, Lazorchak e colaboradores enfatizam o papel de mTORC2 na fosforilação de AKT no sítio de HM, para que FOXO1 possa ser fosforilado com sucesso por AKT (93) e AID, assim, degradada. Estes resultados corroboram nossos achados e os de Limon e colaboradores, uma vez que na ausência de mTORC2 funcional, a inativação de FOXO1 e sequestro de AID para o citoplasma estariam comprometidos, o que poderia beneficiar a troca de isotipo em células de Rictor$^{\Delta B}$ (40). Portanto, a ausência de um mTORC2 funcional poderia acarretar em mais FOXO1 ativo no núcleo e, consequentemente, maior atividade de AID, o que

poderia ser a razão do aumento em frequência de células B IgG1^{+} provenientes de animais Rictor$^{\Delta B}$. Por outro lado, a redução na troca de isotipo para IgG1 observada em células B deficientes de mTORC1 deve ocorrer devido ao fato de FOXO1 estar sendo hiperfosforilado por AKT na ausência de mTORC1 (38, 40).

Uma vez que nos experimentos *in vitro* foi observada uma maior diferenciação de células B em plasmablastos, uma maior produção total de IgM e maior troca de isotipo em células B deficientes de mTORC2, imaginou-se que animais Rictor$^{\Delta B}$ poderiam rejeitar mais rapidamente o transplante de pele em relação a animais CT. Entretanto, não foi observada diferença estatística na sobrevida do enxerto entre animais Rictor$^{\Delta B}$ e CT, sendo que ambos tiveram rejeição maior que 90% por volta do dia 7. Todavia, assim como nos animais deficientes de Glut1 utilizados por Caro-Maldonado et al. (56), nós também observamos uma diminuição significativa na frequência de células B no baço e linfonodos drenantes em animais Rictor$^{\Delta B}$, indicativo de que mTORC2 apresenta impactos no desenvolvimento e/ou manutenção destas células. Nossos resultados também corroboram os observados por um estudo que fez uso do modelo *Vav-Cre transgene* (39), no qual Rictor foi deletado em células hematopoiéticas após tratamento com tamoxifeno. Supreendentemente, em outro estudo, no qual o mesmo modelo utilizado em nosso estudo foi empregado, não foi observada alteração significativa nas populações de células B (40). As diferenças observadas provavelmente ocorreram por diferentes níveis de deleção de Rictor nas células B.

Apesar de nossos animais Rictor$^{\Delta B}$ apresentarem redução na população de células B, a população de plasmócitos (CD19^{-}CD138^{+}) formada nos linfonodos drenantes do enxerto são comparáveis entre os grupos. Estes resultados indicam que um número superior de células B provenientes de animais Rictor$^{\Delta B}$ se diferenciaram em plasmócitos. Desta maneira, apesar de uma provável maior diferenciação, a avaliação dos impactos diretos de mTORC2 na formação de plasmócitos e produção de anticorpos *in vivo* em nosso modelo se torna difícil, uma vez que animais Rictor$^{\Delta B}$ naive já apresentam redução no número de células B na periferia. Acreditamos que mTORC2 interfira em estágios anteriores nestas células, como em vias fundamentais para a manutenção de células B na periferia.

O papel das células B no processo de rejeição de transplantes foi inicialmente subestimado, sendo as células T consideradas as principais mediadoras. Isso se deve ao fato de apenas a transferência de linfócitos sensibilizados ao receptor do enxerto levar à rejeição de transplante de pele, mas não a transferência passiva de anticorpos no momento do transplante (78). Entretanto, em 1975, Gerlaq e colegas, relataram que soro contendo DSA foi capaz de promover rejeição quando injetado entre os dias 5 e 10 após transplante de pele, e não nos dias antecedentes (94). A ausência de rejeição inicialmente relatada foi justificada pela falta de perfusão dos vasos do enxerto durante os primeiros dias após o transplante (94). Após este período, o enxerto começa a ser perfundido por vasos do receptor e perde a sensibilidade por anticorpos injetados (95). Estes dados nos levam a outro ponto a ser considerado em nosso modelo. Como nossos animais transplantados nunca estiveram em contato com os antígenos presentes no doador, estes necessitam ainda produzirem plasmócitos produtores de DSA, o que deve levar mais de 10 dias. Desta maneira, no momento da produção máxima de anticorpos, é provável que o enxerto tenha sido perfundido por vasos do doador e o processo de rejeição ficar a cargo de células T, principalmente.

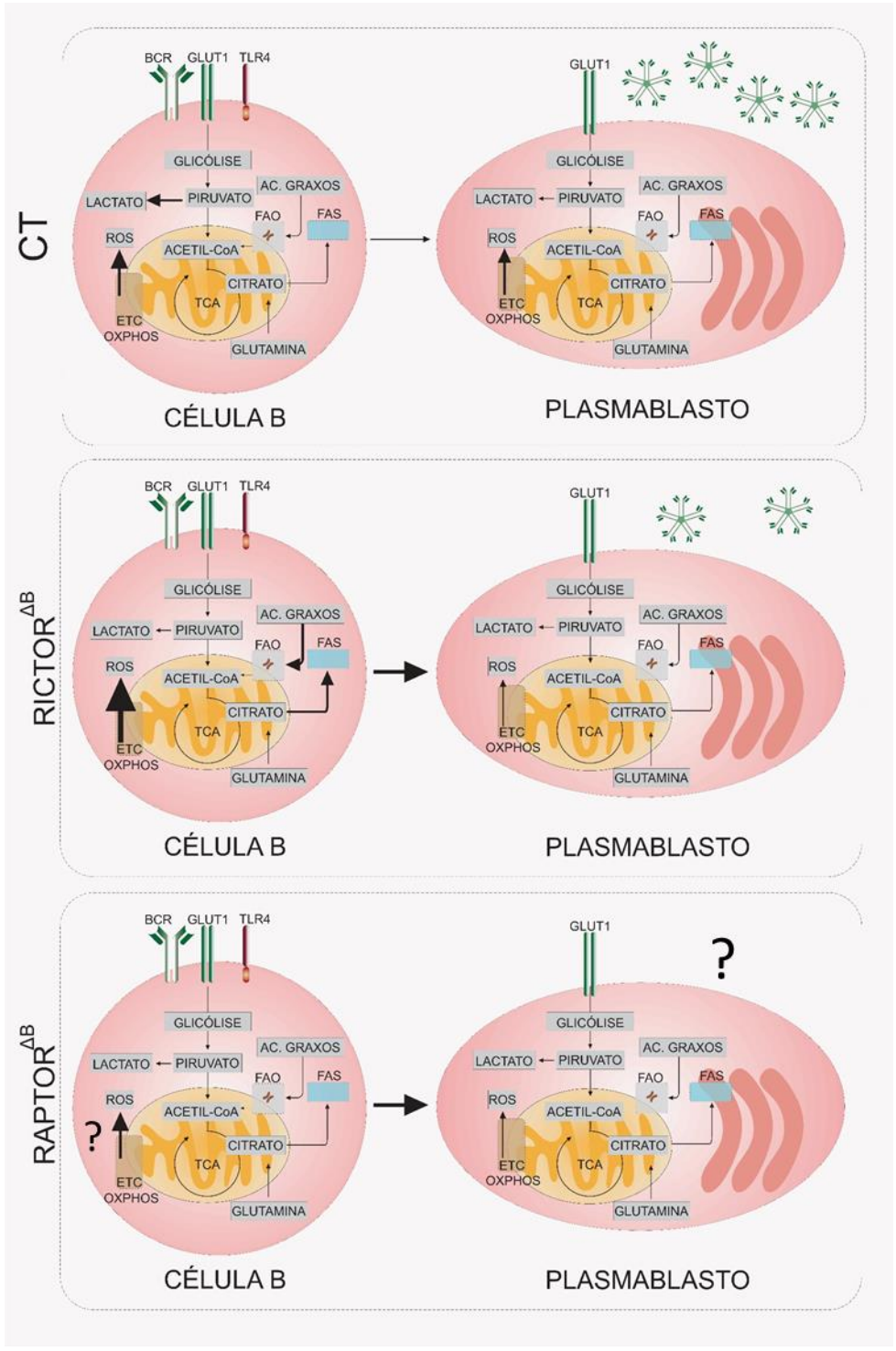
Portanto, nossos dados sugerem uma nova abordagem para o controle da resposta de células B, por meio da interferência nos complexos de mTOR. O uso de drogas específicas para estas vias apresenta potencial terapêutico para o controle de respostas não somente *in vitro*, mas também *in vivo*, o que poderá beneficiar a resposta imune contra inúmeros patógenos, bem como em doenças autoimunes e na rejeição ao transplante.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

- mTORC2 favorece a glicólise aeróbica em detrimento de OXPHOS, prejudicando a ativação de células B e sua diferenciação em plasmablastos. Por outro lado, mTORC2 eleva a atividade mitocondrial de plasmablastos e a secreção de anticorpos.
- mTORC1 favorece a glicólise aeróbica, prejudicando a ativação de células B e sua diferenciação em plasmablastos.

Resumo gráfico:



Esquema ilustrativo da hipótese de ativação de células B **(esquerda)** CT **(superior)** ou Rictor$^{\Delta B}$ **(centro)** ou Raptor$^{\Delta B}$ **(inferior)** estimuladas com LPS antes e após sua diferenciação em plasmablastos **(direita).** Células B provenientes de CT apresentam níveis elevados de glicólise aeróbica (seta grossa de piruvato para lactato) em comparação com células B Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$ (seta fina de piruvato para lactato). Por outro lado, células B Rictor$^{\Delta B}$ apresentam níveis elevados de OXPHOS, oxidação e síntese lipídica (setas grossas). Estas alterações metabólicas beneficiam a formação de plasmablastos em Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$ (seta grossa de célula B para plasmablasto). Por outro lado, plasmablastos Rictor$^{\Delta B}$ e Raptor$^{\Delta B}$ apresentam redução na atividade mitocondrial (seta

fina) em comparação a plasmablastos CT (seta grossa), acreditamos que esta redução seja a responsável pela diminuição de sua capacidade de secreção de IgM em Rictor$^{\Delta B}$ (verde). Não possuímos dados para determinar a secreção de IgM por Raptor$^{\Delta B}$. A grossura das setas compara a intensidade de cada via metabólica entre os grupos e entre células B e plasmablastos de cada grupo.

REFERÊNCIAS*

1. Hiepe F, Dörner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H, Radbruch A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. Nat Rev Rheumatol. 2011;7(3):170-8.
2. Dörner T, Radbruch A. Antibodies and B cell memory in viral immunity. Immunity. 2007;27(3):384-92.
3. Kokko KE, Colvin RB. Below the waterline -- the danger of de novo donor-specific HLA antibodies. Am J Transplant. 2012;12(5):1077-8.
4. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol. 2015;15(3):160-71.
5. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. Curr Opin Immunol. 2008;20(2):149-57.
6. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zúñiga E, et al. Extrafollicular antibody responses. Immunol Rev. 2003;194:8-18.
7. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):741-50.
8. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. Nat Rev Immunol. 2015;15(3):172-84.
9. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. Cell Mol Immunol. 2013;10(2):103-6.
10. Alugupalli KR, Akira S, Lien E, Leong JM. MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. J Immunol. 2007;178(6):3740-9.
11. Hou B, Saudan P, Ott G, Wheeler ML, Ji M, Kuzmich L, et al. Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. Immunity. 2011;34(3):375-84.
12. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. Annu Rev Immunol. 2010;28:21-55.
13. Okada T, Maeda A, Iwamatsu A, Gotoh K, Kurosaki T. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. Immunity. 2000;13(6):817-27.
14. Tuveson DA, Carter RH, Soltoff SP, Fearon DT. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. Science. 1993;260(5110):986-9.
15. Jellusova J, Rickert RC. The PI3K pathway in B cell metabolism. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2016;51(5):359-78.
16. Doughty CA, Bleiman BF, Wagner DJ, Dufort FJ, Mataraza JM, Roberts MF, et al. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. Blood. 2006;107(11):4458-65.
17. Dufort FJ, Gumina MR, Ta NL, Tao Y, Heyse SA, Scott DA, et al. Glucose-dependent de novo lipogenesis in B lymphocytes: a requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation. J Biol Chem. 2014;289(10):7011-24.
18. Garcia-Manteiga JM, Mari S, Godejohann M, Spraul M, Napoli C, Cenci S, et al. Metabolomics of B to plasma cell differentiation. J Proteome Res. 2011;10(9):4165-76.
19. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. Nat Rev Immunol. 2003;3(4):317-30.
20. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(3):155-62.

*Referência Estilo Vancouver

21. Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. Curr Opin Genet Dev. 1999;9(1):49-54.
22. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. Cell. 2000;103(2):253-62.
23. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science. 1991;253(5022):905-9.
24. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. J Cell Sci. 2009;122(Pt 20):3589-94.
25. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. Annu Rev Immunol. 2013;31:259-83.
26. Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. Biochem Biophys Res Commun. 2004;313(2):443-6.
27. Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. Immunity. 2010;33(3):301-11.
28. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol. 1997;7(4):261-9.
29. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. Nat Cell Biol. 2003;5(6):566-71.
30. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. Cell. 2006;127(1):125-37.
31. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005;307(5712):1098-101.
32. Wicker LS, Boltz RC, Matt V, Nichols EA, Peterson LB, Sigal NH. Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. Eur J Immunol. 1990;20(10):2277-83.
33. Kay JE, Kromwel L, Doe SE, Denyer M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. Immunology. 1991;72(4):544-9.
34. Sakata A, Kuwahara K, Ohmura T, Inui S, Sakaguchi N. Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in CD40-mediated activation of murine B cells in vitro. Immunol Lett. 1999;68(2-3):301-9.
35. Zeng Q, Zhang H, Qin J, Xu Z, Gui L, Liu B, et al. Rapamycin inhibits BAFF-stimulated cell proliferation and survival by suppressing mTOR-mediated PP2A-Erk1/2 signaling pathway in normal and neoplastic B-lymphoid cells. Cell Mol Life Sci. 2015;72(24):4867-84.
36. Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. Cell Immunol. 1994;156(2):493-507.
37. Jones DD, Gaudette BT, Wilmore JR, Chernova I, Bortnick A, Weiss BM, et al. mTOR has distinct functions in generating versus sustaining humoral immunity. J Clin Invest. 2016;126(11):4250-61.
38. Keating R, Hertz T, Wehenkel M, Harris TL, Edwards BA, McClaren JL, et al. The kinase mTOR modulates the antibody response to provide cross-protective immunity to lethal infection with influenza virus. Nat Immunol. 2013;14(12):1266-76.
39. Lee K, Heffington L, Jellusova J, Nam KT, Raybuck A, Cho SH, et al. Requirement for Rictor in homeostasis and function of mature B lymphoid cells. Blood. 2013;122(14):2369-79.
40. Limon JJ, So L, Jellbauer S, Chiu H, Corado J, Sykes SM, et al. mTOR kinase inhibitors promote antibody class switching via mTORC2 inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(47):E5076-85.
41. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. J Exp Med. 2015;212(9):1345-60.
42. Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL. Metabolic Instruction of Immunity. Cell. 2017;169(4):570-86.

43. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. J Exp Med. 2011;208(7):1367-76.
44. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. Immunity. 2011;35(6):871-82.
45. Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, et al. mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. Cell Metab. 2013;18(5):726-39.
46. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. Mol Biol Cell. 2007;18(4):1437-46.
47. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. Nat Rev Immunol. 2016;16(9):553-65.
48. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009;324(5930):1029-33.
49. Ramsay RR, Zammit VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. Mol Aspects Med. 2004;25(5-6):475-93.
50. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular fatty acid metabolism and cancer. Cell Metab. 2013;18(2):153-61.
51. Ohlrogge JB, Jaworski JG. REGULATION OF FATTY ACID SYNTHESIS. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1997;48:109-36.
52. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. Immunity. 2013;38(2):225-36.
53. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell. 2013;153(6):1239-51.
54. Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, et al. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8^{+} T cell differentiation. J Clin Invest. 2015;125(5):2090-108.
55. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. Science. 2013;342(6155):1242454.
56. Caro-Maldonado A, Wang R, Nichols AG, Kuraoka M, Milasta S, Sun LD, et al. Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. J Immunol. 2014;192(8):3626-36.
57. Milasta S, Dillon CP, Sturm OE, Verbist KC, Brewer TL, Quarato G, et al. Apoptosis-Inducing-Factor-Dependent Mitochondrial Function Is Required for T Cell but Not B Cell Function. Immunity. 2016;44(1):88-102.
58. Corcoran LM, Nutt SL. Long-Lived Plasma Cells Have a Sweet Tooth. Immunity. 2016;45(1):3-5.
59. Lam WY, Becker AM, Kennerly KM, Wong R, Curtis JD, Llufrio EM, et al. Mitochondrial Pyruvate Import Promotes Long-Term Survival of Antibody-Secreting Plasma Cells. Immunity. 2016;45(1):60-73.
60. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290(1):E1-E8.
61. Boothby M, Rickert RC. Metabolic Regulation of the Immune Humoral Response. Immunity. 2017;46(5):743-55.
62. Ireland R. Renal transplantation: Making kidneys count. Nat Rev Nephrol. 2012;8(6):311.
63. Baran DA. New directions in immunosuppression after heart transplantation. Nat Rev Cardiol. 2013;10(7):422-7.

64. James A, Mannon RB. The Cost of Transplant Immunosuppressant Therapy: Is This Sustainable? Curr Transplant Rep. 2015;2(2):113-21.
65. Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D, et al. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. Hum Immunol. 2010;71(5):442-50.
66. Longnus SL, Mathys V, Dornbierer M, Dick F, Carrel TP, Tevaearai HT. Heart transplantation with donation after circulatory determination of death. Nat Rev Cardiol. 2014;11(6):354-63.
67. Issa F, Schiopu A, Wood KJ. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. Expert Rev Clin Immunol. 2010;6(1):155-69.
68. Fantus D, Rogers NM, Grahammer F, Huber TB, Thomson AW. Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. Nat Rev Nephrol. 2016;12(10):587-609.
69. Nashan B, Gaston R, Emery V, Säemann MD, Mueller NJ, Couzi L, et al. Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. Transplantation. 2012;93(11):1075-85.
70. Tedesco-Silva H, Felipe C, Ferreira A, Cristelli M, Oliveira N, Sandes-Freitas T, et al. Reduced Incidence of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients Receiving Everolimus and Reduced Tacrolimus Doses. Am J Transplant. 2015;15(10):2655-64.
71. Knoll GA, Kokolo MB, Mallick R, Beck A, Buenaventura CD, Ducharme R, et al. Effect of sirolimus on malignancy and survival after kidney transplantation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. BMJ. 2014;349:g6679.
72. Bettencourt IA, Powell JD. Targeting Metabolism as a Novel Therapeutic Approach to Autoimmunity, Inflammation, and Transplantation. J Immunol. 2017;198(3):999-1005.
73. Lee CF, Lo YC, Cheng CH, Furtmüller GJ, Oh B, Andrade-Oliveira V, et al. Preventing Allograft Rejection by Targeting Immune Metabolism. Cell Rep. 2015;13(4):760-70.
74. Ott U, Busch M, Steiner T, Schubert J, Wolf G. Renal retransplantation: a retrospective monocentric study. Transplant Proc. 2008;40(5):1345-8.
75. Coelho V, Saitovitch D, Kalil J, Silva HM. Rethinking the multiple roles of B cells in organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant. 2013;18(1):13-21.
76. Wasowska BA, Qian Z, Cangello DL, Behrens E, Van Tran K, Layton J, et al. Passive transfer of alloantibodies restores acute cardiac rejection in IgKO mice. Transplantation. 2001;71(6):727-36.
77. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Muscari F, Lavayssiere L, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. Am J Transplant. 2014;14(4):867-75.
78. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. Nat Rev Immunol. 2005;5(10):807-17.
79. Mohiuddin MM, Ogawa H, Yin DP, Shen J, Galili U. Antibody-mediated accommodation of heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. Transplantation. 2003;75(3):258-62.
80. Ménoret S, Plat M, Blancho G, Martinat-Botté F, Bernard P, Karam G, et al. Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. Transplantation. 2004;77(9):1468-71.
81. Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. Nucleic Acids Res. 1997;25(6):1317-8.
82. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. Nature. 1995;376(6538):352-5.
83. van der Windt GJ, Chang CH, Pearce EL. Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer. Curr Protoc Immunol. 2016;113:3.16B.1-3.B.4.

84. Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. J Neurochem. 2009;109(4):1179-91.
85. van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. Immunity. 2012;36(1):68-78.
86. Yadava N, Nicholls DG. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. J Neurosci. 2007;27(27):7310-7.
87. Dufort FJ, Bleiman BF, Gumina MR, Blair D, Wagner DJ, Roberts MF, et al. Cutting edge: IL-4-mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6-dependent regulation of glycolytic metabolism. J Immunol. 2007;179(8):4953-7.
88. Reales-Calderón JA, Aguilera-Montilla N, Corbí Á, Molero G, Gil C. Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to Candida albicans. Proteomics. 2014;14(12):1503-18.
89. Zhong D, Xiong L, Liu T, Liu X, Chen J, Sun SY, et al. The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R. J Biol Chem. 2009;284(35):23225-33.
90. Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Koni PA, et al. Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. J Exp Med. 2003;197(5):657-67.
91. Sernández IV, de Yébenes VG, Dorsett Y, Ramiro AR. Haploinsufficiency of activation-induced deaminase for antibody diversification and chromosome translocations both in vitro and in vivo. PLoS One. 2008;3(12):e3927.
92. Omori SA, Cato MH, Anzelon-Mills A, Puri KD, Shapiro-Shelef M, Calame K, et al. Regulation of class-switch recombination and plasma cell differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. Immunity. 2006;25(4):545-57.
93. Lazorchak AS, Liu D, Facchinetti V, Di Lorenzo A, Sessa WC, Schatz DG, et al. Sin1-mTORC2 suppresses rag and il7r gene expression through Akt2 in B cells. Mol Cell. 2010;39(3):433-43.
94. Gerlag PG, Koene RA, Hagemann JF, Wijdeveld PG. Hyperacute rejection of skin allografts in the mouse. Sensitivity of ingrowing skin grafts to the action of alloantibody and rabbit complement. Transplantation. 1975;20(4):308-13.
95. Jooste SV, Colvin RB, Soper WD, Winn HJ. The vascular bed as the primary target in the destruction of skin grafts by antiserum. I. Resistance of freshly placed xenografts of skin to antiserum. J Exp Med. 1981;154(5):1319-31.