

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PAULO JOSÉ BASSO

**Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas  
funções das células B**

São Paulo  
2021

PAULO JOSÉ BASSO

**Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas funções das células B**

**Versão Original**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara  
Co-orientador: Dr. Rafael Ribeiro de Almeida

São Paulo  
2021

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

Catálogo da publicação  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica  
Instituto de Ciências Biomédicas

Basso, Paulo José

Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas funções das células B / Paulo José Basso; Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara - 2021  
170 f.: Il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

1. Metabolismo; 2. Linfócitos B; 3. Plasmócitos.

Candidato: Paulo José Basso

Título da Tese: Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas funções das células B.

Orientador: Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o candidato:

(    ) **Aprovado**                      (    ) **Reprovado**

Banca Examinadora

Examinadora:                      Assinatura: .....

Nome: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bellio

Instituição: IMPPG/UFRJ

Examinador:                      Assinatura: .....

Nome: Dr. João Santana da Silva

Instituição: Fiocruz/SP

Examinadora:                      Assinatura: .....

Nome: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Flavia Popi

Instituição: DMIP/UNIFESP

Presidente:                      Assinatura: .....

Nome: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Instituição: ICB/USP

Trabalho realizado no Laboratório de Imunobiologia dos Transplantes (LIT) do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos nº2012/02270-2, nº2015/26682-6, nº 2017/05264-7 e nº2018/08563-8), da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus** por me abençoar todos os dias muito mais do que eu mereço.

Aos meus pais **Sueli e Vicente** que sempre confiaram nas minhas escolhas, suportaram meus sonhos e me abraçaram em todos os meus tropeços.

Aos meus irmãos **Luis Gustavo e Mariane** e ao meu cunhado **Tiago** pela lealdade e incentivo contínuos, me apoiando sejam quais forem as circunstâncias.

A minha noiva **Camila** pela ressurgência amorosa, por ser luz e pelos cuidados e carinhos diários que tornam a minha vida tão mais leve e completa.

A família que eu tive a oportunidade de escolher no curso da vida e sempre confiaram na minha capacidade e perseverança: **Vó Madalena** (*in memoriam*), **Tio Reinaldo, Tia Cássia, Gustavo, Fabiano, Ton, Padre Gustavo, Tia Maria, Tio Arvico, Zé, Di, Tânia, Guaraci e Jacirema.**

A todos os demais anjos, familiares ou amigos, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação profissional e pessoal, meu amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo Seu amor ilimitado, pelos ensinamentos diários e pela força desmedida que me ajuda a superar os obstáculos da vida.

Ao Professor e amigo Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara que me ensina diariamente e confia no meu trabalho. Obrigado pelo exemplo de liderança, pela referência de ser humano e por me fazer sentir que o Laboratório de Imunobiologia dos Transplantes (LIT) é minha segunda casa.

Ao Dr. e também amigo Rafael Ribeiro de Almeida pela contribuição científica ímpar e amizade diária dentro e fora do laboratório.

Aos professores que compõem a banca examinadora desta defesa de tese, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Bellio, Prof. Dr. João Santana e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Flavia Popi pela contribuição singular na análise deste estudo.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas por oferecer inúmeras oportunidades profissionais.

A Maria Eni, secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia do ICB/USP, pela seriedade e competência, mas, sobretudo, pelo carinho e amizade em todos esses anos de Doutorado.

A Meire, pelo seu difícil e árduo trabalho na manutenção e organização do nosso imenso laboratório.

Aos amigos e colaboradores do antigo e atual LIT, Thiago, Vinicius, Fernanda Terra, Nathália Hiromi, Bruno, Nathália Tejada, Rafael, Jean, Ângela, Raquel, Tom, Cris Naffah, Cris Aguiar, Guilherme, Aline, Marina, Amanda, Tati, Flávia, Vitor, Marcella, Thereza, Bárbara, Camila Morales, Izabella, Eloisa e Claudinha pela amizade diária, pelas ricas contribuições nas reuniões e pelas conversas individuais ao longo dos anos.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental (LICE) da UNIFESP: Marcos, Danilo, Rafael, Tâmisa, Camila, Neto, Hedden e Ingrid.

Aos Prof. Ana Paula Lepique, Vera Calich e Alexandre Keller pelas contribuições excepcionais durante a banca de qualificação.

A todos os funcionários que trabalham no prédio ICB IV, em especial: Mário, Fernando, Jô, Paulo Albe, Amanda, João, Israel, Salete, Neide, Ricardo, Milton pela amizade, pelo profissionalismo, pelo cuidado na limpeza, organização e manipulação dos equipamentos, pelo auxílio nas dúvidas administrativas, pela prestação de serviços técnicos de citometria, microscopia e histologia, pelas confecções de lâminas histológicas, pelo cuidado dos animais nos biotérios e pela disposição ininterrupta em ajudar a superar os mais diversos contratempos.

A todos os professores e alunos dos cursos de Pós-graduação da Imunologia pela competência e pela excelência das disciplinas.

A *Vanderbilt University Medical Center* (VUMC) por ter me aceitado como estudante durante o Doutorado Sanduíche.

Ao Prof. Mark Robin Boothby (VUMC) por me receber em seu laboratório e ter me proporcionado uma experiência científica única.

A Shawna Brookens, amiga e grande profissional que esteve comigo em todos os momentos na VUMC, ensinando os experimentos ou me auxiliando em outras necessidades diárias dentro e fora do laboratório. Aos demais amigos do laboratório Ariel Raybuck, Sung Hoon Cho, Kevin Chen, Jennie Hamilton, Alex Eddie, Mark Rusznak e Christy Paik.

Aos amigos de “Nashville”, Marina, Ana, Paty, Milene, Flaviane, Gustavo e Júlia pela amizade verdadeira, por tornar a rotina diária nos EUA muito mais fácil e pela continuidade da amizade sincera até os dias de hoje.

As agências financiadoras FAPESP, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste e de outros trabalhos de nosso laboratório, além de outros projetos dos quais colaboramos.

Aos meus familiares e amigos sempre foram meu suporte para a perseguição dos meus sonhos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e do meu crescimento científico, pessoal, profissional e humano durante esse período.

*"But the scientist is intensely religious - he is so religious that he will not accept quarter-truths, because they are an insult to his faith."*

Sinclair, 1925

*"Se consegui ver mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes."*

Isaac Newton, 1676

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABREVIATURAS , SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1. CÉLULAS B .....	24
1.2. METABOLISMO E SENSORES METABÓLICOS NAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE .....	29
1.2.1. PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MONOFOSFATO DE ADENOSINA (AMPK) .....	32
1.2.2. PROTEÍNA ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (mTOR) .....	35
1.2.3. FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) .....	36
1.3. O METABOLISMO E O PAPEL DOS SENSORES METABÓLICOS NAS CÉLULAS B .....	37
1.4. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS E CÉLULAS B .....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.1. ANIMAIS .....	48
3.2. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS B .....	50
3.3. CULTURAS DE CÉLULAS B .....	51
3.4. ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE GLICOSE .....	52
3.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	52
3.6. DOSAGEM DE GLICOSE E LACTATO .....	53
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E IMUNOGLOBULINAS POR ELISA .....	53
3.8. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS POR ELISpot .....	54
3.9. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E qPCR.....	54
3.10. ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	55
3.11. WESTERN BLOT .....	56
3.12. DETERMINAÇÃO DA MASSA, DA ATIVIDADE, DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNICA E DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA MITOCONDRIAIS. ....	57
3.13. CITOMETRIA DE FLUXO .....	57
3.14. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	58
3.15. ANÁLISE DE FLUXO EXTRACELULAR (SEAHORSE).....	59
3.16. ENSAIO DE PURIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS SECRETORES DE IMUNOGLOBULINAS DE CLASSES ESPECÍFICAS .....	59
3.17. TRANSFEÇÃO E TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS B PRIMÁRIAS.....	60
3.18. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS .....	60

---

3.19. COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO .....	61
3.20. ESCORE CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL .....	62
3.21. ANÁLISE DO COMPRIMENTO DO CÓLON .....	63
3.22. COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 2,4,6-ÁCIDO TRINITROBENZENOSULFÔNICO .....	63
3.23. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	64
3.24. EXTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS DOS TECIDOS.....	64
3.25. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU PARA BACTÉRIAS INTESTINAIS .....	65
3.26. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS PARA A INDUÇÃO DE COLITE EXPERIMENTAL POR DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO OU PARA IMUNIZAÇÃO .....	65
3.27. IMUNIZAÇÃO.....	66
3.28. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
4.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE DE LPS PARA A ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B.....	69
4.2. EFEITO DAS DIFERENTES DOSES DE LPS E DE OUTROS ESTÍMULOS NO PERFIL METABÓLICO DAS CÉLULAS B.....	71
4.3. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK DURANTE A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS B MURINAS E EM SUBTIPOS DE CÉLULAS B HUMANAS.....	73
4.4. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NO PERFIL METABÓLICO E NA SÍNTESE DE CITOCINAS NAS CÉLULAS B.....	75
4.5. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS B E NA DIFERENCIAÇÃO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPOS.....	77
4.6. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE E NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS NAS CÉLULAS B .....	80
4.7. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEINAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DAS CÉLULAS B .....	81
4.8. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA MASSA E NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAS NAS CÉLULAS B.....	83
4.9. ANÁLISE DO CONSUMO DE OXIGÊNICO EM TEMPO REAL DE CÉLULAS B DEFICIENTES EM AMPK .....	84
4.10. EFEITO DA ATIVAÇÃO DE AMPK E DA AUSÊNCIA DE MTORC1 NA ATIVAÇÃO E METABOLISMO DAS CÉLULAS B.....	85
4.11. AVALIAÇÃO DA REDE PROTEICA RELACIONADA A AMPK.....	86
4.12. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA MITOFAGIA DAS CÉLULAS B.....	87

---

4.13. AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL AGUDA EM CAMUNDONGOS AMPK <sup>ΔB</sup> .....	90
4.14. AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DO INTESTINO GROSSO EM CAMUNDONGOS AMPK <sup>ΔB</sup> SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA .....	92
4.15. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CAMUNDONGOS AMPK <sup>ΔB</sup> SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA.....	93
4.16. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E DE LACTATO EM CAMUNDONGOS AMPK <sup>ΔB</sup> SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA .....	95
4.17. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINA PARA IgA E IgG2c .....	96
4.18. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B NOS DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS AMPK <sup>ΔB</sup> SAUDÁVEIS E SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA.....	98
4.19. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AMPK EM PBMCS E EM CÉLULAS OBTIDAS DAS LESÕES DE CÓLON DE PACIENTES COM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.....	101
4.20. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS AMPK <sup>ΔB</sup> PARA CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM CÉLULAS B.....	103
4.21. AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL AGUDA EM CAMUNDONGOS RAPTOR <sup>ΔB</sup> .....	106
4.22. AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL CRÔNICA E DOS EFEITOS DAS IMUNIZAÇÕES AGUDA E DE REDESAFIO ANTIGÊNICO EM CAMUNDONGOS AMPK <sup>ΔB</sup> .....	107
4.23. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPÓXIA SOBRE A TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINAS PARA IgG1 E IgA IN VITRO .....	109
4.24. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPÓXIA SOBRE A TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINAS PARA IgG1 E IgA COM O SISTEMA IN VITRO DE INDUÇÃO DE CÉLULAS B DE CENTRO GERMINATIVO .....	111
4.25. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO E DA DELEÇÃO DE HIF-1 $\alpha$ SOBRE A TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINA PARA IgG1 COM O SISTEMA IN VITRO DE INDUÇÃO DE CÉLULAS B DE CENTRO GERMINATIVO .....	115
4.26. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE HIF NA LONGEVIDADE DE PLASMÓCITOS DE VIDA LONGA.....	119
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>130</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>135</b>
<b>8. RESULTADOS COMPLEMENTARES .....</b>	<b>151</b>

---

8.1. DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE PURIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS SECRETORES DE CLASSES DE IMUNOGLOBULINAS DE CLASSES ESPECÍFICAS .....	152
8.2. EXPERIMENTO PROVA DE CONCEITO DE CÉLULAS B PRIMÁRIAS TRANSDUZIDAS COM DNA SENSÍVEL AO HIF .....	154
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>157</b>
9.1. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL .....	158
9.2. RELATÓRIO DE VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO .....	159
<b>10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA, PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA E PRÊMIOS NO PERÍODO ....</b>	<b>160</b>
10.1. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS .....	161
10.4. CAPÍTULOS DE LIVROS .....	170
10.5. PRÊMIOS .....	170

## **RESUMO**

BASSO, P. J. **Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas funções das células B.** 2021. 170f. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2021.

É recente a noção de que as células podem modificar suas atividades metabólicas para executarem funções específicas sob determinada pressão do meio externo ou interno. Para isso, sensores metabólicos, como AMPK e HIF-1 $\alpha$ , interpretam sinais intra e extracelulares para coordenar o destino celular, regulando processos energéticos, de ativação, crescimento e diferenciação. No entanto, o papel desses sensores nas células B tem sido pouco explorado. Nossa hipótese foi que a modulação da atividade de AMPK e/ou HIF-1 $\alpha$  alteraria o metabolismo, as funções, a longevidade e a diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos (ASCs), com potencial significativo sobre o curso de doenças inflamatórias. Os resultados mostraram que células B deficientes de AMPK (AMPK<sup>ΔB</sup>) estimuladas com LPS aumentaram a captação de glicose, a atividade glicolítica aeróbica e o perfil de ativação com elevada expressão de moléculas coestimuladoras (CD40 e CD86), aumento na síntese de citocinas (IL-10 e IL-6) e maior secreção de anticorpos por ASCs. Contrariamente, células B tratadas com agonista de AMPK ou deficientes na proteína negativamente regulada por AMPK, mTORC1, diminuíram a expressão de moléculas coestimuladoras, a síntese de citocinas e a glicólise aeróbica. Adicionalmente, células AMPK<sup>ΔB</sup> diminuíram a massa, a atividade e a capacidade respiratória mitocondriais. Animais AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite aguda por DSS tiveram melhora significativa dos sinais clínicos, mas tiveram pior prognóstico na colite experimental crônica. Experimentos de imunização aguda mostraram que a ausência de AMPK em células B aumenta a secreção de anticorpos, mas diminui a expressão de ULK1, prejudicando a mitofagia. No entanto, após o redesafio antigênico, células B aumentaram a produção de ROS e a peroxidação lipídica, comprometendo a frequência de células e a síntese de anticorpos em longo prazo. Utilizando um sistema *in vitro* de indução de células B de centro germinativo, foi encontrado que a hipóxia prejudicou a troca de isotipo de imunoglobulinas (TII) para IgG1, mas não interferiu na diferenciação de plasmócitos. Da mesma forma, a superexpressão e a deleção de HIF-1 $\alpha$  diminuiu e aumentou, respectivamente, a TII para IgG1, sem influenciar a frequência de plasmócitos. Finalmente, a deleção de HIF-1 $\alpha$  em células B oito semanas após serem transferidas adotivamente para camundongos *Rag2*<sup>-/-</sup> recipientes imunizados com NP-KLH comprometeu a frequência de plasmócitos de vida longa na medula óssea e no baço. Em conjunto, AMPK coordena a ativação, o metabolismo, a homeostase mitocondrial e a produção de anticorpos em células B e tem potencial para tratar doenças inflamatórias agudas. Já HIF-1 $\alpha$  é importante para a manutenção de plasmócitos de vida longa e TII para IgG1.

Palavras-chave: Linfócitos B; metabolismo; plasmócitos; hipóxia; colite; imunização.

# **ABSTRACT**

BASSO, P. J. **Evaluation of AMPK and HIF-1 $\alpha$  on B cell functions**. 2021. 170p. Thesis – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2021.

It's recent the concept of cells being able to modify their metabolic profile to perform specific functions under influence from environment. To this end, metabolic sensors such as AMPK and HIF-1 $\alpha$  converge intra and extracellular signals to coordinate the cell fate, regulating cell energy, activation, growing and differentiation. However, the role of metabolic sensors on B cells has not been assessed. Our hypothesis was that modulation of AMPK and/or HIF-1 $\alpha$  activity would change the metabolism, function, longevity and differentiation of B cells into antibody-secreting cells (ASCs) being able to modify the course of inflammatory diseases. Our results showed that LPS-stimulated AMPK-deficient B (AMPK<sup>ΔB</sup>) cells increased glucose uptake, glycolytic activity and activation status by enhancing the expression of costimulatory molecules (CD40 and CD86), cytokine synthesis (IL-10 and IL-6) and antibody secretion by ASCs. In contrast to that, B cells treated with AMPK agonist metformin or B cells deficient in mTORC1, a protein negatively regulated by AMPK, decreased costimulatory molecule expression, cytokine synthesis and aerobic glycolysis. AMPK<sup>ΔB</sup> cells also decreased mitochondrial mass, activity and respiratory capacity. In addition, AMPK<sup>ΔB</sup> animals subjected to DSS-induced acute colitis had a significant improve in their clinical signs but had a worst prognosis in DSS-induced chronic colitis. Acute immunization experiments showed that AMPK-deficient B cells increased antibody secretion but decreased ULK1 expression, impairing the mitophagy process. As consequence, B cells increased ROS production and lipid peroxidation after recall antibody response decreasing both cell frequency and antibody synthesis. Using an *in vitro*-induced germinal center B cell culture system, it was found that hypoxia hindered class switching recombination (CSR) to IgG but it did not affect plasma cell differentiation. Moreover, HIF-1 $\alpha$  overexpression or deletion decreased or increased, respectively, CSR to IgG1. At last, HIF-1 $\alpha$  deletion in B cells eight weeks after being adoptively transferred into Rag2<sup>-/-</sup> recipient mice immunized with NP-KLH decreased the frequency of long-lived plasma cells in bone marrow and spleen. Altogether, AMPK coordinates the activation, metabolism, mitochondrial homeostasis and antibody production in B cells. AMPK in B cells is also a potential target to treat acute inflammatory diseases. HIF-1 $\alpha$ , in turn, is a key regulator to long lived plasma cell maintenance but impairs CSR to IgG1.

Keywords: B lymphocytes; metabolism; plasma cells; hypoxia; colitis; immunization.

## **ABREVIATURAS , SIGLAS E SÍMBOLOS**

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**D** - Variação.

**°C** - Graus Celsius.

**a-KG** - alfa cetoglutarato.

**μL** - Microlitro.

**μm** - Micrometro.

**μM** - Micromolar.

**2-DG** - 2-deoxiglicose.

**2-NBDG** - 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglicose.

**4-OHT** - 4-hidroxitamoxifeno.

**4E-BP1** - Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E, do inglês *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*.

**ACC** - Acetil coenzima A carboxilase.

**ADCC** - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo, do inglês *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*.

**AICAR** - 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-d-ribofuranosídio.

**AKT** - Proteína quinase B.

**AMP** - Monofosfato de adenosina, do inglês *Adenosine monophosphate*.

**AMPK** - Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina, do inglês *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*.

**AMPK<sup>ΔB</sup>** - Deleção de AMPK especificamente em células B.

**ANOVA** - Análise de variância simples.

**AR** - Ácido retinoico.

**ASCs** - Células secretoras de anticorpos, do inglês *Antibody-secreting cells*.

**ATC** - (ciclo do) Ácido tricarboxílico.

**ATP** - Trifosfato de adenosina, do inglês *Adenosine triphosphate*.

**BAFF** - Fator ativador de células B, do inglês *B cell activating factor*.

**BCR** - Receptor de células B, do Inglês *B cell receptor*.

**BKO** - (camundongos) deficientes em células B, do inglês *B cell knockout (mice)*.

**BLNK** - Proteína ligadora de células B, do inglês *B cell linker protein*.

**B<sub>MEM</sub>** - Células B de memória.

**Breg(s)** - Células(s) B reguladora(s).

**BSA** - Fração V da albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*.

**BTK** - Tirosina quinase de Bruton, do inglês *Bruton's tyrosine kinase*.

**CAMKK2** - Proteína quinase tipo 2 dependente de cálcio-calmodulina, do inglês *Calcium/calmodulin-dependent kinase kinase 2*.

- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- CD (acompanhado de um número)** - Grupamento de diferenciação, do inglês *cluster of differentiation*.
- CDC** - citotoxicidade dependente de complemento, do inglês *complement-dependent cytotoxicity*.
- cDNA** - DNA complementar, do inglês *complementary DNA*.
- CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais.
- CG(s)** - Centro(s) germinativo(s).
- CLP** - Progenitor linfóide comum, do inglês *Common lymphoid progenitor*.
- CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono.
- COBEA** - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
- cm** - Centímetros.
- CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- CpG** - Oligodeoxinucleotídeos deoxicitidil-deoxiguanosina desmetilados, do inglês *Unmethylated deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotide*.
- Cre** - (enzima) Cre recombinase.
- CSR** - Recombinação de classe das imunoglobulinas, do inglês *class-switch recombination*.
- CT** - Controle.
- DAG** - Diacilglicerol.
- DAMPs** - Padrões moleculares associados à danos, do inglês *Damage-associated molecular patterns*.
- DAPI** - 4',6'-diamino-2-fenilindol.
- DC** - Doença de Crohn.
- DCs** - Células dendríticas, do inglês *Dendritic cells*.
- DII** - Doença(s) inflamatória(s) intestinal(is).
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*.
- dNTP** - Desoxirribonucleotídeos trifosfato, do inglês *Deoxynucleotide triphosphates*.
- DSS** - Dextran sulfato de sódio.
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*.
- eIF4E** - Fator de iniciação eucariótico 4E, do inglês *Eukaryotic translation initiation factor 4E*.
- ELISA** - Imunoensaio enzimático, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*.
- EUA** - Estados Unidos da América.
- FACS** - Separação de células ativada por fluorescência, do inglês *Fluorescence-activated Cell Sorting*.
- FADH<sub>2</sub>** - Flavina adeninad nucleotídeo reduzida, do inglês *Flavin adenine dinucleotide*.
- FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

**FCCP** - Carbonil cianeto-4-(Trifluorometoxi) fenilhidrazona do inglês *Carbonyl Cyanide 4-(Trifluoromethoxy)phenylhydrazone*.

**FIH-1** - Fator inibidor do HIF-1 $\alpha$ .

**FISH** - Hibridização florescente *in situ*, do inglês *Fluorescence in situ hybridization*.

**FO** - Folicular(es).

**FoxP3+** - do inglês *Forkhead box P3*.

**g** - Gramas.

**g** - Gravidade.

**GEO** - Repositório *Gene Expression Omnibus*.

**GFP** - Proteína fluorescente verde, do inglês *Green fluorescent protein*.

**GLUT** - Transportador de glicose, do inglês *Glucose transporter*.

**H&E** - Hematoxilina e eosina.

**H<sub>2</sub>O** - Água.

**HBSS** - Solução salina balanceada de Hanks, do inglês *Hank's balanced salt solution*.

**HEPES** - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico.

**HCl** - Ácido clorídrico.

**HIF** - Fator induzido por hipóxia, do inglês *Hypoxia-inducible factor*.

**HK2** - Hexoquinase 2.

**HMG-CoA** - 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.

**HRE** - Elementos responsivos à hipóxia, do inglês *Hypoxia response elements*.

**HSC** - Células-tronco hematopoéticas, do inglês *Hematopoietic stem cells*.

**i.p.** - Intraperitoneal.

**i.v.** - Intravenoso.

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama.

**IL** - Interleucina.

**ILC** - Células linfoides inatas, do inglês *innate lymphoid cells*.

**ICB** - Instituto de Ciências Biomédicas.

**JAK** - Proteína Janus quinase, do inglês *Janus kinase protein*.

**kg** - Quilograma.

**KHCO<sub>3</sub>** - Carbonato de potássio.

**KLH** - Hemocianina da lapa *keyhole*, do inglês *Keyhole limpet hemocyanin*.

**LAMP1** - Proteína de membrana lisossomal 1, do inglês *Lysosomal-associated membrane protein 1*.

**LDH** - Enzima lactato desidrogenase, do inglês *Lactate dehydrogenase*.

**LICE** - Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental.

**LIT** - Laboratório de Imunobiologia dos Transplantes.

**LKB1** - Proteína quinase B1 do fígado, do inglês *Liver kinase B1*.

**LPS** - Lipopolissacarídeo.

**M** - Molar.

**M $\phi$**  - Macrófago.

**MALT** - Tecidos linfoides associados à mucosa, do inglês *Mucosa-associated lymphoid tissues*.

**MFI** - Média de intensidade de fluorescência, do inglês *Mean fluorescence intensity*.

**mg** - Miligrama.

**mL** - Mililitros.

**mM** - Milimolar.

**MPC** - Carreador de piruvato mitocondrial, do inglês *Mitochondrial pyruvate carrier*.

**mTOR** - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês *mammalian target of rapamycin*.

**mTORC1** - Complexo 1 de mTOR.

**mTORC2** - Complexo 2 de mTOR.

**MZ** - Zona marginal, do inglês *Marginal zone*.

**n** - Número de animais.

**N** - Normal.

**NaCl** - Cloreto de sódio.

**NADH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo, do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*.

**NaHCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de sódio.

**NE** - Não estimulado.

**NH<sub>4</sub>Cl** - Cloreto de amônio.

**NLRC4** - Proteína contendo o domínio CARD 4, do inglês *NLR family CARD domain-containing protein 4*.

**NLRs** - Receptores do tipo NOD, do inglês *NOD-like receptors*.

**nm** - Nanômetros.

**nM** - Nanomolar.

**Nod** - Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain*.

**NP** - 4-hidroxi-3-nitrofenil.

**NRLP3** - Proteína da família NLR contendo domínio pirina 3, do inglês *NLR family pyrin domain containing 3*.

**OAA** - Oxaloacetato.

**OCR** - Taxa de consumo de oxigênio, do inglês *Oxygen consuming rate*.

**OVA** - Ovalbumina.

**OXPHOS** - Fosforilação oxidativa, do inglês *Oxidative phosphorylation*.

**p** - Nível descritivo.

**PAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*.

**PBS** - Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*.

**PDH** - Piruvato desidrogenase, do inglês *pyruvate dehydrogenase*.

**PDK1** - Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos-1, do inglês *Phosphoinositide-dependent kinase-1*.

**PDK1** - Piruvato desidrogenase quinase, do inglês *Pyruvate dehydrogenase kinase 1*.

**PFK1** - Fosfofrutoquinase 1, do inglês *Phosphofructokinase-1*.

**pg** - Picograma(s).

**PGC1 $\alpha$**  - Coativador-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma, do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 $\alpha$* .

**pH** - Potencial hidrogeniônico.

**PHDs** - Proteínas do domínio prolil-hidroxilase, do inglês *Prolyl hydroxylase domain proteins*.

**PIP<sub>2</sub>** - Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, do inglês *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*.

**PIP<sub>3</sub>** - Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, do inglês *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*.

**PI3K** - Fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*.

**PKM2** - Piruvato quinase M2, do inglês *pyruvate kinase M2*.

**PLC $\gamma$**  - Fosfolipase C $\gamma$ , do inglês *Phospholipase C $\gamma$* .

**pO<sub>2</sub>** - Tensão de oxigênio.

**PPP** - Via da pentose fosfato, do inglês *Pentose phosphate pathway*.

**Prot 26S** - Proteassoma 26S.

**PRRs** - Receptores de reconhecimento padrão, do inglês *pattern recognition receptors*.

**PVDF** - fluoreto de polivinilideno

**qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa (ou em tempo real), do inglês *quantitative polymerase chain reaction*.

**Raptor<sup>AB</sup>** - Deleção de Raptor (mTORC1) especificamente em células B.

**RFP** - Proteína fluorescente vermelha, do inglês *Red fluorescent protein*.

**RNA** - Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*.

**RNAm** - RNA mensageiro.

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive oxygen species*.

**RPMI** - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute 1640*.

**S6K** - proteína quinase ribossomal S6, do inglês *ribosomal s6 kinase*.

**SBCAL** - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

**SCID** - Camundongos com imunodeficiência combinada grave, do inglês *Severe combined immunodeficient mice*.

**SFB** - Soro fetal bovino.

**SREBP1/2** - Proteína de ligação reguladora de esteroides 1 e 2, do inglês *Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 and 2*

**SucCoA** - Succinil coenzima A.

**STAT** - Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição, do inglês *signal transducer and activator of transcription*.

**T CD4<sup>+</sup>** - Linfócito T CD4<sup>+</sup>.

**T CD8<sup>+</sup>** - Linfócito T CD8<sup>+</sup>.

**T1/T2/T3** - Células B de transição 1, 2 ou 3.

**TBS-T** - Tampão Tris-HCl + 0,5% de Tween-20.

**T<sub>FH</sub>** - Células T foliculares.

**TGF-β** - Fator de crescimento e transformação beta, do inglês *transforming growth factor beta*.

**Th** - Linfócito T auxiliar, do inglês *T helper*.

**TII** - Troca de isotipo de imunoglobulina.

**TLRs** - Receptores do tipo *Toll*, do inglês *Toll-like receptors*.

**TMRE** - Éster etílico de tetrametil-rodamina do inglês *Tetramethylrhodamine, ethyl ester*.

**TNBS** - Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico.

**TNF** - Fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*.

**Treg(s)** - Linfócito(s) T regulador(es).

**TRITC** - Tetrametilrodamina, do inglês *Tetramethylrhodamine*.

**TSC** - Complexo da esclerose tuberosa, do inglês *tuberous sclerosis complex*.

**Ub** - Ubiquitina.

**UC** - Colite ulcerativa, do inglês *ulcerative colitis*.

**UFRJ** - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**ULK1** - Proteína quinase do tipo unc-51, do inglês *Unc-51 like autophagy activating kinase*.

**UNIFESP** - Universidade Federal de São Paulo.

**USP** - Universidade de São Paulo.

**VHL** - Proteína von Hippel Lindau.

**VUMC** - Centro Médico da Universidade de Vanderbilt, do inglês *Vanderbilt University Medical Center*.

**WT** - Selvagem, do inglês *Wild type*.

**ZMP** - 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotideo.

# **1. INTRODUÇÃO**

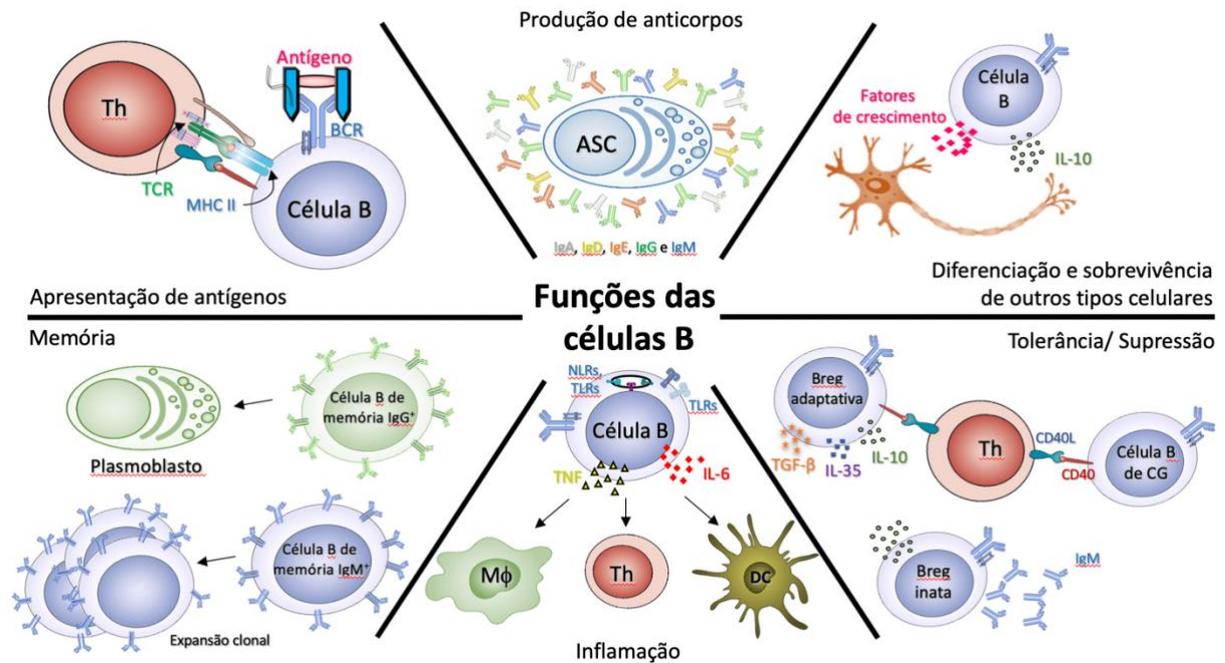
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CÉLULAS B

As células B (ou linfócitos B) desempenham papéis relevantes em todas as etapas da resposta imunológica, seja ela inata ou adaptativa. Elas expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) do tipo *toll* (TLRs, do inglês *toll-like receptors*; por exemplo, TLR-3, -4, -7 e/ou -9) e do tipo *Nod* (NLRs, do inglês *Nod-like receptors*; por exemplo, Nod1, Nod2, NLRC4 e NLRP3), sintetizam citocinas (por exemplo, IL-2, IL-4, TNF, IL-6, IL-12, IL-10 e/ou TGF- $\beta$ ), reconhecem e apresentam antígenos para as células T, produzem anticorpos após se diferenciarem em células secretoras de anticorpos (ASCs, do inglês *antibody-secreting cells*), geram memória imunológica e até suprimem a atividade de outras células (Figura 1) (CERUTTI; PUGA; COLS, 2011; SHEN; FILLATREAU, 2015). Tanto a estrutura celular como as funções principais desempenhadas por células B dependem dos seus subtipos, existindo diferenças entre células B murinas e humanas (GARRAUD et al., 2012).

Células B são produzidas essencialmente na medula óssea a partir de células progenitoras linfóides (Figura 2), mas tem sido demonstrado que elas podem também se desenvolver no intestino e que a microbiota residente tem papel fundamental neste aspecto (WESEMANN et al., 2013). Antes de alcançar a periferia, as células B passam por distintas etapas de maturação caracterizadas pelos diferentes rearranjos dos segmentos gênicos de imunoglobulina V, D e J (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013). Resumidamente, no estágio pró-B, ocorre a recombinação somática da cadeia pesada pelo rearranjo dos segmentos DJ seguida pela recombinação do segmento V com o segmento rearranjado DJ, levando a formação de um pré-receptor de células B (pré-BCR) (NAGASAWA, 2006; HERZOG; RETH; JUMAA, 2009). É nesta fase que as células B começam a expressar o coreceptor CD19, responsável por coordenar o limiar de ativação destas células. Em seguida, no estágio pré-B, as sinalizações transmitidas pelo pré-BCR promovem alterações intracelulares que, dentre outras funções, induzem a recombinação somática das cadeias leves (cadeias  $\kappa$  e  $\lambda$ ) através do rearranjo dos segmentos gênicos V e J (não possuem segmento D), permitindo a formação do BCR propriamente dito (HERZOG; RETH; JUMAA, 2009; MELCHERS, 2015). Alcançando o estágio imaturo, as células B expressam o BCR na superfície celular e a seleção positiva é realizada para, posteriormente, deixarem a medula óssea (LIU, Z.; DAVIDSON, 2011; MELCHERS, 2015).

Esses diferentes rearranjos gênicos estabelecem o grande repertório de células B capazes de reconhecer mais de  $5 \times 10^{13}$  antígenos distintos (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013).

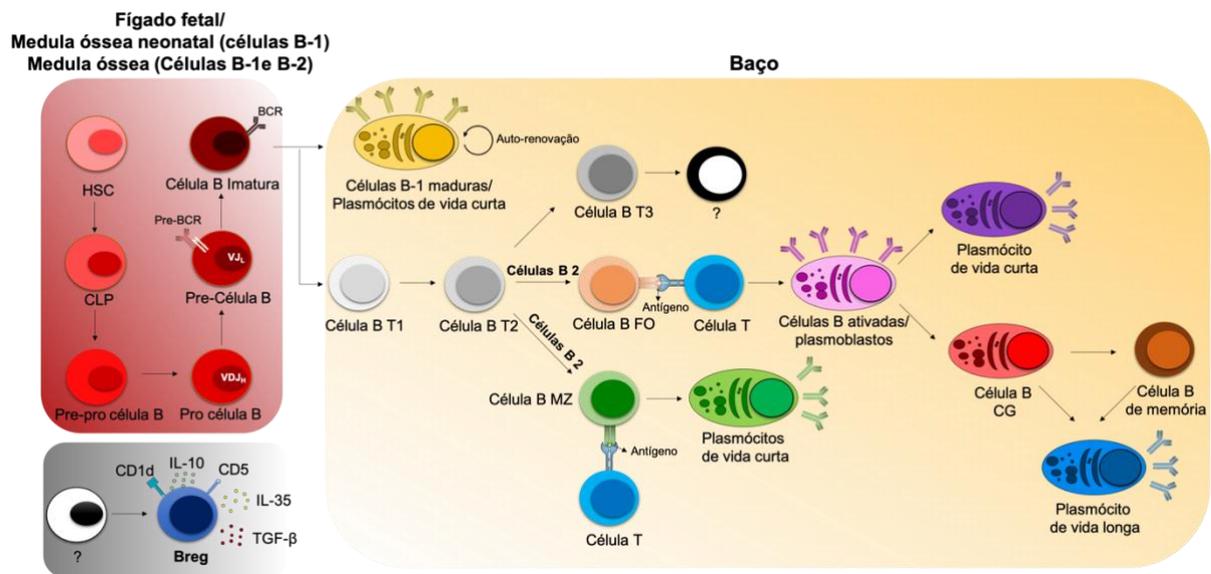


**Figura 1. Funções das células B.** Células B (ou linfócitos B) desempenham diversas funções na imunidade inata e adaptativa. Considerando que seus diferentes subtipos celulares podem privilegiar certas funções, de modo geral, elas têm a capacidade de apresentar antígenos para as células T, produzir e secretar imunoglobulinas (anticorpos) de diversas classes (IgM, IgD, IgA, IgG ou IgE), auxiliar na diferenciação e sobrevivência de outros tipos celulares, induzir tolerância ou suprimir respostas inflamatórias, responder a PAMPs/DAMPs e gerar respostas imunológicas duradouras para antígenos específicos (memória imunológica). **ASC:** célula secretora de anticorpos; **Breg:** célula B reguladora; **CG:** centro germinativo; **DAMPs:** padrões moleculares associados à danos; **DCs:** célula dendrítica; **Mφ:** macrófago; **NLRs:** receptores do tipo *Nod*; **PAMPs:** padrões moleculares associados à patógenos; **Th:** células T Foliculares; **TLRs:** receptores do tipo *toll*. Fonte: Figura adaptada de Selvaraj e colaboradores (SELVARAJ et al., 2016).

Três subpopulações de células B são atualmente descritas (Figura 2). As células B1 são células B extrafoliculares caracterizadas por serem principalmente de origem fetal e terem a capacidade de autorenovação na periferia (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ, 2007). Elas são encontradas principalmente nos líquidos das cavidades pleural, peritoneal e no intestino, mas compreendem 1,5-2% das células B esplênicas (SUZUKI et al., 2010). Acredita-se que determinados autoantígenos e antígenos microbianos não-patogênicos direcionem a expansão e a manutenção das células B1, uma vez que estão localizadas em regiões de interface entre o ambiente externo e interno do organismo (BAUMGARTH, 2011; MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2012). Células

B1 são as principais células produtoras de anticorpos naturais (produzidos antes do reconhecimento do antígeno cognato) e respondem rapidamente aos patógenos de mucosa ao produzirem espontaneamente grandes quantidades de IgM e IgA poliespecíficas (BAUMGARTH, 2011; CERUTTI; PUGA; COLS, 2011). Diversos tipos e níveis de expressão de marcadores têm sido utilizados para caracterizar fenotipicamente essas células em murinos, tais como  $CD19^{hi}CD1d^{mid}CD23-CD43^{+}IgM^{hi}IgD^{low}$  (BAUMGARTH, 2011). Ainda, células B1 podem ser subdivididas em células B1a ( $CD5^{+}$ ) e B1b ( $CD5^{-}$ ) (SUZUKI et al., 2010) (BAUMGARTH, 2016). Embora células B1a e B1b tenham fenótipos e localizações semelhantes, estas células possuem diferentes precursores e funções, como a geração de memória encontrada apenas no subtipo B1b (HAAS, 2015).

As células B2 (ou convencionais) estão presentes principalmente nos órgãos linfoides secundários, mas também nos tecidos linfoides associados à mucosa (MALT, do inglês *mucosa-associated lymphoid tissues*) e são os mediadores da imunidade adaptativa mais comumente descritos (SUZUKI et al., 2010). Geralmente, o termo “células B2” é utilizado para descrever células B foliculares (FO), mas células B da zona marginal (MZ, do inglês *marginal zone*) também compõem esse subgrupo. Ambas as populações celulares são sujeitas à mudança de classe de imunoglobulina e à diferenciação em células B de memória ( $B_{MEM}$ ) (BAUMGARTH, 2011; MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2012). Células B FO são geralmente caracterizadas por apresentarem o fenótipo  $CD5-CD19^{mid}CD1d^{mid}CD23^{+}CD43-IgM^{low}IgD^{hi}$ , enquanto as células B MZ podem ser caracterizadas pelo fenótipo  $CD5-CD19^{mid}CD1d^{hi}CD21^{hi}CD23-CD43-IgM^{hi}IgD^{low}$  (BAUMGARTH, 2011).



**Figura 2. Desenvolvimento e subtipos de células B.** Três subpopulações de células B são atualmente identificadas: B-1, B-2 e Breg. Células B-1 têm origem no fígado fetal e medula óssea neonatal, com capacidade de auto-renovação na periferia. Já as células B-2, compostas pelas células B FO e da MZ, são geradas majoritariamente na medula óssea. Células B FO são as principais células que se diferenciam em células secretoras de anticorpos (plasmoblastos e plasmócitos). A origem exata das células Bregs ainda é desconhecida, mas parece que diversos precursores e subtipos de células B têm capacidade de se diferenciarem nesta população. **Breg:** células B reguladoras; **CLP:** progenitor linfóide comum; **FO:** folicular; **CG:** centro germinativo; **HSC:** célula tronco hematopoiética; **MZ:** zona marginal; **T1/T2/T3:** Células B de Transição 1,2 e 3. Fonte: Figura própria adaptada de Ghirotto e colaboradores (GHIROTTI et al., 2019).

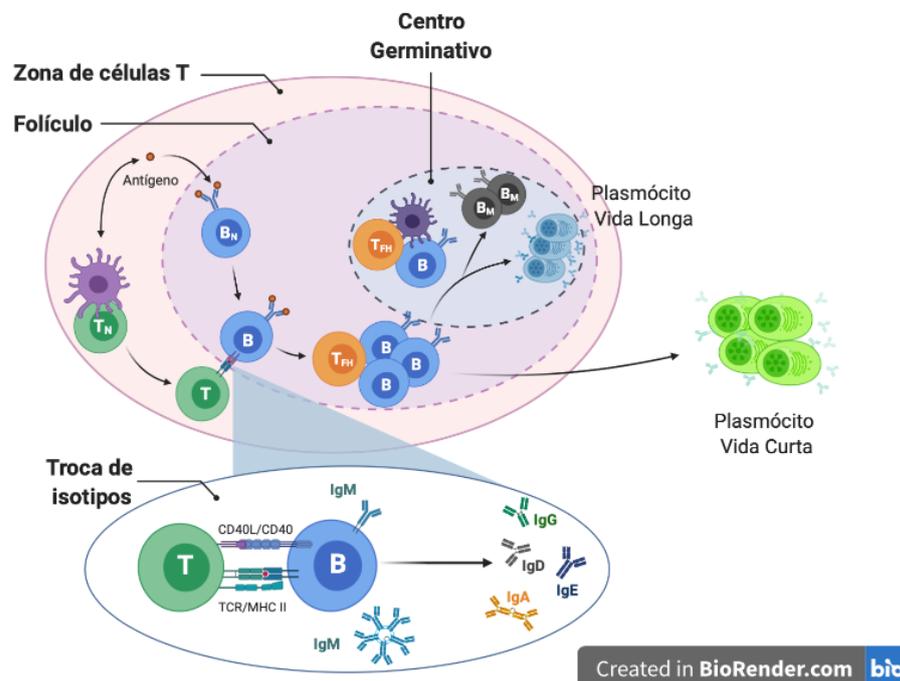
As células B reguladoras (Bregs) foram descritas recentemente e, de modo semelhante às bem caracterizadas células T reguladoras (Tregs), produzem as citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35, exercendo também funções supressoras mediante contato direto com outras células (MAURI; BOSMA, 2012; SHEN et al., 2014). Além disso, as células Bregs podem induzir a apoptose de células T CD4<sup>+</sup>, a anergia de células T CD8<sup>+</sup>, diminuir a polarização de células T CD4<sup>+</sup> para os perfis T auxiliares (h, do inglês *helper*) 1 e Th2, suprimir a diferenciação de monócitos e células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*), além de induzir a diferenciação de células Tregs (MAURI; BOSMA, 2012; ROSSER; MAURI, 2015). Diversos marcadores têm sido propostos para a fenotipagem das células Bregs (CD19<sup>+</sup>Tim-1<sup>+</sup>; CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup>, CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>-</sup>; CD138<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>), porém ainda não existe um consenso sobre o assunto e não se conhece, até o momento, um fator de transcrição característico dessa população, tal como FoxP3 é para as células Tregs (YANABA et al., 2008; ROSSER; MAURI, 2015) (WORTEL; HEIDT, 2017). A origem destas células também não está bem estabelecida, mas sabe-se que células B convencionais

podem se diferenciar em Bregs em todos os estágios do desenvolvimento, principalmente de células B imaturas, B<sub>MEM</sub> ou plasmoblastos, via ativação de diversos receptores, incluindo BCR, CD40, PRRs e/ou citocinas pró-inflamatórias (OLEINIKA; MAURI; SALAMA, 2019).

A ativação de células B pode ser independente ou dependente de células T. Enquanto a primeira envolve a coativação de células B por citocinas ou ligantes de PRRs, a segunda envolve a ativação bidirecional com as células T. As células B ativadas por antígeno podem gerar plasmócitos de vida curta secretores de anticorpos de baixa afinidade em um processo conhecido como “resposta extrafolicular” ao migrarem para a interface entre a zona de células T e o folículo e interagirem com células T CD4<sup>+</sup> também ativadas pelo antígeno (Figura 3) (SHLOMCHIK; WEISEL, 2019). A íntima relação entre as células B e T nesta etapa também induz a troca de isotipos (ou recombinação de classes) de imunoglobulinas. Alternativamente, as células B cooperativamente ativadas por células T CD4<sup>+</sup> podem entrar em folículos especializados e iniciar reações de centros germinativos (CGs) (Figura 3) (NUTT et al., 2015; BOOTHBY, M. R.; HODGES; THOMAS, 2019). CGs são estruturas transitórias formadas dentro dos órgãos linfoides periféricos nas respostas dependentes de células T. Reações de CG induzem altas taxas de proliferação de células B, hipermutação somática e a maturação de afinidade para produzirem anticorpos com alta afinidade, e geram tanto células B de memória (B<sub>MEM</sub>) quanto plasmócitos de vida longa (Figura 3) (BOOTHBY, M. R.; HODGES; THOMAS, 2019). De modo importante, plasmócitos de vida curta e longa possuem mais semelhanças do que diferenças (anatômicas, funcionais e metabólicas) (TELLIER; NUTT, 2019) e pouco se sabe sobre os fatores que determinam as longevidades destas populações.

Os anticorpos (ou imunoglobulinas) são glicoproteínas heterodiméricas compostas por duas cadeias pesadas e cadeias leves. Elas executam diversas funções na manutenção da homeostase imunológica, tais como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), citotoxicidade dependente de complemento (CDC, do inglês *complement-dependent cytotoxicity*), opsonização e neutralização de microrganismos e toxinas (JANEWAY CA JR, 2001; SATHISH et al., 2013). A capacidade dos anticorpos de reconhecerem um grande número de antígenos vem das diferentes estruturas encontradas nas chamadas “regiões variáveis” das cadeias leves e pesadas, resultado da recombinação dos genes

codificadores das cadeias de imunoglobulinas, como já descrito anteriormente (SELANG; KUNIK; OFRAN, 2013). Cinco classes de imunoglobulinas são descritas (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD), sendo que a classe IgG pode ser subdividida em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3.e IgG4) e a classe IgA em 2 subclasses (IgA1 e IgA2). Informações adicionais sobre a estrutura, função e distribuição de todas as classes de imunoglobulinas pode ser encontrada no estudo publicado por Schroeder Jr. & Cavacini (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).



**Figura 3. Reações extrafoliculares e de CG.** Após o reconhecimento do antígeno cognato pelas células B, elas migram para borda do folículo justaposto à zona de células T onde interage com a respectiva célula T CD4<sup>+</sup>, que também foi ativada nas zonas das células T por meio da apresentação do mesmo antígeno por DCs. T auxiliares. Estas interações cognatas promovem a proliferação e facilita a rápida diferenciação de plasmócitos de vida curta/plasmoblastos que são fontes de anticorpos protetores de baixa afinidade. Esta etapa é conhecida como “respostas extrafoliculares”. Concomitantemente, a contínua coestimulação fornecida por citocinas e contato de células B e T leva a diferenciação de células T<sub>FH</sub>, ao início da troca de isotipos de imunoglobulinas e a formação de CGs. CGs são estruturas transitórias formadas dentro dos órgãos linfoides periféricos nas respostas dependentes de células T. Dentro dos CGs, ocorre a hipermutação somática e a maturação de afinidade que, por último, resulta na formação de células B<sub>MEM</sub> e plasmócitos de vida longa. Essas etapas garantem a geração de anticorpos de alta afinidade contra antígenos. **B<sub>MEM</sub>**: células B de memória; **CGs**: centros germinativos; **DCs**: células dendríticas; **T<sub>FH</sub>**: células T foliculares. Fonte: Figura própria criada com BioRender.com.

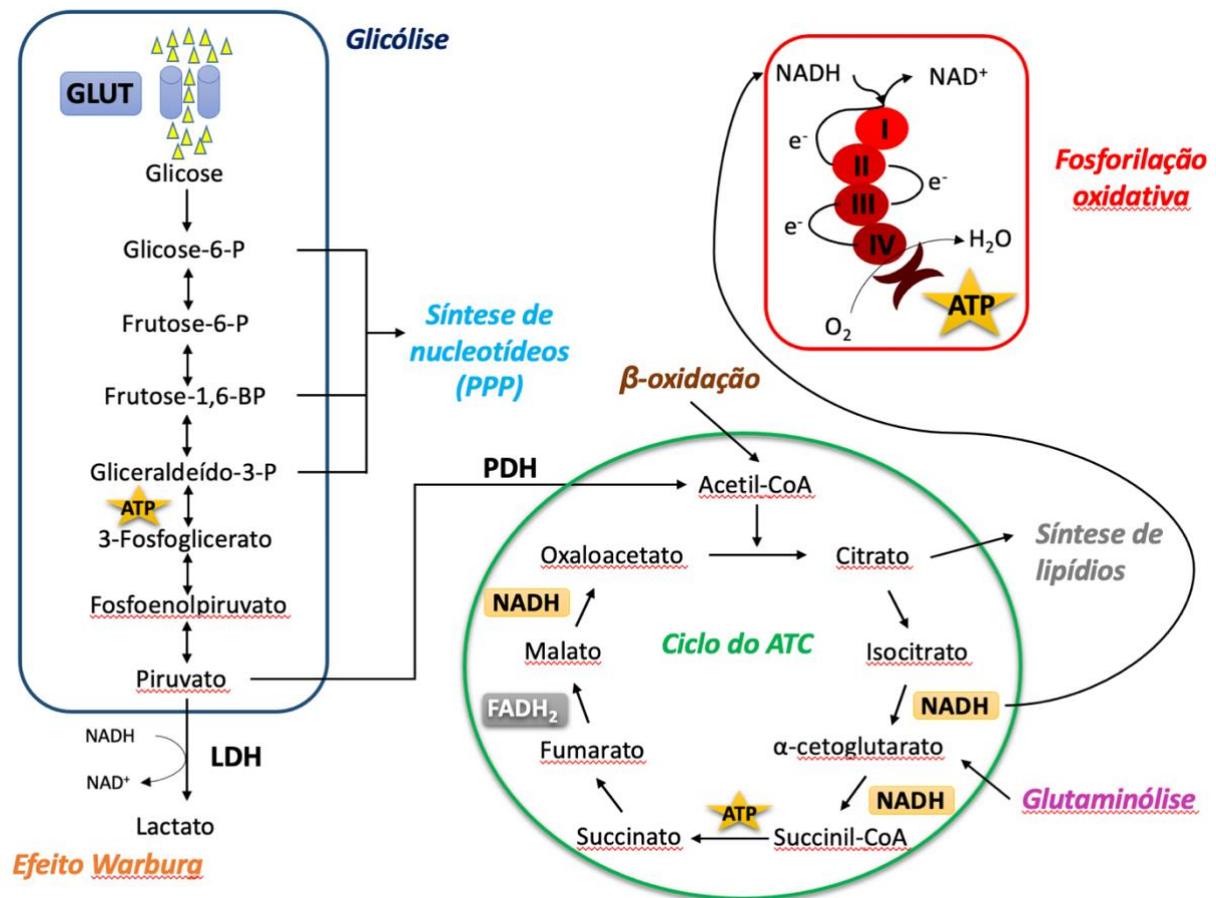
## 1.2. METABOLISMO E SENSORES METABÓLICOS NAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

Atualmente, um novo campo de estudo com potencial terapêutico promissor para diversas doenças tem sido explorado: o metabolismo celular. O conceito de que as células

necessitam de energia para crescerem, dividirem-se e exercerem suas funções é antigo e os processos bioquímicos para a geração de energia são bem compreendidos, podendo ser revisados na Figura 4. No entanto, é recente a noção de que as células podem modificar suas atividades metabólicas e otimizar as suas funções sob determinada pressão do meio externo ou interno. Neste sentido, o entendimento de como as células coordenam os processos metabólicos através de inúmeros sinais intra e extracelulares, bem como a identificação dos fatores que regulam suas atividades energéticas têm sido objetos de grande interesse dos pesquisadores na atualidade (PEARCE; PEARCE, 2013).

Hoje, sabe-se que o metabolismo energético regula o número, o desenvolvimento e a função de diversos tipos celulares, que é diferente na ontogenia e nos estágios de maturação de cada população celular. Assim, as células utilizam vias metabólicas específicas para conseguirem executar determinada função ou para produzirem intermediários que viabilizem processos anabólicos (AGATHOCLEOUS; HARRIS, 2013).

Embora as atividades metabólicas tenham sido exploradas em diversos tipos celulares, as células do sistema imune têm recebido atenção especial. Durante uma resposta inflamatória, as alterações intracelulares nestas populações são bastante significativas e rápidas, uma vez que elas precisam sair do estado de quiescência, modular a expressão de receptores na superfície celular, proliferar, migrar para o sítio inflamado e realizar funções efetoras específicas que irão prevenir a disseminação do agente agressor (FAGONE et al., 2007; BUCK et al., 2017). Desse modo, estas células necessitam de uma atividade bioenergética altamente eficiente, independente do longo processo transcricional (pelo menos num primeiro momento) e que forneça os componentes fundamentais para a execução de todas as etapas da resposta inflamatória. Para isso, uma rede de proteínas nomeadas “sensores metabólicos” atua coletivamente e coordenadamente para integrar diversos sinais nutricionais e ambientais (por exemplo, fatores de crescimento, níveis energéticos, agentes estressores, hormônios) que irão determinar o destino da célula.



**Figura 4. Principais vias metabólicas.** A glicose é transportada para o citoplasma das células através de transportadores específicos (GLUTs) e sofre uma série de reações enzimáticas sequenciais para a produção de piruvato (glicólise). Em seguida, o piruvato pode ser convertido a lactato pela enzima LDH num processo chamado glicólise aeróbia (ou aeróbica ou efeito Warburg). Alternativamente, o piruvato pode ser oxidado na mitocôndria pela enzima PDH no ciclo do ATPC (também conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico) e convertido em acetil-CoA para gerar equivalentes redutores (NADH e FADH<sub>2</sub>) que irão abastecer a cadeia transportadora de elétrons para a fosforilação oxidativa. Cada molécula de glicose metabolizada produz 2 moléculas de ATP durante a etapa da glicólise, 2 moléculas no ciclo do ATPC e 34 moléculas na fosforilação oxidativa, totalizando 38 moléculas de ATP. Além disso, durante a glicólise também são gerados precursores metabólicos para biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos pelas vias da PPP e da biossíntese da serina. Outros substratos podem também ser metabolizados no ciclo do ATPC, como a glutamina através da reação de glutaminólise e os ácidos graxos pela β-oxidação. O citrato pode ser exportado da mitocôndria para o citoplasma e servir como precursor da síntese lipídica. A glutamina e o oxaloacetato também podem atuar como precursores da síntese de nucleotídeos e/ou aminoácidos (não mostrados na figura). **ATC:** ácido tricarbóxico; **ATP:** trifosfato de adenosina; **FADH<sub>2</sub>:** flavina adeninad nucleotídeo reduzida; **GLUT:** transportadores de glicose; **NADH:** nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; **LDH:** lactato desidrogenase; **PDH:** piruvato desidrogenase; **PPP:** via da pentose fosfato. Fonte: Própria.

Os sensores metabólicos mais estudados incluem a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*), a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK, do inglês *adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase*) e o fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , do inglês *hypoxia-induced factor  $\alpha$* ).

### 1.2.1. PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MONOFOSFATO DE ADENOSINA (AMPK)

AMPK é uma serina/treonina quinase que controla o estado energético da célula, maximizando a geração de energia através da produção de ATP principalmente por via da oxidação de ácidos graxos (HERZIG; SHAW, 2018). Ao mesmo tempo, ela inibe vias anabólicas, como a síntese proteica e lipídica, limitando processos que consomem ATP. Desse modo, AMPK controla diretamente a relação AMP/ATP na célula através de mecanismos de fosforilação (Figura 5). No entanto, diversas outras funções têm sido atribuídas direta ou indiretamente à molécula, como o controle da biogênese mitocondrial, autofagia/ mitofagia, transcrição, modificações pós-traducionais e a regulação no desenvolvimento/ função de diversas células do sistema imune (CAO et al., 2010; MIHAYLOVA; SHAW, 2011; KIM et al., 2016).

AMPK é um composto heterotrimérico constituído de uma subunidade catalítica  $\alpha$  ( $\alpha 1$  ou  $\alpha 2$ ) e duas subunidades reguladoras:  $\beta$  ( $\beta 1$  ou  $\beta 2$ ) e  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  ou  $\gamma 3$ ). As possíveis combinações das subunidades de AMPK produzem diferentes isoformas, cuja expressão é dependente do organismo e dos diferentes tecidos, além de possuírem funções virtualmente distintas (WU et al., 2013; JEON, 2016).

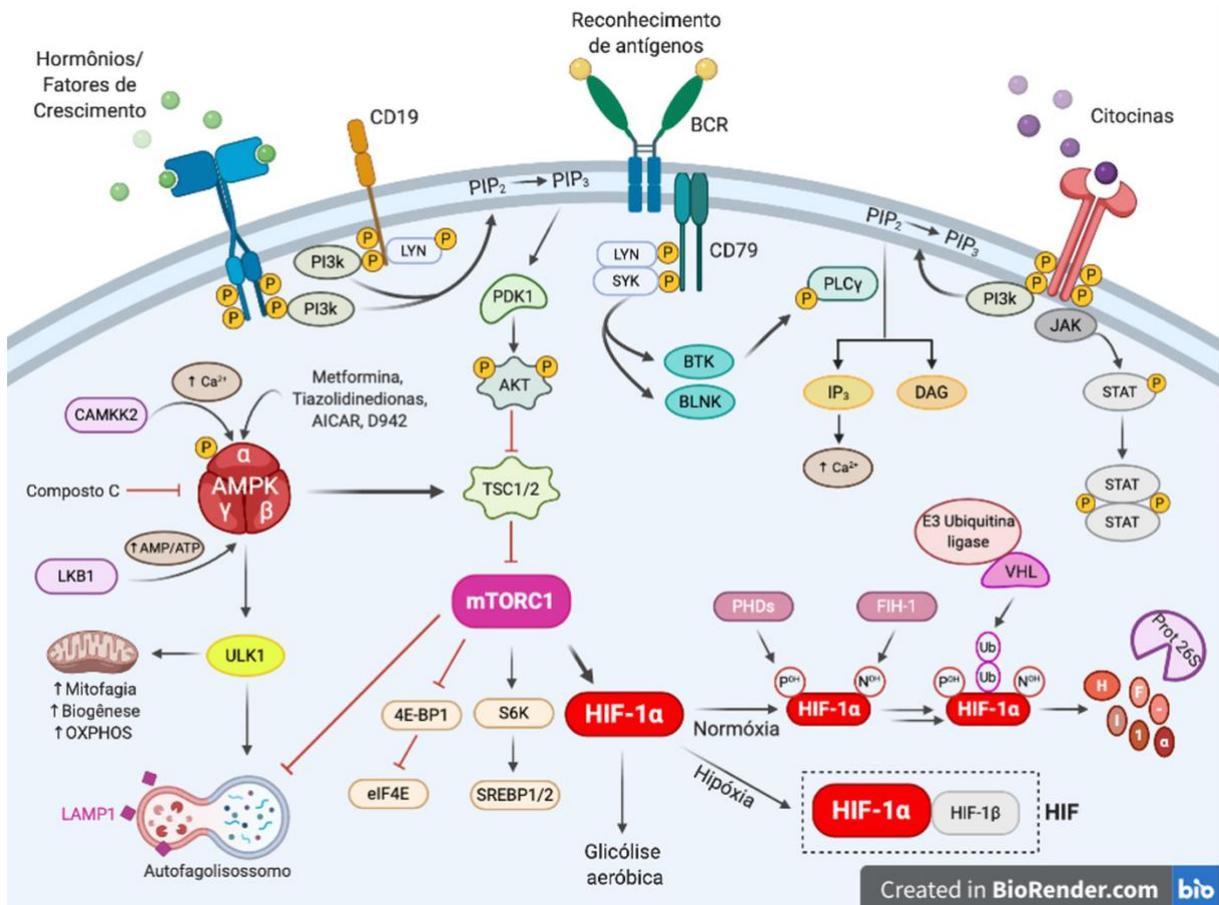
Os principais ativadores fisiológicos de AMPK são a proteína quinase hepática B1 (LKB1, do inglês *liver kinase B1*, ou STK11) e a proteína quinase quinase dependente de cálcio/ calmodulina (CAMKK2, do inglês *calcium/ calmodulin-dependent kinase kinase 2*, ou CAMKK $\beta$ ). Ambas LKB1 e CAMKK2 são estruturalmente homólogas e fosforilam um resíduo de treonina (Thr<sup>172</sup>) conservado localizado na subunidade  $\alpha$  de AMPK (Figura 5). LKB1 está diretamente relacionada ao controle do estresse energético via concentração AMP/ATP dentro da célula (GARCIA; SHAW, 2017). Já CAMKK2 é ativada pelo aumento de cálcio intracelular e é independente das concentrações de AMP/ATP. A ativação de AMPK parece ser sinérgica se houver aumento concomitante de ambas as concentrações de

cálcio e AMP intracelulares (FOGARTY et al., 2010; MIHAYLOVA; SHAW, 2011; KIM et al., 2016).

Além disso, compostos farmacológicos também podem inibir ou ativar AMPK. Mostrou-se que a metformina, droga antidiabética capaz de reduzir a produção de glicose hepática e aumentar a sensibilidade insulínica periférica, ativa AMPK de maneira não seletiva e dependente de LKB1. A droga também é capaz de inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a razão AMP/ATP e, conseqüentemente, ativando AMPK. Outras drogas utilizadas no tratamento da diabetes, as tiazolidinedionas, assim como a D942, têm sido também descritas como ativadoras de AMPK por mecanismos semelhantes aos exercidos pela metformina. AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -d-ribofuranosídio) é um outro agonista de AMPK que funciona como precursor de uma molécula que mimetiza o AMP, o ZMP, que se liga à subunidade reguladora  $\gamma$  de AMPK (LEBRASSEUR et al., 2006; FULLERTON et al., 2013; DUCOMMUN et al., 2014). Já o composto C, um inibidor competitivo com o ATP pelo sítio de ligação na molécula de AMPK, tem sido bastante utilizado para bloquear as ações da proteína. No entanto, além de ser tóxico, o composto C age em vias independentes de AMPK (EMERLING et al., 2007; LIU, X. et al., 2014).

Após ativação, AMPK fosforila diretamente diversos substratos para controlar o metabolismo e crescimento celular. Uma das principais ações executadas por AMPK é regular negativamente mTORC1. Essa atividade pode ser direta ou indireta através da ativação do complexo da esclerose tuberosa (TSC, do inglês *tuberous sclerosis complex*), inibidor fisiológico de mTORC1 (Figura 5) (GWINN et al., 2008). Ao mesmo tempo, AMPK estimula a biogênese mitocondrial de novo através do coativador-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 $\alpha$ , do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$* ), um potente coativador de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo energético. Ainda a proteína induz a autofagia/mitofagia através da ativação da proteína quinase do tipo unc-51 (ULK1, do inglês *unc-51-like autophagy-activating kinase 1*) que, por sua vez, é regulada negativamente por mTORC1 (GARCIA; SHAW, 2017). AMPK também inibe enzimas metabólicas como as acetil CoA carboxilases 1 (ACC1)/ ACC2 e a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase). Essas proteínas atuam ativamente na síntese de ácidos graxos e esteroides, respectivamente, em diversos organismos (CORRADETTI et al., 2004; REZNICK;

SHULMAN, 2006; GWINN et al., 2008). Adicionalmente, AMPK induz o processo de fissão mitocondrial, aumenta a captação de glicose e a atividade glicolítica, mas inibe programas de gluconeogênese (GARCIA; SHAW, 2017).



**Figura 5. Vias de ativação de células B e AMPK-mTORC1-HIF-1 $\alpha$ .** Após reconhecimento de antígeno pelo BCR e co-estimulação (ativação de CD19, citocinas, hormônios e/ou fatores de crescimento), uma cascata de sinalização é iniciada pelas proteínas que se associam aos resíduos citoplasmáticos fosforilados dos receptores transmembrana, formando complexos supramoleculares denominados signalossomos. A atividade da via PI3K-AKT culmina com a ativação de mTORC1, indutor da síntese de proteínas e lipídios, da glicólise aeróbica, da proliferação celular e inibidor da autofagia. Ao mesmo tempo, o aumento na concentração citoplasmática de cálcio e/ou a diminuição da disponibilidade ATP leva a ativação das proteínas CAMKK2 e LKB1, respectivamente. Essas proteínas, juntamente com outras drogas sintéticas (metformina, tiazolidinedionas, AICAR, D942 e composto C), regulam direta ou indiretamente AMPK, uma proteína heterotrímica composta por 1 subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e 2 subunidades reguladoras ( $\beta$  e  $\gamma$ ). Como um antagonista de mTORC1, AMPK induz autofagia/mitofagia, bem como a geração de energia via OXPHOS e biogênese mitocondrial. Um dos efeitos da ativação de mTORC1 é a ativação e estabilização de HIF-1 $\alpha$ . Este fator de transcrição, que também é estabilizado em situações de hipóxia, se dimeriza com a subunidade citoplasmática constitutiva HIF-1 $\beta$  e medeia diversas funções de mTORC1, principalmente a indução de glicólise aeróbica. Na ausência da atividade de mTORC1 ou em situações de normóxia, HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado, ubiquitinado e degradado pelo complexo VHL-ubiquitina-proteassoma. **4E-BP1**: proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E; **AICAR**: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -D-ribofuranosídeo (agonista de AMPK); **AKT**: Proteína quinase B; **AMP**: monofosfato de adenosina; **AMPK**: proteína quinase ativada por AMP; **ATP**: trifosfato de adenosina; **BCR**: receptor de células B; **BLNK**: proteína ligadora de células B; **BTK**: tirosina quinase de Bruton; **CAMKK2**: Proteína

quinase tipo 2 dependente de cálcio-calmodulina; **DAG**: diacilglicerol; **eIF4E**: fator de iniciação eucariótico 4E; **FIH-1**: fator inibidor do HIF-1 $\alpha$ ; **HIF**: fator induzido/induzível por hipóxia; **IP<sub>3</sub>**: inositol-1,4,5-trifosfato; **JAK**: proteína janus quinase; **LAMP1**: proteína de membrana lisossomal 1; **LKB1**: quinase B1 do fígado; **mTORC1**: complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos; **OXPHOS**: fosforilação oxidativa; **PDK1**: Proteína quinase dependente de fosfoinositídeos-1; **PHDs**: proteínas do domínio prolil-hidroxilase; **PI3K**: fosfatidilinositol-3-quinase; **PIP<sub>2</sub>**: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; **PIP<sub>3</sub>**: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; **PLC $\gamma$** : fosfolipase C $\gamma$ ; **Prot 26S**: proteassoma 26S; **S6K**: proteína quinase ribossomal S6; **SREBP1/2**: proteína de ligação reguladora de esteroides 1 e 2; **STAT**: proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição; **TSC**: Complexo da esclerose tuberosa; **Ub**: ubiquitina; **ULK1**: proteína quinase do tipo unc-51; **VHL**: proteína von Hippel Lindau. Fonte: Figura própria criada com BioRender.com.

### 1.2.2. PROTEÍNA ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (mTOR)

A proteína mTOR é uma serina/treonina quinase e é elemento comum de uma rede de sinalizações que controlam o metabolismo, coordenando e integrando sinais de múltiplas vias, tais como as da insulina, fatores de crescimento, energia, estresse e mitógenos. Este sensor metabólico desempenha papel essencial no controle da síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, assim como no crescimento e na proliferação celular (SOLIMAN, 2013).

A proteína mTOR se apresenta em dois grandes complexos chamados mTORC1 e mTORC2, que possuem diferentes funções e distintos níveis de regulação. Como sugerido pelo próprio nome, mTOR é sensível à droga imunossupressora rapamicina. No entanto, mTORC1 pode ser inibido em baixas doses, enquanto mTORC2 é inibido somente após altas concentrações e longa exposição à droga (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; DOBASHI et al., 2011).

As vias de sinalização de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ proteínas quinase B (AKT) e de AMPK, coordenadoras das atividades fisiológicas e metabólicas dentro das células, são importantes eixos regulatórios da ativação de mTORC1 (Figura 5). Essencialmente, fatores de crescimento, citocinas e moléculas coestimuladoras ativam a via PI3K/AKT que, por sua vez, bloqueia as funções inibitórias de TSC sobre mTORC1 culminando com sua ativação. No entanto, a ativação de AMPK, como já descrito, inibe a atividade de mTORC1.

Uma vez ativado, mTORC1 fosforila proteínas quinases alvo, como a proteína quinase ribossomal S6 (S6K, do inglês *S6 kinase*) e a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1, do inglês *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*), que levarão às diferentes ações relacionadas ao complexo (THOMSON; TURNQUIST; RAIMONDI, 2009; CZARNY et al., 2015). A ativação de mTORC1 também leva a estabilização de HIF-1 $\alpha$  (Figura 5), cujos papéis serão descritos posteriormente.

Embora tenha sido descrito que o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) regula a atividade de mTORC2, pouco é conhecido sobre os fatores que coordenam a ativação deste complexo. Sabe-se que mTORC2 é bastante responsivo a fatores de crescimento quando está associado aos ribossomos (FRUMAN; ROMMEL, 2014). O mTORC2, diferentemente de mTORC1, é capaz de fosforilar AKT, outra serina/treonina quinase envolvida com diversas vias e funções celulares (metabolismo, angiogênese, ciclo celular, sobrevivência, autofagia e biogênese celular). Sabe-se que AKT pode ser ativada por meio da fosforilação em dois resíduos de aminoácidos, o primeiro no sítio catalítico (Thr<sup>308</sup>) e o segundo no motivo hidrofóbico C-terminal (Ser<sup>473</sup>). O sítio catalítico pode ser fosforilado por mensageiros secundários ativados por PI3K, enquanto a Ser<sup>473</sup> é fosforilada por mTORC2. Embora mTORC2 ative AKT e esta possua ação estimulante sobre mTORC1, a inibição total de mTORC2 não diminui a ativação de S6K, indicando que mTORC2 não ativa diretamente mTORC1 (ALESSI et al., 1997; JACINTO et al., 2006).

mTORC1 orchestra programas glicolíticos e lipogênicos para impulsionar a saída do estado de quiescência e regula várias proteínas relacionadas ao metabolismo celular. Já mTORC2 promove a sobrevivência celular ativando AKT, que regula a dinâmica do citoesqueleto e inibe o fator de transcrição Foxo, outra proteína relacionada à proliferação celular, apoptose, longevidade, câncer e metabolismo. O papel de mTORC2 tem sido pouco avaliado no metabolismo celular.

### 1.2.3. FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )

HIF-1 $\alpha$  é uma proteína que compõe o complexo dimérico HIF-1 juntamente com a outra subunidade  $\beta$ , expressa constitutivamente pelas células (HUDSON et al., 2002; SHEHADE et al., 2015). Os HIFs (1, 2 ou 3) desempenham papel central nas respostas

celulares à hipóxia. Em condições normóxicas, HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado por proil hidroxilases (PHDs) e/ou asparaginil hidroxilases (fator inibidor de HIF-1 $\alpha$  – FIH1), permitindo sua degradação proteossômica pelo complexo formado pela proteína von Hippel Lindau (VHL) e ubiquitina ligase (Figura 5). No entanto, a diminuição da biodisponibilidade de oxigênio inibe a atividade de PHDs e FIH1, prevenindo a degradação de HIF-1 $\alpha$  e permitindo a formação dos heterodímeros. A ativação de mTORC1 também é capaz de induzir a estabilização de HIF-1 $\alpha$  independentemente das concentrações de oxigênio (AGANI; JIANG, 2013; LAUKKA et al., 2016).

Após a estabilização de HIF, este migra para o núcleo celular e se liga aos elementos responsivos à hipóxia (HRE, do inglês *hypoxia response elements*), regulando a expressão de diversos outros genes relacionados ao metabolismo de oxigênio e ao metabolismo celular como um todo (CHOUDHRY; HARRIS, 2018). A ativação de HIF reduz o consumo de oxigênio dentro das células ao priorizar a glicólise aeróbica ao invés da fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*), processo dependente de oxigênio (MCNAMEE et al., 2013).

Como um importante alvo de mTORC1 que, por sua vez, é um agente pró-glicolítico, HIF-1 $\alpha$  promove o aumento da expressão de genes relacionados às enzimas glicolíticas, como a hexoquinase 2, isomerase trifosfato e piruvato quinase (SEMENZA et al., 1994; DANG et al., 2011).

### **1.3. O METABOLISMO E O PAPEL DOS SENSORES METABÓLICOS NAS CÉLULAS B**

De modo geral, a glicólise aeróbica coordena a ativação da maioria das células imunes, enquanto a OXPHOS suporta as células de memória, quiescentes e reguladoras (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2020). Uma vez que a glicólise aeróbica é um processo rápido com baixo rendimento energético, presume-se que as células ativadas utilizem essa rota para gerar precursores para as vias biossintéticas e divisão celular. A OXPHOS, por sua vez, é a via escolhida para a geração de grandes quantidades de ATP. É importante ressaltar que todas as vias metabólicas parecem ser relevantes para o desenvolvimento e função de qualquer célula, mas uma determinada via pode aumentar ou diminuir mais significativamente em relação a outra no contexto de desafios específicos. Por exemplo, ao descrever que um tipo celular ativado é glicolítico significa que esta via metabólica

predomina ou aumenta mais significativamente que outras, embora também ocorra o aumento das atividades das vias da pentose fosfato (PPP, do inglês *pentose phosphate pathway*) e da glutaminólise, embora em uma extensão menor.

Com relação as células B, para proliferarem e produzirem anticorpos rapidamente após encontro com antígenos, elas precisam obter uma resposta bioenergética altamente responsiva e eficiente, de modo a fornecer precursores necessários para geração de energia e anabolismo (DOUGHTY et al., 2006; FAGONE et al., 2007). A descrição do perfil metabólico das células B começou a ser investigada recentemente e pouco se sabe sobre as características metabólicas dos subtipos de células B e sobre o papel dos sensores metabólicos no contexto de desafios específicos.

Após a ativação pelo reconhecimento de antígenos, as células B aumentam rapidamente a captação de glicose e a taxa de glicólise para promover o crescimento celular (DOUGHTY et al., 2006). Além disso, células B estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) aumentam a síntese de fosfolipídios e de diversos componentes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos (FAGONE et al., 2007). Ainda, foi demonstrado que o programa metabólico das células B ativadas difere do encontrado em células T ativadas. Enquanto estas priorizam a atividade glicolítica após ativação, as células B aumentam tanto a glicólise aeróbica como a OXPHOS após estímulo (CARO-MALDONADO et al., 2014). Células B ativadas com LPS também aumentam a expressão do transportador de glicose GLUT-1 e a massa mitocondrial (CARO-MALDONADO et al., 2014).

Considerando as ASCs, a captação de glicose parece ser essencial para a proliferação, para a expansão da rede de membranas intracelulares (permitindo a produção de anticorpos) e para a expressão de marcadores de ASCs (CD138 e Blimp-1)(DUFORT et al., 2014). De fato, camundongos com células B deficientes em GLUT-1 falharam na produção de IgM ou IgG específicas e totais 7 dias após a imunização com NP-ovalbumina (OVA)(Caro-Maldonado, Wang et al. 2014). A glicose captada deve ser direcionada principalmente para a OXPHOS que se mostrou essencial para a síntese de anticorpos (PRICE et al., 2018). Além disso, plasmócitos de vida longa captam mais glicose para gerar piruvato, expressam mais transportador de aminoácido CD98 e têm maior massa autofagossômica do que plasmócitos de vida curta (LAM et al., 2016; LAM et al., 2018).

Os poucos dados disponíveis na literatura envolvendo mTOR e células B são provenientes de estudos sobre a influência da proteína sobre o desenvolvimento destas células ou de linhagens de câncer (KAY et al., 1991; AAGAARD-TILLERY; JELINEK, 1994; PEARCE; PEARCE, 2013; LIMON et al., 2014). Até o momento, sabe-se que mTORC2 impede a troca de isotipo após uso de inibidores de mTOR (LIMON et al., 2014). mTOR também é ativado após estimulação prolongada do BCR, mas há limitada magnitude de ativação com baixa exposição a antígenos, indicando que mTOR é crítico para integrar sinais que afetam as funções de células B e que é regulado por títulos antigênicos (DONAHUE; FRUMAN, 2003; 2007). De modo interessante, foi relatado que o uso de rapamicina ou de animais contendo células B deficientes de mTORC1 promoveu proteção contra diferentes cepas letais do vírus da influenza devido a reatividade cruzada dos anticorpos após vacinação (KEATING et al., 2013). Observou-se que estes animais não desenvolveram 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 do vírus (KEATING et al., 2013). No entanto, não existem estudos que mostrem as implicações energéticas após inibição ou ativação de mTOR em células B.

Considerando a proteína AMPK, ela tem sido avaliada especialmente em macrófagos, DCs e linfócitos T, mas tem sido envilecida nas demais subpopulações, tais como as células B e as polimorfonucleares (BLAGIH et al., 2015; KELLY; O'NEILL, 2015). Em linfócitos T, foi mostrado que a deleção de LKB1 prejudica parcialmente o desenvolvimento tímico, o número de células T periféricas, a sobrevivência e a proliferação destas células (CAO et al., 2010; TAMAS et al., 2010). Células T sem a expressão de AMPK apresentam bioenergética mitocondrial reduzida e diminuída produção de ATP celular em resposta a desafios patogênicos *in vivo*. Sob deprivação de glicose ou glutamina, células T efetoras elevaram a atividade de AMPK, mas a ausência desta molécula neste contexto de privação energética prejudicou o desenvolvimento de células Th1 e Th17 e as respostas primárias de células T a infecções bacterianas e virais. Células T efetoras deficientes de AMPK aumentam marcadamente a ativação de mTORC1, associada com aumentada tradução do RNAm de *Ifng* e maior síntese de IFN- $\gamma$ , quando cultivadas em baixas concentrações de glicose (BLAGIH et al., 2015). No entanto, não há

relatos na literatura que descrevam o papel de AMPK no metabolismo e desenvolvimento de células B.

Considerando HIF1- $\alpha$ , ele é importante para regular a produção de IL-10 por células Bregs CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> através da indução de glicólise. Como resultado, a deficiência de HIF-1 $\alpha$  em células B aumentou a gravidade da artrite induzida por colágeno e encefalomielite autoimune experimental (MENG et al., 2018). Já as células B1 peritoneais de camundongos quiméricos deficientes de HIF-1 $\alpha$  produziram altos níveis de anticorpos IgG e IgM contra DNA de dupla fita, sugerindo um papel regulador de HIF-1 $\alpha$  nas células B (KOJIMA et al., 2002). Além disso, estudos recentes mostraram que as zonas claras dos CG são hipóxicas e que baixas tensões de oxigênio (pO<sub>2</sub>) induzem alterações nas funções das células B, como a diminuição da proliferação, aumento da morte celular, comprometimento na troca de isotipos de imunoglobulinas tanto para IgG1 como para o isotipo pró-inflamatório IgG2c, além de prejudicar respostas ao redesafio antigênico (CHO et al., 2016). A troca de classe de isotipo para IgA não foi prejudicada quando induzida sob condições de hipóxia (CHO et al., 2016).

Uma limitação do estudo publicado por Cho e colaboradores (CHO et al., 2016) foi o uso de LPS como principal ativador nos experimentos *in vitro*, uma vez que células T não fornecem sinais via TLR-4 para as células B nas reações de CG. Como descrito anteriormente, as células T auxiliam a ativação das células B ao fornecerem ligantes coestimuladores (CD40L) e citocinas (por exemplo, IL-4, IL-21, IFN- $\gamma$ ) que induzem a proliferação e diferenciação em plasmócitos e células B<sub>MEM</sub> (GONG; ZHENG; ZHOU, 2019).

Em 2011, Nojima e colaboradores usaram fibroblastos murinos que expressam tanto CD40L como BAFF (linhagem celular 40LB) para simular o microambiente do CG, juntamente com a adição externa de citocinas (neste caso, IL-4) para induzir troca de isotipos específicas (neste caso, o uso de IL-4 induz a troca para IgG1) (NOJIMA et al., 2011). Células B cultivadas sob estas condições expressaram moléculas características de células B CG, como PNA, GL-7 e Fas. No entanto, quando estas células foram adotivamente transferidas para camundongos recipientes, elas persistiram majoritariamente como um fenótipo de memória (B<sub>MEM</sub>) com baixa frequência de plasmócitos (NOJIMA et al., 2011). De fato, a citocina IL-21 é necessária para a eficiente formação do CG, geração de células T<sub>FH</sub> (que também são fontes de IL-21) e diferenciação de plasmócitos ao induzir a

expressão de Blimp-1 (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016). No entanto, IL-21 parece ser desnecessária para a diferenciação de células B<sub>MEM</sub>. Desse modo, Kuraoka e colaboradores introduziram por transdução retroviral nas células 40LB o cDNA murino responsável pela produção de IL-21, criando uma nova linhagem celular que expressa CD40L, BAFF e IL-21, as células NB21-2.D9 (KURAOKA et al., 2016). Desse modo, as células passam a produzir primordialmente plasmócitos com classes de imunoglobulinas específicas após a adição externa de citocinas. portanto, o uso desse sistema *in vitro* parece representar mais fielmente o ambiente do CG para, assim, confirmar a influência da hipóxia sobre as funções de células B CG encontrados por Cho e colaboradores.

Além disso, nenhum estudo verificou até o momento o papel de HIF-1 $\alpha$  nas funções metabólicas de plasmócitos. Essa questão é muito importante, uma vez que o estresse metabólico de uma ASC é grande devido a contínua e alta atividade secretória. De fato, a literatura existente sugere que os plasmócitos de vida curta morrem em decorrência do estresse metabólico (LAM; BHATTACHARYA, 2018) e ainda é desconhecido como plasmócitos de vida longa mantêm a longevidade, escapando do estresse. Uma hipótese levantada é que os plasmócitos de vida longa, que residem primordialmente na medula óssea, migram para o órgão naturalmente hipóxico e estabilizam HIF-1 $\alpha$  para se proteger do estresse metabólico (LIGHTMAN; UTLEY; LEE, 2019).

Em conjunto, este estudo avaliou o papel dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas funções de células B e se a modulação desses sensores seria suficiente para alterar o curso clínico de doenças inflamatórias ou a função/longevidade de plasmócitos de vida longa, respectivamente.

Sabe-se que as células B são a população celular predominante na mucosa inflamada, embora tenha sido envilecida por muitos anos no contexto de doenças intestinais (WANG et al., 2015; MIZOGUCHI, ATSUSHI; BHAN, 2017). Dessa forma, a colite experimental foi selecionada como modelo de estudo para verificar se as alterações metabólicas das células B poderiam alterar o curso da doença. Portanto, um breve resumo das doenças inflamatórias intestinais (DII) será apresentado a seguir.

#### 1.4. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS E CÉLULAS B

As DII são condições caracterizadas pela resposta inflamatória crônica no trato gastrointestinal. A Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (UC, do inglês *ulcerative colitis*) são as principais doenças que compõem este grupo, que também é formado pela colite colagenosa e a colite linfocítica (LAMB et al., 2019).

Embora cerca de 10% dos pacientes com DII não tenham o diagnóstico clínico definido como CD ou UC devido às similaridades clínicas (TREMAINE, 2011), mas a localização e os tipos das lesões, a dinâmica da resposta imunológica e a suscetibilidade aos tratamentos são diferentes (MARTINS; PEPPERCORN, 2004; PRIDEAUX et al., 2012; LAMB et al., 2019). Especificamente, as lesões observadas na DC são irregulares e transmurais que podem estar presentes em qualquer segmento do trato gastrointestinal (KALLA et al., 2014; MOZDIK; O'MALLEY; ARASARADNAM, 2015; KOBAYASHI et al., 2020). Já a UC é uma doença na qual as lesões superficiais restritas à mucosa acometem inicialmente o reto, podendo se estender continuamente até o cólon proximal (KOBAYASHI et al., 2020).

Com 6,8 milhões de casos totais em 2017 (COLLABORATORS, 2020), o impacto econômico e na qualidade de vida dos doentes é alto devido aos ciclos repetidos de relapso e remissão da doença, complicações extraintestinais, necessidade de acompanhamento contínuo, hospitalizações, cirurgias e tratamentos prolongados e dispendiosos (TERZIC et al., 2010; BUCHANAN et al., 2011; M'KOMA, 2013).

As DII têm origem complexa e multifatorial, com fatores microbianos, genéticos, imunológicos e ambientais desempenhando papéis centrais no desenvolvimento (BASSO, P.J. et al., 2014). Além disso os protocolos terapêuticos atuais são focados apenas nos tratamentos dos sintomas e indução da remissão das doenças, mas não há até o momento, nenhuma abordagem curativa. Desse modo, as DII são objetos contínuos de investigação, sendo utilizados diversos modelos experimentais sendo classificados como espontâneos, químicos, microbianos, transferência celular e geneticamente modificados (SALEH; ELSON, 2011; MIZOGUCHI, A., 2012).

Uma vez que modelos experimentais, de modo geral, não conseguem reproduzir exatamente os mecanismos observados em humanos, a escolha de cada modelo depende dos objetivos propostos em cada estudo. O modelo químico de dextran sulfato de sódio

(DSS), por exemplo, tem sido extensivamente utilizado por ser um método simples e dinâmico, uma vez que consiste na adição da droga na água de beber dos animais. Dessa forma, diferentes concentrações da droga e/ou mudanças na periodicidade da administração podem induzir graus distintos da inflamação intestinal (EICHELE; KHARBANDA, 2017). As moléculas de DSS parecem se complexar com ácidos graxos de cadeia média presentes no cólon, resultando na formação de vesículas nanométricas que se fundem com as membranas das células colônicas. Uma vez dentro das células epiteliais do cólon, o grupo dextran é capaz de ativar as vias de sinalização inflamatórias (LAROUÏ et al., 2012). O DSS promove uma inflamação intestinal contínua e homogênea, facilitando o direcionamento de vários segmentos intestinais para diferentes tipos de análises, além de ser considerado um bom modelo para estudos translacionais (MELGAR et al., 2008). O tipo de resposta imunológica induzido por DSS depende das características genéticas da linhagem de camundongo utilizada. Enquanto camundongos BALB/c tem uma resposta mais Th2/Th17/Treg, animais C57BL/6 tem uma resposta mais Th1 (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015; YANG et al., 2017).

Outro método químico bastante utilizado é o do ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Este modelo é caracterizado pela aplicação intrarectal do hapteno juntamente com etanol absoluto que lesiona a barreira intestinal, permitindo a interação do TNBS com as proteínas do cólon. Desse modo, a resposta inflamatória é iniciada no intestino e uma forte resposta Th1/Th17 é montada (ANTONIOU et al., 2016). Embora o método do DSS seja considerado tradicionalmente um processo agudo na indução de colite (uma vez que ele é bastante versátil), o modelo de TNBS (em dose única) é um processo inflamatório ainda mais súbito. Ainda, o TNBS induz várias áreas com lesões descontínuas no trato intestinal, além do que camundongos C57BL/6 são geneticamente mais resistentes à indução da doença (ALEX et al., 2009).

Considerando os outros métodos, o modelo de transferência de células (células T CD45RB<sup>high</sup> para camundongos linfopênicos SCID ou Rag<sup>-/-</sup>) é utilizado para estudar a imunoregulação e células Tregs, enquanto que os modelos genéticos, como os animais deficientes de IL-10, são úteis para estudos sobre as funções de macrófagos e também outros processos imunorregulatórios (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015).

Uma das principais características das DII é a inflamação descontrolada da mucosa intestinal (HANAUER, 2006). De modo geral, praticamente todos os componentes do sistema imune estão alterados e/ou sofrem alteração durante o curso da doença. Porém, ainda existem populações celulares que, mesmo essenciais para a manutenção da homeostase intestinal, foram pouco exploradas, tais como as células B.

Como descrito anteriormente, células B têm papel importantes nas defesas de mucosa, já que cerca de 80% dos plasmócitos estão localizados no intestino (BRANDTZAEG; CARLSEN; HALSTENSEN, 2006). No entanto, estudos passados mostraram não haver participação fundamental desta população na colite experimental induzida por DSS (DIELEMAN et al., 1994). Contudo, um trabalho recente de Wang e colaboradores mostrou que o papel de células B durante a colite por DSS é fundamental para a atenuação da doença e que existe uma cooperação mútua entre células B e T, com as primeiras auxiliando na proliferação de células Tregs, enquanto as segundas auxiliam células B a diferenciarem-se em plasmócitos secretores de anticorpos IgA (WANG et al., 2015). No entanto, não existem evidências se, modificações metabólicas nas células B poderiam induzir alterações suficientemente significativas no curso da doença inflamatória intestinal experimental.

Portanto, a nossa hipótese foi que a modulação das vias AMPK-mTOR-HIF-1 $\alpha$  em células B poderia ser potencialmente determinante para a inflamação e/ou regeneração tecidual intestinal.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar os papéis de AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas funções das células B.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.2.1. Caracterizar o perfil metabólico de células B sob diferentes estímulos *in vitro*;
- 2.2.2. Avaliar o papel de AMPK no metabolismo das células B;
- 2.2.3. Investigar o papel de AMPK no perfil de ativação das células B, na secreção de anticorpos e na diferenciação em plasmoblastos;
- 2.2.4. Avaliar se a modulação da atividade de AMPK especificamente em células B altera o curso de doenças inflamatórias (colite experimental);
- 2.2.5. Investigar o papel de HIF-1 $\alpha$  na troca de isotipo de imunoglobulinas e na diferenciação em plasmócitos;
- 2.2.6. Avaliar o papel de HIF-1 $\alpha$  na longevidade de plasmócitos de vida longa.

## **3.MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

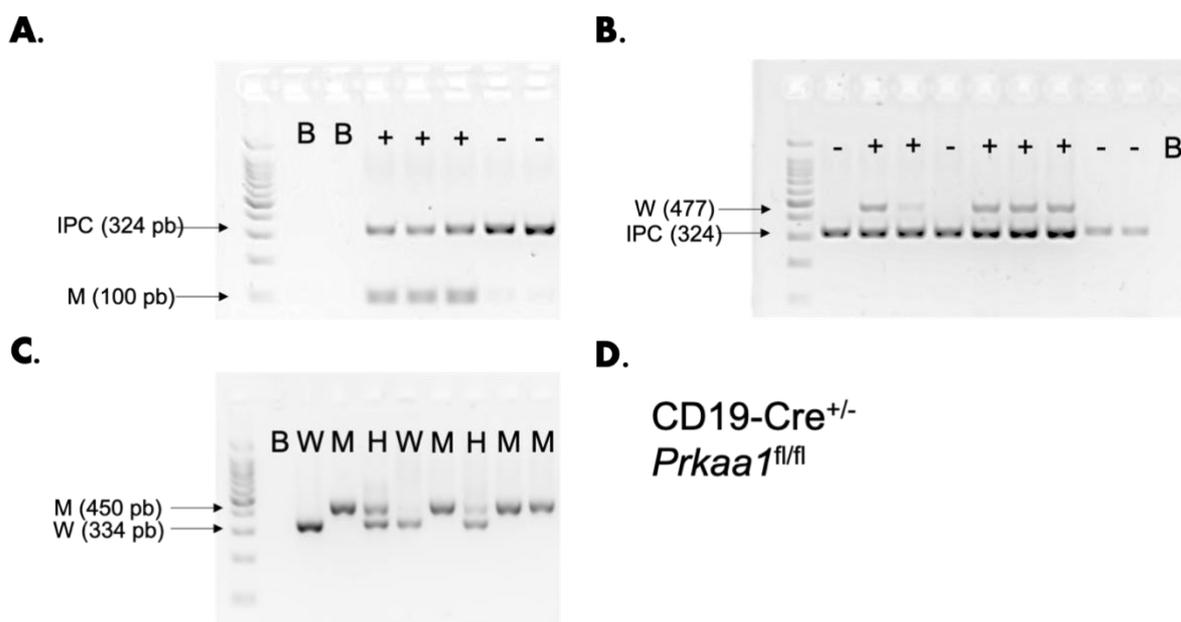
Os experimentos foram realizados com camundongos C57BL/6 (CT), *Cd19-cre* (CT), *Prkaa1<sup>fl/fl</sup>* (CT), *Rosa26-CreER<sup>T2</sup>* (CT), mMT (BKO – do inglês, *B cell knockout mice*), *Cd19-cre-Prkaa1<sup>fl/fl</sup>* (AMPK<sup>ΔB</sup>), huCD20-CreER<sup>T2</sup> *Prkaa1<sup>fl/fl</sup>* (AMPK<sup>ΔB</sup>), *Mb1-cre-Prkaa1<sup>fl/fl</sup>* (AMPK<sup>ΔB</sup>), *Cd19-cre-Raptor<sup>fl/fl</sup>* (Raptor<sup>ΔB</sup>), *Rosa26-CreER<sup>T2</sup>Hif1a<sup>fl/fl</sup>* (*Hif1a<sup>-/-</sup>*), *Rosa26-CreER<sup>T2</sup>Vhl<sup>fl/fl</sup>* (*Vhl<sup>-/-</sup>*), *Rag2<sup>-/-</sup>*, OT-II, CD45.1<sup>+</sup>IgH<sup>a</sup> e mT/mG, de idade entre 6 a 10 semanas, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo (USP) ou da Vanderbilt University Medical Center (VUMC) (Tabela 1). É importante ressaltar que animais de linhagem diferentes receberam mesmos acrônimos neste estudo porque os resultados não apresentaram diferenças significativas entre si. Os animais foram ambientados e mantidos em gaiolas de microisoladores autoclavados (5 animais por gaiola), em condições livres de patógenos específicos, com fotoperíodo e temperaturas controlados e recebendo água e dieta balanceada esterilizados *ad libitum* até o momento dos experimentos. Todos os procedimentos realizados foram de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo n°7/2016; Anexo I) ou pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da VUMC.

Tabela 1. Descrição dos camundongos utilizados

Camundongos	Abreviatura	Observação	Background genético	Idade (semanas)	Sexo
C57Bl/6	CT	Expressão de AMPK, mTORC1 e HIF-1 $\alpha$ normal nas células B	C57Bl/6	6-10	Macho*
<i>Cd19-Cre<sup>+/-</sup></i>					
<i>Prkaa1<sup>fl/fl</sup></i>					
<i>Rosa26-CreER<sup>T2</sup></i>					
<i>Cd19-Cre<sup>+/-</sup> Prkaa1<sup>fl/fl</sup></i>	AMPK <sup>ΔB</sup>	Deleção de AMPK nas células B; <u>Possível feito:</u> (hiper)ativação de mTORC1 e HIF-1 $\alpha$			
huCD20-CreER <sup>T2</sup> <i>Prkaa1<sup>fl/fl</sup></i>					
Mb1-cre <i>Prkaa1<sup>fl/fl</sup></i>					
<i>Cd19-Cre<sup>+/-</sup> Raptor<sup>fl/fl</sup></i>	Raptor <sup>ΔB</sup>	Deleção de AMPK nas células B; <u>Possível feito:</u> (hiper)ativação de mTORC1 e HIF-1 $\alpha$			
<i>Ighm<sup>tm1Cgn</sup></i> ou $\mu$ MT	BKO	Ausência de células B			
<i>Rosa26-CreER<sup>T2</sup> Hif1a<sup>fl/fl</sup></i>	<i>Hif1a<sup>-/-</sup></i>	Deleção condicional de HIF-1 $\alpha$ nas células B			
<i>Rosa26-CreER<sup>T2</sup> Vhl<sup>fl/fl</sup></i>	<i>Vhl<sup>-/-</sup></i>	(Hiper)ativação de HIF-1 $\alpha$ nas células B			
<i>Rag2<sup>tm1Cgn</sup></i>	<i>Rag2<sup>-/-</sup></i>	Camundongos deficientes de células B e T			
B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J	OT-II	Células T CD4 <sup>+</sup> com receptor de células T específicos para Ovalbumina			
<i>Gt(ROSA)26Sor<sup>tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J</sup></i>	mT/mG	Células duplo fluorescentes			
Cruzamento de B6.SJL- <i>Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/Boy</i> e C.129S1- <i>Igha<sup>tm1(Myc)Janz/J</sup></i>	CD45.1 <sup>+</sup> IgH <sup>a</sup>	Camundongos com o alelo a do locus de cadeia pesada de imunoglobulina			

\*Dez camundongos fêmeas foram utilizados para a realização de um experimento de colite experimental.

As genotipagens dos animais foram realizadas com o uso de kit de extração e preparação de DNA apropriado, seguindo as especificações do vendedor (REDEXTRACT-N-Amp™ Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich, EUA). Um exemplo de interpretação dos resultados de genotipagem para animais *Cd19-cre-Prkaa1<sup>fl/fl</sup>* é demonstrado na Figura 6.



**Figura 6. Exemplo da determinação do genótipo dos animais transgênicos.** A-D. A preparação do material genético dos camundongos foi realizada com uso de kit apropriado seguindo as especificações do vendedor (REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich, EUA). Os *primers* utilizados foram específicos para a identificação das sequências de pares de bases mutadas (A) ou selvagens (B) do gene *Cd19*, bem como para a identificação das sequências de pares de bases mutadas ou selvagens do gene *Prkaa1* (C). Também foi utilizado um controle interno (IPC) para garantir a presença de DNA nas reações de identificação do gene *Cd19* mutado ou selvagem. Todas as linhagens de animais transgênicos contendo o gene da cre recombinase sob controle do gene promotor *Cd19* utilizadas neste estudo foram necessariamente heterozigotas, como exemplificado no item D da figura, uma vez que a homozigose causa a deleção do gene *Cd19*, prejudicando o desenvolvimento das células B. No caso dos genes flanqueados pelos sítios loxP (floxeados), todos os animais foram mantidos em homozigose. **B**: branco; **H**: heterozigoto; **IPC**: controle positivo interno; **M**: mutante; **W**: selvagem.

### 3.2. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS B

O meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco-Invitrogen, EUA) foi utilizado para a manutenção das células em vários tipos de experimentos e foi suplementado com aminoácidos não essenciais com diluição sugerida pelo fabricante (*MEM non-essential amino acid solution 100 x*- Sigma-Aldrich, EUA), 23,8 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10,9 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 500 μM de β-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina (ambos fornecidos por Gibco-Invitrogen, EUA), pH 7,2-7,4. Para fins de simplificação, o meio de cultura RPMI 1640 suplementado será mencionado apenas como “meio RPMI completo” ao longo do texto e as modificações, quando presentes, serão especificadas.

Para o experimento, os camundongos foram devidamente eutanasiados e tiveram o baço assepticamente removidos e mantidos em meio de cultura RPMI completo com

10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, os órgãos foram cuidadosamente macerados e filtrados em peneira de 70  $\mu\text{m}$  para a obtenção de células. As células foram então centrifugadas a 300 x *g* por 10 minutos a 4°C, tratadas por 5 minutos com tampão de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM,  $\text{KHCO}_3$  10mM e EDTA 0,1mM, pH 7,2) a 4°C, novamente lavadas e quantificadas em hemocitômetro e azul de tripan 0,4%. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo contendo SFB 10% na concentração de  $10^8$  células/mL e marcadas com anticorpos anti-CD19 acoplados a fluorocromos (Biolegend, EUA) por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas e ressuspensas em RPMI completo contendo SFB 10% na concentração de  $2 \times 10^7$  células/mL e levadas para separação (*cell sorting*) de células CD19<sup>+</sup> em aparelho BD FACS Aria™ III (BD Bioscience, EUA). Células B também foram obtidas utilizando seleção positiva com uso de kit apropriado (CD19 MicroBeads, Miltenyi Biotec, EUA) ou por seleção negativa com uso de anti-Thy1.2 biotilado seguido pelo uso de *beads* magnéticas conjugadas à estreptavidina (BD™ IMag Cell Separation System, BD Bioscience, EUA).

### 3.3. CULTURAS DE CÉLULAS B

Diversos protocolos para a realização de culturas de células B *in vitro* foram utilizados e procurou-se descrever todas as particularidades de cada experimento em praticamente todas as figuras deste estudo. De modo geral, células B foram cultivadas em placas de 6, 12 ou 24 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL na presença ou ausência de LPS (5 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por diferentes períodos de tempo (horas ou dias). Nos casos em que as culturas celulares foram por longos períodos (acima de 3 dias) houve a adição de 10 ng/mL de BAFF e o meio de cultura e estimuladores foram renovados a cada 3 dias.

Em determinados experimentos, as células B também foram estimuladas com CpG (1 mM), F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e/ou  $\alpha\text{CD40}$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + IL-4 (10 ng/mL) por até 72 horas. Tratamentos com metformina 1 mM (agonista inespecífico de AMPK) e com 2-deoxiglicose (2-DG) 5 mM (inibidor da glicólise) também foram realizados. A adição das drogas foi feita sempre no início da cultura celular em concomitância com os estímulos e deixadas até o fim do experimento. Meios de cultura RPMI 1640 sem a presença de glicose (Gibco-Invitrogen, EUA) ou com adição de 10 mM de galactose ao meio RPMI 1640 sem glicose também foram utilizados para a execução de experimentos.

Para os experimentos de indução de ASCs e troca de classe de isotipo de imunoglobulinas, células B foram cultivadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL na presença de BAFF (10 ng/mL), LPS (1  $\mu$ g/mL), IL-5 (10 ng/mL) +/- IL-4 (10 ng/mL) para induzir troca de classe de isotipo para IgG1 ou BAFF (10 ng/mL), LPS (1  $\mu$ g/mL), IL-5 (10 ng/mL) +/- IL-4 (10 ng/mL), TGF- $\beta$  (5 ng/mL) e ácido retinoico (AR; 10 nM) para induzir a troca de classe para IgA. Para a maioria destes experimentos, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia (pO<sub>2</sub> 21%) e outro de hipóxia (pO<sub>2</sub> 1%).

Foi também utilizado um sistema que simula CGs *in vitro* com células NB21-2.D9 (NB21) que expressam CD40L (CD154), BAFF e IL-21. Para isso, placas de 6 poços receberam  $3,44 \times 10^5$  células/poço. Após 4 horas para permitir a aderência dessas células, as mesmas foram irradiadas (80 Gy de raios gama) e, em seguida, células B foram adicionadas ( $1,2 \times 10^5$  células/poço) aos poços contendo as células NB21 com adição de 10 ng/mL de IL-4 para a indução de troca de isotipo para IgG1 ou 10 ng/mL de IL-4 + 5 ng/mL de TGF- $\beta$  + 10 nM de AR para a indução de IgA. As células B foram contadas e transferidas adequadamente para poços contendo novas células NB21 irradiadas a cada 3 dias de cultura. Para a maioria destes experimentos, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia (pO<sub>2</sub> 21%) e outro de hipóxia (pO<sub>2</sub> 1%).

### 3.4. ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Para o ensaio de captação de glicose, células B foram lavadas 2 vezes em PBS 1x e incubadas por 45 minutos na presença de 50  $\mu$ M de 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglicose (2-NBDG; análogo fluorescente da glicose; Thermo Fisher Scientific, EUA) diluída em PBS 1x contendo 25 mM de aminoácidos não essenciais, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 500  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 U/mL de penicilina e 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina, à 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida as células foram lavadas e imunofenotipadas por citometria de fluxo, sempre protegidas da luz.

### 3.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Células B foram inicialmente coletadas, contadas e resuspendidas em meio de cultura RPMI completo sem SFB na densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, elas foram marcadas com 1,25  $\mu$ M de CellTrace (Invitrogen, EUA) por 20 minutos, em

temperatura ambiente e protegidas da luz. Após o período de incubação, as células receberam um volume cinco vezes maior de meio RPMI completo contendo 10% de SFB, lavadas, novamente resuspendidas em meio RPMI completo/10% de SFB e deixadas descansar por 10 minutos antes da estimulação. Posteriormente, as células foram plaqueadas em densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL, estimuladas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS por 2 ou 3 dias e analisadas por citometria de fluxo.

### 3.6. DOSAGEM DE GLICOSE E LACTATO

Amostras de sobrenadante de cultura celular, soro e homogenato de tecido foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento das análises. Para todas as determinações foram utilizados kits específicos (Glicose Liquiform e Lactato Liquiform, Labtest, Brasil) seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante. Resumidamente, 5  $\mu\text{L}$  de amostra, padrão (controle positivo) ou água destilada (controle negativo) foram adicionados aos respectivos reagentes (500  $\mu\text{L}$  do reagente Glicose Liquiform ou 400  $\mu\text{L}$  do reagente Lactato Liquiform. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 5-10 min e levadas para leitura da absorbância com comprimento de onda 505 nm (glicose) e 550 nm (lactato) em espectrofotômetro (Synergy™ Mx Microplate Reader; BioTek) acoplado ao software Gen5™ (BioTek). O cálculo das concentrações de glicose (G) foi realizado pelo uso da fórmula:  $G = (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do padrão}) \times 100$ . Já as concentrações de lactato (L) das amostras foram determinadas pela fórmula:  $L = (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do padrão}) \times 40$ . Finalmente, a relação de L/G foi calculada para determinar a atividade glicolítica aeróbica das células em estudo. Os resultados foram expressos em mg/dL de soro ou sobrenadante de cultura ou em mg/dL/mg de proteína para normalização das diferentes amostras de homogenato de tecido.

### 3.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E IMUNOGLOBULINAS POR ELISA

A quantificação de IL-10, IL-6, TGF- $\beta$  e IgM nos experimentos *in vitro* e/ou *ex vivo* foram avaliadas por ELISA, seguindo as instruções fornecidas pelos fabricantes (Mouse Duoset IL-10 ELISA kit, Mouse Duoset IL-6 ELISA kit; Mouse Duoset TGF- $\beta$  ELISA kit - R&D, EUA; mouse IgM uncoated ELISA kit, Invitrogen, EUA). Kits *in house* devidamente validados foram utilizados para a quantificação das imunoglobulinas IgM, IgG1, IgG2c e IgA totais ou específicas para ovalbumina (OVA) ou NP20.

As quantificações *ex vivo* foram realizadas em soro ou homogeneizado de tecidos imersos em solução contendo inibidores de protease (Complete, Roche, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g por 15 min e o sobrenadante utilizado para as reações. Para os experimentos *in vitro*, os sobrenadantes das culturas foram utilizados para as dosagens. A concentração nas amostras foi determinada empregando-se curva de diluição seriada do padrão descontando-se o branco e os resultados expressos em pg/mL para os experimentos *in vitro* e em pg/mL/g de proteínas para análise *ex vivo*.

### 3.8. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS POR ELISpot

Para a detecção de imunoglobulinas de classes específicas, placas apropriadas de 96 poços contendo membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF)(Millipore, Sigma, EUA) foram ativadas com metanol 75% por 1 minuto e lavadas com PBS 1x estéril por duas vezes. Rapidamente, os poços foram cobertos com anticorpos anti-imunoglobulinas (H+L)(Tonbo Biosciences, EUA) na concentração de 1 µg/mL por poço. Em seguida, as placas foram seladas e incubadas *overnight* a 4°C. Após o período, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1x estéril e bloqueadas por 2 horas com RPMI completo contendo 10% de SFB. Posteriormente, diferentes quantidades de células resuspendidas em meio RPMI completo/10% de SFB foram adicionadas aos poços (1000-5000 células) e novamente incubadas *overnight* em condições normais de cultura (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>). Passado o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão ELISpot (PBS 1x estéril contendo 1% de SFB e 0,2% de Tween) e incubadas por 4 horas com anti-IgM (1 ng/mL), anti-IgG1 (1 ng/mL) ou anti-IgA (2 ng/mL) (Tonbo Biosciences, EUA), sob agitação lenta e contínua. Em seguida, as células foram lavadas, incubadas por 1 hora com complexo avidina-peroxidase (Vector Laboratories, EUA), lavadas novamente e reveladas com uso de 3-amino-9-etilcarzol (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão PBS 1x contendo 0,1 N de ácido acético e 0,1 N de acetato de sódio. A quantificação de imunoglobulinas foi realizada em sistema apropriado acoplado à câmera fotográfica (ImmunoSpot Analyzer, Cellular Technology, EUA).

### 3.9. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E qPCR

Células B tiveram seu RNA extraído e purificado com o uso do RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Em seguida, a pureza,

qualidade e quantidade do RNA obtido foram determinadas com o uso de um espectrofotômetro (NanoDrop® ND1000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi então sintetizado a partir de 1 µg de RNA purificado. Para a reação foi utilizada a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* – MMLV (Promega, Madison, WI, EUA) e *primer* oligo-dT. A reação de PCR em tempo real ou quantitativo (qPCR) foi realizada com *primers* específicos para a detecção dos genes *Slc2a1*, *Hk2*, *Pfk1*, *Pkm2* e *Pdk1*, cujas sequências podem ser observadas na Tabela 2. As amplificações foram feitas com uso de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e as leituras realizadas em aparelho *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados corrigidos pela expressão do gene da β-actina, de modo a normalizar os níveis de expressão dos genes alvos. Os cálculos foram realizados com base no valor de Ct (ciclo limiar – do inglês, *cycle threshold*) e o resultado calculado pela fórmula  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ amostra controle}$ , onde  $\Delta Ct = Ct \text{ gene estudado} - Ct \beta\text{-actina}$ . O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro (RNAm) comparado com o controle foi definido pela fórmula matemática  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , como já descrito na literatura (Livak and Schmittgen 2001).

**Tabela 2. Relação de primers utilizados e suas respectivas sequências nucleotídicas**

	Sense (5' – 3')	Anti-sense (5' – 3')
<i>Slc2a1</i>	AAGTCCAGGAGGATATTCAG	CTACAGTGTGGAGATAGGAG
<i>Hk2</i>	CAAGCTACAGATCAAAGAGAAG	CATGAGACCAAGAACTCTC
<i>Pfk1</i>	AAGAGACTGATTTTGAGCAC	CTCAGAAACCCTTGTCTATG
<i>Pkm2</i>	GCCGCCTGGACATTGACTC	CCATGAGAGAAATTCAGCCGAG
<i>Pdk1</i>	AGGATCTGACTGTGAAGATG	TGGAAGTACTGTGCATAGAG

### 3.10. ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a análise da atividade enzimática das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e piruvato quinase 2 (PKM2) foram utilizados kits específicos seguindo as especificações

dos fabricantes (Desidrogenase láctica, Ref. 37, Labtest, Brasil; Pyruvate kinase Activity colorimetric/fluorimetric Assay Kit, BioVision, EUA). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro (Synergy™ Mx Microplate Reader; BioTek) acoplado ao software Gen5™ (BioTek).

### 3.11. WESTERN BLOT

Para a detecção de AMPK total e fosforilada, células B foram estimuladas por 60 minutos em condições apropriadas de cultura celular (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Para a detecção de ULK1 total e fosforilada, as células foram estimuladas com LPS (5 µg/mL), BAFF (10 ng/mL) e 50 nM de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) por 2 dias, lavadas em PBS 1x estéril e colocadas em novamente em cultura resuspendidas em meio RPMI completo sem glicose por 2 horas. Na sequência, as células foram lisadas com tampão de extração proteica na presença de inibidores de fosfatases (Roche, Alemanha) e proteases (Roche, Alemanha). Em seguida, foi realizada a quantificação de proteínas pelo método de biureto (LabTest, Brasil) e 40 µg de proteínas totais por amostra foram desnaturadas por aquecimento (5 minutos; 95°C). Subsequentemente, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose ou PVDF. As membranas foram então bloqueadas com uso de leite em pó 5% diluído em tampão Tris-HCl na presença de 0,5% de Tween-20 (TBS-T) e posteriormente incubadas com anticorpos primários *overnight*. Os anticorpos primários utilizados foram: AMPKα total, AMPK fosforilada (T172), ULK1 total e ULK1 fosforilada (S317). Todos os anticorpos primários foram utilizados na diluição de 1:1000 e foram obtidos da empresa *Cell Signaling Technology* (EUA). Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (*Cell Signaling Technology*, EUA) para detecção de AMPK total e fosforilada ou anticorpo anti-coelho IgG-680 fluorescente (Invitrogen, EUA) para detecção de ULK1 total e fosforilada. Para a determinação da massa molecular foi utilizado o padrão de massa molecular *Rainbow* (BioRad Laboratories, EUA). A detecção de AMPK total e fosforilada 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 a quimioluminescência detectada com o uso do aparelho Image Quant LAS500 (GE Healthcare Life Science, EUA). A quantificação dos pixels e normalização dos resultados foi feito com software ImageJ (*National Institutes of*

Health, EUA). Para a detecção de ULK1 total ou fosforilada, a fluorescência foi detectada utilizando o sistema *Odyssey Imaging System* (LI-COR Biosciences, EUA).

### **3.12. DETERMINAÇÃO DA MASSA, DA ATIVIDADE, DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNICA E DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA MITOCONDRIAIS.**

Células B mantidas em cultura foram lavadas com meio RPMI incompleto sem soro e, então, incubadas com 200 nM de MitoTracker Deep Red FM (Thermo Fisher Scientific, EUA), 200 nM de tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE; *Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit*, Abcam, Inglaterra), 5 µM de MitoSOX (Thermo Fisher Scientific, EUA) ou 1,25 µM de BODIPY C-11 581/591 (Thermo Fisher Scientific, EUA) diluídos em meio RPMI por 20 minutos em condições de cultura (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) para a detecção de massa, potencial de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica mitocondrial, respectivamente. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS 1x estéril contendo 2% de SFB. Anticorpos de imunofenotipagem e uso de corante de viabilidade também foram utilizados com as incubações feitas antes da marcação com as sondas MitoTracker e TMRE ou após a marcação com as sondas MitoSOX e BODIPY. As análises foram feitas por citometria de fluxo ou microscopia confocal e os resultados de MitoSOX e BODIPY foram demonstrados através da normalização relativa ao grupo CT.

### **3.13. CITOMETRIA DE FLUXO**

Para a caracterização dos subtipos de células B, identificação de moléculas co-estimuladoras, caracterização mitocondrial e determinação de viabilidade celular, as células B obtidas nos diversos experimentos foram marcadas com anticorpos específicos acoplados à fluorocromos ou sondas fluorescentes. Estes anticorpos incluíram aqueles diretamente relacionados à caracterização dos subtipos de células B e aqueles utilizados para eliminar outras populações da amostra: CD19, CD138, TACI, CD40, CD86, IgM, IgA, IgG1, CD23, GL-7, CD1d, B220, Fas, IgD, CD38, nitrofenol – NP, CD11b, CD11c, F4/80, Gr-1. As sondas fluorescentes (TMRE, MitoTracker Deep Red TM, MitoSOX, BODIPY C-11 581/591 e 2-NBDG) e marcadores de viabilidade (LIVE&DEAD, Life Technologies, EUA; 7-AAD; Ghost-780) também foram utilizados. De modo geral, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C ou 20 minutos em condições normais de cultura celular (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) para marcações com anticorpos/marcadores de viabilidade ou sondas fluorescentes, respectivamente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x

contendo 1% de SFB, centrifugadas por 5 minutos a 300 x *g* e levadas para leitura em citômetro de fluxo. A aquisição das células marcadas foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Bioscience, EUA) e as análises realizadas pelo software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA). Para as análises, o posicionamento das seleções (*gates*) foram inicialmente feitas em FSC-H vs. FSC-A para eliminação de *doublets* e *triplets*, seguida da seleção de todas as células na avaliação FSC-A vs. SSC-A e das células negativas para a marcação com corantes de viabilidade. Ainda, foi utilizada a estratégia de fluorescência menos uma (FMO, do inglês *Fluorescence minus one*) ou o uso células não marcadas para auxiliar o posicionamento das *gates*.

### 3.14. MICROSCOPIA CONFOCAL

Células B foram incubadas por 48 horas na presença de LPS e marcadas com as sondas TMRE e MitoTracker, conforme descrito anteriormente. Além disso, as células foram incubadas com o marcador de DNA Hoechst (10 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, EUA) por 10 minutos para visualização do núcleo celular e, em seguida, adicionadas às lâminas de microscopia. Após preparação das células, as fotomicrografias fluorescentes foram obtidas com o uso do sistema confocal Zeiss LSM-780 (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram coletadas em objetiva de 63x/1.4NA Oil e zoom de 3x em imagens de 1024 x 1024 pixels.

Alternativamente, as células estimuladas com LPS por 48 horas foram incubadas em poços contendo lamínulas cobertas com poli-D-lisina em poços de placas de 24 poços e marcadas com 100 nM de MitoTracker Deep Red por 20 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas, fixadas com metanol e bloqueadas com PBS 1x contendo 0,1% de Tween 20 e 1% de albumina de soro bovino (BSA - do inglês, *bovine serum albumin*). Posteriormente, as lamínulas contendo as células foram incubadas *overnight* com anticorpos anti-B220 fluorescente e anti-LAMP1 (*Cell signaling Technologies*, EUA), lavadas, incubadas com anticorpo secundário fluorescente (anti-coelho 488, Invitrogen, EUA) e adequadamente montadas em lâminas com meio de montagem ProLong Gold (Invitrogen, EUA). As fotomicrografias foram adquiridas em microscópio confocal fluorescente FV-1000. A colocalização de lisossomos e mitocôndrias como indicador de mitofagia foi determinada pelo uso do *Just Another Colocalization Plugin* com o *software*

ImageJ]. Para a demonstração dos resultados, foi utilizado o coeficiente de Manders que representa a porcentagem de pixels mitocondriais que sobrepõem os pixels de LAMP1.

### 3.15. ANÁLISE DE FLUXO EXTRACELULAR (SEAHORSE)

Um milhão de células B não estimuladas e  $8 \times 10^5$  células B estimuladas *overnight* com LPS foram adicionadas à placas de 24 poços próprias para *Seahorse* (XF24-Bioscience, Agilent, EUA) previamente tratadas com Poli-D-lisina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 2 horas para permitir a aderências das células. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x estéril e incubadas com meio RPMI incompleto não tamponado suplementado com 10 mM de glicose, 1 mM de glutamina e 1 mM de piruvato de sódio. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C em estufa com ausência de CO<sub>2</sub> por pelo menos 30 minutos antes da análise. Para a avaliação do estresse mitocondrial, as taxas de consumo de oxigênio (OCR, do inglês *Oxygen consumption rates*) foram avaliadas em tempo real antes e depois dos tratamentos com drogas específicas administradas na respectiva ordem: oligomicina (1  $\mu\text{M}$ ; inibidor do complexo V ou ATP sintase), cianeto de carbonila p-trifluorometoxi-fenil-hidrazona (FCCP; 1,5  $\mu\text{M}$ ; desacoplador da cadeia transportadora de elétrons e síntese de ATP) e rotenona + antimicina A (ambas na concentração de 2  $\mu\text{M}$ ; inibidores dos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, respectivamente). A partir do perfil de consumo de oxigênio obtido antes e após o uso dos estressores mitocondriais foi possível determinar diversos parâmetros que podem ser calculados de acordo com o item B da Figura 17: respiração basal, escape de prótons, produção de ATP, respiração máxima, capacidade respiratória e respiração não mitocondrial. A normalização dos resultados foi feita pelo número de células por poço.

### 3.16. ENSAIO DE PURIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS SECRETORES DE IMUNOGLOBULINAS DE CLASSES ESPECÍFICAS

Células B de animais CT (IgH<sup>b</sup>) e CD45.1+IgH<sup>a</sup> foram cultivadas por 3 e 6 dias usando células NB21 como descrito anteriormente. Brevemente,  $1 \times 10^5$  células B foram incubadas com anti-IgM para bloquear a IgM de superfície nas ASCs, lavadas e então incubadas com o reagente de captura (anti-CD138 biotinilado + anti-IgM biotinilado + estreptavidina conjugada à um fluorocromo). Em seguida, as células foram incubadas a 37°C por 2 horas para permitir a secreção de anticorpos. Após o período de incubação, as

células foram marcadas com corantes (7-AAD) e anticorpos específicos conjugados a fluorocromos (anti-IgM[a], anti-IgM[b] e anti-B220) para as análises de viabilidade celular e imunofenotipagem, respectivamente, por citometria de fluxo.

### 3.17. TRANSFEÇÃO E TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS B PRIMÁRIAS

Para os experimentos de transfecção-transdução foi utilizado o vetor viral MIT-HRE-CreER<sup>T2</sup> que permite a expressão e ativação da enzima cre-recombinase após tratamento com 4-OHT e estabilização/ligação de HIF. O vetor MIT-Thy1.1 foi usado como controle. Ambos os vetores virais permitem que as células transduzidas eficientemente expressem a molécula Thy1.1 na superfície das células. Brevemente, células empacotadoras da linhagem Phoenix foram incubadas com precipitados de fosfato de cálcio e plasmídeos por 16 horas. Após esse período, as células foram lavadas, o meio de cultura celular foi renovado e as células incubadas por mais 24 horas para permitir a produção das partículas virais. Em seguida, o sobrenadante contendo vírus foi coletado, filtrado em membrana de 0,45 µm, aliquoteado e imediatamente congelado até o momento da transdução.

Para a realização da transdução, células B de animais duplo-fluorescentes mT/mG (1 x 10<sup>6</sup> células) foram incubadas com o sobrenadante contendo vírus, polibreno (5 µg/mL) e submetidos à dois ciclos consecutivos de centrifugação de 30 minutos a 10.000 x g. Em seguida, diferentes protocolos foram utilizados para testes de eficiência na transdução. O protocolo com melhor resultado foi aquele em que, após o primeiro dia de transdução, as células B foram estimuladas com LPS (5 µg/mL), BAFF (10 ng/mL) e 50 nM de 4-OHT, incubadas em condições normais de cultura (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>; 21% de pO<sub>2</sub>) *overnight* e novamente transduzidas após esse período com dois ciclos consecutivos de centrifugação de 30 minutos a 10.000 x g. Em seguida, metade das células foram mantidas a 37°C e normóxia (21% de pO<sub>2</sub>) e a outra metade foi cultivada sob condições de hipóxia (1% de pO<sub>2</sub>; 37°C) por 2 dias. Finalmente, as células foram marcadas com Ghost-780, anti-B220 e anti-Thy1.1 e analisadas por citometria de fluxo.

### 3.18. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS

Dados de transcriptômica disponibilizados no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) foram manualmente selecionados

e organizados para encontrar conjuntos de análises de transcriptoma de regiões do cólon ou células polimorfonucleadores (PBMcs) de pacientes com DC e/ou UC. A análise de expressão foi realizada com base nos valores de expressão normalizados do autor usando o software GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). Quando necessário, os valores de expressão normalizados foram convertidos para uma escala log2 para análise.

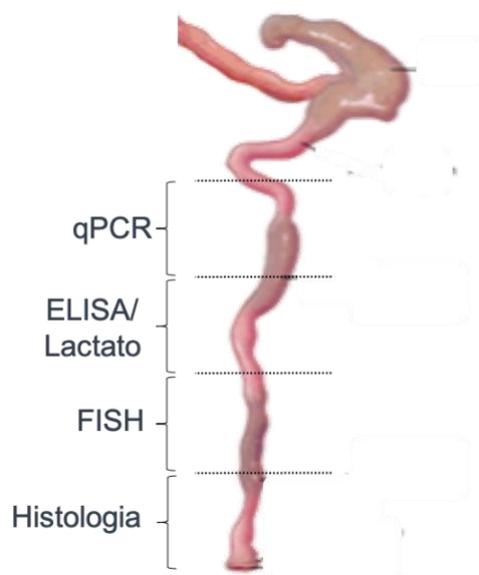
O repositório GSE87466 inclui dados transcriptômicos de biópsia de mucosa de 21 pacientes saudáveis e 87 pacientes com UC ativada moderada e grave. A atividade da doença também foi avaliada endoscopicamente. Já o repositório GSE71730 inclui PBMcs tratadas com plasma de pacientes com DC (n=22), UC (n=15), e saudáveis (n=10).

Além disso, o gene de AMPK $\alpha$ 1, *PRKAA1*, foi submetido à uma análise de enriquecimento pelo algoritmo presente no *website* Metascape (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) que, por sua vez, gerou vias de interação proteica previsíveis (STRING). As interações incluíram associações físicas e funcionais das 20 proteínas mais relacionadas a via de sinalização de *PRKAA1* usando banco de dados KEGG.

Finalmente, também foram realizadas análises com dados de sequenciamento de RNA de células individuais (scRNAseq) através do *software* do Single Cell Expression Atlas (banco de dados número ERP109332).

### 3.19. COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO

A inflamação intestinal aguda foi induzida pelo oferecimento exclusivo de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% (MP Biomedicals, EUA) para os camundongos em condições de consumo *ad libitum* por 7 dias consecutivos. Em seguida, os animais foram devidamente eutanasiados e amostras de sangue (total e soro), intestino (cólon), medula óssea, baço e linfonodos mesentéricos foram coletadas para as análises posteriores. Os cólons dos camundongos foram rapidamente fragmentados em diversos segmentos para a realização dos diferentes ensaios propostos. Cada segmento foi direcionado para um determinado tipo de análise (qPCR, ELISA/ dosagem de lactato, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e histologia) obedecendo rigorosamente a mesma sequência para cada amostra coletada dos diferentes animais (Figura 7).



**Figura 7. Imagem representativa dos fragmentos de cólon de camundongos destinados às diferentes análises.** Cada segmento foi direcionado para um determinado tipo de análise (qPCR, ELISA/dosagem de lactato, histologia, (FISH), qPCR e quantificação de proteínas) obedecendo rigorosamente a mesma sequência para cada amostra coletada dos diferentes animais MPO. **ELISA:** imunoenensaio enzimático; **FISH:** hibridização florescente *in situ*; **qPCR:** reação em cadeia polimerase em tempo real ou quantitativo. Fonte: Figura adaptada de Treuting & Dintzis (TREUTING; DINTZIS, 2012).

Alternativamente, para a indução crônica da doença, camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> receberam continuamente 2% de DSS adicionados a água de beber por 7 dias e, após esse período, receberam água de beber potável por mais 14 dias para permitir a recuperação. Em seguida, novos ciclos de DSS-água-DSS-água de 7, 14, 7 e 21 dias, respectivamente, foram realizados, totalizando 70 dias de experimento. Todos os protocolos aqui utilizados foram adaptados de Wirtz e colaboradores (WIRTZ et al., 2007).

### 3.20. ESCORE CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL

Camundongos submetidos à colite experimental foram diariamente avaliados quanto às variações de peso corporal, de consumo de DSS/água e de ração. O consumo de água e ração não foi diferente entre os grupos e não foram apresentados neste estudo. A variação da massa corporal foi determinada pela comparação com o peso do animal no dia do início do experimento (dia 0). Além disso, os sinais clínicos da doença também foram avaliados e incluíram: perda de peso, consistência das fezes e presença de sangue nas fezes. Para esta avaliação clínica, foi utilizado um critério de pontuação descrito na

Tabela 3. A somatória dos pontos determinou o escore clínico diário da doença. A “soma do escore clínico” foi determinada pela soma dos escores clínicos obtidos durante todo o período de exposição ao DSS.

**Tabela 3. Descrição dos parâmetros e escore clínicos avaliados na colite experimental**

Parâmetros	Descrição	Escore
Perda de peso	0-4,99%	0
	5-9,99%	1
	10-14,99%	2
	15-19,99%	3
	≥20%	4
Consistência das fezes	Bem formada	0
	Pouco pastosa (não adere ao ânus)	1
	Moles (não adere ao ânus)	2
	Diarreia (adere ao ânus)	4
Sangue nas fezes	Nada	0
	Teste oculto positivo	1
	Sangue visível	2
	Sangramento grave (mais de 50% do conteúdo das fezes)	4

### 3.21. ANÁLISE DO COMPRIMENTO DO CÓLON

Após a coleta do cólon dos camundongos em estudo, os mesmos foram colocados cuidadosamente sobre uma superfície limpa e fotografados com auxílio de câmera fotográfica acoplada a um suporte de altura fixa. As imagens foram calibradas pela presença de papel milimetrado que serviu como escala para as análises. Posteriormente, a determinação do comprimento do intestino grosso foi realizada pelo uso do *software ImageJ* (*National Institutes of Health*, EUA).

### 3.22. COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 2,4,6-ÁCIDO TRINITROBENZENOSULFÔNICO

Camundongos foram submetidos à colite experimental por TNBS, conforme descrito por Wirtz e colaboradores (Wirtz, Neufert et al. 2007). Resumidamente, os animais foram deixados em jejum *overnight*. Após serem devidamente anestesiados, um

cateter de aproximadamente 1,2 mm de diâmetro acoplado a uma seringa contendo 100 µL de solução de TNBS 2,5% em etanol absoluto foi introduzido no reto dos camundongos e a solução administrada cuidadosamente. Durante e após aplicação, os camundongos foram deixados em posição de Trendelenburg por alguns minutos e sob aquecimento até o retorno da anestesia. Em seguida, os animais foram avaliados diariamente quanto a perda de peso por 5 dias.

### **3.23. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Para avaliar a morfologia e as alterações patológicas no intestino dos camundongos em estudo, fragmentos de aproximadamente 1 cm do cólon contendo fezes em seu interior foram coletados no 7º dia após a indução da colite e fixados em metacarn (60% Metanol + 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por 3 horas a 4°C. Posteriormente, os tecidos foram desidratados com banhos de álcoois etílicos de concentrações crescentes, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de forma perpendicular ao plano de microtomia. Usando-se um micrótomo, as secções coronais dos tecidos foram realizadas em espessura de 5 µm e dispostas em lâminas de microscopia. Em seguida, os cortes foram fixados, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e fotografados usando-se uma câmera acoplada ao microscópio para as análises morfométricas.

### **3.24. EXTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS DOS TECIDOS**

Para obter as células do baço e medula óssea, os animais foram devidamente eutanasiados e os respectivos órgãos removidos e processados sempre com uso de meio de cultura RPMI 1640. Em seguida, a suspensão de células foi lavada com PBS 1x estéril e tratadas por 5 minutos com tampão de lise (NH<sub>4</sub>Cl 155mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM e EDTA 0,1mM, pH 7,2) a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com meio RPMI contendo 10% de SFB e preparadas para a quantificação e determinação da viabilidade celular em hemocítmetro e azul de tripan 0,4%.

Para obtenção de células da lâmina própria, o intestino grosso foi coletado, lavado com tampão HBSS para remoção do conteúdo do lúmen intestinal, aberto longitudinalmente e fragmentado em pedaços de aproximadamente 1 cm. Esses pedaços foram adicionados em meio de cultura RPMI incompleto contendo 20 mM de HEPES, 100

U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10<sup>5</sup> unidades/mL de colagenase VIII e 150 mg/mL de DNase) e incubados a 37°C por 60 minutos sob agitação vigorosa. Após o período de incubação, os tubos contendo os tecidos foram novamente agitados de forma vigorosa para liberação das células e, posteriormente, foram acondicionados por 5 minutos em gelo para reduzir a espuma formada. Após o período de incubação, o tecido digerido foi macerado e filtrado em peneira de 70 µm para a obtenção das células. Os tubos contendo as células da lâmina própria foram então centrifugados a 300 x *g* por 20 minutos e 4°C, contadas e marcadas para análise por citometria de fluxo.

### 3.25. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* PARA BACTÉRIAS INTESTINAIS

Os tecidos de cólon foram coletados, preparados e parafinizados conforme descrito no item 3.24. Após a desparafinização, os cortes foram lavados com um tampão de hibridização (20 mM de Tris-HCl, 0,9 M NaCl e 0,1% SDS; pH 7,2) a 50°C por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 100 nM de uma *probe* fluorescente para identificação de bactérias totais (Sequência 5'->3': GCTGCCTCCCGTAGGAGT, FITC-conjugada, Sigma, Brasil) diluída em tampão de hibridização a 50°C por 4h. Após lavagem com tampão apropriado (20 mM de Tris-HCl, 0,9 M de NaCl; pH 7,2), as secções coronais foram incubadas com a aglutinina I de *Ulex europaeus* fluorescente (20 µg/mL, TRITC-conjugada, L4889, Sigma, Brasil) por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram novamente lavados e incubados por 10 minutos na presença de DAPI (1 µg/mL; Thermo Fisher). Finalmente, as lâminas foram montadas com meio de montagem apropriado (SlowFade® Gold; Invitrogen, EUA) e os cortes fotografados com sistema de microscopia confocal Zeiss LSM-780 (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram coletadas em objetiva de 63x/1.4NA Oil e zoom de 3x em imagens de 1024 x 1024 pixels.

### 3.26. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS PARA A INDUÇÃO DE COLITE EXPERIMENTAL POR DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO OU PARA IMUNIZAÇÃO

De modo geral, as células B de diferentes linhagens de camundongos foram processadas e contadas, conforme já descrito anteriormente. Em seguida, elas foram transferidas adotivamente para os respectivos camundongos recipientes (BKO ou *Rag2*<sup>-/-</sup>) por via intravenosa (i.v.) através do plexo retro-orbital.

Para os experimentos de colite experimental,  $10^7$  células CT ou AMPK<sup>DB</sup> foram transferidas para camundongos BKO e, após 2 dias, foram induzidos à colite experimental por DSS por 7 dias de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

Para os experimentos de imunização,  $5 \times 10^6$  células B de camundongos Rosa26-ER<sup>T2</sup>-Cre-Hif1 $\alpha^{\text{fl/fl}}$ ,  $4 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup> policlonais e  $1 \times 10^6$  de células T CD4<sup>+</sup> OT-II foram transferidas para camundongos recipientes *Rag2*<sup>-/-</sup>. Um dia após a transferência, os camundongos recipientes foram imunizados com 100  $\mu\text{g}$  de NP-OVA diluída em Alum via intraperitoneal (i.p.) e 14 dias após a imunização primária receberam uma nova injeção de NP-OVA na mesma dose. Oito semanas após a imunização primária, os camundongos receberam 3 injeções consecutivas i.p. de tamoxifeno (3 mg x 3 doses) para induzir a atividade da enzima cre recombinase ou veículo. Coletas de soro foram realizadas frequentemente (dias 14, 28, 35, 56, 70, 94 e 108) até o dia da eutanásia (dia 108 de experimento).

### 3.27. IMUNIZAÇÃO

Para os experimentos de avaliação de células B obtidas de camundongos imunizados em curto prazo, camundongos CT ou AMPK<sup>AB</sup> receberam 100  $\mu\text{g}$  de NP-KLH diluído em Alum i.p. Posteriormente, os camundongos receberam um novo desafio antigênico com a mesma dose do imunizante 3 semanas após o primeiro desafio e foram sacrificados para coleta das amostras uma semana após a última imunização, totalizando 4 semanas de experimento.

Para os experimentos de avaliação de células B obtidas de camundongos imunizados em longo prazo, os camundongos CT e AMPK<sup>AB</sup> receberam com 100  $\mu\text{g}$  de NP-KLH diluído em Alum i.p. no dia 0. Posteriormente, os camundongos receberam um novo desafio antigênico com a mesma dose do imunizante 3 semanas após o primeiro desafio e foram sacrificados para coleta das amostras 8 semanas após a última imunização, totalizando 11 semanas de experimento.

Conforme descrito no item anterior (3.26), para os experimentos de transferência adotiva de células, um dia após a transferência os camundongos recipientes foram imunizados com 100  $\mu\text{g}$  de NP-OVA diluída em Alum via intraperitoneal (i.p.) e 14 dias após a imunização primária receberam uma nova injeção de NP-OVA na mesma dose. Oito

semanas após a imunização primária, os camundongos receberam 3 injeções consecutivas i.p. de tamoxifeno (3 mg x 3 doses) para induzir a atividade da enzima cre recombinase ou veículo. Coletas de soro foram realizadas frequentemente (dias 14, 28, 35, 56, 70, 94 e 108) até o dia da eutanásia (dia 108 de experimento).

### **3.28. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com auxílio do software Graphpad Prism® 8. Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea utilizou-se testes paramétricos. Nos casos em que a distribuição não foi gaussiana ou em que as variâncias foram estatisticamente significativas entre os grupos utilizou-se testes não paramétricos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%). Para análises de mortalidade foram utilizados teste de LogRank e Gehan-Breslow-Wilcoxon. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%).

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE DE LPS PARA A ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B

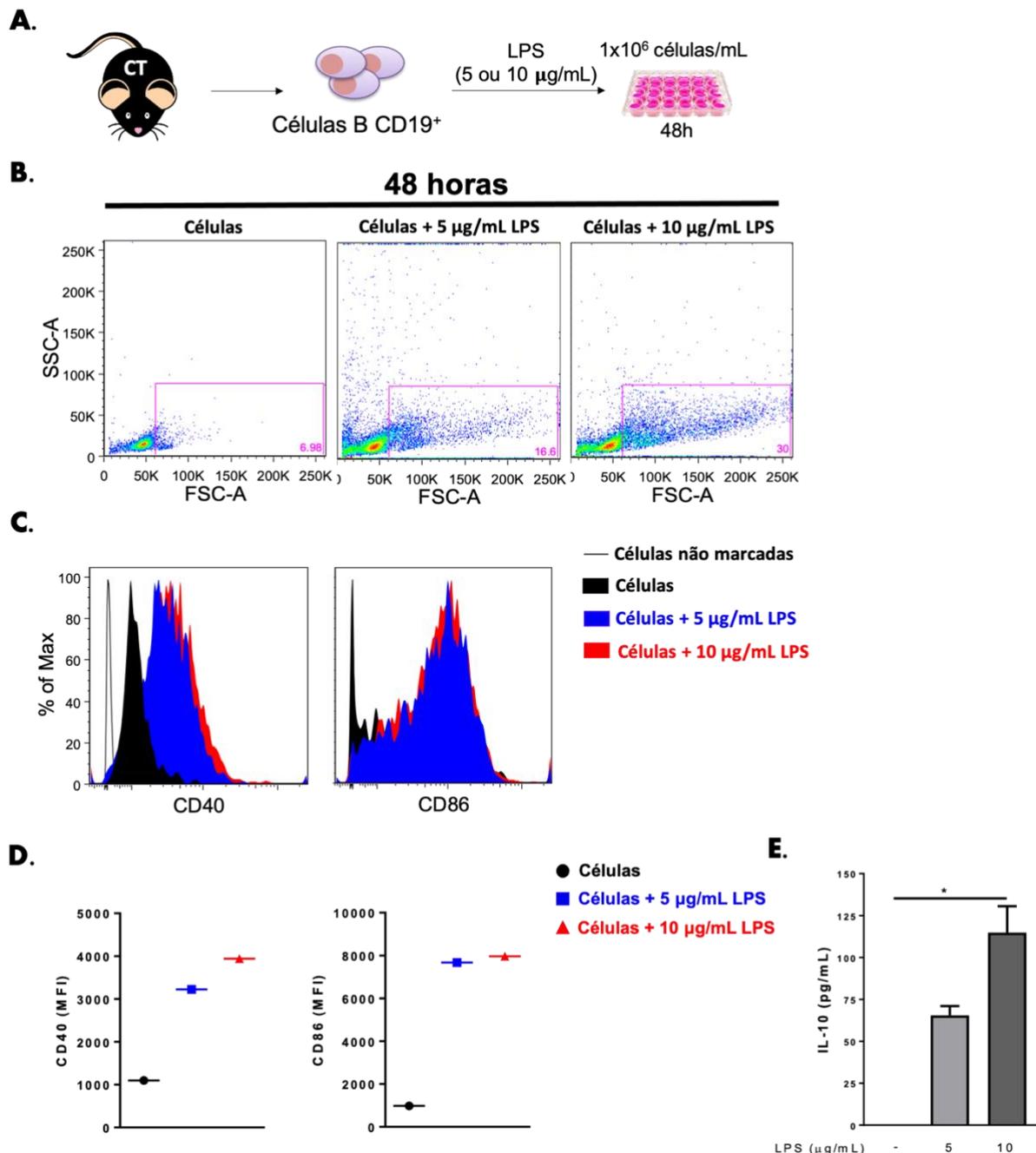
Antes de verificar o papel de AMPK na fisiologia e metabolismo das células B, foi questionado qual seria o melhor estímulo para induzir sua ativação para a realização dos estudos. Conforme descrito anteriormente, tradicionalmente, as células B podem ser ativadas por antígenos de baixa valência (proteínas solúveis ou haptenos conjugados a proteínas) juntamente com sinais coestimuladores fornecidos por células T CD4<sup>+</sup> nas chamadas “respostas dependentes de células T” ou por padrões moleculares repetitivos não protéicos (geralmente ligantes de TLRs, como LPS e CpG), induzindo as “respostas independentes de células T” (LIAO et al., 2017). Embora menos frequente, altas cargas de antígenos que se ligam em múltiplos BCRs são capazes de ativar células B independentemente de sinais coestimuladores e, conseqüentemente, de células T (CYSTER; ALLEN, 2019).

As respostas de células B dependentes de células T são mais demoradas e geralmente resultam na produção de plasmócitos de vida longa e células B<sub>MEM</sub>. Variações na concentração dos estímulos *in vitro* que simulam respostas dependentes de células T (geralmente anti (α)-CD40 + IL-4) geram diferentes perfis de proliferação celular e diferenciação em ASCs, conforme demonstrado previamente (HAWKINS et al., 2013). Já as respostas independentes de células B são mais rápidas e, ao atingir um limiar de ativação, os tempos para divisão celular e diferenciação em ASCs independem da dose do estímulo (HAWKINS et al., 2013). Desse modo, o uso de LPS tem sido altamente usado em diversos estudos por apresentar padrões de respostas celulares mais consistentes.

Embora diferentes concentrações de LPS não influenciam na proliferação celular e diferenciação em ASCs, outros aspectos de ativação de células B não são comumente descritos. Desse modo, duas doses de LPS consideradas acima do limiar de ativação foram selecionadas a partir de estudos da literatura (Xu, Liew et al. 2008)(HAWKINS et al., 2013) para investigar se outros parâmetros de ativação independem da dose do estímulo. Para isso, células B CD19<sup>+</sup> oriundas de camundongos CT foram cultivadas na presença de 5 ou 10 µg/mL de LPS por 48 horas (Figura 8A).

Os resultados mostraram inicialmente que as células B aumentaram de tamanho de maneira dose-dependente de LPS (Figura 8B). Embora a frequência de células que

expressaram moléculas coestimuladoras (CD40 e CD86) tenha sido semelhante para ambas as doses de LPS, células B estimuladas com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS apresentaram maior expressão de CD40, mas nenhuma diferença na expressão de CD86 (Figuras 8C-D).



**Figura 8. Efeito das diferentes concentrações de LPS na ativação de células B CD19<sup>+</sup> *in vitro*.** **A.** Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT saudáveis foram estimuladas com 5 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS e cultivadas por 48 horas em densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL. **B.** Estratégia de *gate* e observação do efeito do estímulo sobre as características morfológicas das células B. **C-D.** Efeito das diferentes concentrações de LPS na frequência (C) e MFI (D) de células B CD19<sup>+</sup> na expressão de moléculas coestimuladoras (CD40 e CD86). **E.** Quantificação de IL-10 no sobrenadante da cultura celular por ELISA; os resultados foram expressos em pg/mL. Estes dados são representativos de dois ou três experimentos independentes.  $n=3$  amostras por grupos. \* $p<0,05$ . CT: controle; MFI: média de intensidade de fluorescência.

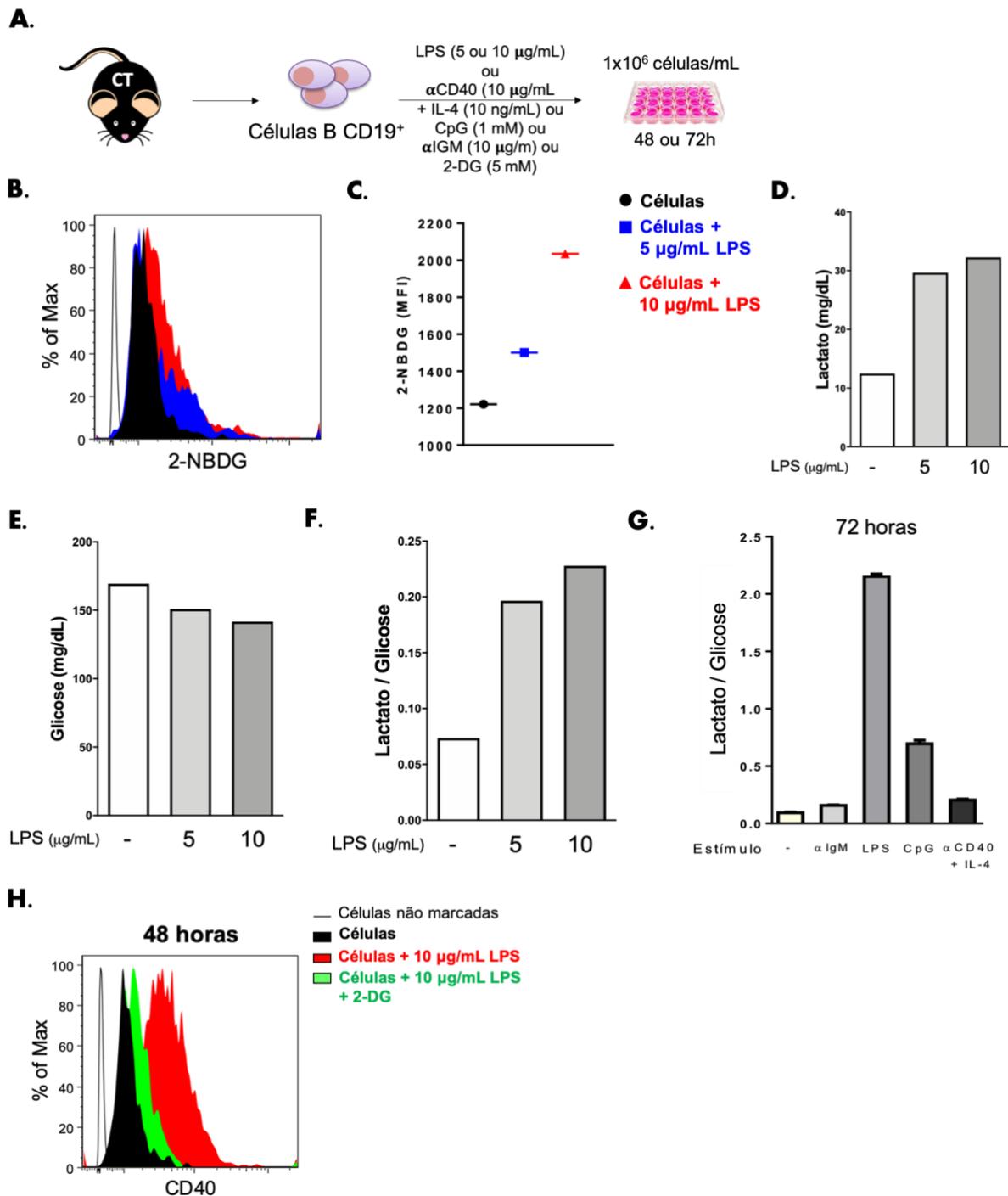
Além disso, células estimuladas com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS produziram mais IL-10 do que aquelas estimuladas com a concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 8E). Desse modo, foi observado que outros fatores indicadores de ativação, como a expressão de moléculas coestimuladoras e síntese de citocinas, são modulados de maneira dose-dependente de LPS.

#### **4.2. EFEITO DAS DIFERENTES DOSES DE LPS E DE OUTROS ESTÍMULOS NO PERFIL METABÓLICO DAS CÉLULAS B**

O tipo e a taxa das atividades metabólicas essenciais também têm sido utilizados como parâmetros para descrever a ativação celular (PEARCE; PEARCE, 2013). De fato, as células B ativadas aumentam a atividade glicolítica aeróbica quando comparadas com células B quiescentes, ou seja, elevam a produção de lactato (Caro-Maldonado, Wang et al. 2014). Dessa forma, as diferentes doses de LPS foram novamente utilizadas para avaliar se a concentração do estímulo influencia nos parâmetros metabólicos das células B usando o mesmo protocolo descrito anteriormente (Figura 9A).

Os resultados mostraram que tanto a captação de glicose (Figura 9B) como o aumento da atividade glicolítica aeróbica, indicada pelo consumo de glicose, produção de lactato e/ou pela relação produção de lactato/ consumo de glicose (Figuras 9D, E e F, respectivamente), dependem da dose de LPS. Assim, os dados mostraram que a maior dose de LPS, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , leva a uma maior ativação celular e metabólica em células B e, por isso, foi escolhida para os experimentos posteriores.

Em seguida, de modo semelhante ao realizado com o LPS, outros ativadores que simulam respostas de células B dependentes ( $\alpha\text{CD40} + \text{IL-4}$ ) e independentes (CpG,  $\alpha\text{IgM}$ ) de células T foram testados para selecionar a dose mais efetiva, utilizando-se os parâmetros metabólicos da relação produção de lactato/consumo de glicose para esta seleção (dados não mostrados).



**Figura 9. Efeito de diferentes concentrações de LPS e de outros estímulos no metabolismo de células B CD19<sup>+</sup>.** A. Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT saudáveis foram estimuladas com 5 ou 10 µg/mL de LPS e cultivadas por 48 horas em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. Alternativamente, células B também foram estimuladas com uso de anti (α)-IgM (10 µg/mL), LPS (10 µg/mL), CpG (1 mM), ou αCD40 (1 µg/mL) + IL-4 (10 ng/mL) por 72 horas. As concentrações de αCD40, IL-4, CpG e αIgM também foram otimizadas como a de LPS, mas apenas os resultados com as melhores concentrações foram mostrados. B-C. Frequência (B) e MFI (C) de células B CD19<sup>+</sup> na captação de glicose fluorescente (2-NBDG). D-E. Efeito das diferentes concentrações de LPS na produção/liberação de lactato (D) e consumo de glicose (E) quantificados no meio de cultura celular. F. A razão lactato/glicose é informativa de maior atividade de glicólise aeróbica e também indicativa de ativação celular. G. Efeito dos diferentes estímulos (αIgM, LPS, CpG, ou αCD40 + IL-4) na atividade de glicólise aeróbica. H. Efeito da

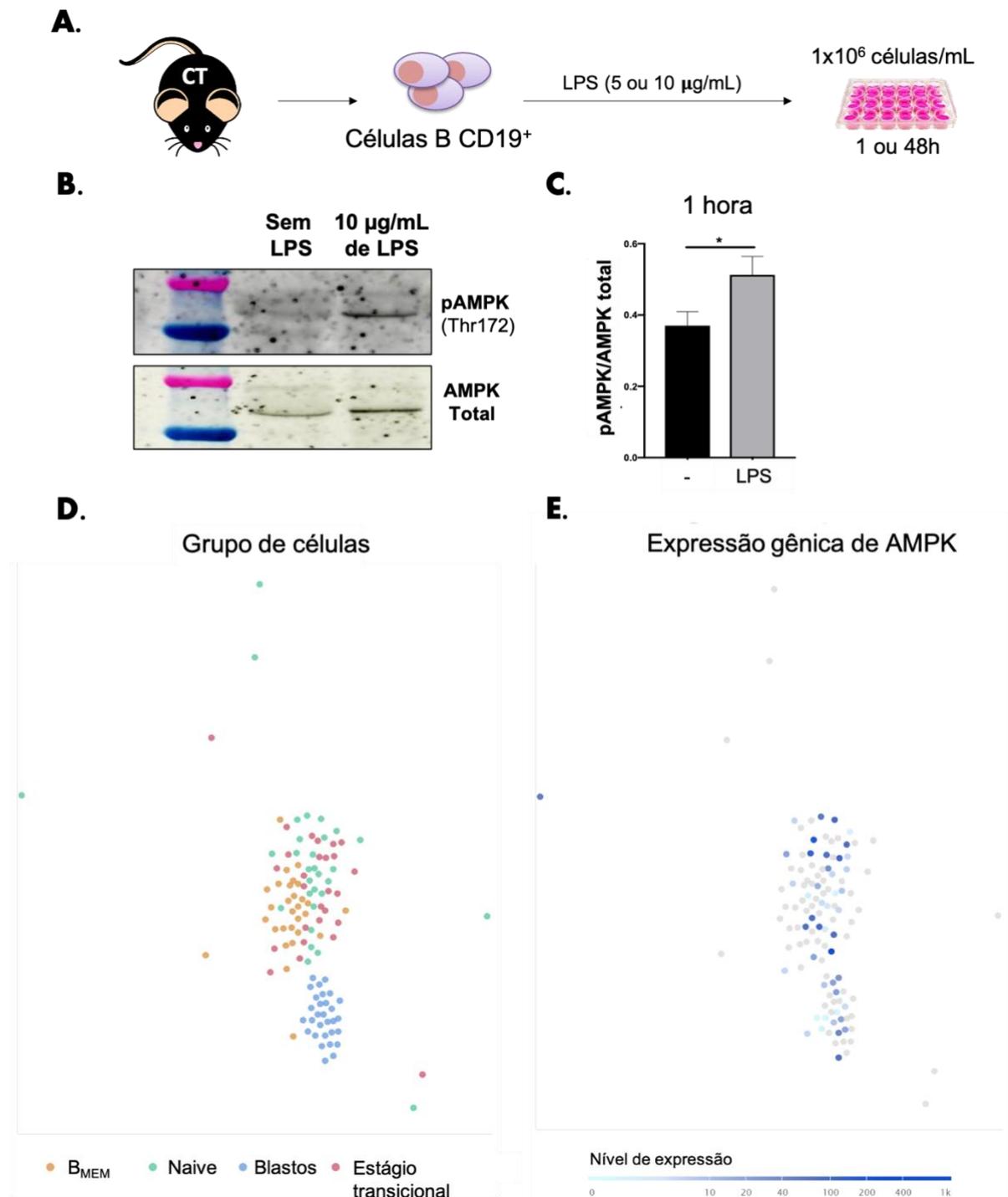
inibição da captação de glicose (2-DG - 5mM) na expressão de CD40 nas células B. Estes dados são representativos de um ou dois experimentos independentes. n=1 (*pool* de 3 amostras) ou n=3 amostras por grupo. **2-NBDG**: 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglicose; **2-DG**: 2-deoxiglicose; **CT**: controle; **MFI**: média de intensidade de fluorescência.

Posteriormente, usando-se o mesmo critério metabólico, comparou-se a melhor dose efetiva de todos os estímulos selecionados para determinar qual ativador induzia maior atividade glicolítica após 72 horas de estímulo. Conforme esperado, os resultados mostraram que estímulos que simulam as respostas independentes de células T geraram maior atividade glicolítica nas células B, sendo o LPS o mais potente deles (Figura 9G). Finalmente, foi demonstrado que a ativação das células B foi dependente da captação de glicose, uma vez que a inibição deste processo com o uso do inibidor 2-DG diminuiu drasticamente a expressão da molécula coestimuladora CD40 em células B estimuladas com 10 µg/mL (Figura 9H). Em conjunto, os resultados mostraram que a ativação de células B é influenciada pela concentração e tipo de estímulo e que também depende da disponibilidade de glicose.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK DURANTE A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS B MURINAS E EM SUBTIPOS DE CÉLULAS B HUMANAS

Em seguida, foi questionado se AMPK teria algum papel no processo de ativação de células B após estímulo com LPS. De fato, células B aumentaram a fosforilação no resíduo de treonina 172 da subunidade catalítica a de AMPK após estímulo com LPS por 1 hora (Figura 10A-C), inferindo que AMPK desempenha funções fisiológicas nos mecanismos de ativação destas células.

Foram também realizadas análises *in silico* com bancos de dados de sequenciamento de RNA de células individuais (scRNAseq) através do *software* do Single Cell Expression Atlas (banco de dados número ERP109332). As avaliações foram feitas em células B obtidas de humanos saudáveis sem nenhum tipo de estímulo. Os resultados mostraram que AMPK é importante para diversos subtipos de células B, principalmente células B naive, de estágio transicional e plasmoblastos (Figuras 10D-E).



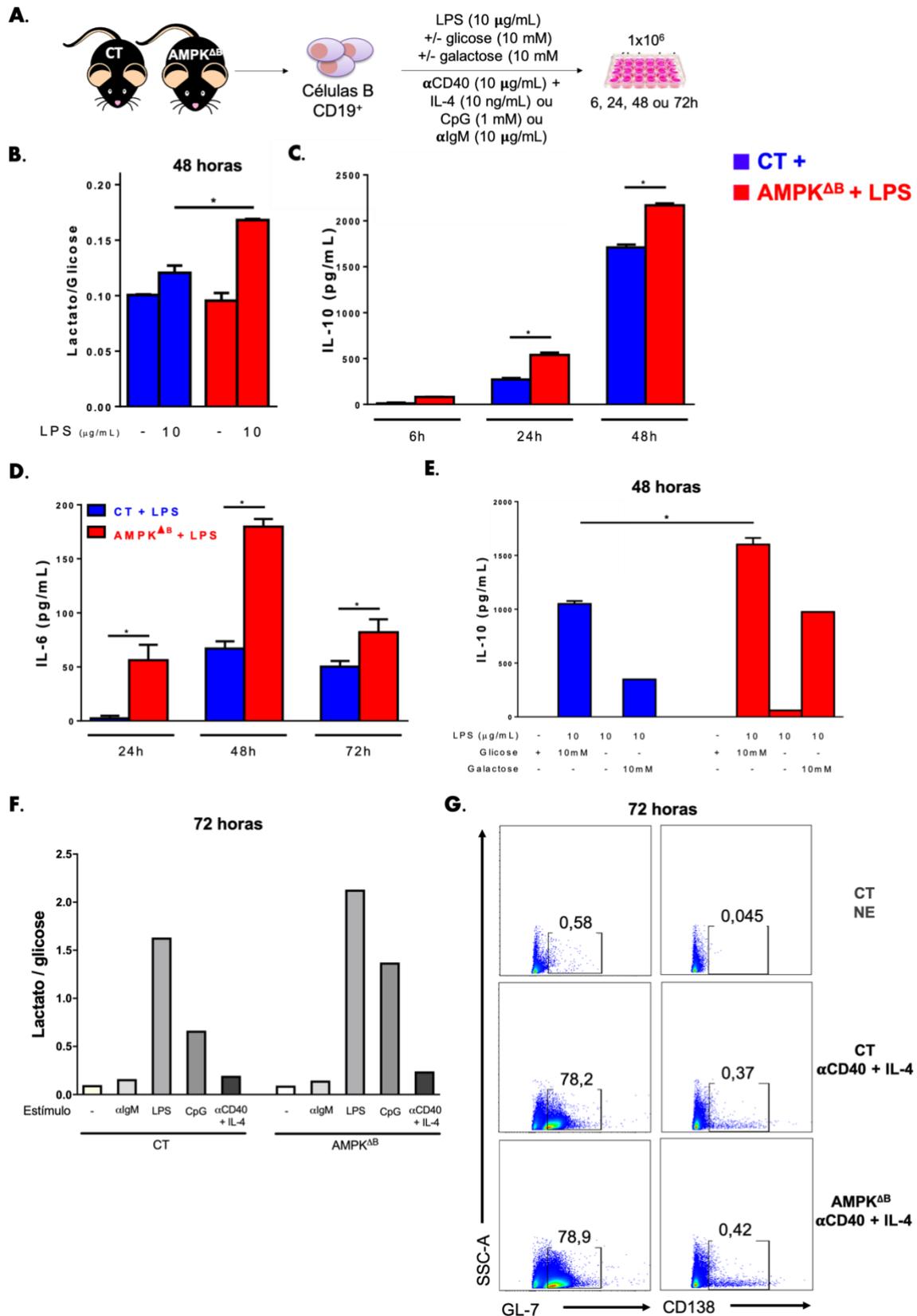
**Figura 10. Papel de AMPK na ativação de células B estimuladas com LPS e em células B de humanos.** **A.** Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT saudáveis foram estimuladas com 5 ou 10 µg/mL de LPS e cultivadas por 1 hora (para avaliação da ativação de AMPK) ou por 48 horas (para os demais experimentos) em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. **B-C.** Efeito da estimulação de células B com LPS na fosforilação (ativação) de AMPK. Os resultados foram quantificados em *software* apropriado (ImageJ, National Institutes of Health, EUA) e os valores obtidos de pAMPK foram normalizados pelos valores de AMPK total. **D-E.** Análise *in silico* realizada com dados de sequenciamento de RNA de células individuais (scRNAseq) através do

*software* do Single Cell Expression Atlas (banco de dados número ERP109332). É demonstrado o agrupamento dos subtipos de células B obtidas de humanos saudáveis, incluindo B<sub>MEM</sub> (amarelo), naïve (verde), plasmoblastos (azul) e estágio transicional (vermelho) (A), e o nível de expressão de AMPK nas células correspondentes em A (B). Quanto maior a densidade de cor azul, maior a expressão de AMPK no subtipo de células B correspondente. Estes dados são representativos de um ou dois experimentos independentes. n=1 (*pool* de 3 amostras) ou n=3 amostras por grupo. Estes dados são representativos de 2 experimentos independentes. n=2-4 amostras por grupo. \*p<0,05. B<sub>MEM</sub>: células B de memória; CT: controle; pAMPK: AMPK fosforilado.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NO PERFIL METABÓLICO E NA SÍNTESE DE CITOCINAS NAS CÉLULAS B

Uma vez que AMPK se mostrou importante no papel de ativação de células B murinas, foram utilizadas células B deficientes de AMPK (AMPK<sup>ΔB</sup>) para avaliar o papel desta proteína nos parâmetros de ativação celular e metabolismo usados até o momento. Para isso, células CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram estimuladas com 10 µg/mL de LPS e cultivadas por 6, 24, 48 e/ou 72 horas (Figura 11A). Células AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas por 48 horas tiveram maior atividade glicolítica aeróbica quando comparadas às células B CT (Figuras 11B). De modo interessante, células AMPK<sup>ΔB</sup> produziram maior quantidade de IL-10 e IL-6 do que células B CT já a partir de 6 ou 24 horas de cultura, respectivamente (Figura 11C-D).

Posteriormente, foi questionado se a síntese de citocinas era diretamente relacionada com a atividade metabólica de células B e se AMPK poderia regular este processo. Para isso, as células foram estimuladas e cultivadas em meio RPMI sem glicose ou na presença de galactose (um indutor do metabolismo oxidativo) ao invés de glicose (Figura 11A). Os resultados mostraram que, assim como a expressão de CD40 (Figura 9H), células B CT e AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com LPS foram incapazes de sintetizar IL-10 (Figura 11E). A adição de galactose no meio de cultura desprovido de glicose foi capaz de restabelecer parcialmente a capacidade das células B de ambos os grupos de produzirem a citocina, porém em menor quantidade do que quando expostas ao meio contendo glicose (Figura 11E). De modo interessante, as células AMPK<sup>ΔB</sup> foram capazes de produzir mais IL-10 do que células B CT em todas as condições experimentais (Figura 11E).



**Figura 11.** Efeito da deleção de AMPK em células B CD19<sup>+</sup> na ativação celular estimuladas com LPS e na diferenciação em células B CG ou ASC estimuladas com αCD40 + IL-4. **A.** Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas com 10

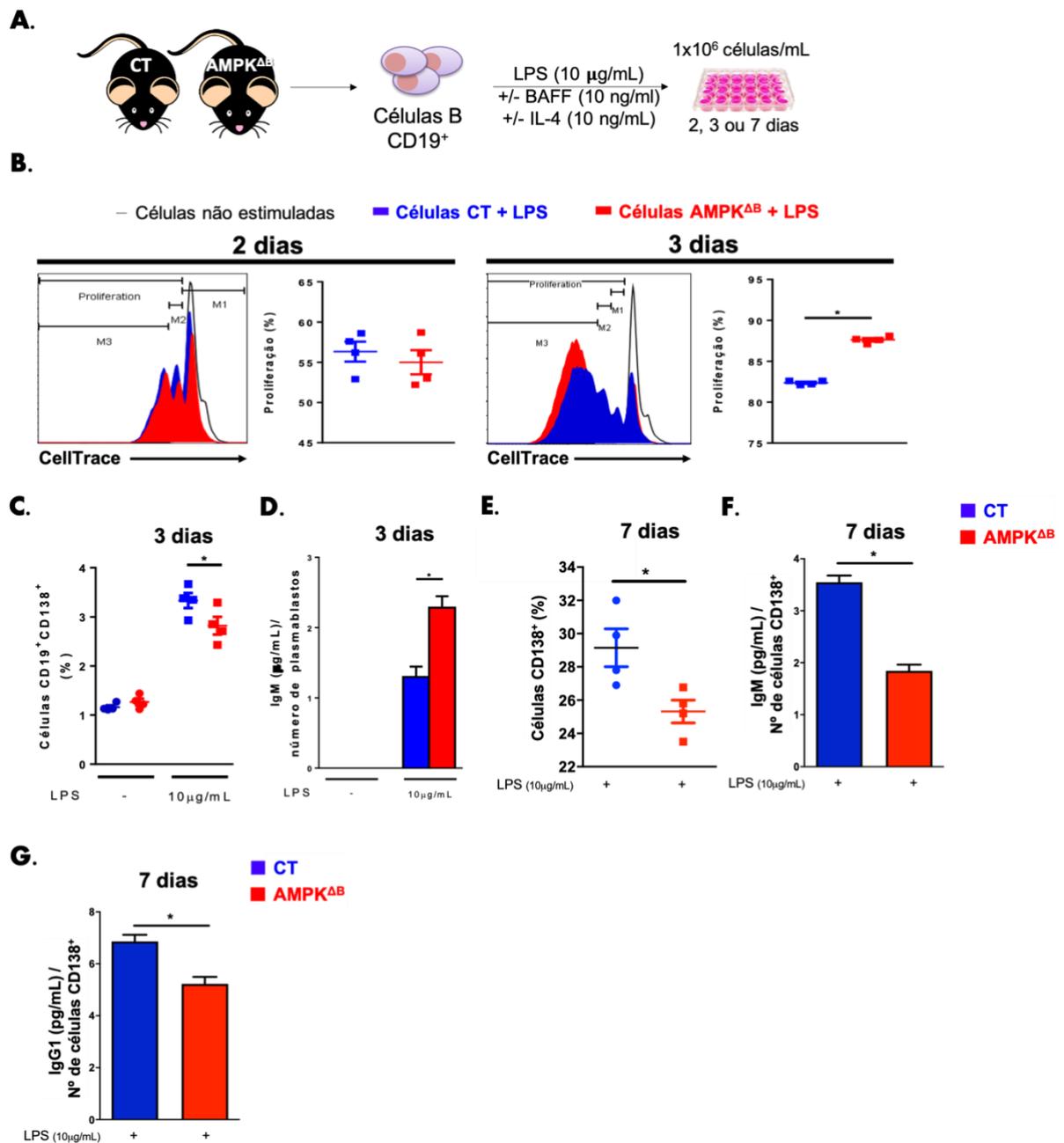
$\mu\text{g/mL}$  de LPS e cultivadas por 6, 24, 48 ou 72 horas em densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL. Alternativamente, células B foram estimuladas com  $10 \mu\text{g/mL}$  de LPS na presença ou ausência de glicose ( $10 \text{ mM}$ ) ou galactose ( $10 \text{ mM}$ ). Ainda, células B também foram estimuladas com uso de anti ( $\alpha$ )-IgM ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), LPS ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), CpG ( $1 \text{ mM}$ ), ou  $\alpha\text{CD40}$  ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) + IL-4 ( $10 \text{ ng/mL}$ ) por 72 horas. As concentrações de  $\alpha\text{CD40}$ , IL-4, CpG e  $\alpha\text{IgM}$  também foram otimizadas como a de LPS, mas apenas os resultados com as melhores concentrações foram mostrados. **B.** Razão lactato/glicose é informativa de maior atividade de glicólise aeróbica e também indicativa de ativação celular. **C-D.** Quantificação de IL-10 (C) e IL-6 (D) no sobrenadante da cultura celular por ELISA após 6, 24, 48 ou 72 horas de estímulo com  $10 \mu\text{g/mL}$  de LPS. **E.** Células B foram estimuladas com  $10 \mu\text{g/mL}$  de LPS na presença ou ausência de glicose ( $10 \text{ mM}$ ) ou galactose ( $10 \text{ mM}$ ) para a quantificação de IL-10 no sobrenadante de cultura por ELISA. Galactose é utilizada para forçar a fosforilação oxidativa mitocondrial. **F.** Efeito dos diferentes estímulos ( $\alpha\text{IgM}$ , LPS, CpG, ou  $\alpha\text{CD40}$  + IL-4) na atividade de glicólise aeróbica de células B CT e  $\text{AMPK}^{\Delta\text{B}}$ . **G.** Avaliação da frequência de células B CG ( $\text{CD19}^+\text{GL-7}^+$ ) e de ASC ( $\text{CD138}^+$ ) após estímulo com  $\alpha\text{CD40}$  ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) + IL-4 ( $10 \text{ ng/mL}$ ) por 72 horas. Estes dados são representativos de 1-3 experimentos independentes.  $n=1$  (*pool* de 3 amostras) ou  $n=2-4$  amostras por grupo.  $*p<0,05$ . **AMPK<sup>ΔB</sup>:** Células B  $\text{CD19}^+$  deficientes de AMPK; **ASCs:** células secretoras de anticorpos; **CG:** centro germinativo; **CT:** controle; **NE:** não estimulado.

Finalmente, células B CT e  $\text{AMPK}^{\Delta\text{B}}$  foram estimuladas com diferentes ativadores por 72 horas. Células  $\text{AMPK}^{\Delta\text{B}}$  tiveram maior atividade glicolítica aeróbica após estímulos com LPS e CpG do que as células B CT, mas não diferiram entre si com uso de  $\alpha\text{IgM}$  e  $\alpha\text{CD40}$  + IL-4 (Figura 11F). Da mesma forma, não houve diferença nas frequências de células de CG ( $\text{GL-7}^+$ ) e ASCs ( $\text{CD138}^+$ ) entre os dois grupos de células B após estímulo com  $\alpha\text{CD40}$  + IL-4 (Figura 11G). Em conjunto, os resultados demonstram que a síntese de citocinas por células B é dependente do metabolismo glicolítico e oxidativo e que AMPK regula negativamente tanto o metabolismo glicolítico, como a síntese de citocinas. Adicionalmente, AMPK parece desempenhar um papel majoritário em respostas independentes de células T.

#### **4.5. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS B E NA DIFERENCIAÇÃO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPOS**

Uma vez que as determinações de aumento da síntese de citocinas e da atividade glicolítica em células  $\text{AMPK}^{\Delta\text{B}}$  foram realizadas por análises no sobrenadante de cultura, foi questionado se estes resultados não poderiam ser consequência de uma maior proliferação destas células. De fato, células  $\text{AMPK}^{\Delta\text{B}}$  mostraram maior taxa de proliferação celular após 72 horas de estímulo com LPS, mas nenhuma alteração foi observada após 48 horas de cultura (Figuras 12A-B). Como as diferenças na síntese das biomoléculas

analisadas já começaram a ocorrer após 6-24 horas de estímulo com LPS, pode-se inferir que as alterações encontradas parecem não ser decorrentes do aumento da proliferação de células AMPK<sup>ΔB</sup>. No entanto, todos os resultados obtidos com cultura celular acima de 72 horas foram normalizados. Para isso, foram realizadas contagens do número total de células presentes em cada poço ao final do experimento e, dependendo do tipo de análise, o número de células da população de interesse foi determinada pelo cálculo da frequência desta população.

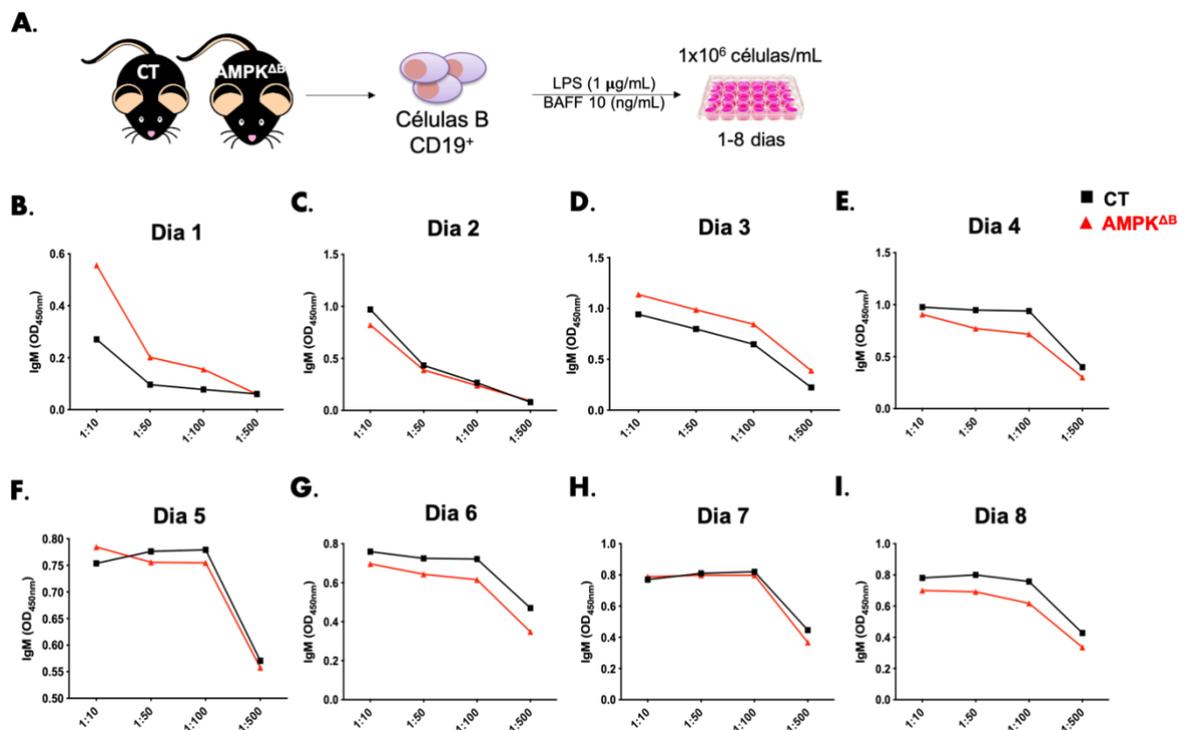


**Figura 12. Efeito da deleção de AMPK em células B CD19<sup>+</sup> na proliferação e diferenciação em ASCs estimuladas com LPS.** A. Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas com 10 μg/mL de LPS e cultivadas por 2 ou 3 dias em

densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL para avaliação da proliferação celular. Alternativamente, células B foram estimuladas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, 10  $\text{ng/mL}$  de BAFF e 10  $\text{ng/mL}$  de IL-4 por 3 ou 7 dias para avaliação da frequência de ASC e da secreção de anticorpos IgM e IgG1. **B.** Células B CT e AMPK<sup>ΔB</sup> foram marcadas com 1,25  $\mu\text{M}$  de CellTrace™ e estimuladas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS por 2 ou 3 dias para avaliação da frequência de células proliferadas. **C-D.** Frequência (%) de ASC (C) e quantificação de IgM secretada (D) no sobrenadante de cultura celular em células B CT e AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS por 3 dias; os resultados da determinação de IgM foram expressos em  $\text{pg/mL}$  e corrigidos pelo número de plasmoblastos (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>). **E-G.** Frequência (%) de ASC (E) e quantificação de IgM (F) e IgG1 (G) secretadas no sobrenadante de cultura celular em células B CT e AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, 10  $\text{ng/mL}$  de BAFF e 10  $\text{ng/mL}$  de IL-4 por 7 dias; os resultados da determinação de IgM e IgG1 foram expressos em  $\text{pg/mL}$  e corrigidos pelo número de ASCs (CD138<sup>+</sup>). Estes dados são representativos de 2-3 experimentos independentes.  $n=2-5$  amostras por grupo.  $*p<0,05$ . **AMPK<sup>ΔB</sup>:** Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **ASCs:** células secretoras de anticorpos; **CT:** controle.

Posteriormente, células B foram estimuladas com LPS para verificar se o aumento da atividade glicolítica induzida pela ausência de AMPK impactaria a diferenciação destas células em ASCs (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> e/ou CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>). Células AMPK<sup>ΔB</sup> foram cultivadas por 3 e 7 dias e, embora tenham se diferenciado menos em ASCs, elas produziram mais anticorpos no dia 3 de cultura celular, seguido pelo comprometimento desta produção no dia 7 (Figuras 12C-G).

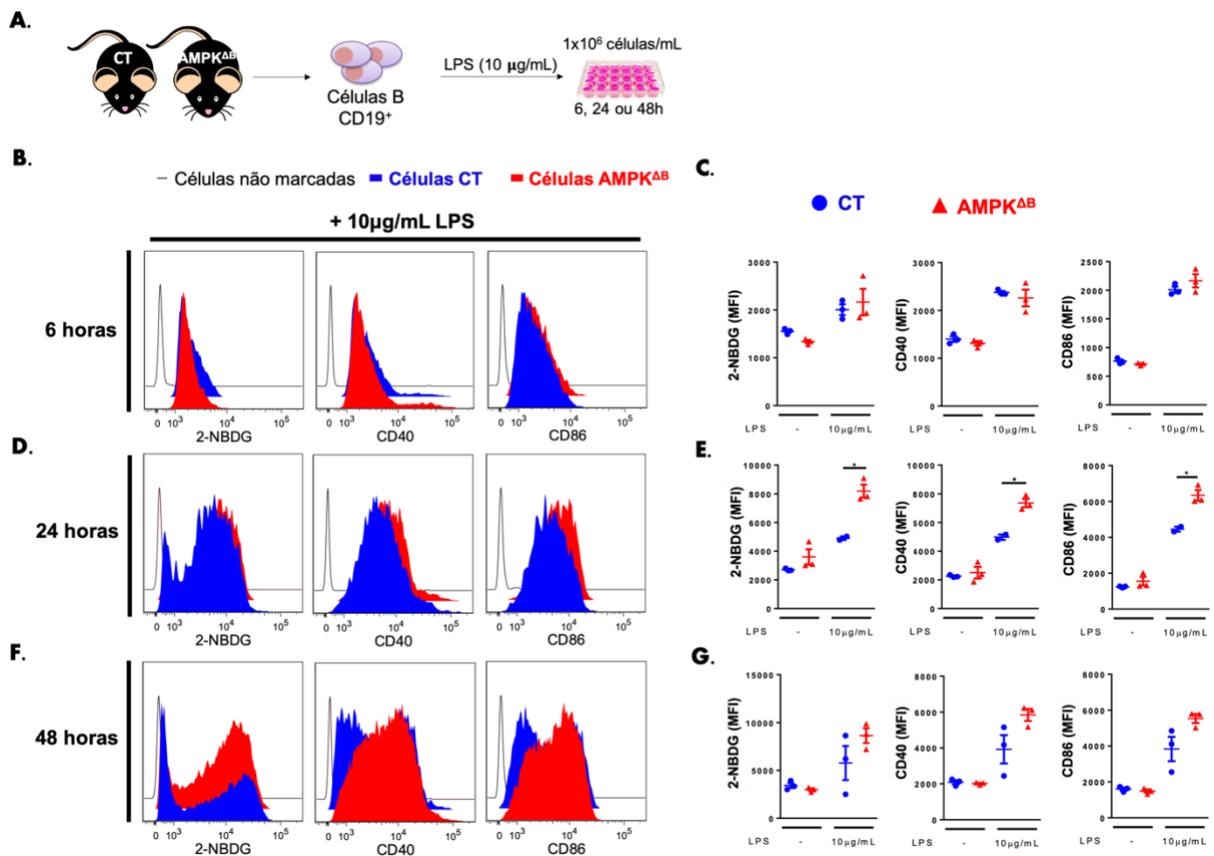
Esses resultados foram confirmados pela quantificação diária de IgM no sobrenadante de cultura, quando foi observado um aumento na síntese da imunoglobulina até o dia 3 pelas células AMPK<sup>ΔB</sup>, seguida pela diminuição da secreção do dia 4 até o dia 8 de experimento (Figura 13A-I). Em conjunto, os resultados mostraram que AMPK regula negativamente a diferenciação em ASCs e a secreção de anticorpos.



**Figura 13. Avaliação da secreção de anticorpos IgM em células AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com LPS.** A. Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS, 10 ng/mL de BAFF e cultivadas por 8 dias em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. No dia 3 de cultura foi adicionado o mesmo volume de meio de cultura contendo os estímulos e as células foram divididas em 2 poços. No dia 6 de cultura, apenas novo meio de cultura foi adicionado aos poços contendo as células e novamente divididos em 2 novos poços. A coleta de sobrenadante foi feita diariamente e os sobrenadantes de cultura das mesmas amostras foram coletados juntamente para as análises (*pool*). B-I. O sobrenadante de cultura foi utilizado para detecção de IgM secretada por ELISA. Os resultados foram normalizados pelo número de células CD138<sup>+</sup>. Estes dados são representativos de 1 experimento. n= 1 animal com triplicatas técnicas. AMPK<sup>ΔB</sup>: Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; CT: controle.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE E NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS NAS CÉLULAS B

Uma vez que o aumento da glicólise parece contribuir com o estado de ativação de células B, células AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas tiveram maior frequência na captação de glicose após 48 horas de cultura e maior frequência na expressão de moléculas coestimuladoras CD40 e CD86 após 24 e 48 horas de estímulo (Figuras 14A-B, D e F). A avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI, do inglês *mean fluorescence intensity*) mostrou que as células AMPK<sup>ΔB</sup> captaram mais glicose e expressaram maior quantidade de CD40 e CD86 após 24 e 48 horas quando comparadas às células B CT (Figuras 14C, E e G). Em conjunto, estes dados sugerem que AMPK regula a captação de glicose e o limiar de ativação das células B.

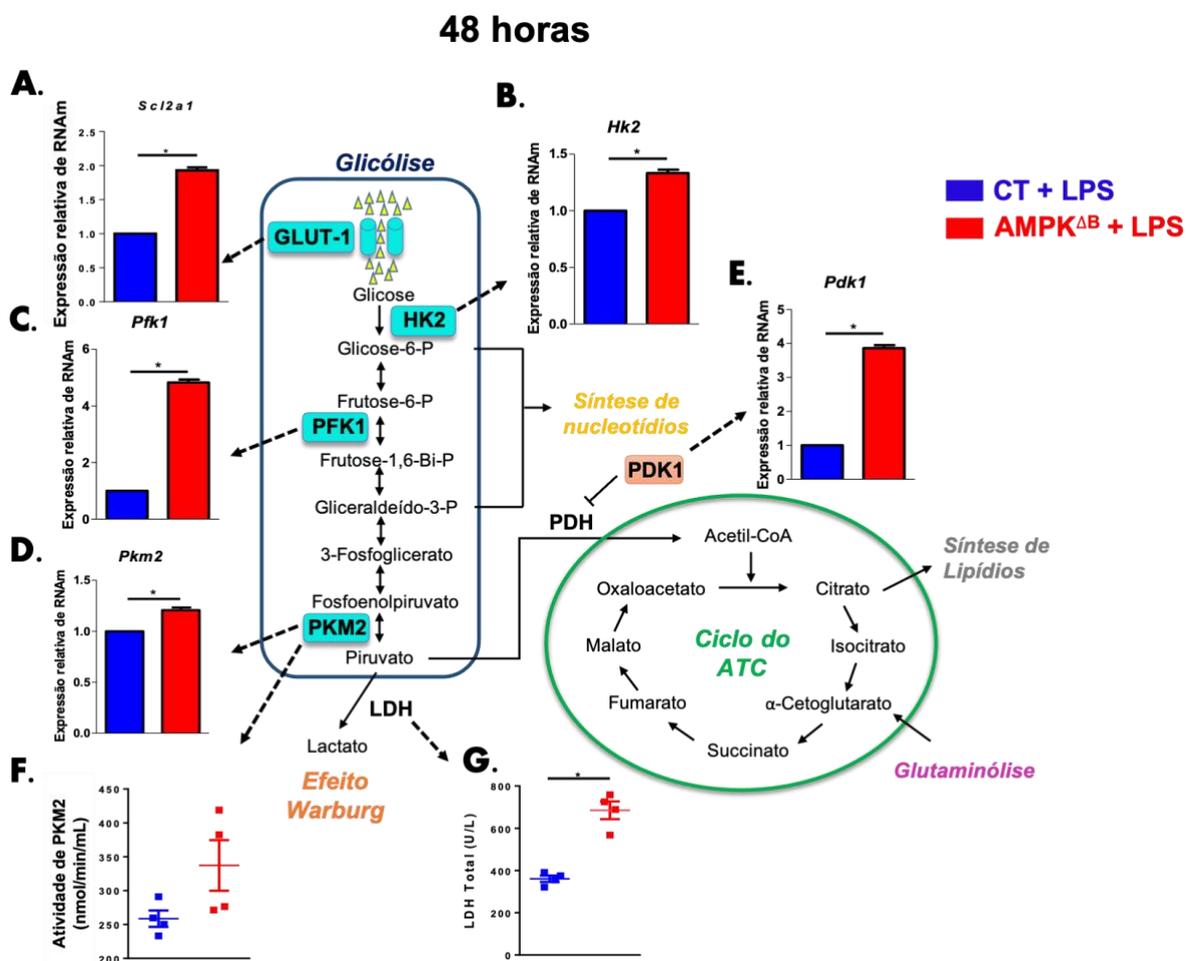


**Figura 14. Efeito da deleção de AMPK em células B na captação de glicose e na expressão de moléculas coestimuladoras após estímulo com LPS.** A. Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas com 10 μg/mL de LPS e cultivadas por 6, 24 ou 48 horas em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. B-G. Frequência (B, D e F) e MFI (C, E e G) de células B CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> na captação de glicose fluorescente (2-NBDG) e na expressão de moléculas coestimuladoras (CD40 e CD86) após 6 (B e C), 24 (D e E) e 48 horas (F e G) de estímulo com LPS. Estes dados são representativos de um experimento. n=3 amostras por grupo. **2-NBDG:** 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglicose; **AMPK<sup>ΔB</sup>:** Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **CT:** controle; **MFI:** média de intensidade de fluorescência.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DAS CÉLULAS B

Para confirmar que células AMPK<sup>ΔB</sup> têm uma maior atividade glicolítica e captação de glicose, nós avaliamos a expressão de genes relacionados à síntese de enzimas glicolíticas, bem como do transportador de glicose GLUT-1. Confirmando os resultados anteriores, células AMPK<sup>ΔB</sup> tiveram maior expressão do gene relacionado ao transportador GLUT-1 (*Slc2a1*) e das enzimas hexoquinase-2 (*Hk2*), fosfofrutoquinase 1 (*Pfk1*) e piruvato quinase 2 (*Pkm2*) (Figuras 15A-D). Além disso, nós também avaliamos a atividade das enzimas PKM2 e lactato desidrogenase (LDH) que se mostraram

aumentadas (Figuras 15E-F), corroborando os achados de que AMPK regula negativamente a glicólise aeróbica. De modo interessante, foi também observado o aumento da expressão gênica da enzima mitocondrial piruvato desidrogenase quinase (*Pdk1*) em células AMPK<sup>ΔB</sup>, responsável por regular negativamente o complexo da piruvato desidrogenase na conversão de piruvato em acetil-CoA. O acetil-CoA é o substrato derivado da glicólise que alimenta o ciclo do ATC e, conseqüentemente, a OXPHOS. Dessa maneira, interpreta-se que células AMPK<sup>ΔB</sup> direcionem preferencialmente o piruvato para a produção de lactato e, como conseqüência, a atividade mitocondrial deve estar comprometida.

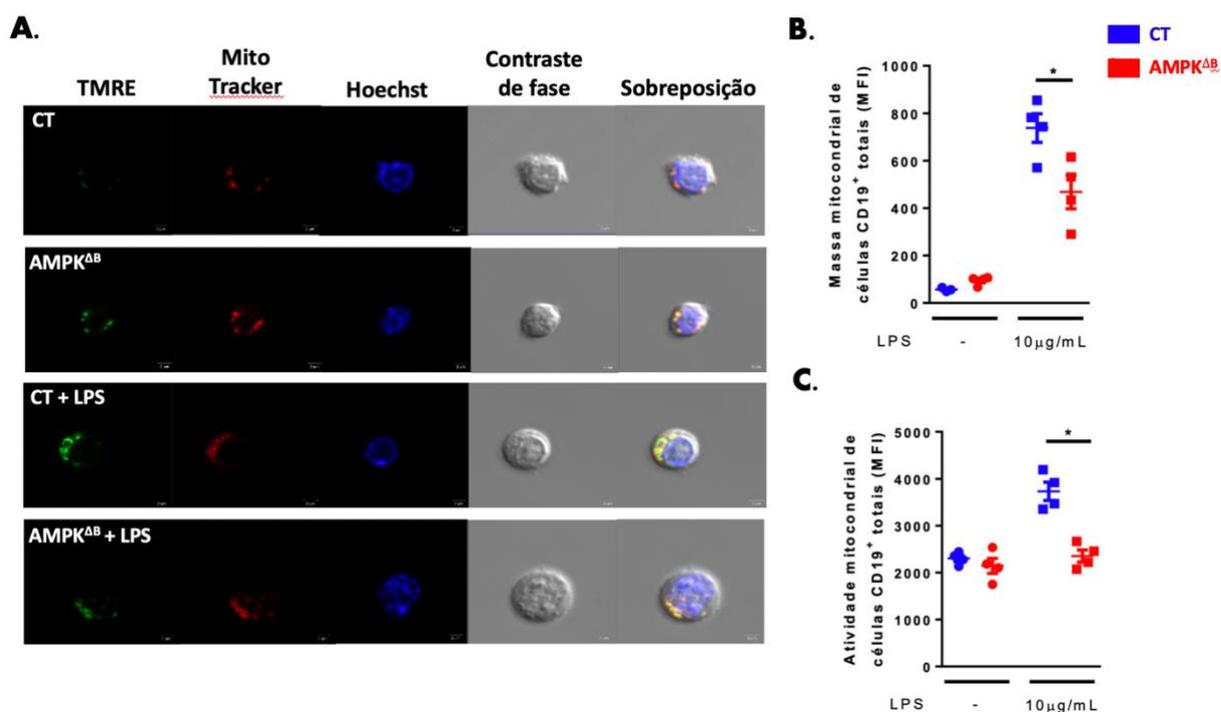


**Figura 15. Expressão e atividade enzimática de moléculas relacionadas ao metabolismo celular em células AMPK<sup>ΔB</sup> após estímulo com LPS.** Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas com 10 μg/mL de LPS e cultivadas por 48 horas em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. Resultados semelhantes foram obtidos com células estimuladas por 24 horas (dados não mostrados). A-F. Avaliaram-se as expressões gênicas do transportador de glicose (*Sc12a1*) (A), de enzimas relacionadas à glicólise [hexoquinase 2 - *Hk2* (B); fosfofrutoquinase 1 - *Pfk1* (C); Piruvato quinase 2 - *Pkm2* (D)] e da enzima mitocondrial piruvato desidrogenase quinase (*Pdk1*) (E). PDK1 inibe a atividade da enzima piruvato desidrogenase e conseqüente conversão do piruvato em acetil-CoA (substrato para o ciclo do ATC). Ainda, as atividades enzimáticas de PKM2 (F) e da lactato desidrogenase (LDH) (G), enzima

específica relacionada à glicólise aeróbica, também foram determinadas após lavagem das células e subsequente lise celular. Estes dados são representativos de 2 experimentos independentes. n=1 (pool de amostras) ou 3-4 amostras por grupo. \*p<0,05. **AMPK<sup>ΔB</sup>**: Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **CT**: controle.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA MASSA E NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAIS NAS CÉLULAS B

Uma vez que as células AMPK<sup>ΔB</sup> priorizam a via glicolítica, foi investigado se a atividade mitocondrial foi realmente comprometida nestas células. De modo interessante, tanto a massa como a atividade mitocondrial encontraram-se reduzidas nestas células, como pode ser observado em experimentos de microscopia e citometria de fluxo (Figuras 16A-C). É importante ressaltar que as análises foram feitas com células CD19<sup>+</sup> totais, mas não houve diferenças significativas entre células B convencionais (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>) e plasmoblastos (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) (dados não mostrados).

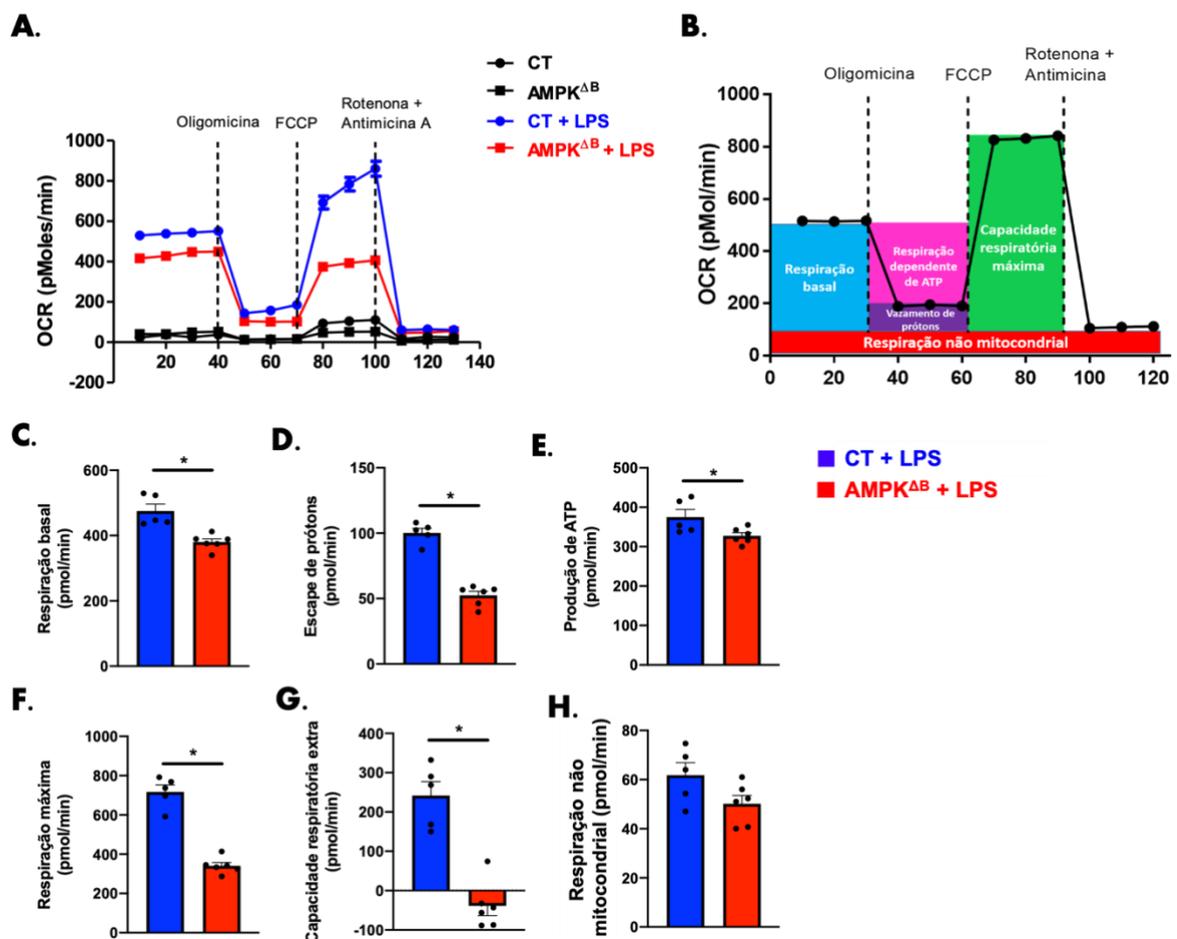


**Figura 16. Avaliação da massa e atividade mitocondrial em células AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com LPS.** Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas ou não com 10 μg/mL de LPS e cultivadas por 48 horas em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. Resultados semelhantes foram obtidos com células estimuladas por 24 horas (dados não mostrados). **A.** Fotomicrografias imunofluorescentes representativas de células B CT e AMPK<sup>ΔB</sup> marcadas com TMRE (verde; relativo a atividade mitocondrial), MitoTracker Deep Red (vermelho; relativo a massa mitocondrial) e Hoechst (azul; núcleo celular). Objetiva: 40x. **B.** Análise da massa mitocondrial (MitoTracker) por citometria de fluxo (MFI) de células CD19<sup>+</sup> totais. **C.** Análise da atividade mitocondrial (TMRE) por citometria de fluxo (MFI) de células CD19<sup>+</sup> totais. Resultados semelhantes foram obtidos por sistema de imagem por campo largo (dados não mostrados). Estes dados são representativos de 1 experimento para cada técnica empregada. n=4

amostras por grupo. \* $p < 0,05$ . AMPK<sup>ΔB</sup>: Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; CT: controle; MFI: média de intensidade de fluorescência.

#### 4.9. ANÁLISE DO CONSUMO DE OXIGÊNICO EM TEMPO REAL DE CÉLULAS B DEFICIENTES EM AMPK

Dado o fato de que células AMPK<sup>ΔB</sup> apresentaram menor massa e atividade mitocondrial, o consumo de oxigênio em tempo real destas células foi avaliado. Os resultados confirmaram que, de modo geral, as células AMPK<sup>ΔB</sup> possuem menor atividade metabólica mitocondrial (Figura 17A). Especificamente, células AMPK<sup>ΔB</sup> tiveram menor respiração basal, escape de prótons, produção de ATP, respiração máxima e capacidade respiratória extra do que células B CT (Figuras 17B-H). Desse modo, os resultados mostraram que AMPK regula a atividade mitocondrial de células B estimuladas com LPS.

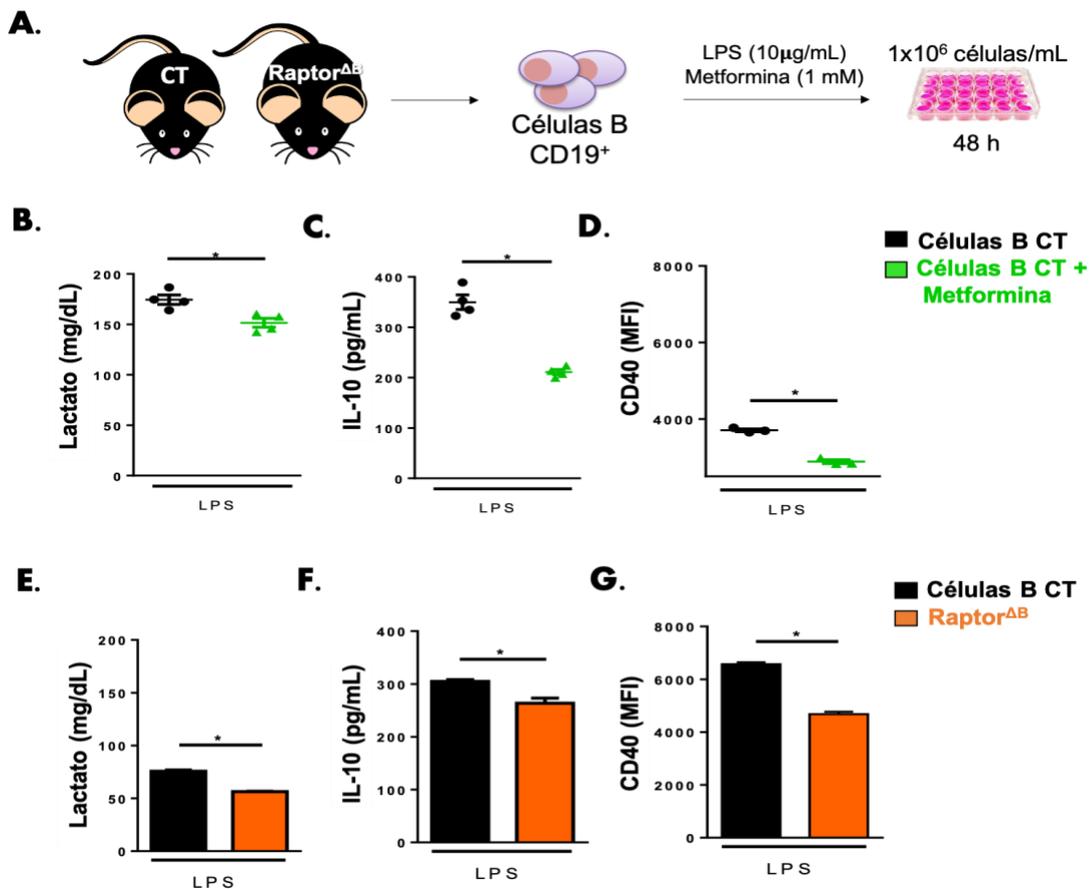


**Figura 17.** Avaliação do consumo de oxigênio em tempo real por analisador de fluxo extracelular (*seahorse*) de células AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com LPS. A-G. Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas ou não com 10 μg/mL de LPS e cultivadas *overnight* em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. Após o período de cultura, as células foram lavadas e colocadas em meio de cultura RPMI não-tamponado

suplementado com 10 mM de glicose, 1 mM de glutamina e 1 mM de piruvato de sódio e então avaliadas quanto às taxas de consumo de oxigênio (OCR) com uso de estressores mitocondriais na seguinte sequência: 1  $\mu$ M de oligomicina - inibidor da ATP sintase; 1,5  $\mu$ M de FCCP - desacoplador e acelerador da cadeia respiratória mitocondrial; 2  $\mu$ M de antimicina-A + 2  $\mu$ M de rotenona - ambos inibidores da cadeia transportadora de elétrons. Os resultados foram normalizados pelo número de células presentes em cada poço. À partir do perfil de consumo de oxigênio antes e após o uso dos estressores mitocondriais (A) é possível determinar diversos parâmetros que podem ser calculados de acordo com o item B: respiração basal (C), escape de prótons (D), produção de ATP (E), respiração máxima (F), capacidade respiratória (G) e respiração não mitocondrial (H). Estes dados são representativos de 2 experimentos. n=6-10 amostras por grupo. **AMPK<sup>ΔB</sup>**: Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **CT**: controle; **FCCP**: cianeto de carbonila p-trifluorometoxi-fenil-hidrazona.

#### **4.10. EFEITO DA ATIVAÇÃO DE AMPK E DA AUSÊNCIA DE MTORC1 NA ATIVAÇÃO E METABOLISMO DAS CÉLULAS B**

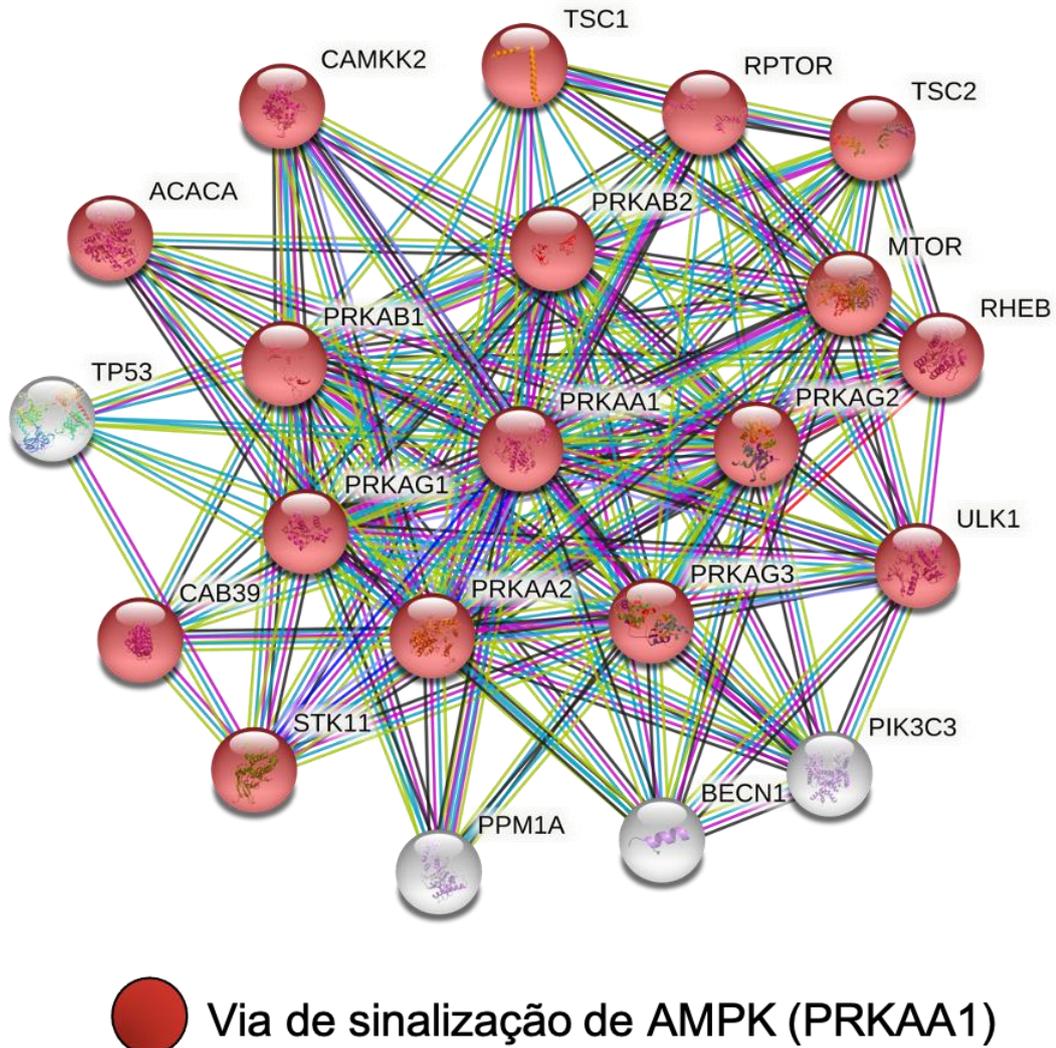
AMPK é o principal inibidor fisiológico de mTORC1, mas também dotado de outras funções. Desse modo, foi avaliado se as principais alterações observadas até o momento com a ausência de AMPK foram mediadas pelo aumento da atividade de mTORC1. Para isso, foi utilizada metformina, droga antidiabética comumente usada na clínica e descrita como ativadora não seletiva de AMPK. De modo interessante, a produção de lactato, a síntese de IL-10 e a expressão de CD40 foram diminuídas nas células B CT tratadas com a droga, em oposição ao encontrado em células AMPK<sup>ΔB</sup> (Figuras 18A-D). De modo semelhante, a estimulação de células B deficientes de raptor (Raptor<sup>ΔB</sup>), subunidade essencial para o correto funcionamento de mTORC1, levou a resultados semelhantes àqueles observados com células B CT tratadas com metformina (Figuras 18E-G). Estes resultados sugerem que a maioria das alterações observadas em células AMPK<sup>ΔB</sup> são mediadas, pelo menos parcialmente, pelo aumento da atividade de mTORC1.



**Figura 18. Efeitos da ativação de AMPK e da deleção de mTORC1 no metabolismo, ativação e diferenciação de células B após estimulação com LPS.** A. Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT saudáveis foram estimuladas com 10 μg/mL de LPS e 1 mM de metformina e cultivadas por 48 horas em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. Alternativamente, células B CD19<sup>+</sup> esplênicas foram obtidas de camundongos Raptor<sup>ΔB</sup> e estimuladas com 10 μg/mL nas mesmas condições descritas anteriormente. B-G. Quantificação de lactato (B e E) e IL-10 (C e F) e análise de expressão de CD40 (D e G). Estes dados são representativos de 1 experimento. n=3-4 amostras por grupo. \*p<0,05. CT: controle; Raptor<sup>ΔB</sup>: células B deficientes em Raptor (mTORC1).

#### 4.11. AVALIAÇÃO DA REDE PROTEICA RELACIONADA A AMPK

Análises *in silico* com uso de banco de dados de interações de proteínas previsíveis (STRING) mostrou as 20 principais proteínas relacionadas à proteína PRKAA1 que corresponde a subunidade catalítica α de AMPK (Figura 19A). Esta lista incluiu proteínas relacionadas ao eixo AMPK-mTORC1 (por exemplo, TSC1, TSC2, RPTOR, MTOR, RHEB), também incluiu o ativador fisiológico de AMPK sensível a altas concentrações de cálcio (CAMKK2), proteínas que constituem os diferentes heterotrímeros de AMPK (PRKAA1, PRKAG1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAG1, PRKAG2, PRKAG3) e proteínas-alvo de AMPK (acetil-CoA carboxilase – ACACA, promotora da β-oxidação; proteína quinase do tipo unc-51 - ULK1, responsável pelos processos de autofagia/mitofagia) (Figura 19A).

**A.**

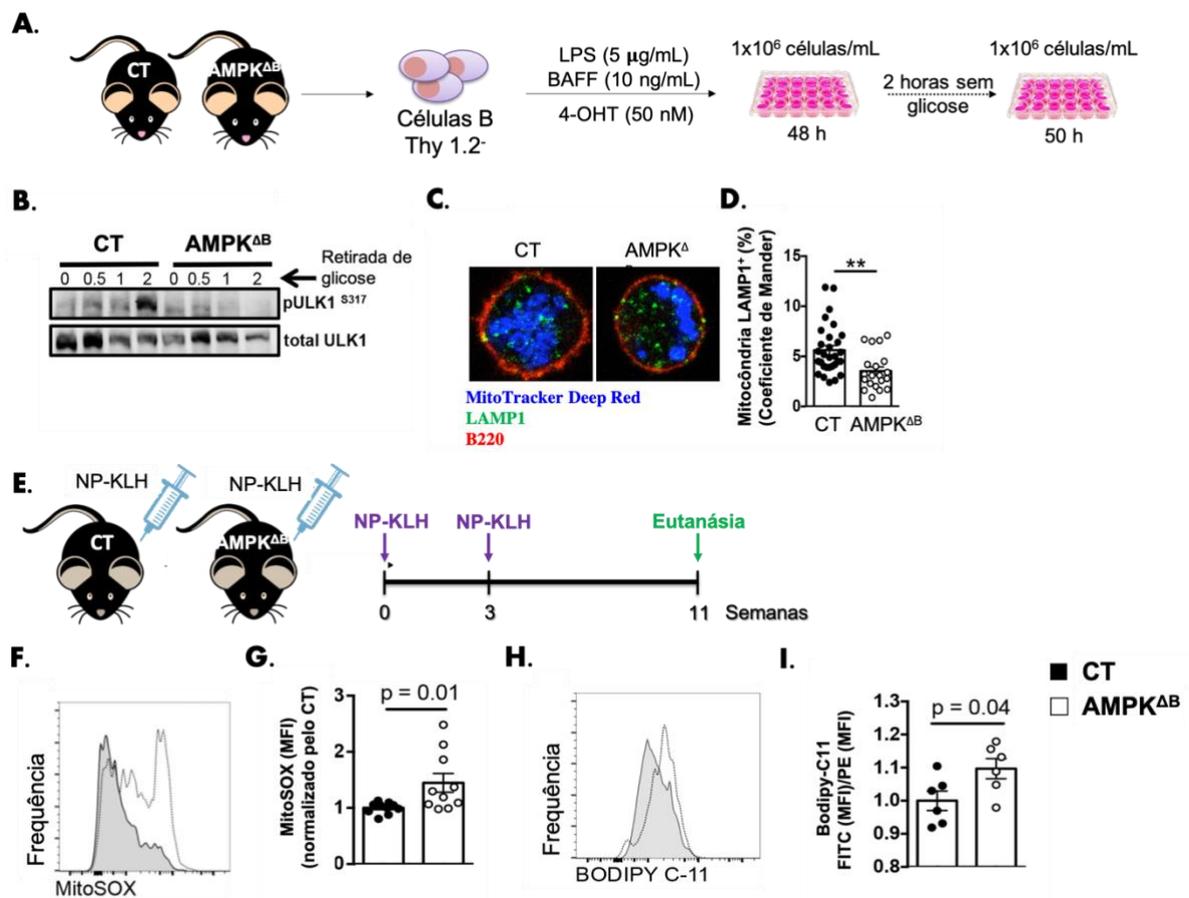
**Figura 19. Rede de interação proteica relacionada a via de sinalização de AMPK.** Análise bioinformática com banco de dados de interações de proteínas previsíveis (STRING). As interações incluem associações físicas e funcionais. **A.** Relação das 20 proteínas mais relacionadas a via de sinalização de AMPK usando banco de dados KEGG. Número de nós: 21; número de arestas: 137; grau médio das arestas: 13; média do coeficiente de agrupamento local: 0,861; número esperado de arestas: 21; valor-p de enriquecimento de interação proteína-proteína  $<1 \times 10^{-16}$ .

#### 4.12. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA MITOFAGIA DAS CÉLULAS B

Os resultados da análise *in silico* levaram à hipótese de que a função mitocondrial prejudicada observada em células AMPK<sup>ΔB</sup> poderia também ser decorrente da deficiência no processo de mitofagia que, por sua vez, poderia comprometer a longevidade celular. De fato, células AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com LPS por 48 horas e deixadas em meio de cultura sem glicose por 2 horas para permitir ativação de AMPK, tiveram menor ativação da

proteína ULK1 (Figuras 20A-B). Após AMPK fosforilar ULK1, esta proteína migra para a mitocôndria e ativa uma cascata de sinalização que culmina em sua fusão com lisossomos. Para testar se esse processo estava prejudicado em células AMPK<sup>ΔB</sup>, foi realizada a colocalização de mitocôndria e LAMP1, um marcador lisossomal que, se associado à mitocôndria, indica a formação de mitofagossomos. Corroborando os resultados anteriores, células AMPK<sup>ΔB</sup> apresentaram menor sobreposição de LAMP1 em mitocôndrias, inferindo uma menor atividade mitofágica nestas células (Figuras 20C-D).

A deficiência de processos de mitofagia leva ao acúmulo de mitocôndrias com funções prejudicadas que, por sua vez, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e podem induzir morte celular por diversos mecanismos, incluindo peroxidação lipídica. Para verificar esta hipótese, camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> foram imunizados com NP-KLH, novamente imunizados após 3 semanas e sacrificados 8 semanas após a última imunização (Figura 20E). De fato, células B<sub>MEM</sub> (que também tem função mitocondrial prejudicada) obtidas de camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> tiveram maior produção de ROS mitocondrial e maior peroxidação lipídica que células B<sub>MEM</sub> de camundongos controle (Figuras 20F-I). É importante ressaltar que os gráficos apresentados na Figura 19 foram intencionalmente apresentados em seus formatos originais (com legendas adaptadas) do artigo científico publicado em colaboração com o grupo do Prof. Mark R. Boothby (BROOKENS et al., 2020a). Os resultados aqui apresentados foram obtidos pela primeira autora do estudo Shawna K. Brookens com colaboração do autor desse trabalho aqui apresentado, como pode ser verificado no item 10.1.



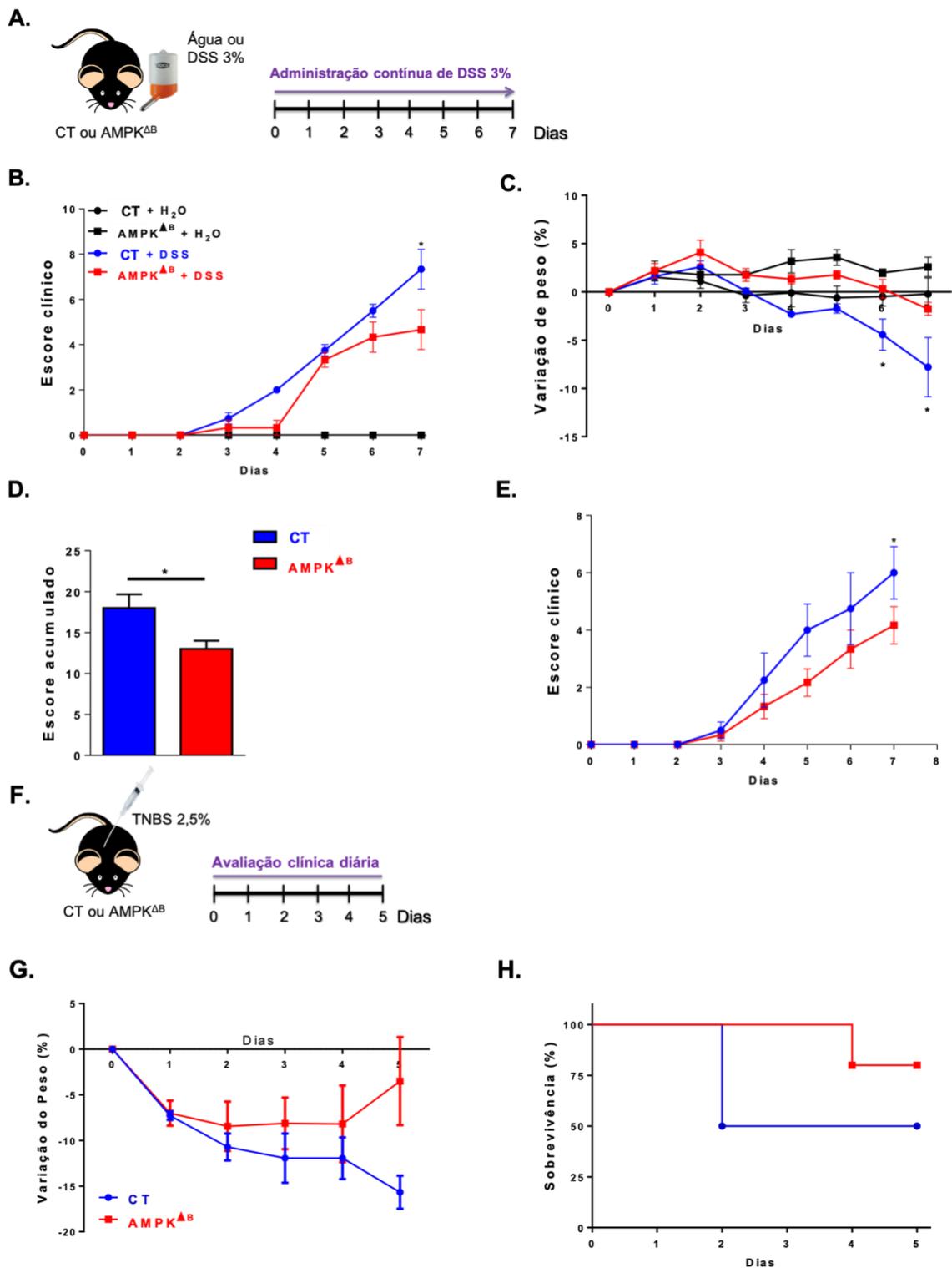
**Figura 20. Avaliação do papel de AMPK na ativação na autofagia de células B estimuladas com LPS e na peroxidação lipídica de células B de camundongos imunizados.** **A.** Células B Thy1.2<sup>-</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram estimuladas com 5 μg/mL de LPS, 10 ng/mL de BAFF e 50 nM de 4-OHT e, então, cultivadas por 48 horas em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL. Alternativamente (seta pontilhada), as células B foram estimuladas sob mesmas condições e deixadas em meio de cultura sem glicose por 2 horas antes das análises. **B.** ULK fosforilada na serina 317 em células B CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> após estímulo com LPS seguido de privação de glicose por 2 horas. **C-D.** Colocalização por imagem (C) e quantificação (D) de mitocôndria LAMP1<sup>+</sup> em células B. MitoTracker Deep Red pode ser observado em azul, LAMP1 em verde e B220 em vermelho. Aumento da imagem: 100x. **E.** Camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> foram imunizados com 100 μg de NP-KLH diluído em Alum, i.p., no dia 0 e receberam uma nova aplicação após 3 semanas. Finalmente, os camundongos foram sacrificados 11 semanas após a primeira imunização para a realização dos experimentos. **F-G.** Frequência (F) e MFI normalizado pelo CT (G) de mitoSOX como medida da produção de ROS mitocondrial em células CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> estimuladas com LPS. **H-I.** Frequência (H) e MFI normalizado pelo CT (I) de BODIPY 581/591 C11, como resultado da peroxidação lipídica. Estes dados são representativos de 2 experimentos independentes. n=3-4 animais por grupo. \*p<0,05. **4-OHT:** 4-hidroxitamoxifeno; **AMPK<sup>ΔB</sup>:** Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **CT:** controle; **i.p.:** intraperitoneal; **KLH:** hemocianina da lapa *keyhole*; **MFI:** média de intensidade de fluorescência; **NP:** 4-hidroxi-3-nitrofenil. #Os gráficos dessa figura foram intencionalmente apresentados em seus formatos originais com legendas adaptadas do artigo científico publicado em colaboração com o grupo do Prof. Mark R. Boothby (BROOKENS et al., 2020a). Os resultados aqui apresentados foram obtidos pela primeira autora do estudo Shawna K. Brookens com colaboração do autor desse trabalho aqui apresentado, como pode ser verificado no item 10.1.

#### 4.13. AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL AGUDA EM CAMUNDONGOS AMPK<sup>ΔB</sup>

Em seguida, foi questionado se as modificações funcionais induzidas pela ausência de AMPK em células B seriam suficientes para alterar o curso clínico de doenças inflamatórias. O ambiente intestinal é rico em bactérias pertencentes à microbiota indígena e o hospedeiro é constantemente desafiado por estes e outros microorganismos oportunistas. Células B no intestino apresentam papel primordial na regulação e proteção contra infecções, principalmente por secretarem grandes quantidades de IgA após diferenciarem-se em plasmócitos. Desse modo, foi investigado se o curso clínico da colite experimental poderia ser modificado em animais AMPK<sup>ΔB</sup>.

Para isso, camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> receberam água de beber contendo 3% de DSS por 7 dias para a indução da doença aguda (Figura 21A). De modo interessante, camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> apresentaram menor escore clínico e praticamente não perderam peso durante o período de exposição ao DSS, diferentemente dos animais CT (Figuras 21B-D). Uma vez que a responsividade ao modelo químico de colite experimental induzido por DSS pode ser diferente entre machos e fêmeas (BABICKOVA et al., 2015), camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> fêmeas foram avaliados e também foram protegidos da doença (Figura 21E).

Em seguida, para verificar se os resultados observados foram dependentes do modelo experimental utilizado, camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> machos foram induzidos à colite pelo método do TNBS (também químico) e tiveram menor perda de peso, melhor recuperação e melhor taxa de sobrevivência, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas pelo baixo número de amostras (Figuras 21F-H). Em conjunto, esses resultados mostram que a alteração fisiológica de células B induzida pela ausência de AMPK melhorou o curso da colite experimental aguda.

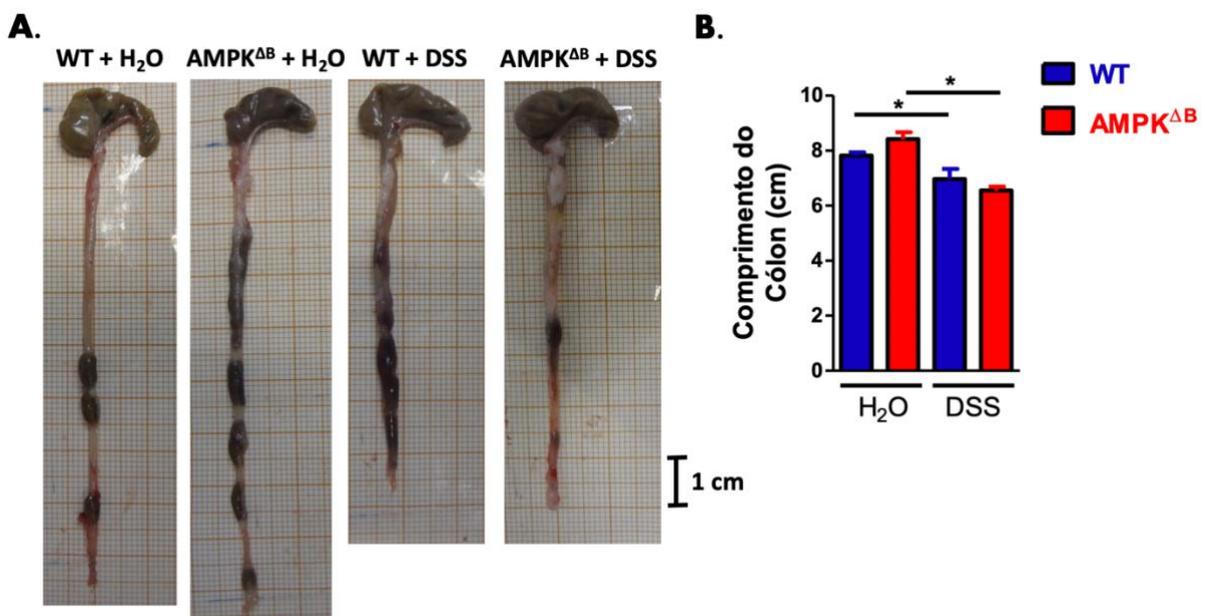


**Figura 21. Avaliação clínica de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS ou TNBS.** **A.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> machos foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. **B.** Escore clínico foi determinado a partir dos sinais clínicos (consistência das fezes, presença/ausência de sangue e perda de peso) que receberam pontuações seguindo os critérios descritos na Tabela 3. **C.** A variação de peso foi calculada em relação ao peso observado no primeiro dia de exposição ao DSS. **D.** O escore acumulado corresponde a soma do escore clínico nos sete dias de exposição ao DSS. **E.** Análise do escore clínico de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> fêmeas submetidas à colite experimental por DSS conforme protocolo descrito anteriormente. **F.**

Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> machos foram deixados em jejum *overnight* e, então, 100 μL de uma solução de TNBS 2,5% em etanol foi administrada em dose única por via retal com auxílio de um cateter de 1,2 mm de diâmetro acoplado à uma seringa. Em seguida, os animais foram avaliados diariamente quanto a perda de peso e sobrevida por 5 dias. **G-H.** Variação de peso (G) e sobrevida (H) de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental por TNBS. A variação de peso foi calculada em relação ao peso observado no primeiro dia de exposição ao TNBS. Estes dados são representativos de 1-3 experimentos. n=3-6 animais por grupo. \*p<0,05. AMPK<sup>ΔB</sup>: camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; CT: controle; DSS: dextran sulfato de sódio; TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico.

#### 4.14. AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DO INTESTINO GROSSO EM CAMUNDONGOS AMPK<sup>ΔB</sup> SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA

Está bem estabelecido na literatura que a colite experimental induzida por DSS pode causar o encurtamento do cólon (Kim, Shajib et al. 2012). Sendo assim, procurou-se avaliar se a proteção observada nos animais AMPK<sup>ΔB</sup> preveniu essa característica clínica. Entretanto, não houve diferenças entre os respectivos grupos que receberam água e DSS, embora ambos os grupos expostos ao DSS tenham apresentado o encurtamento significativo do órgão (Figuras 22A-B).

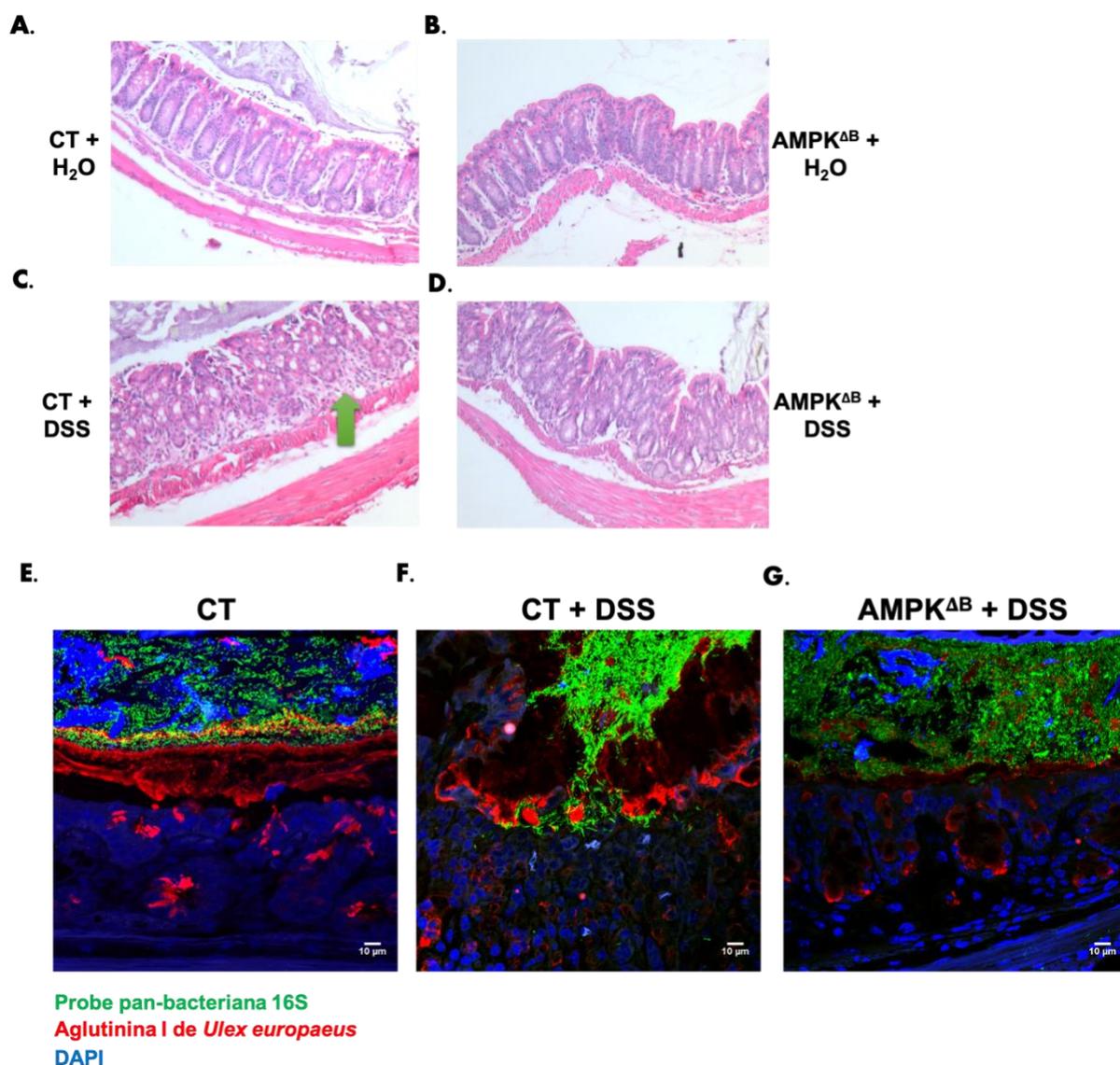


**Figura 22. Análise do comprimento do cólon de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. **A.** Imagens representativas dos cólons de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis e submetidos à colite experimental por DSS. As análises foram realizadas por um *software* apropriado (ImageJ) e o ceco não foi considerado na avaliação. **B.** Comprimento médio dos fragmentos intestinais em centímetros (cm). Estes dados são representativos de dois experimentos independentes. n=3-5 por grupo. AMPK<sup>ΔB</sup>: camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; CT: controle; DSS: dextran sulfato de sódio.

#### 4.15. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CAMUNDONGOS AMPK<sup>ΔB</sup> SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA

A arquitetura intestinal dos animais CT e AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis mostrou revestimento epitelial normal, com presença de criptas dispostas em formas retas e paralelas (Figuras 23A-B). Já os camundongos CT expostos ao DSS apresentaram áreas com ausência de criptas no cólon e com áreas de mucosa preservadas (Figura 23C). Adicionalmente, o epitélio superficial mostrou-se irregular e achatado, e a mucosa apresentou aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria. De modo interessante, camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> expostos ao DSS mostraram maior preservação da arquitetura intestinal e menor número de focos de hiperplasia na lâmina própria (Figura 23D).

As análises morfométricas do epitélio intestinal de camundongos CT saudáveis pela técnica de FISH também mostraram que a arquitetura do cólon estava preservada, com células epiteliais (azul) bem dispostas e eubactérias (verde) separadas do epitélio intestinal por uma camada de muco (vermelho) (Figura 23E). Células produtoras de muco (células caliciformes) também puderam ser observadas no epitélio intestinal. De modo interessante, o cólon de animais CT submetidos à colite experimental perdeu as características anatômicas naturais, apresentando contato direto entre as bactérias e o epitélio intestinal, com focos de suposta invasão bacteriana na lâmina própria que, por sua vez, contribuiu para inflamação exacerbada e mau prognóstico da doença (Figura 23F). Por sua vez, camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> mostraram epitélio mais preservado, com diminuição da produção de muco sem focos de invasão bacteriana na lâmina própria (Figura 23G). Assim, animais AMPK<sup>ΔB</sup> doentes apresentaram maior preservação das características naturais do epitélio intestinal, confirmando a melhora clínica encontradas anteriormente.

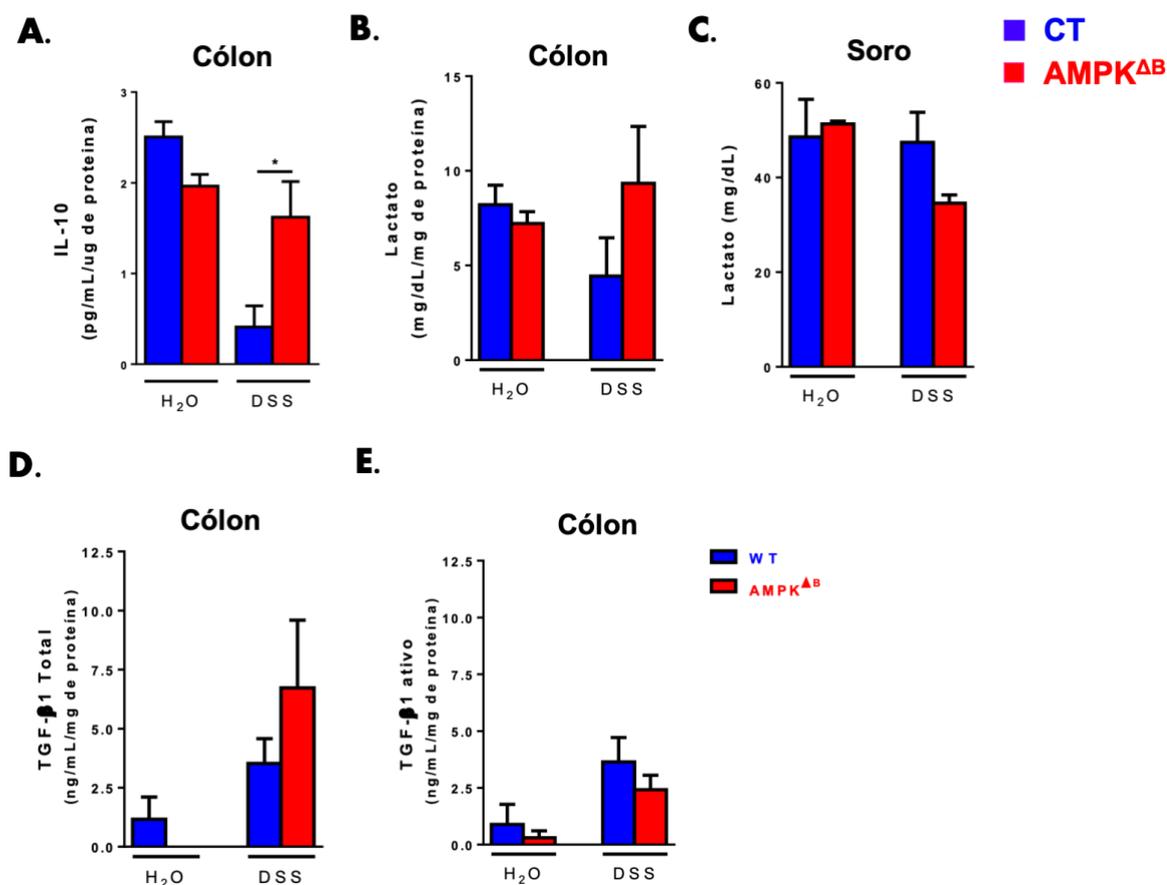


**Figura 23. Análise histopatológica do cólon de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. **A-D.** Os animais foram avaliados quanto à arquitetura e ao processo inflamatório encontrados nos tecidos. Animais CT (A) e AMPK<sup>ΔB</sup> (B) saudáveis apresentaram epitélio regular e criptas uniformes. Já os animais CT + DSS (C) apresentaram epitélio irregular com depleção acentuada de criptas comparados aos animais AMPK<sup>ΔB</sup> + DSS (D). A seta verde aponta focos de hiperplasticidade na lâmina própria. Fotomicrografias obtidas com objetiva de 20x. **E-G.** Avaliação da arquitetura intestinal através da marcação do núcleo predominantemente de células epiteliais (DAPI – azul), presença e localização de bactérias (Probe pan-bacteriana 16S; verde) e presença de muco/células produtoras de muco (aglutinina I de *Ulex europaeus*; vermelho) através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). **E.** Arquitetura normal do cólon de camundongo CT saudável. **F.** Ausência de muco separando bactérias e epitélio, promovendo contato íntimo direto entre bactérias e epitélio intestinal, com focos de infiltração na lâmina própria. **G.** Diminuição da produção de muco e proximidade das bactérias ao epitélio intestinal, mas sem focos de invasão ou danos à arquitetura epitelial. As fotomicrografias foram obtidas com objetiva de 40x. Estes dados são representativos de um experimento. n=3-5 animais por grupo. AMPK<sup>ΔB</sup>: camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; CT: controle; DSS: dextran sulfato de sódio.

#### 4.16. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E DE LACTATO EM CAMUNDONGOS AMPK<sup>ΔB</sup> SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA

Nossos estudos *in vitro* sugeriram que células AMPK<sup>ΔB</sup> possuem um perfil de ativação maior do que células B CT. Desta forma, esperava-se que células imunes mais ativadas levassem a respostas inflamatórias mais exacerbadas, o que seria um efeito indesejado nas DII. Assim, mecanismos reguladores tornam-se importantes candidatos para explicar a proteção observada em camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite. Uma vez que as células AMPK<sup>ΔB</sup> produziram mais IL-10 e lactato *in vitro* e que ambos os mediadores possuem atividades anti-inflamatórias, foi investigado se suas concentrações estariam alteradas no intestino e/ou na circulação destes camundongos.

De modo interessante, observou-se um aumento nas quantidades de IL-10 e lactato no homogenato de cólon de camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> doentes, enquanto nenhuma diferença foi observada na concentração de lactato circulante (Figuras 24A-C). Já as concentrações da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  (total e ativa) não foram diferentes nos intestinos dos diferentes grupos experimentais, embora ambas as frações tenham aumentado em camundongos doentes comparados aos saudáveis (Figuras 24D-E). Em conjunto, esses resultados sugerem que mecanismos reguladores como aumento da síntese de IL-10 e de lactato podem contribuir para a proteção da colite experimental observada em camundongos AMPK<sup>Δ</sup>.

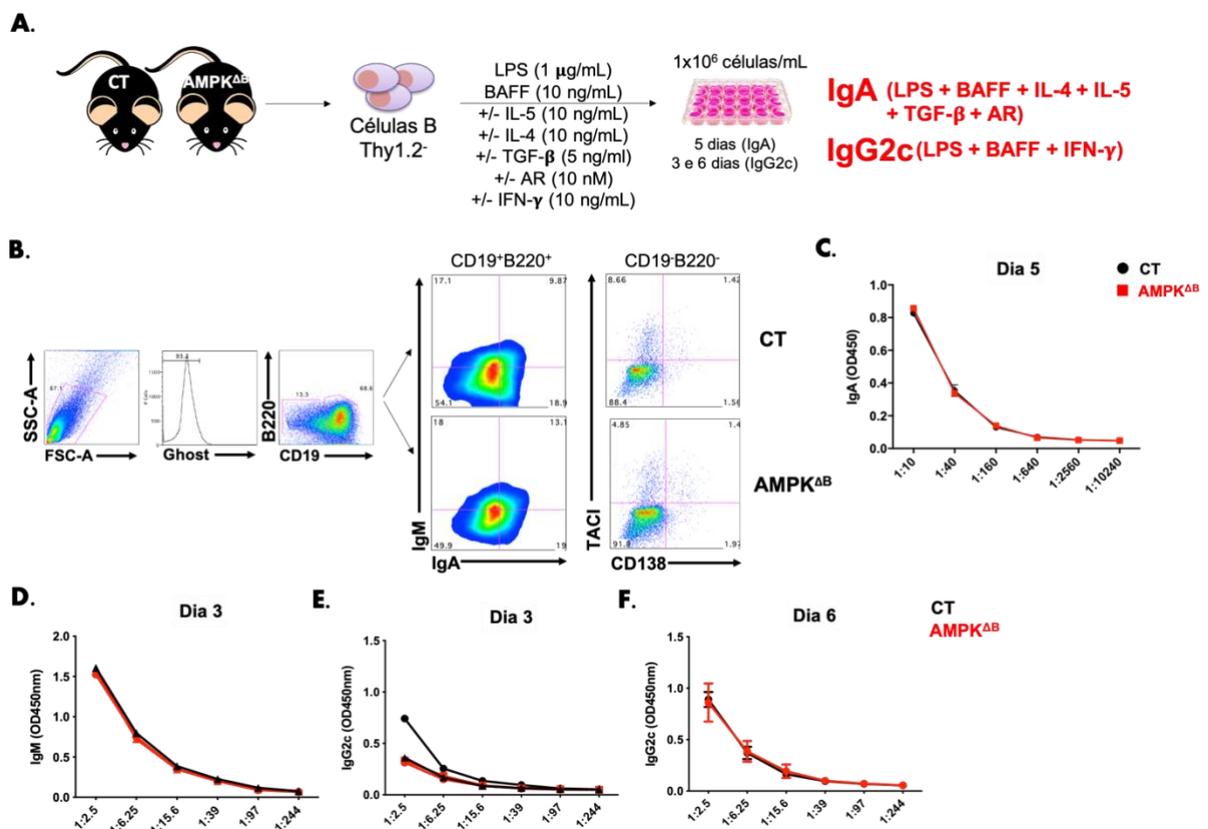


**Figura 24. Quantificação de mediadores anti-inflamatórios em camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. **A.** Determinação de IL-10 em homogenato de cólon dos camundongos saudáveis e doentes por ELISA. As concentrações de IL-10 foram corrigidas pela quantidade de proteínas presente nas amostras. **B-C.** Determinação das concentrações de lactato no cólon (B) e soro (C) dos respectivos camundongos saudáveis e doentes por uso de kit apropriado. A concentração de lactato no cólon foi corrigida pela quantidade de proteínas presente nas amostras. **D-E.** Determinação de TGF-β1 total (C) e ativo (D) em homogenato de cólon de camundongos saudáveis e doentes por ELISA. As concentrações de TGF-β1 foram corrigidas pela quantidade de proteínas presente nas amostras. Estes dados são representativos de um experimento. n=3-5 por grupo. **AMPK<sup>ΔB</sup>:** camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **CT:** controle; **DC:** doença de Crohn; **DII:** doenças inflamatórias intestinais; **DSS:** dextran sulfato de sódio; **mod.:** moderada; **UC:** colite ulcerativa.

#### 4.17. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMPK NA TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINA PARA IgA E IgG2c

Em seguida, foi investigado se AMPK regula a troca de classes de anticorpos para o isotipo IgA ou para o isotipo pró-inflamatório IgG2c. IgA é a imunoglobulina mais rica e essencial para a proteção de mucosas e seu aumento em células AMPK<sup>ΔB</sup> poderia sugerir um mecanismo adicional para a proteção observada nos camundongos submetidos à colite experimental aguda. Alternativamente, a diminuição da troca de isotipo para a

imunoglobulina pró-inflamatória IgG2c também poderia contribuir para esta proteção. Para esta avaliação, células B foram cultivadas em condições próprias para indução de troca de isotipo para IgA, contendo LPS, BAFF, IL-4, TGF- $\beta$  e AR ou para IgG2c, contendo LPS, BAFF e IFN- $\gamma$  (Figura 25A). Tanto a análise de imunofenotipagem quanto a quantificação em sobrenadante de cultura mostraram não haver diferenças na expressão/secreção de IgA entre os grupos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> (Figuras 25B-C). Do mesmo modo, a quantificação de IgM e IgG2c nos sobrenadantes de cultura não foram diferentes entre os grupos (Figuras 25D-F). Em conjunto, esses resultados mostraram que AMPK parece não regular a troca de classes de anticorpo para os isotipos IgA e IgG2c.

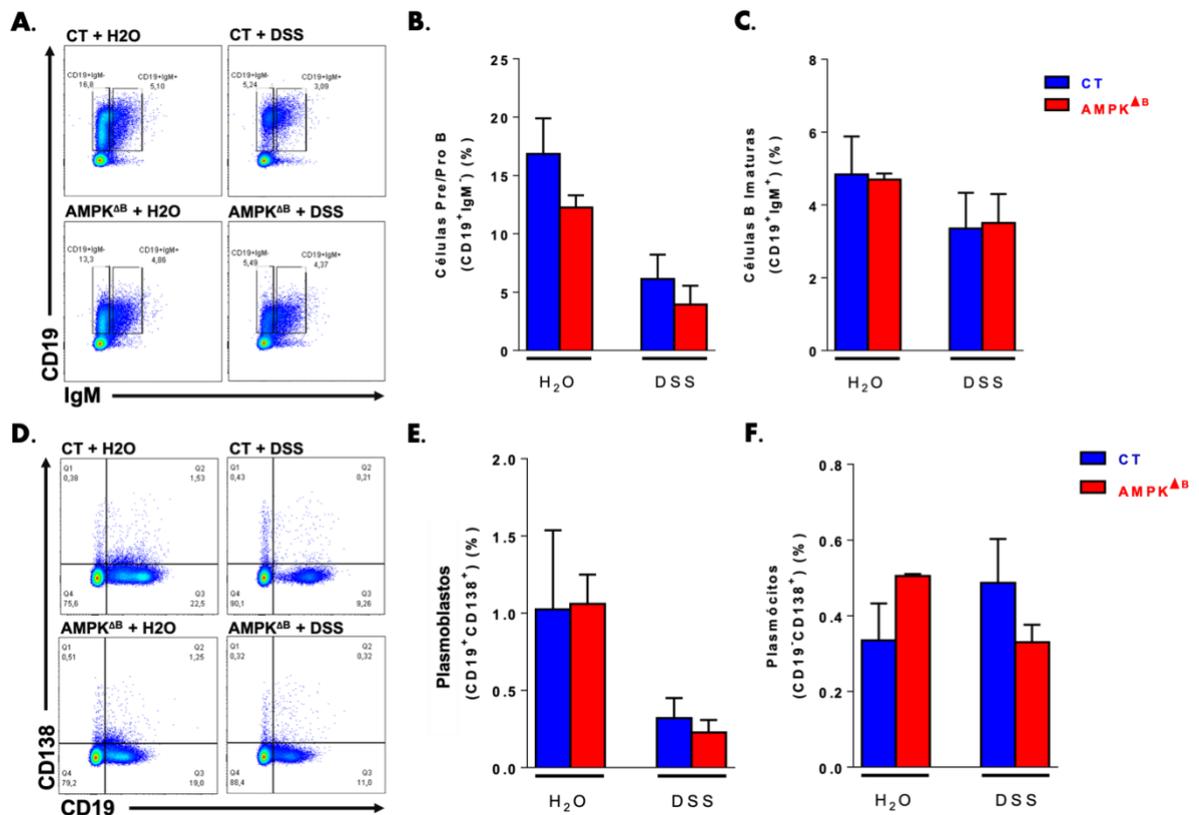


**Figura 25. Avaliação da capacidade de troca de classe de anticorpo para os isotipos IgA e IgG2c em células AMPK<sup>ΔB</sup>.** **A.** Células B CD19<sup>+</sup> esplênicas obtidas de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis foram cultivadas na presença de LPS (1  $\mu$ g/mL), BAFF (10 ng/mL), IL-5 (10 ng/mL), IL-4 (10 ng/mL), TGF- $\beta$  (5 ng/mL) e AR (10 nM) por 5 dias para indução de troca de classe de anticorpo para IgA. Alternativamente, células B foram cultivadas na presença de LPS (1  $\mu$ g/mL), BAFF (10 ng/mL), IL-5 (10 ng/mL) e IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) por 6 dias para indução de troca de classe de anticorpo para IgG2c (pró-inflamatório). **B.** Frequência (%) de células B IgA<sup>+</sup> e de plasmócitos (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup>). As gates foram posicionadas de acordo com o controle negativo (sem a presença de IL-4, TGF- $\beta$  e ácido retinoico). **C.** Quantificação de IgA no sobrenadante de cultura celular por ELISA após 5 dias. **D-F.** Quantificação de IgM (D) e IgG2c no sobrenadante de cultura celular nos dias 3 (E) e 6 (F) em condições indutoras de troca de classe de anticorpo para IgG2c. Estes dados são representativos de 2 experimentos. n= 1 animal com triplicatas técnicas ou 3

animais por grupo. \* $p < 0,05$ . **AMPK<sup>ΔB</sup>**: Células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **AR**: ácido retinoico; **CT**: controle.

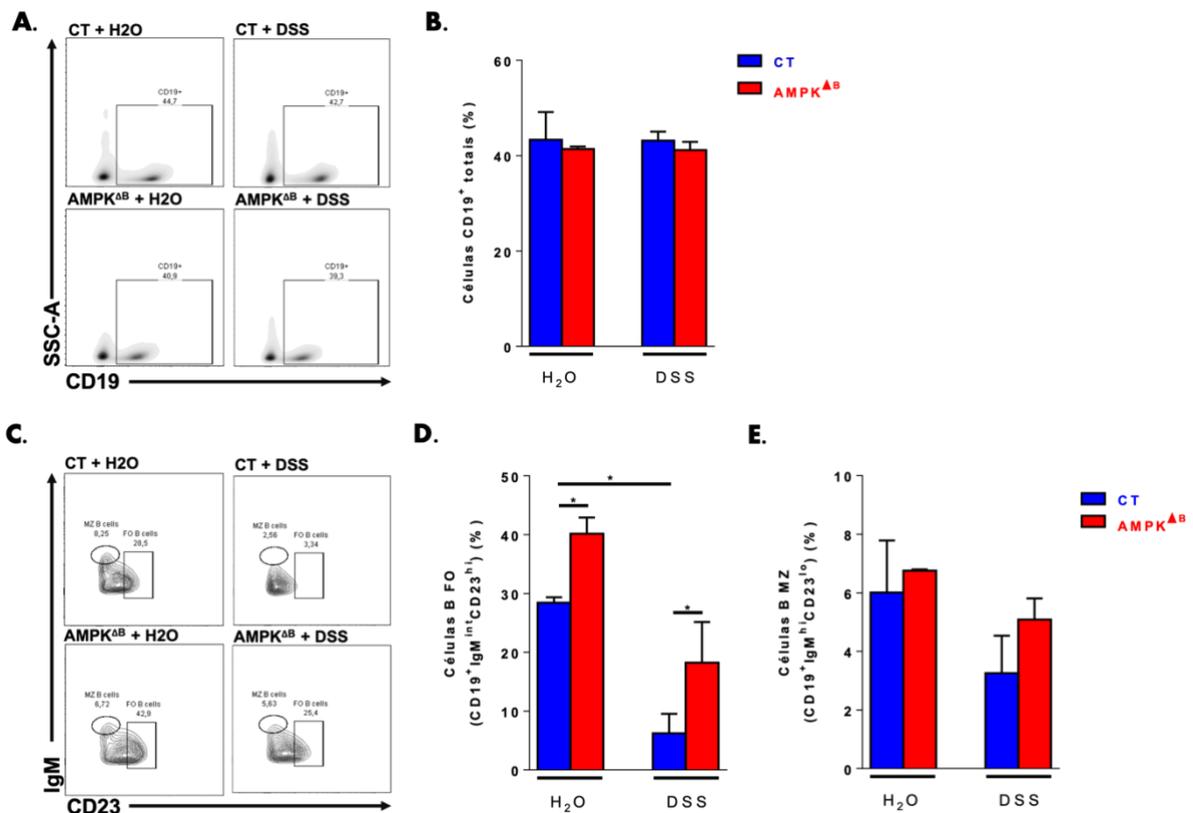
#### **4.18. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B NOS DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS AMPK<sup>ΔB</sup> SAUDÁVEIS E SUBMETIDOS À COLITE EXPERIMENTAL AGUDA**

Em seguida, foi investigado se animais AMPK<sup>ΔB</sup> teriam impacto no desenvolvimento de subpopulações de células B e como estariam as suas respectivas distribuições nos diferentes tecidos após a indução da colite experimental. As análises das frequências celulares em animais CT e AMPK<sup>ΔB</sup>, saudáveis ou expostos ao DSS, mostraram não haver diferenças significativas nas subpopulações de células Pre/Pro B e de células B imaturas na medula óssea, embora a frequência de células Pre/Pro B tenha diminuído nos camundongos doentes comparados aos saudáveis (Figuras 26A-C). Além disso, ambas as populações de plasmoblastos e plasmócitos não foram afetadas pela deleção de AMPK ou pela indução da colite experimental (Figuras 26D-F). É importante ressaltar que não houve diferença no número absoluto de células na medula óssea entre animais CT e AMPK<sup>ΔB</sup> (dados não mostrados).



**Figura 26. Imunofenotipagem de células B na medula óssea de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. Para a análise, as células foram inicialmente separadas por tamanho e granulosidade e, posteriormente, foram realizadas seleções (*gates*) sequenciais de *singlets* e de células vivas com auxílio de marcador de viabilidade fluorescente. As frequências foram determinadas pela porcentagem dentro da *gate* das subpopulações avaliadas. **A-C.** Estratégia de *gate* e frequência (%) de células Pré/Pró B (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) e células B imaturas (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>). **D-F.** Estratégia de *gate* e frequência (%) de plasmoblastos (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) e plasmócitos (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>). Estes dados são representativos de um experimento. n=3-5 animais por grupo. **AMPK<sup>ΔB</sup>:** camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **CT:** controle; **DSS:** dextran sulfato de sódio.

Já na análise das subpopulações de células B periféricas do baço, não houve diferença na frequência de células B totais entre os camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> (Figuras 27A-B). No entanto, animais AMPK<sup>ΔB</sup> tiveram maior frequência de células B FO nos animais saudáveis que, apesar de diminuir após a indução da doença, ainda permaneceu maior que a encontrada no grupo CT (Figuras 27C-D). Não foram observadas alterações nas frequências de células B MZ entre os grupos estudados (Figuras 27 C, E). É importante ressaltar que não foi encontrada diferença no número absoluto de esplenócitos entre animais CT e AMPK<sup>ΔB</sup> (dados não mostrados).

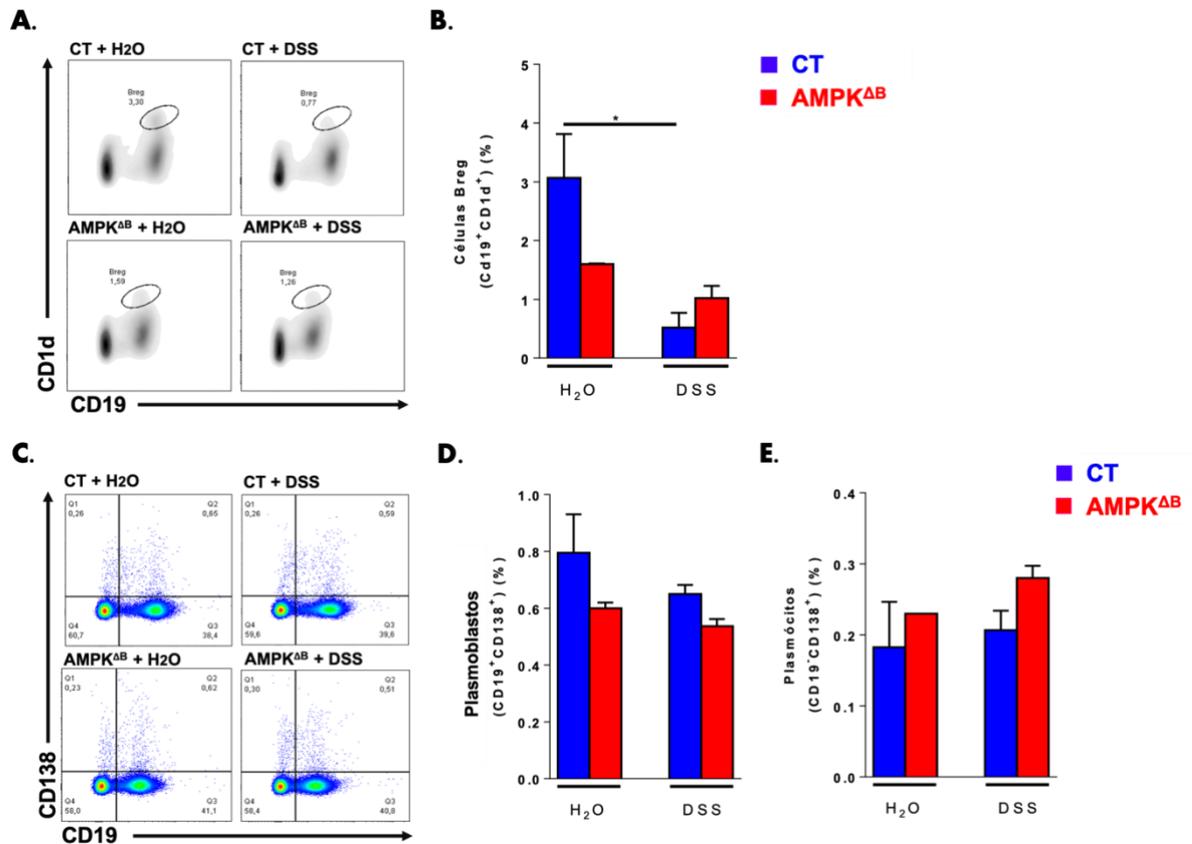


**Figura 27. Imunofenotipagem de células B no baço de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. Para a análise, as células foram inicialmente separadas por tamanho e granulosidade e, posteriormente, foram realizadas seleções (*gates*) sequenciais de *singlets* e de células vivas com auxílio de marcador de viabilidade fluorescente. As frequências foram determinadas pela porcentagem dentro da *gate* das subpopulações avaliadas. **A-B.** Estratégia de *gate* e frequência (%) de células B totais (CD19<sup>+</sup>). **C-E.** Estratégia de *gate* e frequência (%) de células B FO (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>int</sup>CD23<sup>hi</sup>) e da MZ (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>CD23<sup>lo</sup>). Estes dados são representativos de um experimento. n=3-5 animais por grupo. \*p<0,05. AMPK<sup>ΔB</sup>: camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; CT: controle; DSS: dextran sulfato de sódio; FO: foliculares; ZM: zona marginal.

Considerando a frequência de células Bregs, camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> saudáveis tiveram menor frequência que camundongos CT (Figuras 28A-B). No entanto, após a indução de colite, enquanto a frequência de células Bregs diminuiu em animais CT, a frequência permanece praticamente inalterada em camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> que, por sua vez, é maior do que aquela encontrada nos camundongos CT doentes.

Além disso, não houve diferença nas frequências de plasmócitos e plasmoblastos no baço de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup>, saudáveis ou doentes (Figuras 28C-E). Portanto, o aumento observado na frequência de células B FO no baço de animais AMPK<sup>ΔB</sup>,

principais subtipos celulares que se diferenciam em blastos, plasmócitos e células B<sub>MEM</sub>, não afetou a frequência dessas populações.

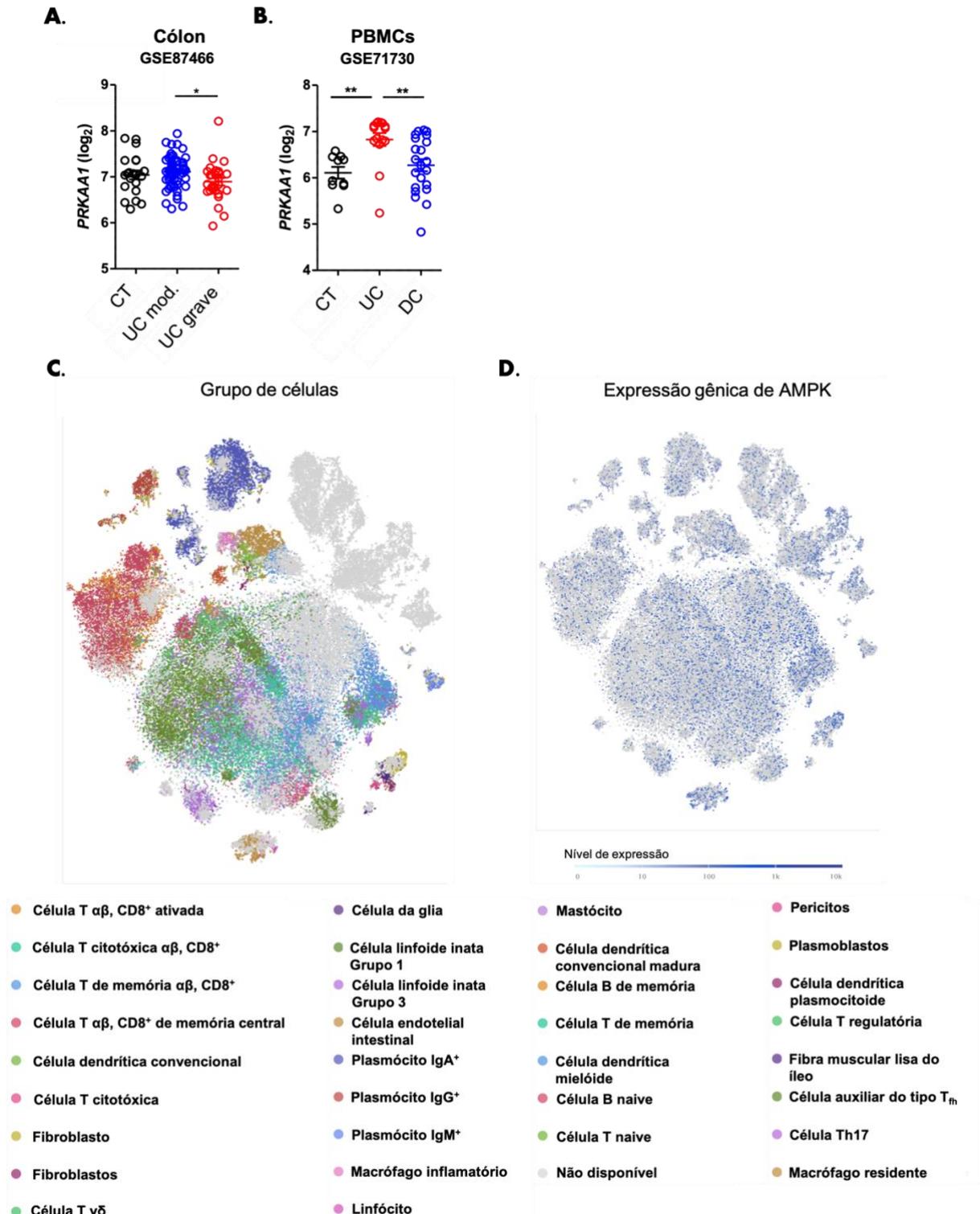


**Figura 28.** Imunofenotipagem de células B no baço de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS. Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. Para a análise, as células foram inicialmente separadas por tamanho e granulosidade e, posteriormente, foram realizadas seleções (*gates*) sequenciais de *singlets* e de células vivas com auxílio de marcador de viabilidade fluorescente. As frequências foram determinadas pela porcentagem dentro da *gate* das subpopulações avaliadas. **A-B.** Estratégia de *gate* e frequência (%) de células Breg (CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>). **C-E.** Estratégia de *gate* e frequência (%) de plasmoblastos (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) e plasmócitos (CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>). Estes dados são representativos de um experimento. n=3-5 animais por grupo. \*p<0,05. AMPK<sup>ΔB</sup>: camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **Breg**: células B reguladoras; **CT**: controle; **DSS**: dextran sulfato de sódio.

#### 4.19. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AMPK EM PBMCS E EM CÉLULAS OBTIDAS DAS LESÕES DE CÓLON DE PACIENTES COM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Análises *in silico* usando bancos de dados GEO mostraram que a expressão de AMPK total não é diferente no cólon de humanos saudáveis e pacientes com diferentes formas de UC (Figura 29A). Entretanto, a expressão de AMPK está aumentada em PBMCS

circulantes de pacientes com UC e levemente aumentada em pacientes com DC (Figura 29B).



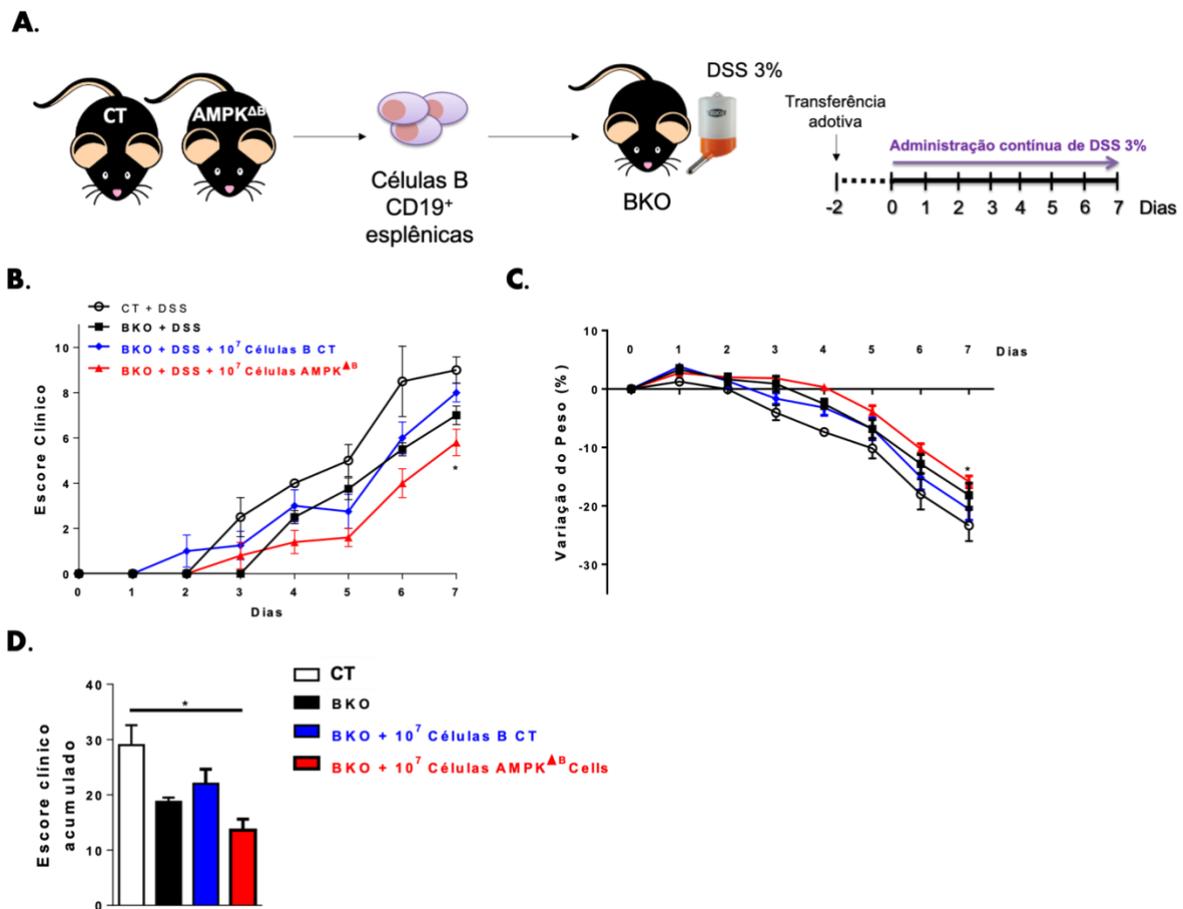
**Figura 29. Expressão de AMPK em células de lesões de cólon e PBMCs de pacientes com DII.** **A.** Meta-análise do gene PRKAA1 (AMPK) no contexto de diferentes estágios da UC (moderada e grave). Expressão dos respectivos genes no colon de humanos saudáveis e doentes (Banco de dados: GSE87466). **B.** Meta-análise do gene PRKAA1 (AMPK) no contexto das DII (UC e DC).

Expressão dos respectivos genes em PBMCs de humanos saudáveis e doentes (Banco de dados: GSE71730). **C-D.** Análise bioinformática realizada com dados de sequenciamento de RNA de células individuais (scRNAseq) de pacientes com UC. As análises foram feitas pelo *software* do Single Cell Expression Atlas (banco de dados número ERP109332). São mostrados os agrupamentos de células do sistema immune e seus subtipo (C) e o nível de expressão de AMPK nas células correspondentes em C (D). Quanto maior a densidade de cor azul, maior a expressão de AMPK no respectivo tipo celular correspondente. **UC:** colite ulcerativa.

As análises de dados de sequenciamento de RNA de células individuais (scRNAseq) obtidas de lesões de cólon de pacientes com UC mostraram que AMPK está expresso em diversos subtipos de células imunes e não imunes (Figuras 29C-D). As populações celulares com maior expressão de AMPK incluíram as células T CD8<sup>+</sup>, células T<sub>FH</sub>, células T<sub>MEM</sub>, células Treg e DCs de origem mieloide (Figuras 29C-D). Considerando os subtipos de células B, foi observado que plasmócitos secretores de IgA e plasmoblastos foram as populações que mais expressaram AMPK no cólon de pacientes com UC (Figuras 29C-D).

#### **4.20. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS AMPK<sup>ΔB</sup> PARA CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM CÉLULAS B**

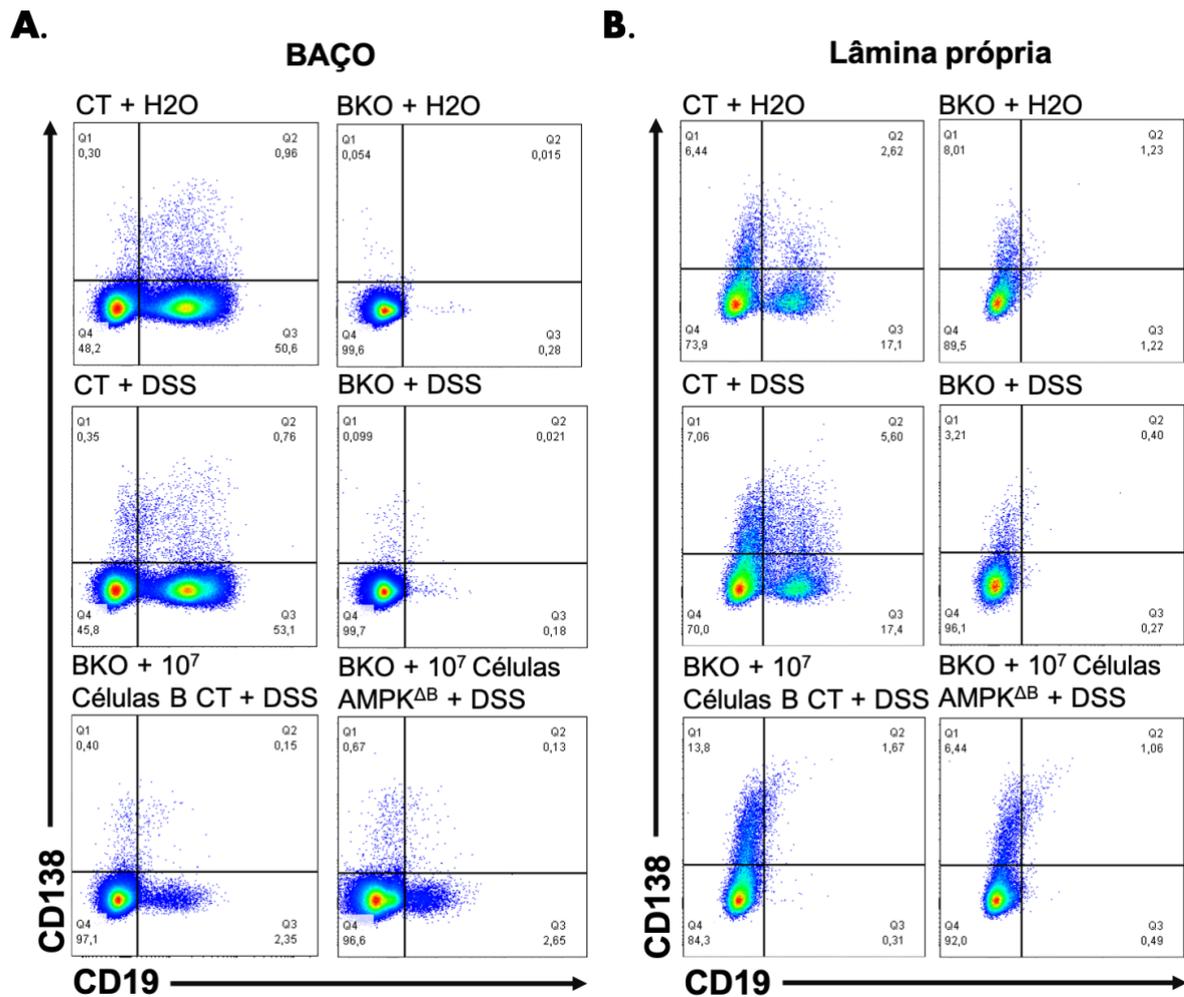
Para investigar se a melhora observada na colite experimental é resultado de alguma atividade mediada por células AMPK<sup>ΔB</sup> foi realizado um experimento de transferência adotiva de células B CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> para camundongos recipientes BKO. Dois dias após a transferência adotiva, os camundongos recipientes foram submetidos à colite experimental aguda por DSS (Figura 30A). Corroborando os resultados anteriores, os camundongos recipientes que receberam células AMPK<sup>ΔB</sup> apresentaram o melhor escore da doença e menor perda de peso durante o período em comparação aos animais que receberam células B CT, aos animais BKO e aos CT, embora a melhora tenha sido significativa apenas quando comparado ao grupo CT (Figuras 30B-D). Além disso, camundongos BKO doentes mostraram-se moderadamente melhores da doença quando comparados aos camundongos CT submetidos à colite experimental (Figuras 30B-D).



**Figura 30. Avaliação do curso da colite experimental aguda induzida por DSS em camundongos BKO adotivamente transferidos com células B CT e  $AMPK^{\Delta B}$ .** A. Animais BKO receberam adotivamente 10 milhões de células B de camundongos CT ou  $AMPK^{\Delta B}$  e, após 2 dias, foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. **B-D.** Escore clínico (B), variação de peso corporal (C) e escore clínico acumulado (D) no período de exposição ao DSS são mostrados. O escore clínico foi determinado a partir dos sinais clínicos (consistência das fezes, presença/ausência de sangue e perda de peso) que receberam pontuações seguindo os critérios descritos na Tabela 3. A variação de peso foi calculada em relação ao peso observado no primeiro dia de exposição ao DSS. O escore acumulado corresponde à soma do escore clínico nos sete dias de exposição ao DSS. Estes dados são representativos de um experimento.  $n=3-4$  animais por grupo.  $*p<0,05$ .  **$AMPK^{\Delta B}$ :** camundongos com células B  $CD19^+$  deficientes de AMPK; **BKO:** camundongo deficiente de células B; **CT:** controle; **DSS:** dextran sulfato de sódio.

Após o sétimo dia de exposição ao DSS no experimento de transferência adotiva de células B, os camundongos foram sacrificados e o baço e cólon retirados para verificar a distribuição de células B transferidas. Os resultados mostraram que os animais BKO recipientes tiveram o baço repopulado com células B, embora as frequências tenham sido bem menores que aquelas encontradas em camundongos CT (Figura 31A). Animais BKO recipientes apresentaram aumento na frequência de plasmócitos quando comparados aos animais do grupo BKO não repopulado, mas não foi observada diferença entre aqueles

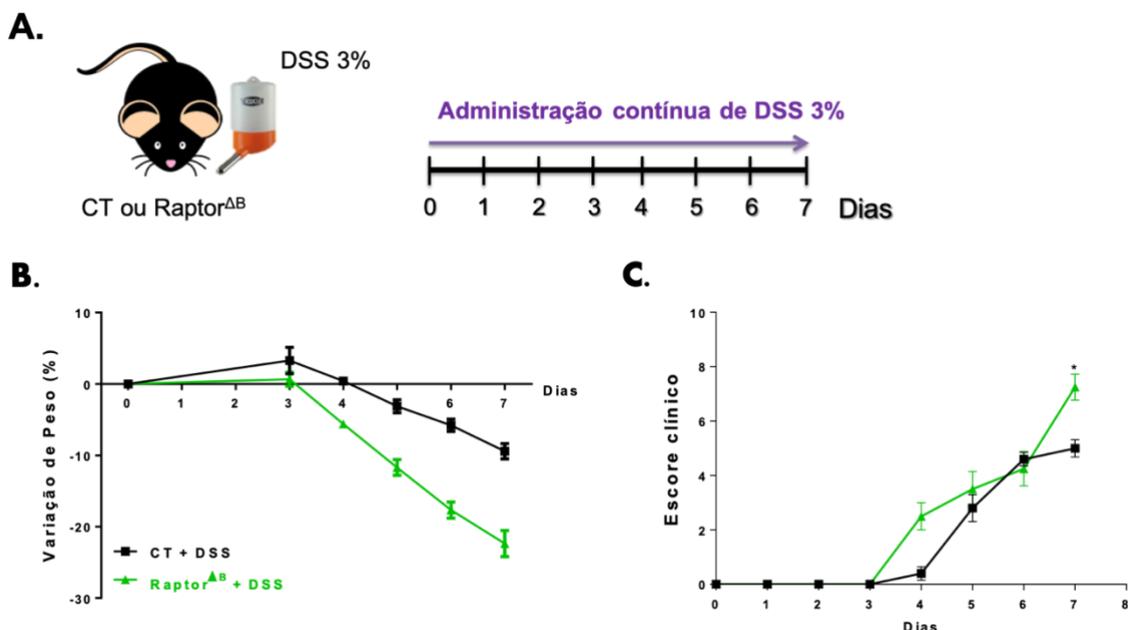
que receberam células B CT ou AMPK<sup>ΔB</sup>. A análise da lâmina própria mostrou que as células B CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> transferidas não foram capazes de alcançar/repopular o cólon dos animais BKO recipientes (Figura 31B), uma vez que estas células não expressam a integrina de *homing* intestinal  $\alpha 4\beta 7$ , sugerindo um possível efeito sistêmico e/ou indireto de células AMPK<sup>ΔB</sup> que causou a melhora do curso clínico da colite experimental.



**Figura 31. Recuperação das células B no estudo de transferência adotiva de células B CT e AMPK<sup>ΔB</sup> para camundongos BKO recipientes submetidos à colite experimental aguda por DSS.** Animais BKO receberam adotivamente 10 milhões de células B de camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> e, após 2 dias, foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. **A-B.** Frequência (%) de células B totais (CD19<sup>+</sup>) e ASCs (CD138<sup>+</sup>) no baço (A) e na lâmina própria (B). Estes dados são representativos de um experimento. n=3-4 animais por grupo. **AMPK<sup>ΔB</sup>:** camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **BKO:** camundongo deficiente de células B; **CT:** controle; **DSS:** dextran sulfato de sódio.

#### 4.21. AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL AGUDA EM CAMUNDONGOS RAPTOR<sup>ΔB</sup>

Uma vez que as alterações metabólicas e funcionais de células AMPK<sup>ΔB</sup> foram parcialmente relacionadas ao aumento da atividade de mTORC1, camundongos Raptor<sup>ΔB</sup> foram submetidos à colite experimental aguda por DSS para avaliar o curso da colite experimental. Camundongos Raptor<sup>ΔB</sup> tiveram pior curso clínico da doença quando comparados aos camundongos CT (Figuras 32A-C) e, desse modo, sugere-se que AMPK regula as funções de células B via mTORC1 e que modificações nessa via são capazes de alterar o curso da doença inflamatória intestinal experimental aguda.



**Figura 32. Avaliação clínica de camundongos CT ou Raptor<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda por DSS.** A. Camundongos CT ou Raptor<sup>ΔB</sup> machos foram submetidos à colite experimental pela adição de 3% de DSS na água de beber continuamente por 7 dias. B-C. Escore clínico (B) e variação de peso corporal (C) foram avaliados diariamente. O escore clínico foi determinado a partir dos sinais clínicos (consistência das fezes, presença/ausência de sangue e perda de peso) que receberam pontuações segundo a Tabela 3. A variação de peso foi calculada em relação ao peso observado no primeiro dia de exposição ao DSS. Estes dados são representativos de um experimento. n=3-5 animais por grupo. \*p<0,05. CT: controle; DSS: dextran sulfato de sódio; Raptor<sup>ΔB</sup>: camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de Raptor (mTORC1).

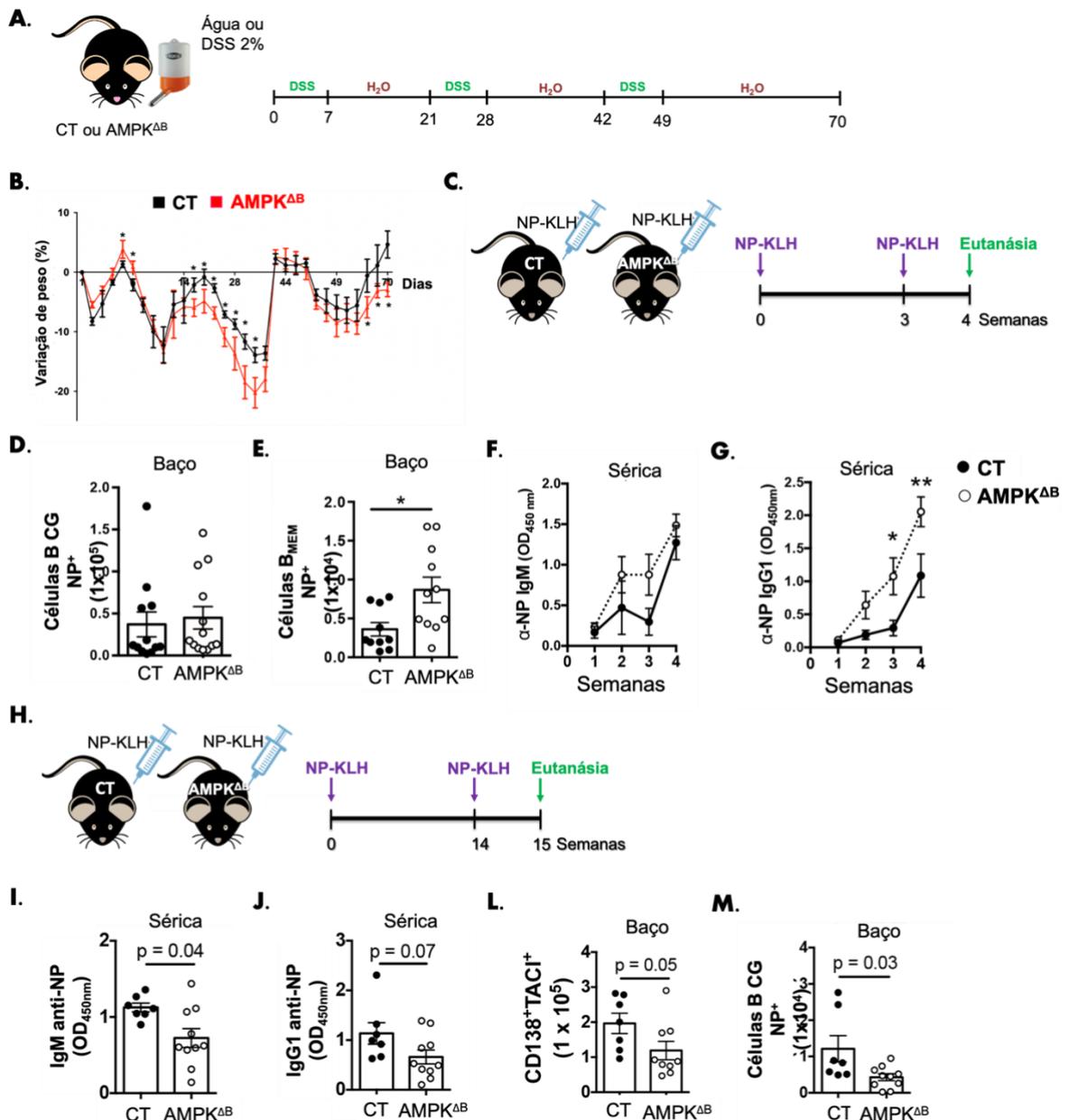
#### 4.22. AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA COLITE EXPERIMENTAL CRÔNICA E DOS EFEITOS DAS IMUNIZAÇÕES AGUDA E DE REDESAFIO ANTIGÊNICO EM CAMUNDONGOS AMPK<sup>ΔB</sup>

Uma vez que as células AMPK<sup>ΔB</sup> aumentam sua capacidade funcional logo após estimulação, mas aumentam a produção de ROS e peroxidação lipídica em células B obtidas de estágios tardios pós-imunização, foi investigado se os efeitos protetores observados em camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental aguda se manteria na doença crônica. Para isso, camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> receberam continuamente 2% de DSS adicionado a água de beber por 7 dias e, em seguida, receberam água de beber potável por mais 14 dias para permitir a recuperação. Posteriormente, novos ciclos de DSS-água-DSS-água de 7, 14, 7 e 21 dias, respectivamente, foram realizados, totalizando 70 dias de experimento (Figura 33A). Os resultados mostraram que, embora os camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> percam menos peso no primeiro ciclo de administração de DSS, eles perdem mais peso nos ciclos seguintes do que os camundongos CT (Figura 33B), sugerindo que a proteção da doença no modelo agudo de colite experimental não pode ser mantida por longos períodos.

Em seguida, foi investigado se as alterações fisiológicas de células AMPK<sup>ΔB</sup> poderiam também se estender para respostas a antígenos. Assim, para a avaliação da resposta secundária de curto prazo, camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> foram imunizados com 100 μg de NP-KLH i.p., receberam a mesma dose do imunizante 3 semanas após o primeiro desafio e foram sacrificados para a coleta das amostras uma semana após a última imunização, totalizando 4 semanas de experimento (Figura 33C). De modo interessante, as análises mostraram um aumento no número de células B CG<sup>+</sup> e de B<sub>MEM</sub>NP<sup>+</sup> no baço dos camundongos AMPK<sup>ΔB</sup>, bem como da concentração sérica de anticorpos IgM anti-NP (Figuras 33D-G). No entanto, após o re-desafio antigênico apenas 14 semanas após a primeira imunização (Figura 33H) causou a diminuição nas concentrações de anticorpos IgM e IgG anti-NP, no número de plasmócitos e no número de células B CG NP<sup>+</sup> no baço de camundongos AMPK<sup>ΔB</sup> (Figuras 33I-M).

Em conjunto, esses resultados mostraram que a deleção de AMPK em células B auxilia as respostas agudas nas doenças inflamatórias e à antígenos, mas é prejudicial em respostas de longo prazo. É importante ressaltar que os gráficos apresentados nas Figuras 33C-M foram intencionalmente apresentados em seus formatos originais com legendas

adaptadas do artigo científico publicado em colaboração com o grupo do Prof. Mark R. Boothby (BROOKENS et al., 2020a). Os resultados aqui apresentados foram obtidos pela primeira autora do estudo Shawna K. Brookens com colaboração do autor desse trabalho aqui apresentado, como pode ser verificado no item 10.1.



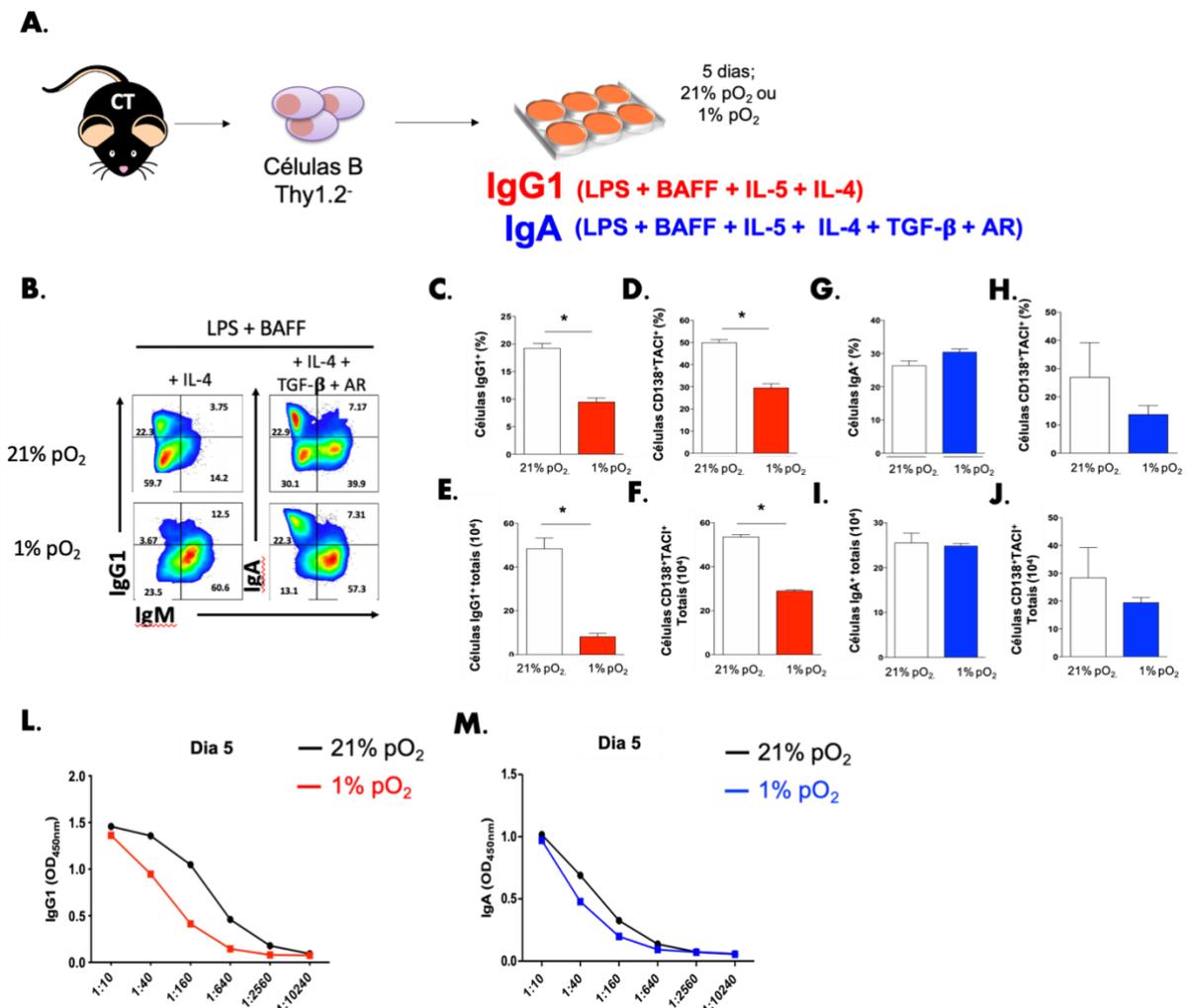
**Figura 33. Avaliação de camundongos CT e AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental crônica, à imunização primária e ao redesafio antigênico.** **A.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> receberam continuamente 2% de DSS adicionados a água de beber por 7 dias e, em seguida, receberam água de beber potável por mais 14 dias para permitir a recuperação. Posteriormente, novos ciclos de DSS-água-DSS-água de 7, 14, 7 e 21 dias, respectivamente, foram realizados, totalizando 70 dias de experimento. **B.** Variação de peso corporal foi avaliada diariamente e foi calculada em relação ao peso observado no primeiro dia de exposição ao DSS. **C.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> machos foram imunizados com 100 μg de NP-KLH diluído em Alum, i.p, receberam a mesma dose do imunizante 3 semanas após o primeiro desafio e foram sacrificados para coleta

das amostras uma semana após a última imunização, totalizando 4 semanas de experimento. **D-E.** Número absoluto de células B de CG NP<sup>+</sup> esplênicas (B220<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>NP<sup>+</sup>) (F) e de células B<sub>MEM</sub> esplênicas (B220<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>NP<sup>+</sup>) (E). **F-G.** Quantificação de IgM (F) e IgG (G) séricas específicas para NP por ELISA do experimento descrito no item C. **H.** Camundongos CT ou AMPK<sup>ΔB</sup> machos foram imunizados com 100 μg de NP-KLH diluído em Alum, i.p, imunizados novamente 14 semanas após a primeira injeção e sacrificados 1 semana após a nova imunização para a coleta das amostras. **I-J.** Quantificação de IgM (I) e IgG (J) séricas específicas para NP por ELISA do experimento descrito no item H. **L-M.** Número absoluto de plasmócitos esplênicos CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup> e células B de CG NP<sup>+</sup> (B220<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>NP<sup>+</sup>). Estes dados são representativos de até 4 experimentos independentes. n=5-9 animais por grupo. \*p<0,05. **AMPK<sup>ΔB</sup>:** camundongos com células B CD19<sup>+</sup> deficientes de AMPK; **B<sub>MEM</sub>:** células B de memória; **CG:** centro germinativo; **CT:** controle; **DSS:** dextran sulfato de sódio; **KLH:** hemocianina da lapa *keyhole*; **NP:** 4-hidroxi-3-nitrofenil. Os gráficos dessa figura foram intencionalmente apresentados em seus formatos originais com legendas adaptadas do artigo científico publicado em colaboração com o grupo do Prof. Mark R. Boothby (BROOKENS et al., 2020a). Os resultados aqui apresentados foram obtidos pela primeira autora do estudo Shawna K. Brookens com colaboração do autor desse trabalho aqui apresentado, como pode ser verificado no item 10.1.

#### 4.23. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPÓXIA SOBRE A TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINAS PARA IgG1 E IgA *IN VITRO*

Conforme descrito anteriormente, estudos demonstraram que as zonas claras dos CG são hipóxicas e que baixas pO<sub>2</sub> induzem alterações nas funções das células B, como a diminuição da proliferação, aumento da morte celular, comprometimento na troca de isotipos de imunoglobulinas tanto para IgG1 como para IgG2c, além de prejudicar respostas ao re-desafio antigênico (CHO et al., 2016). No entanto, a troca de classe de isotipo para IgA não foi prejudicada quando induzidas sob condições de hipóxia (CHO et al., 2016).

De fato, foi possível confirmar que a troca de isotipo de imunoglobulina para IgG1 em células B cultivadas sob condições de hipóxia é bastante prejudicada, enquanto nenhuma alteração foi observada para IgA (Figuras 34A-C, E, G-I). Além disso, os resultados também mostraram que tanto a frequência como o número de plasmócitos CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup>, além da secreção de IgG1, foram afetados pela hipóxia em condições indutoras de troca de isotipo para IgG1, mas nenhuma diferença significativa foi observada para IgA (Figuras 34D, F, H, J-M).

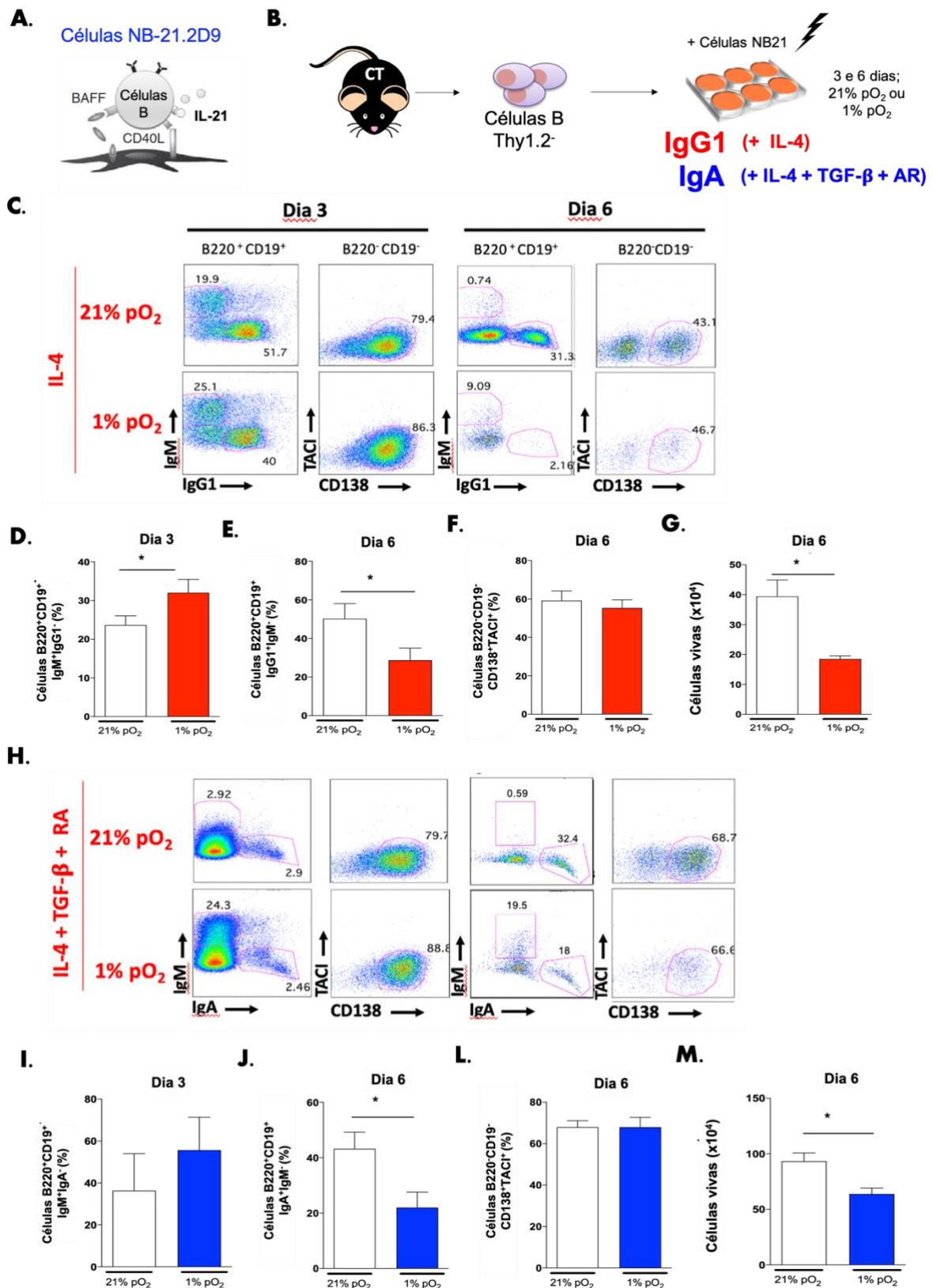


**Figura 34. Avaliação da hipóxia sobre a troca de classe de imunoglobulinas para IgG1 e IgA *in vitro*.** **A.** Células B Thy1.2- esplênicas obtidas de camundongos CT saudáveis por separação com *beads* magnéticas foram estimuladas com LPS (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), BAFF (10 ng/mL), IL-5 (5 ng/mL) + IL-4 (10 ng/mL) para induzir troca de classe de imunoglobulina para IgG1 ou com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), BAFF (10 ng/mL), IL-5 (10 ng/mL) + IL-4 (10 ng/mL), TGF- $\beta$  (5 ng/mL) e AR (10 nM) para induzir troca de classe de imunoglobulina para IgA. Após 3 dias de cultura, as células foram separadas em novos poços contendo meio de cultura fresco e os mesmos estímulos para cada condição. O período total de cultura foi de 5 dias. **B.** Estratégias de *gate* mostrando a frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>-</sup> e B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgG1<sup>+</sup> ou B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgA1<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgA1<sup>+</sup> cultivadas em suas respectivas condições indutoras sob normóxia ou hipóxia. **C-F.** Frequência (C-D) e número absoluto (E-F) de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgG1<sup>+</sup> e B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup> cultivadas em sua respectiva condição indutora de troca de classe para IgG1 sob normóxia ou hipóxia. **G-J.** Frequência (G-H) e número absoluto (I-J) de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> e B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup> cultivadas em sua respectiva condição indutora de troca de classe para IgA sob normóxia ou hipóxia. **L-M.** Quantificação de IgG1 (L) ou IgA (M) por ELISA no sobrenadante de cultura do dia 5. Foi realizada diluição seriada do sobrenadante de cultura conforme apontado nos gráficos. Estes dados são representativos de 3 experimentos independentes. n=1 animal por grupo contendo replicatas técnicas. \*p<0,05. **AR:** ácido retinóico; **CT:** controle; **pO<sub>2</sub>:** tensão de oxigênio.

#### 4.24. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPÓXIA SOBRE A TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINAS PARA IgG1 E IgA COM O SISTEMA *IN VITRO* DE INDUÇÃO DE CÉLULAS B DE CENTRO GERMINATIVO

Como descrito anteriormente, uma limitação do estudo publicado por Cho e colaboradores (CHO et al., 2016) foi o uso de LPS como principal ativador para os experimentos. Desse modo, o uso das células NB21-2.D9 que expressam CD40L e produzem tanto BAFF como IL-21 (Figura 35A) parece ser mais apropriado para verificar os efeitos da hipóxia sobre as funções e etapas de desenvolvimento das células B CG. Com o uso deste sistema *in vitro* de indução de células B CG, as células se diferenciam primordialmente em plasmócitos com classes de imunoglobulinas específicas após adição externa de ativadores. A partir disso, foi questionado se a hipóxia alteraria a troca de isotipo de imunoglobulinas para as classes IgG1 e IgA com o uso desse sistema (Figura 35B).

De modo interessante, a hipóxia (1% pO<sub>2</sub>) diminuiu a frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgG1<sup>+</sup> e B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> após 6 dias de cultura, mas aumentou a morte celular quando comparadas às células cultivadas sob condições de normóxia (21% pO<sub>2</sub>) (Figuras 35C-E, G-J, M). No entanto, nenhum dos grupos mostrou alteração na frequência de formação de plasmócitos CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup> (Figuras 35C, F, H, L). Em conjunto, os resultados mostraram que a hipóxia com o uso do sistema *in vitro* de indução de células B CG aumentou a morte celular e prejudicou a troca de isotipo de imunoglobulina tanto para IgG1 como para IgA, mas não alterou a diferenciação em plasmócitos.

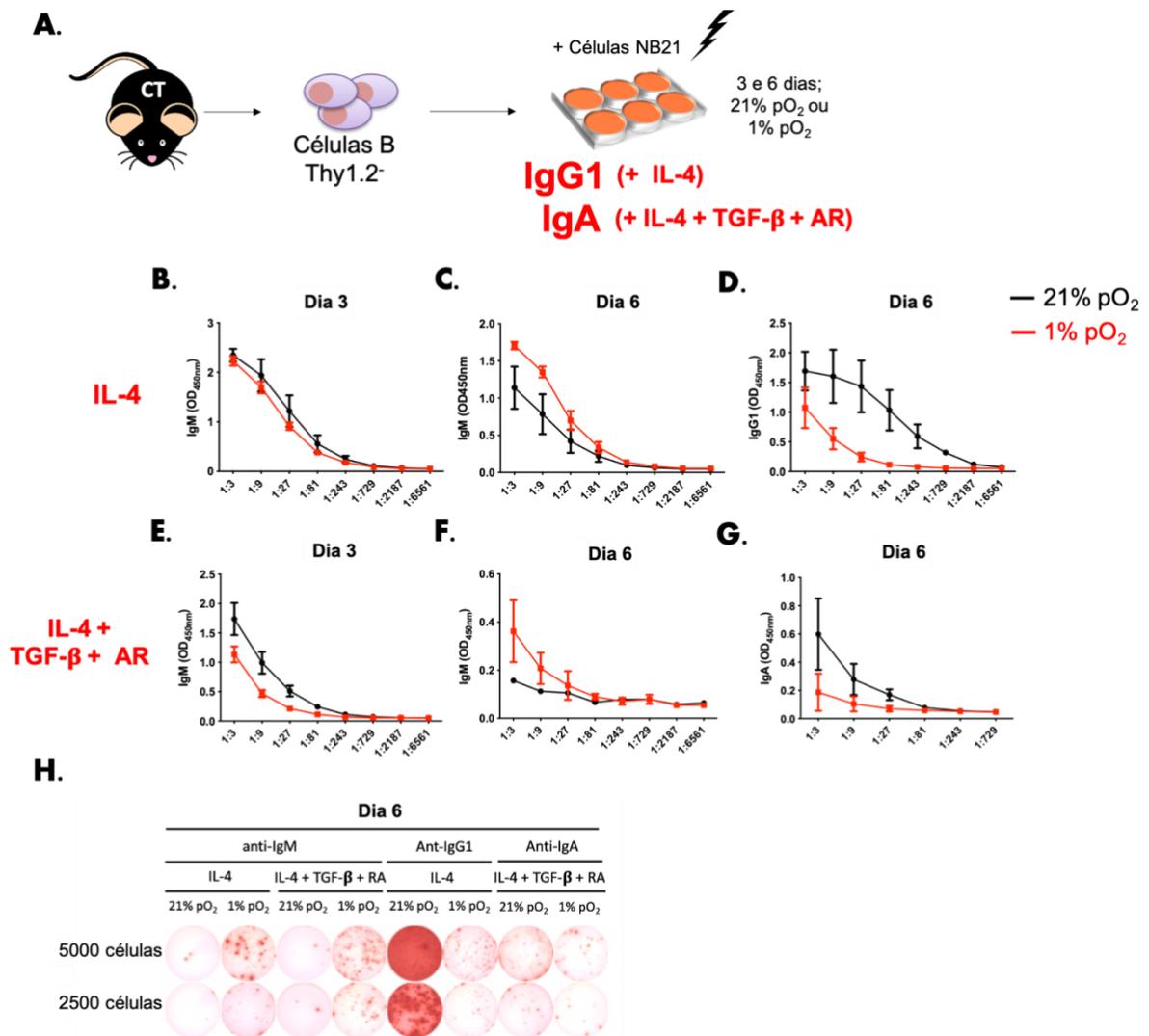


**Figura 35. Avaliação da hipóxia sobre a troca de classe de imunoglobulinas para IgG1 e IgA usando sistema *in vitro* de indução de células B CG.** A. Para simular reações de CG foram realizados experimentos com células da linhagem NB-21.2.D9, fibroblastos que expressam CD40L (CD154) e produzem BAFF e IL-21. B. Para o experimento, 3,44x10<sup>5</sup> de células NB-21.2D9/poço foram adicionadas à placas de 6 poços, deixadas em condições normais de cultura por 4 horas

para permitir aderência e depois irradiadas. Após o período,  $1,2 \times 10^5$  células B Thy1.2 foram adicionadas a cada poço juntamente com 10 ng/mL de IL-4 para indução de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 ou 10 ng/mL de IL-4 + 5 ng/mL de TGF- $\beta$  + 10 nM de AR para indução de IgA. Em seguida, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia ( $pO_2$  21%) e outro grupo incubado sob condições de hipóxia ( $pO_2$  1%) em um total de 6 dias de cultura. Após 3 dias do início da cultura, as células B foram contadas e devidamente transferidas em poços contendo novas células NB-21-2.D9 irradiadas e meios de cultura contendo estímulos. **C.** Estratégias de *gate* mostrando a frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgG1<sup>+</sup> e B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup> cultivadas sob condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia nos dias 3 e 6 de cultura. **D-G.** Frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>-</sup> no dia 3 de cultura (D), frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgG1<sup>+</sup> (E) e de B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup> (F) no dia 6 de cultura e número de células vivas totais no dia 6 de experimento (G) em sua respectiva condição indutora de troca de classe para IgG1 sob normóxia ou hipóxia. **H.** Estratégias de *gate* mostrando a frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgA<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> e B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup> cultivadas sob condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgA sob normóxia ou hipóxia nos dias 3 e 6 de cultura. **I-M.** Frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>-</sup> no dia 3 de cultura (I), frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> (J) e de B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup> (L) no dia 6 de cultura e número de células vivas totais no dia 6 de experimento (M) em sua respectiva condição indutora de troca de classe para IgA sob normóxia ou hipóxia. Estes dados são representativos de 3 experimentos independentes. n=1 animal por grupo contendo replicatas técnicas. \*p<0,05. **AR:** ácido retinoico; **CT:** controle; **pO<sub>2</sub>:** tensão de oxigênio.

Em seguida, foi avaliada a secreção de anticorpos IgG1 e IgA sob condições de normóxia e hipóxia com o uso de células NB21. A secreção de IgM foi similar em ambos os grupos tanto para as condições indutoras de IgG1 como para IgA no dia 3, sendo encontrada apenas uma pequena diminuição na secreção de IgA após o cultivo sob hipóxia (Figuras 36A-B, E). No entanto, no dia 6 de cultura, ambas as concentrações de IgG1 e IgA diminuíram sob condições de hipóxia com respectivo aumento de IgM nas duas condições indutoras de troca de isotipos (Figuras 36C-D, F-G).

Para eliminar a possibilidade de essas alterações terem sido causadas pelo aumento da morte celular induzida por hipóxia, a mesma quantidade de células viáveis foram plaqueadas e avaliadas por ELISpot após o período de cultura de 6 dias. Os resultados confirmaram que a hipóxia prejudicou a troca de isotipos tanto para IgG1 quanto para IgA ao serem detectadas maiores quantidades das respectivas imunoglobulinas sob condições de normóxia e maior quantidade de IgM sob condições de hipóxia (Figura 36H).

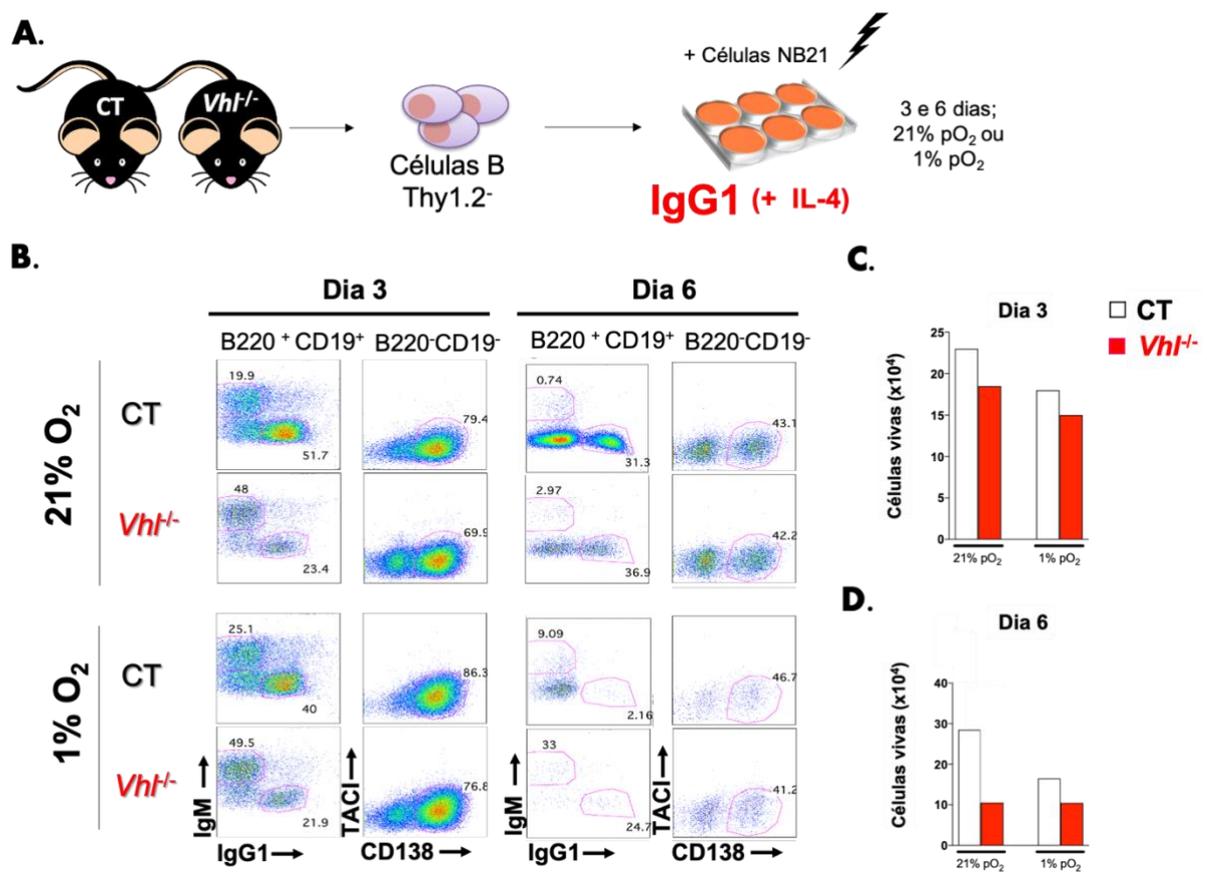


**Figura 36. Avaliação da hipóxia sobre a troca de classe de imunoglobulinas para IgG1 e IgA usando sistema *in vitro* de indução de células B CG.** **A.** Para o experimento,  $3,44 \times 10^5$  de células NB-21.2D9 (que expressam CD40L e produzem BAFF e IL-21)/poço foram adicionadas às placas de 6 poços, deixadas em condições normais de cultura por 4 horas para permitir aderência e depois irradiadas. Após o período,  $1,2 \times 10^5$  células B Thy1.2<sup>-</sup> foram adicionadas a cada poço juntamente com 10 ng/mL de IL-4 para indução de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 ou 10 ng/mL de IL-4 + 5 ng/mL de TGF-β + 10 nM de AR para indução de IgA. Em seguida, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia (pO<sub>2</sub> 21%) e outro grupo incubado sob condições de hipóxia (pO<sub>2</sub> 1%) em um total de 6 dias de cultura. Destaca-se que após 3 dias do início da cultura, as células B foram contadas e devidamente transferidas em poços contendo novas células NB-21-2.D9 irradiadas e meios de cultura contendo os estímulos. **B-D.** Quantificação de IgM por ELISA no sobrenadante de cultura do dia 3 (**B**) e quantificação de IgM (**C**) e IgG1 (**D**) no dia 6 de cultura em condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia. Foi realizada diluição seriada do sobrenadante de cultura conforme apontado nos gráficos. **E-G.** Quantificação de IgM por ELISA no sobrenadante de cultura do dia 3 (**E**) e quantificação de IgM (**F**) e IgA (**G**) no dia 6 de cultura em condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgA sob normóxia ou hipóxia. Foi realizada diluição seriada do sobrenadante de cultura conforme apontado nos gráficos. **H.** Quantificação de IgM, IgG1 e IgA por ELISpot com 2500 e 5000 células cultivadas em condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 ou IgA sob normóxia ou hipóxia. Estes dados são representativos de 3 experimentos independentes (ELISA) ou 1 experimento (ELISpot). n=1 animal por grupo contendo replicatas técnicas. \*p<0,05. **AR:** ácido retinoico; **CT:** controle; **pO<sub>2</sub>:** tensão de oxigênio.

#### **4.25. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO E DA DELEÇÃO DE HIF-1 $\alpha$ SOBRE A TROCA DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINA PARA IgG1 COM O SISTEMA *IN VITRO* DE INDUÇÃO DE CÉLULAS B DE CENTRO GERMINATIVO**

A hipóxia pode alterar a expressão e a atividade de vários fatores relacionados ou não ao metabolismo celular. Os HIFs são, sem dúvidas, os principais mediadores induzidos por hipóxia. Desse modo, foi investigado se a troca de isotipos seria afetada pelo aumento da expressão de HIF-1 $\alpha$  ao induzir a deleção da proteína VHL em células B. VHL é um componente do complexo E3 ubiquitina ligase que interage fisicamente com HIF-1 $\alpha$ , levando a uma rápida ubiquitinação de HIF-1 $\alpha$  e degradação pelo proteossoma sob condições de normóxia (KUBAICHUK; KIETZMANN, 2019). Assim, a deleção do gene *Vhl* evita a degradação de HIF-1 $\alpha$ , aumentando a sua disponibilidade nas células e conseqüente estabilização de HIF. Uma vez que a quantidade de células B *Vhl*<sup>-/-</sup> disponíveis para os experimentos foi bastante limitada, as mesmas foram direcionadas para os experimentos relacionados a troca de isotipo para IgG1, cujos resultados pareceram ser mais consistentes.

Os resultados mostraram que células B *Vhl*<sup>-/-</sup> tiveram maior frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> do que células B CT quando cultivadas sob condições de normóxia em ambos os dias 3 e 6 de cultura celular (Figuras 37A-B), sugerindo que a expressão de HIF está relacionada com o processo de troca de isotipo para IgG1. Embora tenha sido observada uma menor frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgG1<sup>+</sup> em células B *Vhl*<sup>-/-</sup> após 3 dias de cultura, a frequência não foi diferente no dia 6 (Figura 37B). Acredita-se que o baixo número de células B *Vhl*<sup>-/-</sup> viáveis sob condições de normóxia tenha influenciado os resultados de frequência no dia 6 (Figuras 37C-D). Adicionalmente, não houve diferenças significativas na frequência de plasmócitos CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+/-</sup> entre os grupos estudados (Figura 37B).

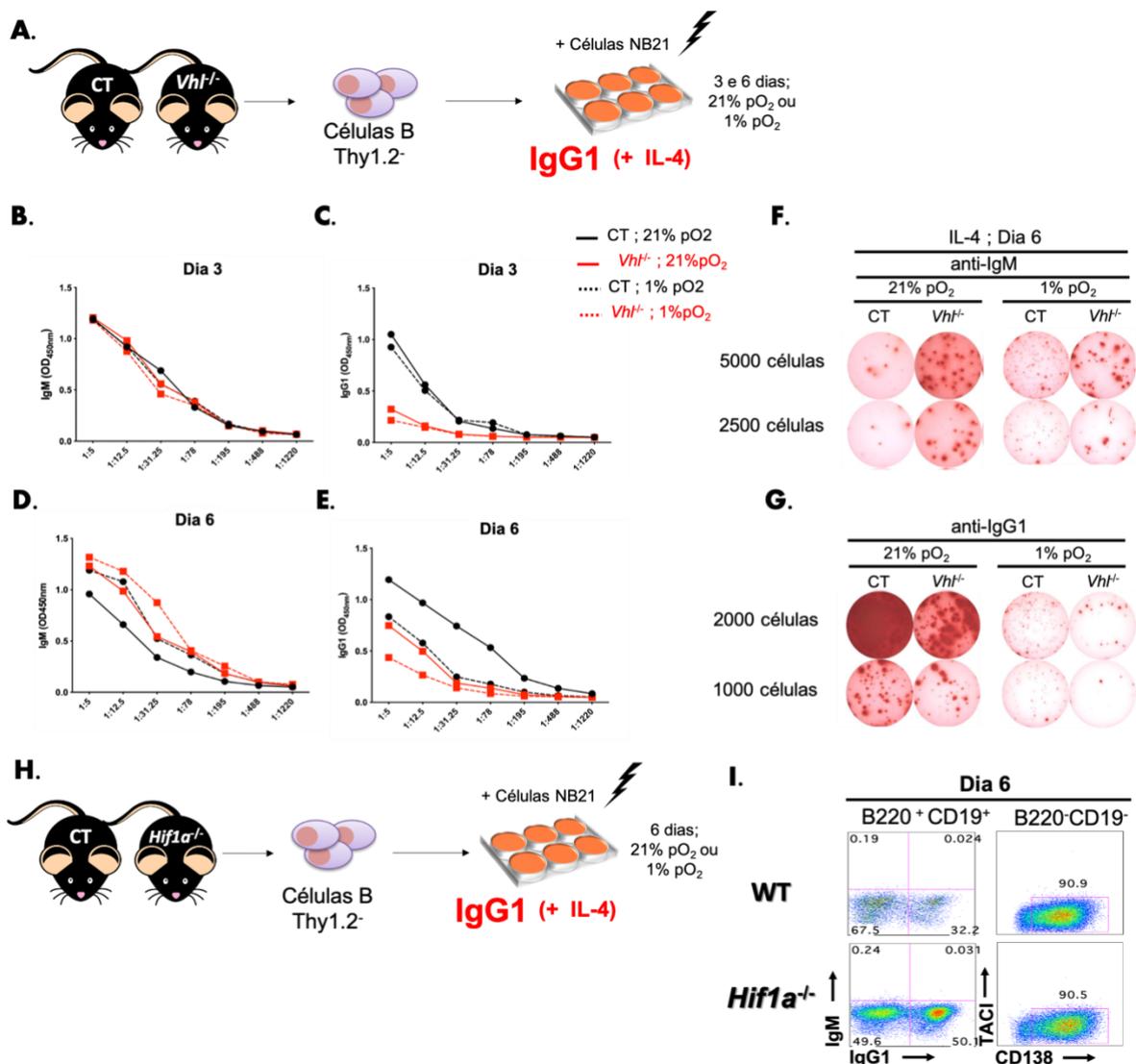


**Figura 37. Avaliação da estabilização de HIF-1 $\alpha$  sobre a troca de classe de imunoglobulinas para IgG1 usando sistema *in vitro* de indução de células B CG.** **A.** Para o experimento,  $3,44 \times 10^5$  de células NB-21.2D9 (que expressam CD40L e produzem BAFF e IL-21)/poço foram adicionadas à placas de 6 poços, deixadas em condições normais de cultura por 4 horas para permitir aderência e depois irradiadas. Após o período,  $1,2 \times 10^5$  células B Thy1.2<sup>-</sup> de camundongos CT ou Vhl<sup>-/-</sup> foram adicionadas a cada poço juntamente com 10 ng/mL de IL-4 para indução de troca de classe de imunoglobulina para IgG1. Em seguida, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia (pO<sub>2</sub> 21%) e outro grupo incubado sob condições de hipóxia (pO<sub>2</sub> 1%) em um total de 6 dias de cultura. Destaca-se que após 3 dias do início da cultura, as células B foram contadas e devidamente transferidas em poços contendo novas células NB-21-2.D9 irradiadas e meios de cultura contendo os estímulos. **B.** Estratégias de *gate* mostrando a frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgG1<sup>+</sup> e B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup> cultivadas sob condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia nos dias 3 e 6 de cultura. **C-D.** Número absoluto de células vivas totais nos dias 3 (C) e 6 (D) de experimento nas diversas condições experimentais. Estes dados são representativos de 1 experimento. n=1 animal por grupo contendo replicatas técnicas. \*p<0,05. **CT:** controle; **pO<sub>2</sub>:** tensão de oxigênio; **Vhl<sup>-/-</sup>:** camundongos ou células B deficientes do gene codificador da proteína von Hippel Lindau que causa estabilização de HIF-1 $\alpha$ .

Além disso, ambas as análises de determinação da produção de IgG1 feitas no sobrenadante de cultura celular por ELISA ou pelo plaqueamento de mesmo número de células viáveis por ELISpot mostraram que as células B Vhl<sup>-/-</sup> cultivadas em condições de normóxia, assim como células B CT cultivadas em condições de hipóxia, secretaram mais IgM do que células B CT cultivadas sob condições de normóxia (Figuras 38A-G).

Corroborando os resultados, o oposto foi observado para IgG1: uma diminuição da secreção de IgG1 por células B *Vhl*<sup>-/-</sup> cultivadas em normóxia e células B CT cultivadas por hipóxia quando comparadas ao grupo de células B CT cultivadas sob condições de normóxia.

Além disso, dados também preliminares mostraram uma frequência aumentada de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgG1<sup>+</sup> em células B *Hif1a*<sup>-/-</sup> cultivadas sob normóxia quando comparadas com células B CT também cultivadas em condições de normóxia (Figura 38H). A frequência de plasmócitos também foi similar entre os grupos. Em conjunto, os resultados sugerem que a expressão de HIF está relacionada com o processo de troca de isotipos para IgG1.



**Figura 38.** Avaliação da estabilização ou ausência de HIF-1 $\alpha$  sobre a troca de classe de imunoglobulinas para IgG1 usando sistema *in vitro* de indução de células B CG. A. Para o experimento,  $3,44 \times 10^5$  de células NB-21.2D9 (que expressam CD40L e produzem BAFF e IL-

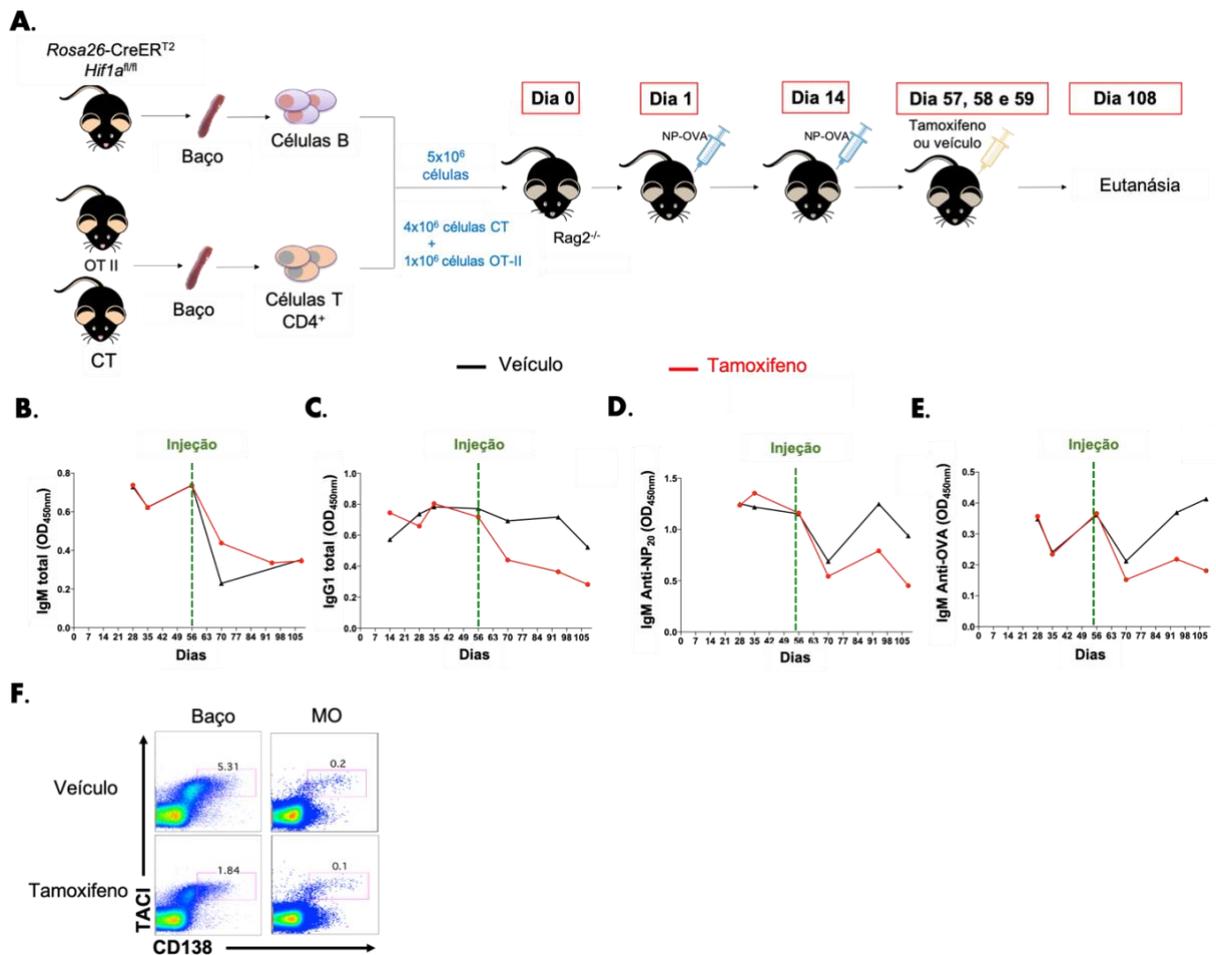
21)/poço foram adicionadas à placas de 6 poços, deixadas em condições normais de cultura por 4 horas para permitir aderência e depois irradiadas. Após o período,  $1,2 \times 10^5$  células B Thy1.2<sup>-</sup> de camundongos CT ou *Vhl*<sup>-/-</sup> foram adicionadas a cada poço juntamente com 10 ng/mL de IL-4 para indução de troca de classe de imunoglobulina para IgG1. Em seguida, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia (pO<sub>2</sub> 21%) e outro grupo incubado sob condições de hipóxia (pO<sub>2</sub> 1%) em um total de 6 dias de cultura. Destaca-se que após 3 dias do início da cultura, as células B foram contadas e devidamente transferidas em poços contendo novas células NB-21-2.D9 irradiadas e meios de cultura contendo os estímulos. **B-E.** Quantificação de IgM (B e D) e IgG1 (C e E) por ELISA no sobrenadante de cultura no dia 3 (B-C) e 6 (D-E) de cultura em condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia. Foi realizada diluição seriada do sobrenadante de cultura conforme apontado nos gráficos. **F.** Quantificação de IgM por ELISpot com 2500 e 5000 células B CT ou *Vhl*<sup>-/-</sup> cultivadas em condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia. **G.** Quantificação de IgG1 por ELISpot com 2000 e 1000 células B CT ou *Vhl*<sup>-/-</sup> cultivadas em condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia. **H.** Para o experimento,  $3,44 \times 10^5$  de células NB-21.2D9 (que expressam CD40L e produzem BAFF e IL-21)/poço foram adicionadas à placas de 6 poços, deixadas em condições normais de cultura por 4 horas para permitir aderência e depois irradiadas. Após o período,  $1,2 \times 10^5$  células B Thy1.2<sup>-</sup> de camundongos CT ou *Hif1a*<sup>-/-</sup> foram adicionadas a cada poço juntamente com 10 ng/mL de IL-4 para indução de troca de classe de imunoglobulina para IgG1. Em seguida, um grupo de células foi incubado em condições de normóxia (pO<sub>2</sub> 21%) e outro grupo incubado sob condições de hipóxia (pO<sub>2</sub> 1%) em um total de 6 dias de cultura. Destaca-se que após 3 dias do início da cultura, as células B foram contadas e devidamente transferidas em poços contendo novas células NB-21-2.D9 irradiadas e meios de cultura contendo os estímulos. **I.** Estratégias de *gate* mostrando a frequência de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgG1<sup>+</sup> e B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup> de camundongos CT ou *Hif1a*<sup>-/-</sup> cultivadas sob condições indutoras de troca de classe de imunoglobulina para IgG1 sob normóxia ou hipóxia no dia 6 de cultura. Estes dados são representativos de 1 experimento. n=1 animal por grupo contendo replicatas técnicas. \*p<0,05. **CT:** controle; ***Hif1a*<sup>-/-</sup>:** camundongos ou células B deficientes do gene codificador da proteína HIF-1 $\alpha$ ; **pO<sub>2</sub>:** tensão de oxigênio; ***Vhl*<sup>-/-</sup>:** camundongos ou células B deficientes do gene codificador da proteína von Hippel Lindau que causa estabilização de HIF-1 $\alpha$ .

Em seguida, foi questionado como estaria o programa transcricional de plasmócitos submetidos à hipóxia que receberam o estímulo para a indução de troca de isotipo para IgG1, mas permaneceram secretando IgM. No entanto, não existem ensaios disponíveis até o momento para a purificação de plasmócitos secretores de anticorpos de classes específicas, uma vez que estas células terminalmente diferenciadas perdem a expressão de BCR na membrana. Além disso, os processos de permeabilização celular comumente utilizados para a identificação de imunoglobulinas citoplasmáticas alteram a qualidade das análises de expressão gênica (por exemplo, com o uso da plataforma *NanoString*). Desta forma, nós desenvolvemos um ensaio de purificação de anticorpos secretores de imunoglobulinas de classes específicas para a continuação do estudo futuramente. O desenvolvimento do ensaio pode ser observado no item 8.1 (Resultados complementares).

#### 4.26. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE HIF NA LONGEVIDADE DE PLASMÓCITOS DE VIDA LONGA

Plasmócitos de vida curta e plasmócitos de vida longa possuem mais semelhanças fisiológicas e transcricionais do que diferenças, sendo difícil a distinção fenotípica destas populações (LAM et al., 2018). No entanto, um estudo recente mostrou que as populações de plasmócitos tem um perfil metabólico diferente, com plasmócitos de vida longa apresentando maior capacidade de captação de glicose e expressão do transporte de aminoácido CD98 do que plasmócitos de vida curta (LAM et al., 2018). Entretanto, os mecanismos subjacentes descrevendo como os plasmócitos de vida longa escapam da morte e mantém a longevidade ainda é desconhecido. Embora existam diversas diferenças estruturais na medula óssea humanos e camundongos, a hipóxia é uma característica compartilhada e necessária para a adaptação de diversos tipos celulares diferenciados e progenitores (ZHANG; SADEK, 2014; BRYNJOLFSSON et al., 2018). Considerando os plasmócitos de vida longa, é conhecido que estas células se localizam primordialmente na medula óssea (NGUYEN et al., 2018; KHODADADI et al., 2019), mas ainda é desconhecido se a baixa tensão de oxigênio contribui para a estabilização de fatores de hipóxia e consequente aumento da longevidade destas células. Assim, foi hipotetizado que os plasmócitos de vida longa migram para a medula óssea hipóxica para se proteger do estresse metabólico, aumentando a estabilização de HIF e consequente aumento da longevidade.

Desse modo, foi realizado um experimento para verificar se HIF é essencial para a estabilização e longevidade de plasmócitos de vida longa. Para isso, células B de camundongos Rosa26-ER<sup>T2</sup>-Cre-Hif1 $\alpha^{fl/fl}$ , células T CD4<sup>+</sup> policlonais e células T CD4<sup>+</sup> OT-II foram transferidas adotivamente para camundongos recipientes *Rag2*<sup>-/-</sup>. Um dia após a transferência celular, os camundongos recipientes foram imunizados com 100  $\mu$ g de NP-OVA, via i.p. (Figura 39A). Quatorze dias após a primeira imunização, os camundongos foram novamente imunizados com NP-OVA com a mesma dose. Oito semanas após a primeira imunização, os camundongos receberam 3 doses consecutivas de veículo ou tamoxifeno (3 mg x 3 doses) para permitir a atividade da enzima cre-recombinase nas células B (plasmócitos). Os camundongos foram eutanasiados no dia 108 após a primeira imunização para a avaliação do baço, medula óssea e soro.



**Figura 39. Avaliação do papel de HIF na longevidade de plasmócitos de vida longa.** **A.** Para o experimento,  $5 \times 10^6$  células B de camundongos Rosa26-ERT2-CreHif1 $\alpha^{fl/fl}$ ,  $4 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup> policlonais de camundongos CT e  $1 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup> de camundongos OT-II foram adotivamente transferidas (i.v.) para camundongos recipientes Rag2<sup>-/-</sup>. Um dia após a transferência de células, os camundongos recipientes foram imunizados com 100  $\mu$ g de NP-OVA via i.p. Quatorze dias após a transferência de células, camundongos receberam uma nova injeção de NP-OVA com mesma via de administração e dose. Oito semanas após a imunização primária, os camundongos receberam 3 injeções consecutivas de tamoxifeno (3 mg/dose) para permitir a atividade da enzima cre-recombinase ou veículo. Os camundongos foram devidamente eutanasiados no dia 108 de experimento e coletas de sangue foram realizadas esporadicamente para quantificação de anticorpos. **B-E.** Quantificação de IgM total (B), IgG1 total, IgM específica para NP<sub>20</sub> (D) e IgM específica para OVA (E) por ELISA em soro diluído 1:400. A área demarcada nos gráficos com a palavra “injeção” indica a primeira dose de tamoxifeno ou veículo que os camundongos receberam. **F.** Frequência de plasmócitos (B220-CD19-CD138<sup>+</sup>TACI<sup>+</sup>) no baço e medula óssea de camundongos. Estes dados são representativos de 1 experimento. n=1-2 animais por grupo. **CT:** controle; **MO:** medula óssea; **NP:** 4-hidroxi-3-nitrofenil; **OVA:** ovalbumina.

As concentrações séricas de IgM total, IgG1 total, IgM anti-NP20 e IgM anti-OVA foram similares entre os grupos antes das injeções de tamoxifeno ou veículo (dias 56-58) (Figuras 39B-E). De modo interessante, após os dias 56-58, o grupo que recebeu

tamoxifeno diminuiu os níveis circulantes de IgG1 total, IgM anti-NP20 e IgM anti-OVA comparado ao grupo que recebeu o veículo. Nenhuma diferença foi observada nas concentrações séricas totais de IgM e as concentrações de IgG anti-NP20, IgG anti-NP2 e IgG anti-OVA não foram detectadas. Embora no geral a frequência de plasmócitos na medula óssea tenha sido muito baixa em ambos os grupos, a frequência foi 50% menos no grupo que recebeu a injeção de tamoxifeno (Figuras 39F). Adicionalmente, a frequência de plasmócitos no baço também diminuiu no grupo tratado com tamoxifeno, sugerindo que HIF pode ser importante para a estabilização e longevidade de plasmócitos de vida longa. É importante ressaltar que o número de animais neste experimento foi baixo (n=1-2 por grupo) devido à alta taxa de mortalidade dos animais *Rag2*<sup>-/-</sup> observada em longos períodos experimentais. No entanto, optou-se por adicionar os resultados pelo potencial observado nos resultados preliminares e para a discussão de melhorias nos experimentos futuros.

Nós também tentamos uma nova abordagem experimental para investigar se HIF é essencial para a estabilização e longevidade de plasmócitos de vida longa. Este experimento consistiu no estabelecimento de protocolos para a realização do mapeamento do destino celular. O item 8.2 (resultados complementares) descreve a primeira etapa deste experimento.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A função efetora das células B é definida logo após a ativação, momento crítico para expansão clonal e para sua diferenciação em ASCs (plasmoblastos/plasmócitos). Este processo é guiado principalmente pela sinalização de receptores de superfície, tais como BCR, TLRs, CD40 e até mesmo o receptor de IL-4 (BOOTHBY, M.; RICKERT, 2017). Neste estudo, foi demonstrado que, embora as células B aumentem a taxa glicolítica após serem ativadas, este perfil de ativação é temporalmente diferente dependendo do tipo de estímulo oferecido. Considerando a importância das células B pelo reconhecimento de padrões microbianos, é intuitivo considerar que o uso de ligantes de TLRs, como o LPS e o CpG, leve à um processo de ativação celular mais rápido que aqueles gerados pelo reconhecimento antigênico via sinalização do BCR, sendo este último um processo mais complexo para a geração de respostas mais específicas e duradouras. Um estudo bastante elegante descreveu o comportamento das células B sob diferentes doses e estímulos de CpG, LPS e  $\alpha$ CD40 + IL-4. Foi observado que, enquanto células estimuladas com CpG não se diferenciam em ASCs, aquelas estimuladas com LPS se diferenciam independentemente da dose utilizada, mas dependem do número de ciclos de proliferação (HAWKINS et al., 2013). A partir de dois ciclos de proliferação, o LPS já começa a induzir a diferenciação em ASCs. Já células B estimuladas com  $\alpha$ CD40 + IL-4 produzem ASCs dependendo da dose usada de  $\alpha$ CD40: quanto maior a dose, maior a capacidade de proliferação dessas células, porém menor a competência para formar ASCs (HAWKINS et al., 2013). Nosso trabalho demonstrou que o LPS foi capaz de diferenciar as células B em ASCs, uma vez que 2 e 3 dias de cultura induziram 3 e 4 ciclos de proliferação, respectivamente. Além disso, o LPS foi o ativador mais potente da glicólise em células B, mas os parâmetros de ativação foram dependentes da dose do estímulo. Além disso, nós usamos doses relativamente baixas de  $\alpha$ CD40 para o ensaio de ativação celular, mas é possível que doses mais altas, que priorizam a proliferação, induzam a atividade glicolítica destas células mais rapidamente.

Uma outra característica importante observada com o uso de LPS foi a ativação de AMPK, sugerindo que a molécula possui função na fisiologia da ativação das células B. Conforme descrito anteriormente, AMPK é um importante regulador do metabolismo que, quando ativado, maximiza a geração de energia através da produção de ATP via OXPHOS, limitando processos que consomem ATP. De fato, nossos resultados mostraram que

AMPK permite o transporte do piruvato para a mitocôndria e o abastecimento do ciclo do ATC por diminuir a regulação negativa de PDK1 sobre o complexo piruvato desidrogenase. Por outro lado, a ausência de AMPK diminuiu tanto a massa como a atividade mitocondrial, comprometendo a sobrevivência das células B durante situações de estresses metabólicos, uma vez que a produção de ATP e de outras funções mitocondriais estão supostamente prejudicadas. De fato, estudos têm mostrado que AMPK auxilia as células T a passarem por períodos de privação nutricional, suportando a hipótese de que a ausência da molécula nas células B também poderia ser prejudicial nas situações em que reprogramações metabólicas mediadas por estresse energético sejam necessárias (BLAGIH et al., 2015).

Embora AMPK desempenhe outras funções, sua principal atividade é regular negativamente mTORC1. mTORC1, por sua vez, ao ser ativado, promove a síntese proteica, lipídica, crescimento celular, glicólise e ativação da via PPP (SHIMOBAYASHI; HALL, 2014). Assim, os resultados aqui apresentados mostraram que, de fato, mTORC1 desempenha papéis opostos aos exercidos por AMPK em células B. Um estudo recente observou que a inibição de mTORC1 em células B diminuiu tanto a atividade glicolítica como a OXPHOS, mostrando a relevância do sensor metabólico na regulação metabólica de células B (IWATA et al., 2016). Aqui, além desses resultados, nosso trabalho demonstrou adicionalmente uma implicação funcional da ausência de mTORC1 nestas células, como a síntese de IL-10 e a expressão de CD40. No entanto, tanto a avaliação do metabolismo lipídico como a síntese proteica tornam-se também necessárias dentro deste contexto.

Um outro estudo usando fibroblastos de embrião murino deficientes de TSC mostrou que a hiperativação de mTORC1 aumentou a expressão de genes relacionados a captação de glicose e glicólise, incluindo os genes *Sc12a1*, *Hk1/2*, *Pfk1* e *Ldh1* (DUVEL et al., 2010), semelhante ao que observamos em células B deficientes de AMPK. Além disso, nossos resultados também são suportados por dados descritos em macrófagos murinos sem a subunidade  $\beta 1$  de AMPK, que apresentaram menores taxas de oxidação de ácidos graxos quando estimulados por LPS, alta produção de IL-1 $\beta$  e TNF e alta captação de glicose mediadas pelo aumento da expressão de mTORC1 e HIF-1 $\alpha$  (SAG et al., 2008; GALIC et al., 2011; KELLY; O'NEILL, 2015). Em conjunto, sugere-se que as principais alterações metabólicas e ativações encontradas no nosso estudo na ausência de AMPK são

consequências da superativação de mTORC1. Embora não esteja descrito aqui neste estudo, de fato a atividade de AMPK está aumentada como pode ser verificado no artigo publicado em colaboração com o Prof. Mark R. Boothby (BROOKENS et al., 2020b).

Um estudo mostrou que animais completamente deficientes de AMPK não apresentaram problemas no desenvolvimento de células B, no entanto nenhuma subpopulação de célula B foi caracterizada. Ainda, foi demonstrado que esplenócitos de animais deficientes de AMPK proliferaram igualmente às células WT com diferentes estímulos (MAYER et al., 2008). Aqui, foi descrito que a deleção específica de AMPK em células B não impactou o desenvolvimento destas células na medula óssea, mas alterou a frequência de células B FO e de Bregs na periferia e que a taxa de proliferação foi aumentada após 72 horas de estímulo com LPS *in vitro*. Uma vez que as células precisam de anabolismo para sintetizar novas biomoléculas durante a proliferação e que AMPK regula negativamente esses processos metabólicos, é esperado que a ausência da molécula interfira no número de divisões destas células, como de fato observa-se em trabalhos sobre o tema (MOTOSHIMA et al., 2006).

Além disso, também foi demonstrado que a atividade mitocondrial está relacionada com a formação de plasmoblastos e que o metabolismo da glutamina (glutaminólise) é a principal via de alimentação do ciclo do TCA e OXPHOS (GARCIA-MANTEIGA et al., 2011). Adicionalmente, Dufort e colaboradores descreveram que a síntese lipídica também é fundamental para a diferenciação de plasmoblastos e que a glicólise é a principal fornecedora dos substratos para a via (DUFORT et al., 2014). Deste modo, esses dois trabalhos sugerem que a OXPHOS é essencial para a formação de plasmoblastos, corroborando os nossos resultados. No entanto, este e outros trabalhos demonstraram que a atividade secretória de anticorpos é regulada principalmente pela glicólise. Embora nós saibamos que as subpopulações de células B tenham que ser estudadas separadamente, a frequência de células ASCs geradas *in vitro* é muito baixa, dificultando os experimentos individuais.

Além disso, embora a deficiência de AMPK tenha aumentado a capacidade de sintetizar anticorpos em curto prazo, a deficiência neste processo é observada em longo prazo. As análises *in vitro* e das respostas ao redeseio antigênico mostraram que o custo de um excesso de produção de anticorpos em curto prazo sem uma compensação da

atividade mitocondrial, aumenta a síntese de ROS, aumenta a peroxidação lipídica e aumenta o número de mitocôndrias disfuncionais por conta da deficiência dos processos mitofágicos, culminando na diminuição da frequência não só de células B<sub>MEM</sub>, mas também de plasmócitos.

De modo interessante, o aumento da atividade de células B deficientes de AMPK também foi o suficiente para melhorar a colite aguda experimental. Embora estudos antigos sugerissem que o desenvolvimento da colite induzida por DSS não teria influência das células T e B (DIELEMAN et al., 1994), estudos recentes apontaram um papel essencial das células B para conter o avanço da doença. Wang e colaboradores mostraram que o papel dessas durante a colite induzida por DSS é fundamental para a atenuação da doença e que existe uma cooperação mútua entre células B e T, com as primeiras auxiliando na proliferação de células Tregs, enquanto as segundas auxiliam células B a diferenciarem-se em plasmócitos secretores de anticorpos IgA (WANG et al., 2015). Outros estudos usando diferentes técnicas de engenharia genética para eliminar células B de camundongos também verificaram a relevância das células B, bem como das vias de sinalização dependentes de Myd88 nestas células, para conter o desenvolvimento da DII experimental (YANABA et al., 2011; KIRKLAND et al., 2012). De fato, 80% das células B ativadas no organismo encontram-se nos MALTs (BRANDTZAEG; JOHANSEN, 2005), sendo improvável que esta população não tenha papel relevante em doenças associadas à mucosa. Aqui, nós descrevemos que as células B não apenas desempenham papel na colite, mas que também podem ser potenciais alvos a serem explorados em doenças relacionadas. No entanto, assim como no redesafio antigênico, a proteção da colite experimental não foi sustentada cronicamente na doença, sugerindo que a modulação de AMPK no curso da DII deve ser transitória e não permanente.

Além de observar o aumento da síntese de IL-10 em homogenato intestinal, citocina anti-inflamatória sabidamente reguladora de respostas imunes, foi também observado aumento da produção de lactato. O lactato tem sido demonstrado atuar como anti-inflamatório em mecanismos de defesa por células cancerígenas para impedir a ação de células imunes no ambiente tumoral (ROMERO-GARCIA et al., 2016). Além disso, o uso farmacológico de lactato melhorou os sinais clínicos da colite induzida por TNBS (IRAPORDA et al., 2016). Um estudo associou o aumento de síntese de IL-10 com o aumento de lactato em neonatos submetidos à operação de troca arterial mostrando forte

correlação entre os dois (CHASOVSKYI et al., 2016). Assim, como nossos resultados *in vitro* sugerem, os mecanismos intracelulares da produção de lactato e IL-10 em células B parecem ser relacionados. Além disso, nós também propomos que o uso de anticorpos neutralizantes contra IL-10 em animais AMPK<sup>ΔB</sup> submetidos à colite experimental poderia complementar a ideia de que a IL-10 é relevante nesse contexto protetor da doença, além de verificar se as próprias células B são as responsáveis diretas pela síntese da citocina e não apenas intermediadoras.

Embora o ensaio de transferência de células B seguido pela indução de colite tenha parecido promissor, os achados devem ser tratados com bastante cautela, uma vez que a taxa de repopulação de células B nos animais recipientes foi baixa. Em virtude dos animais BKO também terem apresentado melhora da colite experimental, é possível que a diminuição do número de células B tenha causado a melhora da doença, principalmente porque as células transferidas não foram capazes de repopular o cólon.

Finalmente, o fato de animais Raptor<sup>ΔB</sup> terem piorado significativamente da colite, indica que os dados *in vitro* e *in vivo* podem estar altamente correlacionados. No entanto, sabemos que isso precisa ainda ser investigado e outras subpopulações de células do sistema imune precisam ser avaliadas para verificar a total contribuição nas DII. Ademais, nossos estudos demonstram que células B têm papel importante no contexto das DII e que o mesmo deve ser explorado, uma vez que tem sido envilecido em estudos sobre o tema.

Como descrito anteriormente, as zonas claras dos CGs são hipóxicas, regulando diversas funções das células B, incluindo a troca de isotipos de imunoglobulinas tanto para IgG1 como para IgG2c, embora a troca de classe para IgA não seja afetada (CHO et al., 2016). No entanto, os estudos utilizaram LPS, agonista de TLR-4, para simular as reações de CGs. Aqui, ao utilizar o sistema *in vitro* de indução de células B CG, foi verificado que, de fato, a hipóxia prejudica a troca de isotipos para IgG1, mas também influencia, até certa extensão, a troca para IgA. De modo interessante, a estabilização de HIF-1 $\alpha$  em células B cultivadas em normóxia comprometeu a troca de isotipo de modo semelhante ao observado na hipóxia, sugerindo que os efeitos da hipóxia são principalmente mediados por HIF.

É importante ressaltar que, embora o sistema *in vitro* contendo células NB21-2.D9 se aproxime mais das condições encontradas nos CGs, ele também apresenta limitações.

Embora análises tenham mostrado que a hipóxia não influencia a expressão de CD40L pelas células NB21-2.D9 cultivadas sob condições de hipóxia (dados não mostrados), é preciso considerar que a produção das citocinas BAFF e IL-21 podem estar prejudicadas nestas células e comprometer o processo de diferenciação das células B. No entanto, a frequência de plasmócitos diferenciados foi semelhante independentemente da  $pO_2$  ou da participação de HIF-1 $\alpha$ , sugerindo que as células NB21-2.D9 permaneceram viáveis e ativas. Além disso, a presença contínua de IL-21 no meio não representa exatamente o que acontece no CG, uma vez que IL-21 prioriza a diferenciação de células B CG em plasmócitos (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016). Além disso, a maior fonte de IL-21 nos CGs são células T<sub>FH</sub> que, por sua vez, estão localizadas principalmente em uma região específica da zona escura onde ocorre a hipermutação somática (WEINSTEIN et al., 2016). Desse modo, sugere-se que a mistura de células 40LB e NB21-2.D9 talvez seja a melhor estratégia para a simulação dos CGs ou até mesmo iniciar a cultura com células 40LB seguida pela transferência de células B para um ambiente contendo células NB21-2.D9.

De modo interessante, um estudo recente mostrou que a troca de isotipo é um evento iniciado antes mesmo das células B serem diferenciadas em células B CG ou plasmoblastos, diminuindo drasticamente nos CGs (ROCO et al., 2019). Desse modo, o fato de os CGs terem regiões hipóxicas, não comprometeria a troca de classe de isotipos. Além disso, tem sido descrito que células B CG dependem tanto da glicólise como da OXPHOS, aumentando principalmente a atividade de mTORC1 e, conseqüentemente, de HIF-1 $\alpha$  e de c-Myc, um outro sensor metabólico diretamente ativado por mTORC1 (CHOI; MOREL, 2020). Assim, é possível que as diferentes etapas das reações de CGs e pré-CG possam induzir transitoriamente a estabilização de HIF-1 $\alpha$  para desempenhar determinadas funções.

Ainda, HIF-1 $\alpha$  se mostrou necessário para a manutenção/função de plasmócitos de vida longa na medula óssea e baço. Embora reconheçamos a limitação do baixo número de animais usados no estudo devido a complexidade do desenho experimental, os resultados têm potencial para a continuidade desta investigação. Embora as concentrações séricas de IgG1 total tenham sido detectadas em ambos os grupos estudados, apenas IgM específicas puderam ser quantificadas. Este dado é importante pelo fato de ter sido observada uma maior frequência de ASCs no baço do que na medula óssea dos animais estudados. Estudos mostram que plasmócitos de vida longa secretores

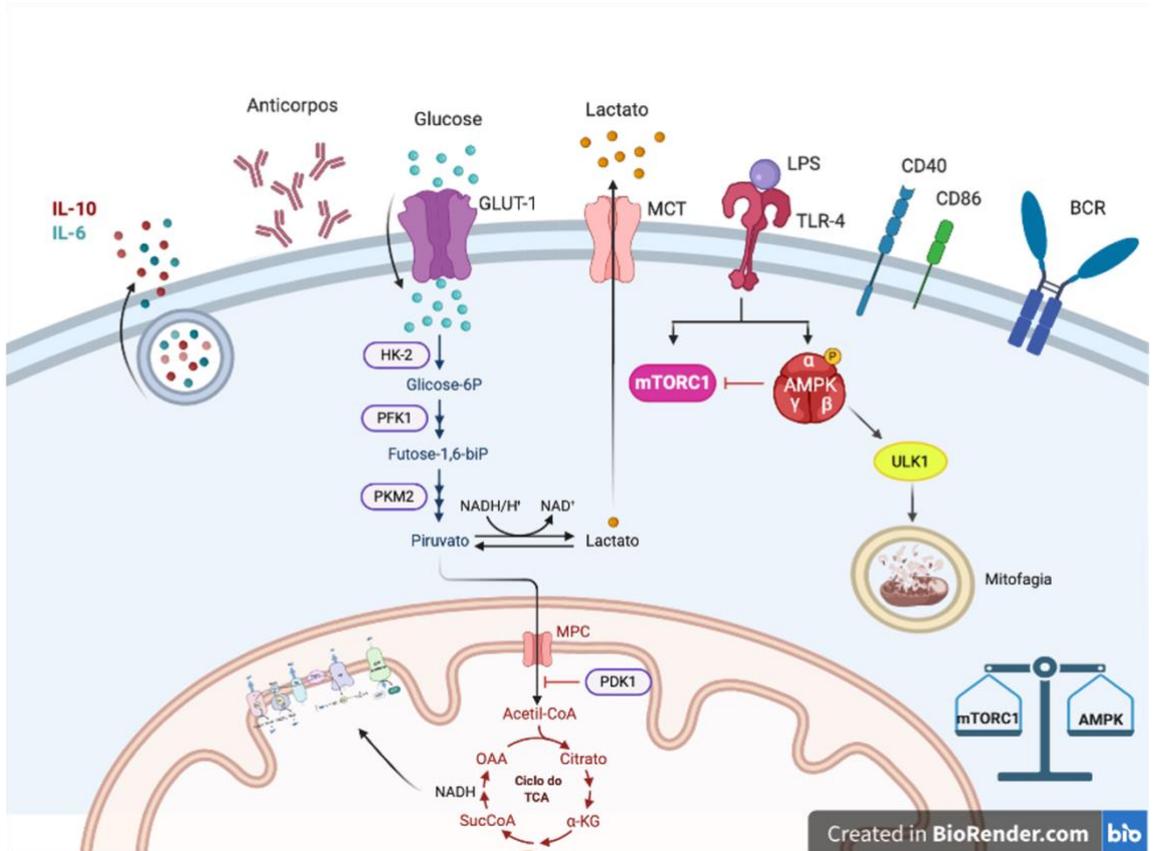
de IgG migram mais para a medula óssea, enquanto que plasmócitos secretores de IgM são principalmente retidos no baço (BOHANNON et al., 2016). Desse modo, embora nossa hipótese inicial de que o ambiente hipóxico da medula óssea poderia induzir a estabilização de HIF-1 $\alpha$  e, conseqüentemente, contribuir com a longevidade de plasmócitos de vida longa, o sensor metabólico também se mostrou necessário para a manutenção destas células no baço. O fato desses plasmócitos secretores de IgM terem a capacidade de se desenvolver independentemente das reações de CG e se distinguirem de células B IgM<sup>+</sup> naturais e de plasmócitos de vida curta (BOHANNON et al., 2016) sugere que essas células possuem necessidades distintas de outras populações. Desse modo, a estabilização de HIF-1 $\alpha$  poderia ser um dos fatores requeridos por esses plasmócitos de vida longa esplênicos induzido pela atividade de mTORC1, uma vez que regiões de hipóxia extrafoliculares não têm sido descritas no baço. Assim, conclui-se que HIF-1 $\alpha$  é importante para a manutenção/função de plasmócitos de vida longa e prejudica a troca de isotipo de imunoglobulinas para IgG1, mas é dispensável para a diferenciação de plasmócitos.

## **6. CONCLUSÕES**

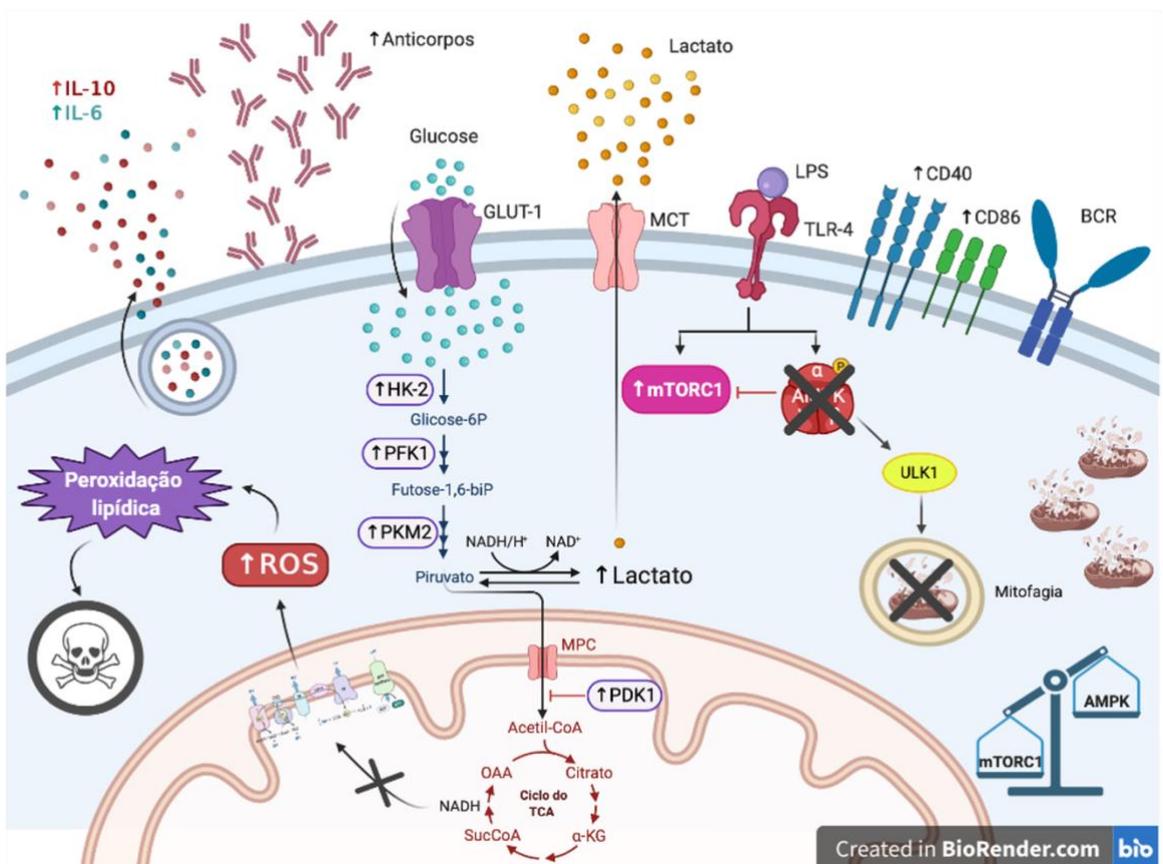
## **6. CONCLUSÕES**

- 6.1. AMPK coordena a ativação, o metabolismo, a homeostase mitocondrial e a produção de anticorpos em células B (Figuras 40A-B).
- 6.2. A modulação de AMPK em células B tem potencial para tratar doenças inflamatórias agudas.
- 6.3. HIF-1 $\alpha$  é importante para a manutenção de plasmócitos de vida longa e prejudica a troca de isotipo de imunoglobulinas para IgG1 (Figura 41).

**A.**

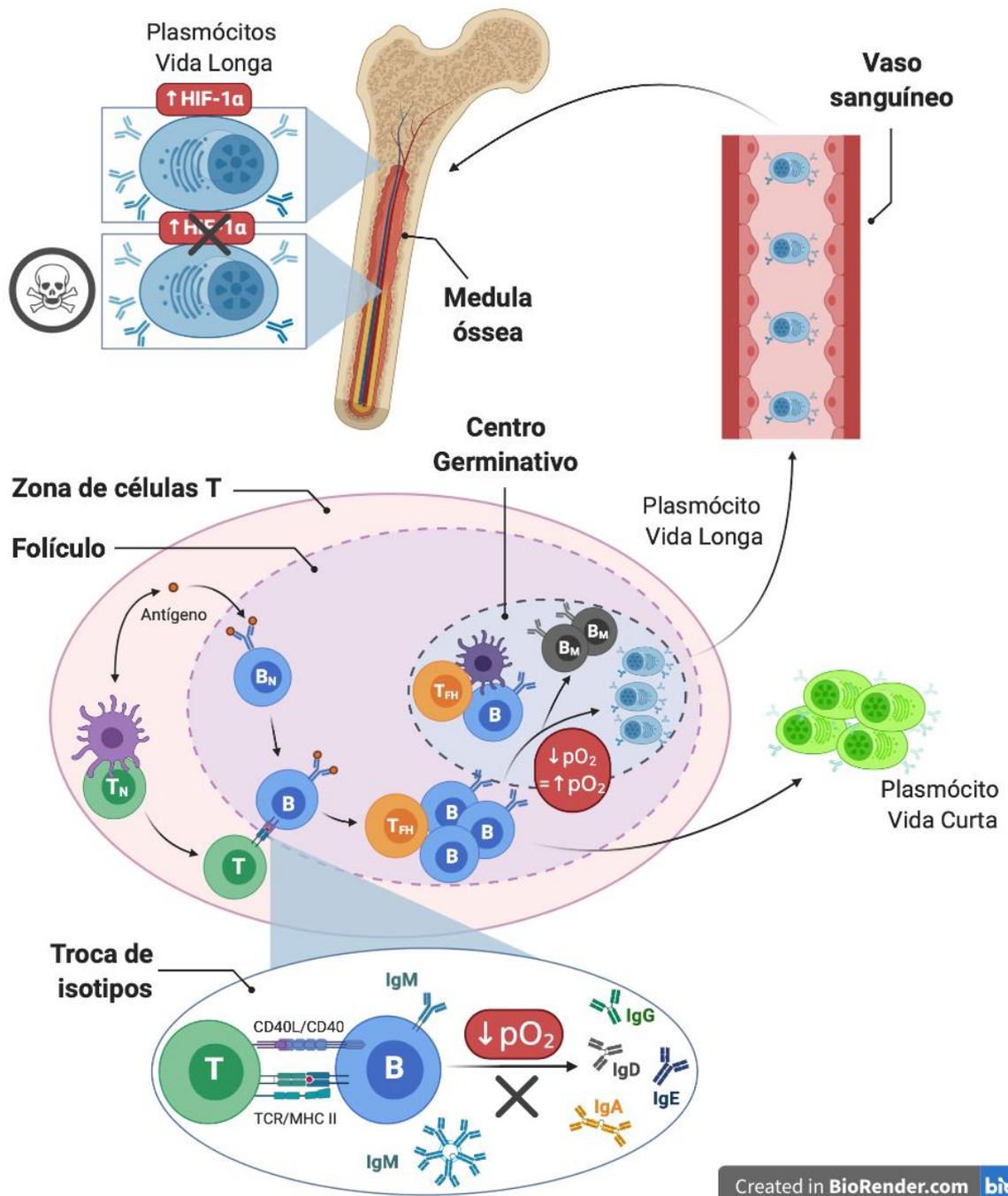


**B.**



**Figura 40. Conclusão. A.** A ativação de AMPK em células B estimuladas com LPS regula a atividade de mTORC1 e a mitofagia. Esses processos parecem coordenar a síntese de citocinas

pró- (IL-6) e anti- (IL-10) inflamatórias, a ativação celular, a síntese de anticorpos após diferenciação em ASCs e o balanço metabólico entre glicólise aeróbica e OXPHOS. **B.** Na ausência de AMPK, células B estimuladas com LPS aumentam seu status de ativação, produzem mais citocinas, sintetizam mais anticorpos após diferenciarem-se em ASCs e induzem um metabolismo predominantemente glicolítico em decorrência da hiperativação de mTORC1. Além disso, o processo de mitofagia torna-se prejudicado e as mitocôndrias danificadas se acumulam no citoplasma das células B, prejudicando as atividades mitocondriais que, somada à uma OXPHOS deficiente, produz altas quantidades ROS que, por sua vez, promove a peroxidação lipídica e consequente morte celular. Assim, a superativação de células B deficientes de AMPK parece ser positiva como observado em doenças inflamatórias agudas e imunização primária, porém, a morte celular precoce decorrente de hiperativação de mTORC1 prejudica respostas mais duradouras, como em doenças inflamatórias crônicas e desafios antigênicos secundários.  **$\alpha$ -KG:** alfa cetoglutarato; **AMPK:** proteína quinase ativada por AMP; **ASCs:** células secretoras de anticorpos; **BCR:** receptor de células B; **HK-2:** hexoquinase-2; **MCT:** transportadores de monocarboxilatos; **MPC:** carreador de piruvato mitocondrial; **OAA:** oxaloacetoato; **OXPHOS:** fosforilação oxidativa; **PDK1:** piruvato desidrogenase quinase 1; **PFK1:** fosfofrutoquinase 1; **PKM2:** piruvato quinase isotipo M2; **ROS:** espécies reativas de oxigênio; **SucCoA:** succinil coenzima A; **TCA:** ciclo do ácido tricarboxílico; **ULK1:** proteína quinase do tipo unc-51. Figura criada com BioRender.com.



**Figura 41. Conclusão.** Células dendríticas apresentam antígenos para as células T CD4<sup>+</sup> naive nas zonas de células T, permitindo a ativação bidirecional de ambas as células T CD4<sup>+</sup> e células B na interface da zona de células T e do folículo. Durante este processo, a troca de classe de isotipos é iniciado. Em seguida, as células B aumentam a taxa de proliferação e podem ou entrar nos centros germinativos ou diferenciarem-se em plasmócitos de vida curta. No centro germinativo, células T foliculares e células dendríticas foliculares auxiliam as células B a diferenciarem-se em plasmócitos de vida longa ou em células B de memória. Posteriormente, os plasmócitos de vida longa migram para medula óssea que, devido ao ambiente hipóxico, induz a estabilização de HIF-1 $\alpha$ , contribuindo para a longevidade celular. Enquanto os mecanismos de diferenciação em plasmócitos de vida longa parecem não ser dependentes da disponibilidade de oxigênio no centro germinativo, a troca de isotipo, principalmente IgG1, é dependente de oxigênio. **B**: células B ativadas; **B<sub>N</sub>**: células B naive; **B<sub>MEM</sub>**: Células B de memória; **T**: células T CD4<sup>+</sup> ativadas; **T<sub>FH</sub>**: células T CD4<sup>+</sup> foliculares; **T<sub>N</sub>**: células T CD4<sup>+</sup> naive. Figura criada com BioRender.com.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD-TILLERY, K. M.; JELINEK, D. F. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. **Cell Immunol**, v. 156, n. 2, p. 493-507, 1994.

AGANI, F.; JIANG, B. H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 3, p. 245-251, 2013.

AGATHOCLEOUS, M.; HARRIS, W. A. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. **Trends Cell Biol**, v. 23, n. 10, p. 484-492, 2013.

ALESSI, D. R.; JAMES, S. R.; DOWNES, C. P.; HOLMES, A. B.; GAFFNEY, P. R.; REESE, C. B.; COHEN, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Curr Biol**, v. 7, n. 4, p. 261-269, 1997.

ALEX, P.; ZACHOS, N. C.; NGUYEN, T.; GONZALES, L.; CHEN, T. E.; CONKLIN, L. S.; CENTOLA, M.; LI, X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 3, p. 341-352, 2009.

ALVES, V. B.; BASSO, P. J.; NARDINI, V.; SILVA, A.; CHICA, J. E.; CARDOSO, C. R. Dehydroepiandrosterone (DHEA) restrains intestinal inflammation by rendering leukocytes hyporesponsive and balancing colitogenic inflammatory responses. **Immunobiology**, v. 221, n. 9, p. 934-943, 2016.

ANTONIOU, E.; MARGONIS, G. A.; ANGELOU, A.; PIKOULI, A.; ARGIRI, P.; KARAVOKYROS, I.; PAPALOIS, A.; PIKOULIS, E. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Ann Med Surg (Lond)**, v. 11, n., p. 9-15, 2016.

ASSENMACHER, M.; LOHNING, M.; RADBRUCH, A. Detection and isolation of cytokine secreting cells using the cytometric cytokine secretion assay. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 6, n., p. Unit 6 27, 2002.

BABICKOVA, J.; TOTHOVA, L.; LENGYELOVA, E.; BARTONOVA, A.; HODOSY, J.; GARDLIK, R.; CELEC, P. Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens. **Inflammation**, v. 38, n. 5, p. 1996-2006, 2015.

BASSO, P. J.; FONSECA, M. T. C.; BONFÁ, G.; ALVES, V. B. F.; SALES-CAMPOS, H.; NARDINI, V.; CARDOSO, C. R. B. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n., p. 727-737, 2014.

BASSO, P. J.; CAMARA, N. O. S.; SALES-CAMPOS, H. Microbial-Based Therapies in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease - An Overview of Human Studies. **Front Pharmacol**, v. 9, n., p. 1571, 2018.

BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 1, p. 34-46, 2011.

BAUMGARTH, N. B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production. **Front Immunol**, v. 7, n., p. 324, 2016.

BLAGIH, J.; COULOMBE, F.; VINCENT, E. E.; DUPUY, F.; GALICIA-VAZQUEZ, G.; YURCHENKO, E.; RAISSI, T. C.; VAN DER WINDT, G. J.; VIOLLET, B.; PEARCE, E. L.; PELLETIER, J.; PICCIRILLO, C. A.; KRAWCZYK, C. M.; DIVANGAHI, M.; JONES, R. G. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 41-54, 2015.

BOHANNON, C.; POWERS, R.; SATYABHAMA, L.; CUI, A.; TIPTON, C.; MICHAELI, M.; SKOUNTZOU, I.; MITTLER, R. S.; KLEINSTEIN, S. H.; MEHR, R.; LEE, F. E.; SANZ, I.; JACOB, J. Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. **Nat Commun**, v. 7, n., p. 11826, 2016.

BOOTHBY, M.; RICKERT, R. C. Metabolic Regulation of the Immune Humoral Response. **Immunity**, v. 46, n. 5, p. 743-755, 2017.

BOOTHBY, M. R.; HODGES, E.; THOMAS, J. W. Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity. **Genes Dev**, v. 33, n. 1-2, p. 26-48, 2019.

BRANDTZAEG, P.; JOHANSEN, F. E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. **Immunol Rev**, v. 206, n., p. 32-63, 2005.

BRANDTZAEG, P.; CARLSEN, H. S.; HALSTENSEN, T. S. The B-cell system in inflammatory bowel disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 579, n., p. 149-167, 2006.

BREDA, C. N. S.; DAVANZO, G. G.; BASSO, P. J.; SARAIVA CAMARA, N. O.; MORAES-VIEIRA, P. M. M. Mitochondria as central hub of the immune system. **Redox Biol**, v. 26, n., p. 101255, 2019.

BROOKENS, S. K.; CHO, S. H.; BASSO, P. J.; BOOTHBY, M. R. AMPK $\alpha$ 1 in B Cells Dampens Primary Antibody Responses yet Promotes Mitochondrial Homeostasis and Persistence of B Cell Memory. **J Immunol**, v. 205, n. 11, p. 3011-3022, 2020a.

BROOKENS, S. K.; CHO, S. H.; BASSO, P. J.; BOOTHBY, M. R. AMPK $\alpha$ 1 in B Cells Dampens Primary Antibody Responses yet Promotes Mitochondrial Homeostasis and Persistence of B Cell Memory. **J Immunol**, v., n., p., 2020b.

BRYNJOLFSSON, S. F.; PERSSON BERG, L.; OLSEN EKERHULT, T.; RIMKUTE, I.; WICK, M. J.; MARTENSSON, I. L.; GRIMSHOLM, O. Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 2673, 2018.

BUCHANAN, J.; WORDSWORTH, S.; AHMAD, T.; PERRIN, A.; VERMEIRE, S.; SANS, M.; TAYLOR, J.; JEWELL, D. Managing the long term care of inflammatory bowel disease patients: The cost to European health care providers. **J Crohns Colitis**, v. 5, n. 4, p. 301-316, 2011.

BUCK, M. D.; SOWELL, R. T.; KAECH, S. M.; PEARCE, E. L. Metabolic Instruction of Immunity. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 570-586, 2017.

CAO, Y.; LI, H.; LIU, H.; ZHENG, C.; JI, H.; LIU, X. The serine/threonine kinase LKB1 controls thymocyte survival through regulation of AMPK activation and Bcl-XL expression. **Cell Res**, v. 20, n. 1, p. 99-108, 2010.

CARO-MALDONADO, A.; WANG, R.; NICHOLS, A. G.; KURAOKA, M.; MILASTA, S.; SUN, L. D.; GAVIN, A. L.; ABEL, E. D.; KELSOE, G.; GREEN, D. R.; RATHMELL, J. C. Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. **J Immunol**, v. 192, n. 8, p. 3626-3636, 2014.

CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M. Innate control of B cell responses. **Trends Immunol**, v. 32, n. 5, p. 202-211, 2011.

CHASOVSKYI, K.; ZHOVNIR, V.; VOROBIOVA, G.; YEMETS, I. Relationship Between Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 and Lactate Concentrations in Neonates Undergoing the Arterial Switch Operation. **Ann Thorac Surg**, v. 101, n. 3, p. 1020-1024, 2016.

CHO, S. H.; RAYBUCK, A. L.; STENGEL, K.; WEI, M.; BECK, T. C.; VOLANAKIS, E.; THOMAS, J. W.; HIEBERT, S.; HAASE, V. H.; BOOTHBY, M. R. Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 234-238, 2016.

CHOI, S. C.; MOREL, L. Immune metabolism regulation of the germinal center response. **Exp Mol Med**, v. 52, n. 3, p. 348-355, 2020.

CHOUDHRY, H.; HARRIS, A. L. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. **Cell Metab**, v. 27, n. 2, p. 281-298, 2018.

COLLABORATORS, G. B. D. I. B. D. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 1, p. 17-30, 2020.

CORRADETTI, M. N.; INOKI, K.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A.; GUAN, K. L. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. **Genes Dev**, v. 18, n. 13, p. 1533-1538, 2004.

CYSTER, J. G.; ALLEN, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. **Cell**, v. 177, n. 3, p. 524-540, 2019.

CZARNY, P.; PAWLOWSKA, E.; BIALKOWSKA-WARZECHA, J.; KAARNIRANTA, K.; BLASIAK, J. Autophagy in DNA damage response. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 2641-2662, 2015.

DANG, E. V.; BARBI, J.; YANG, H. Y.; JINASENA, D.; YU, H.; ZHENG, Y.; BORDMAN, Z.; FU, J.; KIM, Y.; YEN, H. R.; LUO, W.; ZELLER, K.; SHIMODA, L.; TOPALIAN, S. L.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V.; PARDOLL, D. M.; PAN, F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 772-784, 2011.

DE SOUZA, P. R.; SALES-CAMPOS, H.; BASSO, P. J.; NARDINI, V.; SILVA, A.; BANQUIERI, F.; ALVES, V. B.; CHICA, J. E.; NOMIZO, A.; CARDOSO, C. R. Adrenal-Derived Hormones Differentially Modulate Intestinal Immunity in Experimental Colitis. **Mediators Inflamm**, v. 2016, n., p. 4936370, 2016.

DIELEMAN, L. A.; RIDWAN, B. U.; TENNYSON, G. S.; BEAGLEY, K. W.; BUCY, R. P.; ELSON, C. O. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1643-1652, 1994.

DOBASHI, Y.; WATANABE, Y.; MIWA, C.; SUZUKI, S.; KOYAMA, S. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 5, p. 476-495, 2011.

DONAHUE, A. C.; FRUMAN, D. A. Proliferation and survival of activated B cells requires sustained antigen receptor engagement and phosphoinositide 3-kinase activation. **J Immunol**, v. 170, n. 12, p. 5851-5860, 2003.

DONAHUE, A. C.; FRUMAN, D. A. Distinct signaling mechanisms activate the target of rapamycin in response to different B-cell stimuli. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 10, p. 2923-2936, 2007.

DORSHKIND, K.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 3, p. 213-219, 2007.

DOUGHTY, C. A.; BLEIMAN, B. F.; WAGNER, D. J.; DUFORT, F. J.; MATARAZA, J. M.; ROBERTS, M. F.; CHILES, T. C. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4458-4465, 2006.

DUCOMMUN, S.; FORD, R. J.; BULTOT, L.; DEAK, M.; BERTRAND, L.; KEMP, B. E.; STEINBERG, G. R.; SAKAMOTO, K. Enhanced activation of cellular AMPK by dual-small molecule treatment: AICAR and A769662. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 6, p. E688-696, 2014.

DUFORT, F. J.; GUMINA, M. R.; TA, N. L.; TAO, Y.; HEYSE, S. A.; SCOTT, D. A.; RICHARDSON, A. D.; SEYFRIED, T. N.; CHILES, T. C. Glucose-dependent de novo lipogenesis in B lymphocytes: a requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 10, p. 7011-7024, 2014.

DUVEL, K.; YECIES, J. L.; MENON, S.; RAMAN, P.; LIPOVSKY, A. I.; SOUZA, A. L.; TRIANTAFELLOW, E.; MA, Q.; GORSKI, R.; CLEAVER, S.; VANDER HEIDEN, M. G.; MACKEIGAN, J. P.; FINAN, P. M.; CLISH, C. B.; MURPHY, L. O.; MANNING, B. D. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. **Mol Cell**, v. 39, n. 2, p. 171-183, 2010.

EICHELE, D. D.; KHARBANDA, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 33, p. 6016-6029, 2017.

EMERLING, B. M.; VIOLLET, B.; TORMOS, K. V.; CHANDEL, N. S. Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. **FEBS Lett**, v. 581, n. 29, p. 5727-5731, 2007.

FACHI, J. L.; FELIPE, J. S.; PRAL, L. P.; DA SILVA, B. K.; CORREA, R. O.; DE ANDRADE, M. C. P.; DA FONSECA, D. M.; BASSO, P. J.; CAMARA, N. O. S.; DE SALES, E. S. E. L.; DOS SANTOS MARTINS, F.; GUIMA, S. E. S.; THOMAS, A. M.; SETUBAL, J. C.; MAGALHAES, Y. T.; FORTI, F. L.; CANDREVA, T.; RODRIGUES, H. G.; DE JESUS, M. B.; CONSONNI, S. R.; FARIAS, A. D. S.; VARGA-WEISZ, P.; VINOLO, M. A. R. Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. **Cell Rep**, v. 27, n. 3, p. 750-761 e757, 2019.

FAGONE, P.; SRIBURI, R.; WARD-CHAPMAN, C.; FRANK, M.; WANG, J.; GUNTER, C.; BREWER, J. W.; JACKOWSKI, S. Phospholipid biosynthesis program underlying membrane expansion during B-lymphocyte differentiation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 10, p. 7591-7605, 2007.

FOGARTY, S.; HAWLEY, S. A.; GREEN, K. A.; SANER, N.; MUSTARD, K. J.; HARDIE, D. G. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. **Biochem J**, v. 426, n. 1, p. 109-118, 2010.

FRUMAN, D. A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 2, p. 140-156, 2014.

FULLERTON, M. D.; GALIC, S.; MARCINKO, K.; SIKKEMA, S.; PULINILKUNNIL, T.; CHEN, Z. P.; O'NEILL, H. M.; FORD, R. J.; PALANIVEL, R.; O'BRIEN, M.; HARDIE, D. G.; MACAULAY, S. L.; SCHERTZER, J. D.; DYCK, J. R.; VAN DENDEREN, B. J.; KEMP, B. E.; STEINBERG, G. R. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. **Nat Med**, v. 19, n. 12, p. 1649-1654, 2013.

GALIC, S.; FULLERTON, M. D.; SCHERTZER, J. D.; SIKKEMA, S.; MARCINKO, K.; WALKLEY, C. R.; IZON, D.; HONEYMAN, J.; CHEN, Z. P.; VAN DENDEREN, B. J.; KEMP, B. E.; STEINBERG, G. R. Hematopoietic AMPK beta1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. **J Clin Invest**, v. 121, n. 12, p. 4903-4915, 2011.

GARCIA, D.; SHAW, R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. **Mol Cell**, v. 66, n. 6, p. 789-800, 2017.

GARCIA-MANTEIGA, J. M.; MARI, S.; GODEJOHANN, M.; SPRAUL, M.; NAPOLI, C.; CENCI, S.; MUSCO, G.; SITIA, R. Metabolomics of B to plasma cell differentiation. **J Proteome Res**, v. 10, n. 9, p. 4165-4176, 2011.

GARRAUD, O.; BORHIS, G.; BADR, G.; DEGRELLE, S.; POZZETTO, B.; COGNASSE, F.; RICHARD, Y. Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. **BMC Immunol**, v. 13, n., p. 63, 2012.

GHIROTTI, B.; TERRA, F. F.; CAMARA, N. O. S.; BASSO, P. J. Sirtuins in B lymphocytes metabolism and function. **World J Exp Med**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

GONG, F.; ZHENG, T.; ZHOU, P. T Follicular Helper Cell Subsets and the Associated Cytokine IL-21 in the Pathogenesis and Therapy of Asthma. **Front Immunol**, v. 10, n., p. 2918, 2019.

GWINN, D. M.; SHACKELFORD, D. B.; EGAN, D. F.; MIHAYLOVA, M. M.; MERY, A.; VASQUEZ, D. S.; TURK, B. E.; SHAW, R. J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Mol Cell**, v. 30, n. 2, p. 214-226, 2008.

HAAS, K. M. B-1 lymphocytes in mice and nonhuman primates. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1362, n., p. 98-109, 2015.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12 Suppl 1, n., p. S3-9, 2006.

HAWKINS, E. D.; TURNER, M. L.; WELLARD, C. J.; ZHOU, J. H.; DOWLING, M. R.; HODGKIN, P. D. Quantal and graded stimulation of B lymphocytes as alternative strategies for regulating adaptive immune responses. **Nat Commun**, v. 4, n., p. 2406, 2013.

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 121-135, 2018.

HERZOG, S.; RETH, M.; JUMAA, H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 3, p. 195-205, 2009.

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F. G.; CHALASANI, G. B Cells, Antibodies, and More. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 1, p. 137-154, 2016.

HUDSON, C. C.; LIU, M.; CHIANG, G. G.; OTTERNESS, D. M.; LOOMIS, D. C.; KAPER, F.; GIACCIA, A. J.; ABRAHAM, R. T. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 20, p. 7004-7014, 2002.

IRAPORDA, C.; ROMANIN, D. E.; BENGGOA, A. A.; ERREA, A. J.; CAYET, D.; FOLIGNE, B.; SIRARD, J. C.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; RUMBO, M. Local Treatment with Lactate Prevents Intestinal Inflammation in the TNBS-Induced Colitis Model. **Front Immunol**, v. 7, n., p. 651, 2016.

IWATA, T. N.; RAMIREZ, J. A.; TSANG, M.; PARK, H.; MARGINEANTU, D. H.; HOCKENBERY, D. M.; IRITANI, B. M. Conditional Disruption of Raptor Reveals an Essential Role for mTORC1 in B Cell Development, Survival, and Metabolism. **J Immunol**, v. 197, n. 6, p. 2250-2260, 2016.

JACINTO, E.; FACCHINETTI, V.; LIU, D.; SOTO, N.; WEI, S.; JUNG, S. Y.; HUANG, Q.; QIN, J.; SU, B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 125-137, 2006.

JANEWAY CA JR, T. P., WALPORT M, ET AL. . Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. In: (Ed.). New York: Garland Science, 2001,  
JEON, S. M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. **Exp Mol Med**, v. 48, n. 7, p. e245, 2016.

KALLA, R.; VENTHAM, N. T.; SATSANGI, J.; ARNOTT, I. D. Crohn's disease. **BMJ**, v. 349, n., p. g6670, 2014.

KAY, J. E.; KROMWEL, L.; DOE, S. E.; DENYER, M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. **Immunology**, v. 72, n. 4, p. 544-549, 1991.

KEATING, R.; HERTZ, T.; WEHENKEL, M.; HARRIS, T. L.; EDWARDS, B. A.; MCCLAREN, J. L.; BROWN, S. A.; SURMAN, S.; WILSON, Z. S.; BRADLEY, P.; HURWITZ, J.; CHI, H.; DOHERTY, P. C.; THOMAS, P. G.; MCGARGILL, M. A. The kinase mTOR modulates the antibody response to provide cross-protective immunity to lethal infection with influenza virus. **Nat Immunol**, v. 14, n. 12, p. 1266-1276, 2013.

KELLY, B.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell Res**, v. 25, n. 7, p. 771-784, 2015.

KHODADADI, L.; CHENG, Q.; RADBRUCH, A.; HIEPE, F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. **Front Immunol**, v. 10, n., p. 721, 2019.

KIESLER, P.; FUSS, I. J.; STROBER, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 1, n. 2, p. 154-170, 2015.

KIM, J.; YANG, G.; KIM, Y.; KIM, J.; HA, J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Exp Mol Med**, v. 48, n., p. e224, 2016.

KIRKLAND, D.; BENSON, A.; MIRPURI, J.; PIFER, R.; HOU, B.; DEFRANCO, A. L.; YAROVINSKY, F. B cell-intrinsic MyD88 signaling prevents the lethal dissemination of commensal bacteria during colonic damage. **Immunity**, v. 36, n. 2, p. 228-238, 2012.

KOBAYASHI, T.; SIEGMUND, B.; LE BERRE, C.; WEI, S. C.; FERRANTE, M.; SHEN, B.; BERNSTEIN, C. N.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L.; HIBI, T. Ulcerative colitis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 6, n. 1, p. 74, 2020.

KOJIMA, H.; GU, H.; NOMURA, S.; CALDWELL, C. C.; KOBATA, T.; CARMELIET, P.; SEMENZA, G. L.; SITKOVSKY, M. V. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 4, p. 2170-2174, 2002.

KUBAICHUK, K.; KIETZMANN, T. Involvement of E3 Ligases and Deubiquitinases in the Control of HIF-alpha Subunit Abundance. **Cells**, v. 8, n. 6, p., 2019.

KURAOKA, M.; SCHMIDT, A. G.; NOJIMA, T.; FENG, F.; WATANABE, A.; KITAMURA, D.; HARRISON, S. C.; KEPLER, T. B.; KELSOE, G. Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 542-552, 2016.

LAM, W. Y.; BECKER, A. M.; KENNERLY, K. M.; WONG, R.; CURTIS, J. D.; LLUFRIO, E. M.; MCCOMMIS, K. S.; FAHRMANN, J.; PIZZATO, H. A.; NUNLEY, R. M.; LEE, J.; WOLFGANG, M. J.; PATTI, G. J.; FINCK, B. N.; PEARCE, E. L.; BHATTACHARYA, D. Mitochondrial Pyruvate Import Promotes Long-Term Survival of Antibody-Secreting Plasma Cells. **Immunity**, v. 45, n. 1, p. 60-73, 2016.

LAM, W. Y.; BHATTACHARYA, D. Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress. **Trends Immunol**, v. 39, n. 1, p. 19-27, 2018.

LAM, W. Y.; JASH, A.; YAO, C. H.; D'SOUZA, L.; WONG, R.; NUNLEY, R. M.; MEARES, G. P.; PATTI, G. J.; BHATTACHARYA, D. Metabolic and Transcriptional Modules Independently Diversify Plasma Cell Lifespan and Function. **Cell Rep**, v. 24, n. 9, p. 2479-2492 e2476, 2018.

LAMB, C. A.; KENNEDY, N. A.; RAINE, T.; HENDY, P. A.; SMITH, P. J.; LIMDI, J. K.; HAYEE, B.; LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SELINGER, C.; BARRETT, K. J.; DAVIES, R. J.; BENNETT, C.; GITTENS, S.; DUNLOP, M. G.; FAIZ, O.; FRASER, A.; GARRICK, V.; JOHNSTON, P. D.; PARKES, M.; SANDERSON, J.; TERRY, H.; GROUP, I. B. D. G. E. C.; GAYA, D. R.; IQBAL, T. H.; TAYLOR, S. A.; SMITH, M.; BROOKES, M.; HANSEN, R.; HAWTHORNE, A. B. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 68, n. Suppl 3, p. s1-s106, 2019.

LAROUI, H.; INGERSOLL, S. A.; LIU, H. C.; BAKER, M. T.; AYYADURAI, S.; CHARANIA, M. A.; LAROUI, F.; YAN, Y.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32084, 2012.

LAUKKA, T.; MARIANI, C. J.; IHANTOLA, T.; CAO, J. Z.; HOKKANEN, J.; KAELIN, W. G., JR.; GODLEY, L. A.; KOIVUNEN, P. Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. **J Biol Chem**, v. 291, n. 8, p. 4256-4265, 2016.

LEBRASSEUR, N. K.; KELLY, M.; TSAO, T. S.; FARMER, S. R.; SAHA, A. K.; RUDERMAN, N. B.; TOMAS, E. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 1, p. E175-181, 2006.

LIAO, W.; HUA, Z.; LIU, C.; LIN, L.; CHEN, R.; HOU, B. Characterization of T-Dependent and T-Independent B Cell Responses to a Virus-like Particle. **J Immunol**, v. 198, n. 10, p. 3846-3856, 2017.

LIGHTMAN, S. M.; UTLEY, A.; LEE, K. P. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. **Front Immunol**, v. 10, n., p. 965, 2019.

LIMON, J. J.; SO, L.; JELLBAUER, S.; CHIU, H.; CORADO, J.; SYKES, S. M.; RAFFATELLU, M.; FRUMAN, D. A. mTOR kinase inhibitors promote antibody class switching via mTORC2 inhibition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 47, p. E5076-5085, 2014.

LIU, X.; CHHIPA, R. R.; NAKANO, I.; DASGUPTA, B. The AMPK inhibitor compound C is a potent AMPK-independent antiglioma agent. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 3, p. 596-605, 2014.

LIU, Z.; DAVIDSON, A. BAFF and selection of autoreactive B cells. **Trends Immunol**, v. 32, n. 8, p. 388-394, 2011.

M'KOMA, A. E. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. **Clin Med Insights Gastroenterol**, v. 6, n., p. 33-47, 2013.

MARTINS, N. B.; PEPPERCORN, M. A. Inflammatory bowel disease. **Am J Manag Care**, v. 10, n. 8, p. 544-552, 2004.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annu Rev Immunol**, v. 30, n., p. 221-241, 2012.

MAYER, A.; DENANGLAIRE, S.; VIOLLET, B.; LEO, O.; ANDRIS, F. AMP-activated protein kinase regulates lymphocyte responses to metabolic stress but is largely dispensable for immune cell development and function. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 4, p. 948-956, 2008.

MCNAMEE, E. N.; KORNS JOHNSON, D.; HOMANN, D.; CLAMBEY, E. T. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. **Immunol Res**, v. 55, n. 1-3, p. 58-70, 2013.

MELCHERS, F. Checkpoints that control B cell development. **J Clin Invest**, v. 125, n. 6, p. 2203-2210, 2015.

MELGAR, S.; KARLSSON, L.; REHNSTROM, E.; KARLSSON, A.; UTKOVIC, H.; JANSSON, L.; MICHAELSSON, E. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 6, p. 836-844, 2008.

MENG, X.; GROTSCH, B.; LUO, Y.; KNAUP, K. X.; WIESENER, M. S.; CHEN, X. X.; JANTSCH, J.; FILLATREAU, S.; SCHETT, G.; BOZEC, A. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 251, 2018.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 1016-1023, 2011.

MIZOGUCHI, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 105, n., p. 263-320, 2012.

MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. Immunobiology of B Cells in Inflammatory Bowel Disease. In: Baumgart, D. C. (Ed.). **Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach**. Cham: Springer International Publishing, 2017, p.111-117.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. B-1 B cell development in the fetus and adult. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2012.

MOTOSHIMA, H.; GOLDSTEIN, B. J.; IGATA, M.; ARAKI, E. AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. **J Physiol**, v. 574, n. Pt 1, p. 63-71, 2006.

MOZDIK, E.; O'MALLEY, J.; ARASARADNAM, R. Inflammatory bowel disease. **BMJ**, v. 351, n., p. h4416, 2015.

NAGASAWA, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 107-116, 2006.

NGUYEN, D. C.; GARIMALLA, S.; XIAO, H.; KYU, S.; ALBIZUA, I.; GALIPEAU, J.; CHIANG, K. Y.; WALLER, E. K.; WU, R.; GIBSON, G.; ROBERSON, J.; LUND, F. E.; RANDALL, T. D.; SANZ, I.; LEE, F. E. Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 3698, 2018.

NOJIMA, T.; HANIUDA, K.; MOUTAI, T.; MATSUDAIRA, M.; MIZOKAWA, S.; SHIRATORI, I.; AZUMA, T.; KITAMURA, D. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. **Nat Commun**, v. 2, n., p. 465, 2011.

NUTT, S. L.; HODGKIN, P. D.; TARLINTON, D. M.; CORCORAN, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 3, p. 160-171, 2015.

OLEINIKA, K.; MAURI, C.; SALAMA, A. D. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, v. 15, n. 1, p. 11-26, 2019.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. **Cell Res**, v. 30, n. 4, p. 300-314, 2020.

PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 633-643, 2013.

PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, n. 4, p. 959-971, 2013.

PRICE, M. J.; PATTERSON, D. G.; SCHARER, C. D.; BOSS, J. M. Progressive Upregulation of Oxidative Metabolism Facilitates Plasmablast Differentiation to a T-Independent Antigen. **Cell Rep**, v. 23, n. 11, p. 3152-3159, 2018.

PRIDEAUX, L.; DE CRUZ, P.; NG, S. C.; KAMM, M. A. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. **Inflamm Bowel Dis**, v. 18, n. 7, p. 1340-1355, 2012.

REZNICK, R. M.; SHULMAN, G. I. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. **J Physiol**, v. 574, n. Pt 1, p. 33-39, 2006.

ROCO, J. A.; MESIN, L.; BINDER, S. C.; NEFZGER, C.; GONZALEZ-FIGUEROA, P.; CANETE, P. F.; ELLYARD, J.; SHEN, Q.; ROBERT, P. A.; CAPPELLO, J.; VOHRA, H.; ZHANG, Y.; NOWOSAD, C. R.; SCHIEPERS, A.; CORCORAN, L. M.; TOELLNER, K. M.; POLO, J. M.; MEYER-HERMANN, M.; VICTORA, G. D.; VINUESA, C. G. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. **Immunity**, v. 51, n. 2, p. 337-350 e337, 2019.

ROMERO-GARCIA, S.; MORENO-ALTAMIRANO, M. M.; PRADO-GARCIA, H.; SANCHEZ-GARCIA, F. J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. **Front Immunol**, v. 7, n., p. 52, 2016.

ROSSER, E. C.; MAURI, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607-612, 2015.

SAG, D.; CARLING, D.; STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8633-8641, 2008.

SALEH, M.; ELSON, C. O. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. **Immunity**, v. 34, n. 3, p. 293-302, 2011.

SALES-CAMPOS, H.; DE SOUZA, P. R.; BASSO, P. J.; NARDINI, V.; SILVA, A.; BANQUIERI, F.; ALVES, V. B.; CHICA, J. E.; NOMIZO, A.; CARDOSO, C. R. Amelioration of experimental colitis after short-term therapy with glucocorticoid and its relationship to the induction of different regulatory markers. **Immunology**, v. 150, n. 1, p. 115-126, 2017.

SATHISH, J. G.; SETHU, S.; BIELSKY, M. C.; DE HAAN, L.; FRENCH, N. S.; GOVINDAPPA, K.; GREEN, J.; GRIFFITHS, C. E.; HOLGATE, S.; JONES, D.; KIMBER, I.; MOGGS, J.; NAISBITT, D. J.; PIRMOHAMED, M.; REICHMANN, G.; SIMS, J.; SUBRAMANYAM, M.; TODD, M. D.; VAN DER LAAN, J. W.; WEAVER, R. J.; PARK, B. K. Challenges and approaches for the development of safer immunomodulatory biologics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 4, p. 306-324, 2013.

SCHROEDER, H. W., JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-52, 2010.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Front Immunol**, v. 4, n., p. 302, 2013.

SELVARAJ, U. M.; POINSATTE, K.; TORRES, V.; ORTEGA, S. B.; STOWE, A. M. Heterogeneity of B Cell Functions in Stroke-Related Risk, Prevention, Injury, and Repair. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 729-747, 2016.

SEMENZA, G. L.; ROTH, P. H.; FANG, H. M.; WANG, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. **J Biol Chem**, v. 269, n. 38, p. 23757-23763, 1994.

SHEHADE, H.; ACOLTY, V.; MOSER, M.; OLDENHOVE, G. Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 Negatively Regulates Th1 Function. **J Immunol**, v. 195, n. 4, p. 1372-1376, 2015.

SHEN, P.; ROCH, T.; LAMPROPOULOU, V.; O'CONNOR, R. A.; STERVBO, U.; HILGENBERG, E.; RIES, S.; DANG, V. D.; JAIMES, Y.; DARIDON, C.; LI, R.; JOUNEAU, L.; BOUDINOT, P.; WILANTRI, S.; SAKWA, I.; MIYAZAKI, Y.; LEECH, M. D.; MCPHERSON, R. C.; WIRTZ, S.; NEURATH, M.; HOEHLIG, K.; MEINL, E.; GRUTZKAU, A.; GRUN, J. R.; HORN, K.; KUHL, A. A.; DORNER, T.; BAR-OR, A.; KAUFMANN, S. H.; ANDERTON, S. M.; FILLATREAU, S. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. **Nature**, v. 507, n. 7492, p. 366-370, 2014.

SHEN, P.; FILLATREAU, S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 7, p. 441-451, 2015.

SHIMOBAYASHI, M.; HALL, M. N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 155-162, 2014.

SHLOMCHIK, M. J.; WEISEL, F. B cell primary immune responses. **Immunol Rev**, v. 288, n. 1, p. 5-9, 2019.

SOLIMAN, G. A. The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 2231-2257, 2013.

SUZUKI, K.; MARUYA, M.; KAWAMOTO, S.; FAGARASAN, S. Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. **Immunol Rev**, v. 237, n. 1, p. 180-190, 2010.

TAMAS, P.; MACINTYRE, A.; FINLAY, D.; CLARKE, R.; FEIJOO-CARNERO, C.; ASHWORTH, A.; CANTRELL, D. LKB1 is essential for the proliferation of T-cell progenitors and mature peripheral T cells. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 1, p. 242-253, 2010.

TELLIER, J.; NUTT, S. L. Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. **Eur J Immunol**, v. 49, n. 1, p. 30-37, 2019.

TERZIC, J.; GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; KARIN, M. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2101-2114 e2105, 2010.

THOMSON, A. W.; TURNQUIST, H. R.; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 324-337, 2009.

TREMAINE, W. J. Diagnosis and treatment of indeterminate colitis. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 7, n. 12, p. 826-828, 2011.

TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M. 12 - Lower Gastrointestinal Tract. In: Dintzis, P. M. T. M. (Ed.). **Comparative Anatomy and Histology**. San Diego: Academic Press, 2012, p.177-192.

VIEIRA, R. S.; CASTOLDI, A.; BASSO, P. J.; HIYANE, M. I.; CAMARA, N. O. S.; ALMEIDA, R. R. Butyrate Attenuates Lung Inflammation by Negatively Modulating Th9 Cells. **Front Immunol**, v. 10, n., p. 67, 2019.

WANG, L.; RAY, A.; JIANG, X.; WANG, J. Y.; BASU, S.; LIU, X.; QIAN, T.; HE, R.; DITTEL, B. N.; CHU, Y. T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1297-1312, 2015.

WEINSTEIN, J. S.; HERMAN, E. I.; LAINEZ, B.; LICONA-LIMON, P.; ESPLUGUES, E.; FLAVELL, R.; CRAFT, J. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. **Nat Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1197-1205, 2016.

WESEMANN, D. R.; PORTUGUESE, A. J.; MEYERS, R. M.; GALLAGHER, M. P.; CLUFF-JONES, K.; MAGEE, J. M.; PANCHAKSHARI, R. A.; RODIG, S. J.; KEPLER, T. B.; ALT, F. W. Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 112-115, 2013.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat Protoc**, v. 2, n. 3, p. 541-546, 2007.

WORTEL, C. M.; HEIDT, S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. **Transpl Immunol**, v. 41, n., p. 1-9, 2017.

WU, J.; PUPPALA, D.; FENG, X.; MONETTI, M.; LAPWORTH, A. L.; GEOGHEGAN, K. F. Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated protein kinase (AMPK). **J Biol Chem**, v. 288, n. 50, p. 35904-35912, 2013.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-484, 2006.

YANABA, K.; BOUAZIZ, J. D.; HAAS, K. M.; POE, J. C.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 5, p. 639-650, 2008.

YANABA, K.; YOSHIZAKI, A.; ASANO, Y.; KADONO, T.; TEDDER, T. F.; SATO, S. IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model. **Am J Pathol**, v. 178, n. 2, p. 735-743, 2011.

YANG, F.; WANG, D.; LI, Y.; SANG, L.; ZHU, J.; WANG, J.; WEI, B.; LU, C.; SUN, X. Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis. **J Immunol Res**, v. 2017, n., p. 7047201, 2017.

ZHANG, C. C.; SADEK, H. A. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 12, p. 1891-1901, 2014.

## **8. RESULTADOS COMPLEMENTARES**

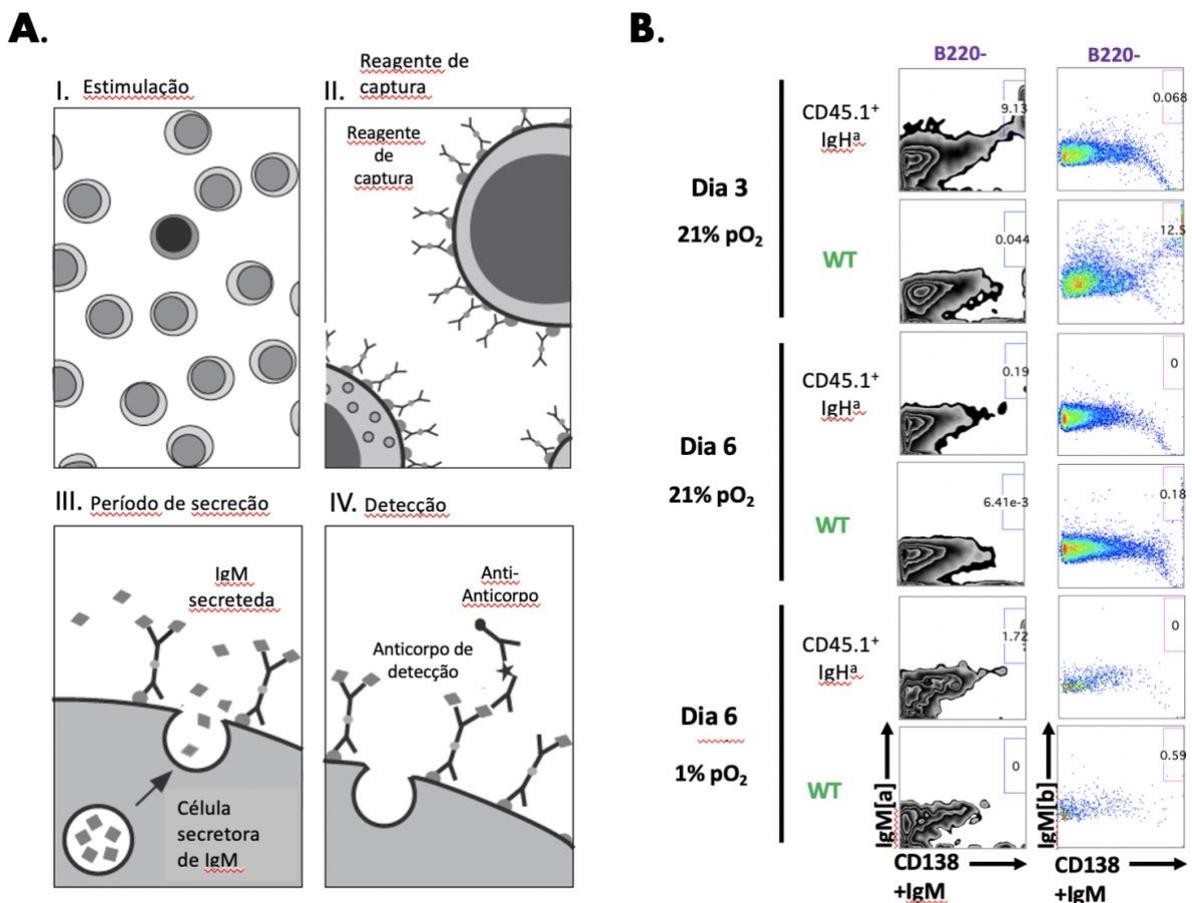
### 8.1. DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE PURIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS SECRETORES DE CLASSES DE IMUNOGLOBULINAS DE CLASSES ESPECÍFICAS

Em 2002, Assenmacher e colaboradores descreveram um protocolo para isolar células secretoras de citocinas específicas denominado “Ensaio de secreção de citocinas por citometria de fluxo” (*Cytometrix cytokines secretion assay*) (ASSENMACHER; LOHNING; RADBRUCH, 2002). Desse modo, foi aplicado o mesmo princípio básico desta técnica para desenvolver um novo ensaio de obtenção de plasmócitos secretores de imunoglobulinas de classes específicas.

Para estabelecer a prova de conceito, foi utilizado o sistema *in vitro* de indução de células B CG para cultivar células B CT (IgH<sup>b</sup>) e CD45.1<sup>+</sup>IgH<sup>a</sup> sob hipóxia e normóxia. Células B foram obtidas de camundongos CT e CD45.1<sup>+</sup>IgH<sup>a</sup> para aumentar a especificidade do ensaio, uma vez que os anticorpos de detecção utilizados para a detecção também pertencem a classes específicas e poderiam interferir no ensaio. Para o ensaio, procurou-se apenas identificar plasmócitos secretores de IgM. Brevemente, o ensaio consistiu em incubar as células B cultivadas previamente sob condições de normóxia e hipóxia com  $\alpha$ IgM para bloquear a IgM de superfície das células B/plasmoblastos remanescentes na cultura. Em seguida, as células foram incubadas com o reagente de captura contendo  $\alpha$ CD138-biotinilado,  $\alpha$ IgM-biotinilado e estreptavidina conjugada à um fluorocromo (Figura 42A). Posteriormente, as células foram permitidas secretar anticorpos por 2 horas em condições de cultura (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 21% de pO<sub>2</sub>). Finalmente, as células foram marcadas com anticorpo de detecção  $\alpha$ IgM[b] (específico para a identificação de anticorpos secretados por células B CT) ou  $\alpha$ IgM[a] (específico para identificação de anticorpos secretados por células B CD45.1<sup>+</sup>IgH<sup>a</sup>) e avaliados por citometria de fluxo (Figura 42A).

De modo interessante, plasmócitos cultivados por 3 dias sob condições de normóxia puderam ser identificados pelos seus respectivos complexos fluorescentes. Em outras palavras, células B CT foram identificadas com o uso de  $\alpha$ IgM[b] e células B CD45.1<sup>+</sup>IgH<sup>a</sup> foram identificadas com o uso de  $\alpha$ IgM[a], demonstrando a especificidade do experimento (Figura 42B). Plasmócitos cultivados sob condições de hipóxia por 6 dias, que possuem uma frequência relativamente alta de IgM, conseguiram ser identificados. No entanto, a frequência encontrada foi relativamente baixa devido ao alto número de células mortas induzidas por hipóxia, como foi demonstrado anteriormente. Além disso,

plasmócitos secretores de anticorpos IgM não foram identificados nas culturas feitas sob condições de normóxia por 6 dias, uma vez que neste tempo praticamente todas as células realizaram troca de isotipo e tornaram-se secretoras de IgG1 como observado anteriormente (Figura 35C). Todos os controles utilizados foram negativos (dados não mostrados). Desse modo, estes resultados mostraram ser possível a purificação de plasmócitos secretores de imunoglobulinas de classes específicas e são promissores para a continuidade do estudo do papel de HIF-1 $\alpha$  na troca de isotipo de imunoglobulinas e para diversas outras aplicações no campo da imunologia e biotecnologia.



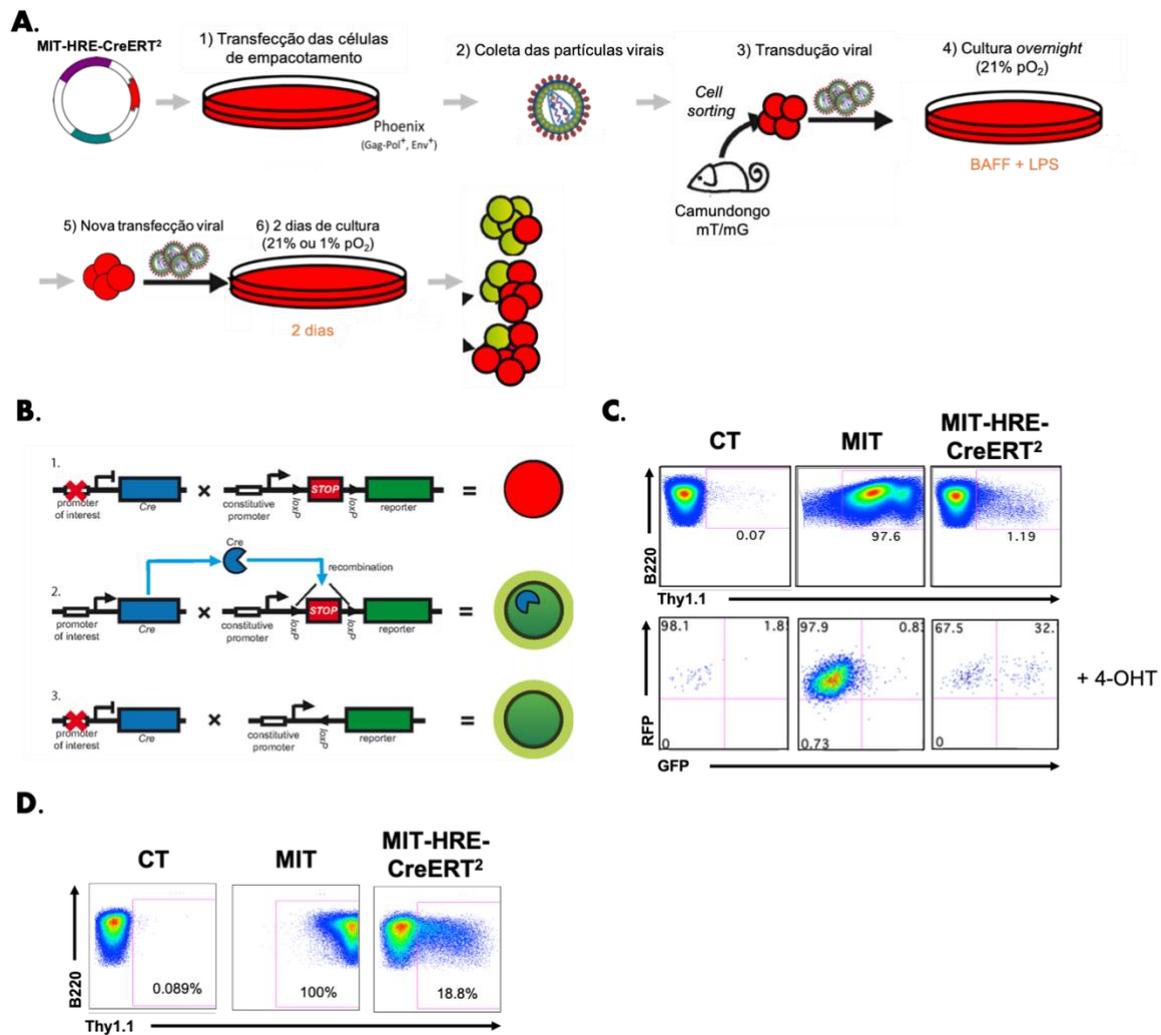
**Figura 42. Ensaio de purificação de plasmócitos secretores de IgM.** A. Células B de camundongos CT e CD45.1<sup>+</sup>IgH<sup>α</sup> foram cultivadas por 3 e 6 dias usando sistema de cultura de células B de CG induzidas *in vitro* (I). Em seguida, células B foram incubadas com  $\alpha$ IgM e então incubadas com reagente de captura (biotina- $\alpha$ CD138 + biotina- $\alpha$ IgM + estreptavidina conjugada à um fluorocromo) (II). Células foram permitidas secretar anticorpos por um período (III) e finalmente marcadas com anticorpos de detecção para análise de viabilidade e imunofenotipagem usando anticorpos apropriados (anti-IgM[a], anti-IgM[b], 7-AAD, B220) (IV). Experimentos CT foram usados usando-se células que não receberam o reagente de captura, mas apenas biotina- $\alpha$ CD138 + estreptavidina conjugada à um fluorocromo. B. Frequência de células B220-IgM[a]+reagente de captura<sup>+</sup> ou B220-IgM[b]+reagente de captura<sup>+</sup>. Estes dados são representativos de 1 experimento. n=1 animal por grupo contendo replicatas técnicas. Outros 2 experimentos foram realizados com variações significativas no protocolo. \*p<0,05. CT: controle;

**pO<sub>2</sub>**: tensão de oxigênio. *Figura adaptada de Assenmacher e colaboradores (ASSENMACHER; LOHNING; RADBRUCH, 2002).*

## 8.2. EXPERIMENTO PROVA DE CONCEITO DE CÉLULAS B PRIMÁRIAS TRANSDUZIDAS COM DNA SENSÍVEL AO HIF

Para tentar uma nova abordagem e investigar se HIF é essencial para a estabilização e longevidade de plasmócitos de vida longa, foi feita a primeira etapa de um experimento que objetiva a realização de mapeamento de destino celular. Para isso, foram usados os vetores MIT-HRE-CreERT2 ou MIT-Thy 1.1 (controle). O vetor MIT-HRE-CreERT2 é sensível à estabilização de HIF e a presença de 4-OHT para permitir a expressão da enzima cre recombinase. A atividade da enzima cre-recombinase, por sua vez, permite a excisão de um elemento lox-STOP-lox que previne a expressão de GFP nas células de camundongos mT/mG duplo fluorescentes. Na ausência de atividade da enzima cre recombinase, células mT/mG mantêm a expressão de RFP (Figura 41B). Além disso, ambos os vetores MIT-HRE-CreERT2 e MIT-Thy 1.1 induzem a expressão de Thy 1.1 na superfície celular e podem ser usados como marcador da eficácia do processo de transdução.

Para estabelecer a prova de conceito e melhor eficácia, diversos protocolos de transfecção (lipossomo, fosfato de cálcio), transduções simples ou duplas ou uso de diferentes células empacotadoras (Plate-E Phoenix) foram utilizados (dados não mostrados). O protocolo mais eficiente consistiu na transfecção dos plasmídios em células empacotadoras da linhagem Phoenix usando o método de fosfato de cálcio (Figura 43A). Após permitir a produção do lentivirus, o sobrenadante foi coletado, filtrado, aliquoteado e imediatamente congelado até o momento da transdução. Em seguida,  $1 \times 10^6$  células B obtidas de camundongos mT/mG duplo-fluorescentes foram incubadas com o sobrenadante contendo lentivirus e submetidas a dois ciclos de centrifugação de 30 minutos para a realização da transdução. Após este procedimento, as células foram estimuladas com LPS (5  $\mu\text{g/mL}$ ), BAFF (10  $\text{ng/mL}$ ) e 50 nM de 4-OHT *overnight* em condições normais de cultura e, no dia seguinte, foram submetidas novamente ao processo de transdução conforme descrito anteriormente. Em seguida, as células foram cultivadas por 2 dias sob condições de normóxia (21% pO<sub>2</sub>) ou hipóxia (1% pO<sub>2</sub>).



**Figura 43. Experimento prova de conceito com vetor viral sensível à HIF e tamoxifeno. A.** Vetores MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup> ou MIT-Thy 1.1 foram usados para transfectar células da linhagem phoenix usando fosfato de cálcio (1). Após permitir a produção do vírus, o sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro 0,45  $\mu$ m, aliquotado e imediatamente congelado até o momento da transdução (2).  $1 \times 10^6$  células B obtidas de camundongos mT/mG duplo-fluorescentes foram incubadas com o sobrenadante contendo lentivirus e submetidas à dois ciclos de centrifugação de 30 minutos, 10.000 x g, para a realização da transdução (3). Após este procedimento, as células foram estimuladas com LPS (5  $\mu$ g/mL), BAFF (10 ng/mL) e 50 nM de 4-OHT *overnight* em condições normais de cultura (4) e no dia seguinte foram submetidas novamente ao processo de transdução conforme descrito anteriormente (5). Em seguida, as células foram cultivadas por 2 dias sob condições de normóxia (21% pO<sub>2</sub>) ou hipóxia (1% pO<sub>2</sub>). Alternativamente, células B foram transduzidas apenas 1 vez conforme descrito no item 3 e deixadas em cultura por 2 dias em condições de hipóxia ou normóxia, conforme descrito no item 6. Células B transduzidas eficientemente com ambos vetores MIT-Thy 1.1 ou MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup> expressam Thy 1.1 em sua superfície, mas apenas células B transduzidas com o vetor MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup> podem ter atividade da enzima cre recombinase após estabilização de HIF e presença de (4-hidroxi)tamoxifeno. **B.** Diagrama de funcionamento da conversão de cor de RFP para GFP em células B mT/mG duplo-fluorescentes transduzidas com o vetor MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup>. Caso ocorra a transcrição e ativação da enzima cre-recombinase, células mT/mG naturalmente RFP<sup>+</sup> tornam-se GFP<sup>+</sup> uma vez que a enzima reconhece um códon de parada flanqueado que impede a expressão da fluorescência GFP. **C.** Frequência de células B mT/mG CT, transduzidas com o vetor MIT-Thy 1.1 ou com o vetor MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup> apenas uma vez e cultivadas na presença de BAFF, LPS e 4-OHT sob condições de hipóxia ou normóxia por 2 dias. **D.** Frequência de células B mT/mG CT, transduzidas 2 vezes com

os vetores MIT-Thy 1.1 ou com MIT-HRE-CreERT2 com intervalo de 1 dia. Após o segundo ciclo de transdução, as células foram cultivadas por 2 dias sob condições de hipóxia ou normóxia. Estes resultados são representados de 6 experimentos independentes com algumas variações nos protocolos para melhor a eficiência da transdução. **4-OHT**: 4-hidroxitamoxifeno; **CT**: controle.

Os resultados obtidos com diferentes protocolos de transdução/transfecção mostraram a viabilidade desta abordagem experimental, uma vez que as células B mT/mG Thy1.1<sup>+</sup> cultivadas sob condições de hipóxia e na presença de 4-OHT passaram a expressar GFP (Figura 43C). No entanto, a frequência de células Thy1.1 foi baixa, impossibilitando o uso dessas células para futuros experimentos de mapeamento de destino celular.

Desse modo, procurou-se aumentar a eficácia de células B mT/mG transduzidas com o vetor MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup>, cujo protocolo descrito acima (Figura 43A) aumentou de uma média de 1,9% de células Thy1.1<sup>+</sup> transduzidas com o uso de diferentes protocolos para 18,8% (Figura 43C-D). Em conjunto, esses resultados foram bastante importantes para permitir a obtenção de células B mT/mG transduzidas com MIT-HRE-CreERT<sup>2</sup> por *cell sorting*, transferidas adotivamente para camundongos recipientes *Rag2*<sup>-/-</sup> ou BKO e então realizar os mesmos protocolos de imunização e administração de tamoxifeno descritos anteriormente (Figura 43A).

## **9. ANEXOS**

## 9. ANEXOS

## 9.1. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



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 "*Avaliação do papel de mTOR no metabolismo energético e ativação de células B durante a inflamação intestinal experimental*", registrado sob o protocolo nº **7/2016**, 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 **08/03/2016** 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 "*Evaluation of mTOR on energy metabolism and activation of B cells during experimental intestinal inflammation*", protocol nº **7/2016**, 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 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 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 **3/8/2016** 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
<i>Mus musculus</i>	C57bl/6	<i>Macho/Male</i>	6 a 10 semanas/weeks	90
	CD19-Cre+ - raptor-fl/fl	<i>Macho/Male</i>	6 a 10 semanas/weeks	90
	CD19-Cre+ - rictor-fl/fl	<i>Macho/Male</i>	6 a 10 semanas/weeks	90
	CD19-Cre+ - TSC1/2-fl/fl	<i>Macho/Male</i>	6 a 10 semanas/weeks	90
	CD19KO	<i>Macho/Male</i>	6 a 10 semanas/weeks	90
	CD19-Cre+ -PRKAA1-fl/fl	<i>Macho/Male</i>	6 a 10 semanas/weeks	90

São Paulo, 08 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

## 9.2. RELATÓRIO DE VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

A análise completa de semelhança pelo programa Turnitin (<https://www.turnitin.com>) resultou em 28% de similaridade, sendo a maioria formada pelo conflito de referências bibliográficas, substantivos e definições.



### Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material:	<b>Paulo Basso</b>
Título do Trabalho:	<b>Quick Submit</b>
Título do envio:	<b>Paulo Tese</b>
Nome do arquivo:	<b>Basso,_PJ_Tese_Final.docx</b>
Tamanho de arquivo:	<b>26.57M</b>
Contagem de páginas:	<b>172</b>
Contagem de palavras:	<b>42,341</b>
Contagem de caracteres:	<b>233,903</b>
Data de envio:	<b>27-jan-2021 09:36AM (UTC-0200)</b>
Identificação do Envio:	<b>1495248149</b>

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PAULO JOSÉ BASSO

**Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 $\alpha$  nas  
funções das células B**

São Paulo  
2021

Direitos Autorais Turnitin 2021. Todos os direitos reservados.

## **10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA, PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA E PRÊMIOS NO PERÍODO**

## 10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA, PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA E PRÊMIOS NO PERÍODO

## 10.1. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

- 10.1.1. BROOKENS, S. K.; CHO, S. H.; BASSO, P. J.; BOOTHBY, M. R. AMPK $\alpha$ 1 in B Cells Dampens Primary Antibody Responses yet Promotes Mitochondrial Homeostasis and Persistence of B Cell Memory. *J Immunol*, v. 205, n. 11, p. 3011-3022, 2020 (BROOKENS et al., 2020a).

Published November 4, 2020, doi:10.4049/jimmunol.1901474

The Journal of Immunology

## AMPK $\alpha$ 1 in B Cells Dampens Primary Antibody Responses yet Promotes Mitochondrial Homeostasis and Persistence of B Cell Memory

Shawna K. Brookens,\* Sung Hoon Cho,<sup>†</sup> Paulo J. Basso,<sup>‡,1</sup> and Mark R. Boothby\*<sup>\*,†</sup>

Emerging evidence indicates that metabolic programs regulate B cell activation and Ab responses. However, the metabolic mediators that support the durability of the memory B cell and long-lived plasma cell populations are not fully elucidated. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is an evolutionary conserved serine/threonine kinase that integrates cellular energy status and nutrient availability to intracellular signaling and metabolic pathways. In this study, we use genetic mouse models to show that loss of AMPK $\alpha$ 1 in B cells led to a weakened recall Ab response associated with a decline in the population of memory-phenotype B cells. AMPK $\alpha$ 1-deficient memory B lymphocytes exhibited aberrant mitochondrial activity, decreased mitophagy, and increased lipid peroxidation. Moreover, loss of AMPK $\alpha$ 1 in B lymphoblasts was associated with decreased mitochondrial spare respiratory capacity. Of note, AMPK $\alpha$ 1 in B cells was dispensable for stability of the bone marrow-resident, long-lived plasma cell population, yet absence of this kinase led to increased rates of Ig production and elevated serum Ab concentrations elicited by primary immunization. Collectively, our findings fit a model in which AMPK $\alpha$ 1 in B cells supports recall function of the memory B cell compartment by promoting mitochondrial homeostasis and longevity but restrains rates of Ig production. *The Journal of Immunology*, 2020, 205: 000–000.

**B** cells confer long-lasting protection against microbes or their exotoxins via the production of highly specific Abs. Upon encounter with cognate Ag, naive B cells rapidly proliferate and ultimately differentiate into Ag-specific memory B cells or Ab-secreting plasma cells, a subset of that persists for decades after clearance of the Ag (1). The persistence of memory B cell and long-lived plasma cell populations is critical for protection against subsequent Ag exposure and achieving long-lasting immunological memory.

After activated B cells undergo proliferation and differentiation, long-lived plasma cells and memory B cells arise from both germinal center (GC)-dependent and -independent pathways (2). After a phase as plasmablasts, long-lived plasma cells can reside in the bone marrow and continuously synthesize and release Ag-specific Ab into the blood stream to bind Ag (3). By contrast, Ag-specific memory B cells continue to circulate through the body and have the capacity to reenter GC or rapidly differentiate into Ab-secreting cells (ASCs) upon subsequent exposure to Ag (4). Although both are long-lived cells in the B lineage, memory B cells appear to be metabolically quiescent, whereas plasma cells continuously synthesize large amounts of secretory glycosylated Ab (5). Apart from diversity in function, long-lived B cells must also adapt to varied nutrient availability in the microenvironment (6, 7). Mechanisms that support longevity in the face of metabolic stressors and demands are incompletely understood.

Bone marrow plasma cell longevity is attributable in part to the expression of Bcl6-related transcription factor ZBTB20 and the ability to shuttle pyruvate to the mitochondria (8–10). Emerging evidence implicates autophagy as critical for the long-term survival of both memory and plasma cells (11–13). However, the mode of autophagy that supports the longevity of the B lineage is unknown.

The energy sensor adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is one upstream activator of canonical autophagy. AMPK is a conserved serine/threonine kinase that couples nutrient availability to cellular metabolism (14). During periods of bioenergetic insufficiency, AMPK can restore cellular energy homeostasis by targeting multiple downstream targets that trigger pathways that increase ATP generation while inhibiting those that consume ATP. Specifically, AMPK promotes fatty acid oxidation, autophagy, and mitochondrial biogenesis while inhibiting protein and fatty acid synthesis (14). Several studies link age-related diseases to the dysregulation of mitochondrial dynamics, suggesting that AMPK may support longevity of cells through regulation of mitochondrial homeostasis (15). Furthermore, AMPK negatively

\*Department of Cancer Biology, Vanderbilt University, Nashville, TN 37232; <sup>†</sup>Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232; and <sup>‡</sup>Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

<sup>1</sup>Current address: Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

ORCID: 0000-0003-1620-6276 (S.K.B.).

Received for publication January 14, 2020. Accepted for publication October 1, 2020.

This work was supported by National Institutes of Health (NIH) Grants R01 AI113292 and R01 HL106812 (to M.R.B.). S.K.B. was supported by NIH Grants R25 GM062459 and T32 CA009592-29, followed by a supplement to R01 AI113292 and PMI Departmental funds. Additional support for S.K.B. was provided by Vanderbilt University's Provost Graduate Fellowship Award. Additional support for P.J.B. was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 2018/08563-8. NIH Shared Instrumentation Grant 1S10OD018015 as well as scholarships via Cancer Center Support Grant CA068485 and Diabetes Research Center Grant DK0205930 helped defray costs of Vanderbilt Cores.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Mark R. Boothby, Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, 1161 21st Avenue South, AA-4214 B MCN, Nashville, TN 37232-2363. E-mail address: mark.boothby@vmc.org

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; ASC, Ab-secreting cell; GC, germinal center; huCD20, human CD20; M<sub>ph</sub><sup>phen</sup>BC, memory-phenotype B cell; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; mtROS, mitochondrially derived reactive oxygen species; NP, nitrophenol; NP-KLH, 4-hydroxy-3-nitrophenylacetate haptens conjugated to keyhole limpet hemocyanin; OCR, oxygen consumption rate; 4-OHT, 4-hydroxytamoxifen; ULK1, Unc-51-like kinase.

Copyright © 2020 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/20/\$37.50

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1901474

- 10.1.2. BREDA, C. N. S.; DAVANZO, G. G.; BASSO, P. J.; SARAIVA CAMARA, N. O.; MORAES-VIEIRA, P. M. M. Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol*, v. 26, n., p. 101255, 2019 (BREDA et al., 2019).

Redox Biology 26 (2019) 101255



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/redox](http://www.elsevier.com/locate/redox)



## Mitochondria as central hub of the immune system

Cristiane Naffah de Souza Breda<sup>a,1</sup>, Gustavo Gastão Davanzo<sup>b,1</sup>, Paulo José Basso<sup>a</sup>, Niels Olsen Saraiva Câmara<sup>a,\*\*</sup>, Pedro Manoel Mendes Moraes-Vieira<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Transplantation Immunobiology Lab, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Immunometabolism  
Mitochondrial function  
Cell fate  
And immune cells

### ABSTRACT

Nearly 130 years after the first insights into the existence of mitochondria, new roles associated with these organelles continue to emerge. As essential hubs that dictate cell fate, mitochondria integrate cell physiology, signaling pathways and metabolism. Thus, recent research has focused on understanding how these multifaceted functions can be used to improve inflammatory responses and prevent cellular dysfunction. Here, we describe the role of mitochondria on the development and function of immune cells, highlighting metabolic aspects and pointing out some metabolic-independent features of mitochondria that sustain cell function.

### 1. Introduction

Cellular metabolism has been an extensively explored field during the past decade. The understanding of how cells use energy to perform their functions has attracted the attention of scientists, especially with regard to metabolic-related diseases such as obesity, diabetes, and cancer [1–4]. Classically, these conditions not only change whole-body metabolism, but also impair the inflammatory responses. Thus, immunometabolism has emerged as a potential new field of inquiry in order to investigate how the metabolic alterations affect immune cells.

The immune system comprises a family of heterogeneous cells with multiple roles during homeostasis and inflammation in a tissue-specific manner. Recent studies have shown that different immune cell subtypes use distinct metabolic programs to perform their functions. For instance, effector T cells prioritize aerobic glycolysis during anabolic metabolism to balance the synthesis of macromolecules and the generation of energy to support it [5]. Conversely, memory T cells, as well as regulatory T cells (Treg), prioritize fatty acid oxidation (FAO also called  $\beta$ -oxidation) to support the energy demand for survival and function [5].

As first hypothesized by Richard Altmann in 1890 [6], the generation of useful metabolic energy is provided mainly by mitochondria in virtually all eukaryotic cells. However, the concept that the mitochondria are only powerhouses of cells has changed due to a myriad

of other roles this membrane-bound organelle can perform. In immune cells, for instance, mitochondria can also regulate cell development, activation, proliferation, differentiation, and death [7,8], which directly impact cell fate and fitness. Moreover, mitochondria are dynamic organelles and can change their morphology and position in the cells through coordinated cycles of fission and fusion to regulate their own and functions and cell metabolism [9]. This process is called mitochondrial dynamics. Another important aspect of the mitochondrial physiology is the local production of oxidants or more commonly referred to as “reactive oxygen species” (mtROS). They were first described as byproducts of the electron transport chain (ETC) and implicated in oxidative damage [10–13], but are also important signaling molecules for cell activation when produced in low quantities [10,14–16].

Thus, the importance of mitochondria goes beyond energy production. Mitochondria can orchestrate immunity by modulating both metabolic and physiologic states in different types of immune cells. In this review, we will focus on how mitochondria drive the development and function of immune cells, highlighting their main metabolic features and pointing out other metabolism-independent roles of mitochondria that sustain cell function.

\* Corresponding author. Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Street Monteiro Lobato 255, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, 13083-970, Brazil.

\*\* Corresponding author. Transplantation Immunobiology Lab, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, ICB IV, Sala 238, 05508000, Cidade Universitária, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: [niels.camara@gmail.com](mailto:niels.camara@gmail.com) (N.O. Saraiva Câmara), [pmvieira@unicamp.br](mailto:pmvieira@unicamp.br) (P.M.M. Moraes-Vieira).

<sup>1</sup> Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101255>

Received 8 March 2019; Received in revised form 1 June 2019; Accepted 10 June 2019

Available online 15 June 2019

2213-2317/ © 2019 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

- 10.1.3. GHIROTTTO, B.; TERRA, F. F.; CAMARA, N. O. S.; BASSO, P. J. Sirtuins in B lymphocytes metabolism and function. *World J Exp Med*, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019 (GHIROTTTO et al., 2019).



Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

*World J Exp Med* 2019 January 16; 9(1): 1-13

DOI: 10.5493/wjem.v9.i1.1

ISSN 2220-315x (online)

MINIREVIEWS

## Sirtuins in B lymphocytes metabolism and function

Bruno Ghirotto, Fernanda Fernandes Terra, Niels Olsen Saraiva Câmara, Paulo José Basso

**ORCID number:** Bruno Ghirotto (0000-0001-6835-3329); Fernanda Fernandes Terra (0000-0002-2860-5365); Niels Olsen Saraiva Camara (0000-0001-5436-1248); Paulo Jose Basso (0000-0003-4856-9207).

**Author contributions:** Ghirotto B wrote the manuscript, edited, generated the table and performed the literature review; Terra FF wrote the manuscript, generated the figures and performed the literature review; Câmara NOS contributed to review the manuscript and approval of the final version; Basso PJ designed the aim of the minireview, wrote, edited and contributed to final approval of the final version.

**Supported by** Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) under Agreements, No. 2015/26682-6, No. 2017/03248-4 and No. 2017/05264-7. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

**Conflict-of-interest statement:** The authors hereby declare to have no potential conflicts of interest.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See:

**Bruno Ghirotto, Fernanda Fernandes Terra, Niels Olsen Saraiva Câmara, Paulo José Basso,** Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

**Niels Olsen Saraiva Câmara,** Division of Nephrology, School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo 04023-062, Brazil

**Niels Olsen Saraiva Câmara,** Laboratory of Renal Physiology (LIM 16), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 01246-903, Brazil

**Corresponding author:** Niels Olsen Saraiva Câmara, MD, PhD, Research Scientist, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 Cid. Universitaria, São Paulo 05508-000, Brazil. [niels@icb.usp.br](mailto:niels@icb.usp.br)

**Telephone:** +55-11-30917388

**Fax:** +55-11-30917224

### Abstract

Sirtuins (SIRT6) are NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases and play a role in virtually all cell biological processes. As SIRT6 functions vary according to their subtypes, they can either activate or inhibit signaling pathways upon different conditions or tissues. Recent studies have focused on metabolic effects performed by SIRT6 in several cell types since specific metabolic pathways (e.g., aerobic glycolysis, oxidative phosphorylation,  $\beta$ -oxidation, glutaminolysis) are used to determine the cell fate. However, few efforts have been made to understand the role of SIRT6 on B lymphocytes metabolism and function. These cells are associated with humoral immune responses by secreting larger amounts of antibodies after differentiating into antibody-secreting cells. Besides, both the SIRT6 and B lymphocytes are potential targets to treat several immune-mediated disorders, including cancer. Here, we provide an outlook of recent studies regarding the role of SIRT6 in general cellular metabolism and B lymphocytes functions, pointing out the future perspectives of this field.

**Key words:** B cells; Metabolic sensors; Histone deacetylases; Cancer

©The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Current studies have focused on understanding which intracellular molecules coordinate the metabolic flux within the cells. In addition to metabolism, sirtuins play a role in virtually all cell biological processes, but they have not been properly described in B lymphocytes function and metabolism, despite the importance of these immune cells in health and disease. Here we discuss studies that associate sirtuins and B lymphocytes, highlight the gaps found in the literature and point out the future research

- 10.1.4. FACHI, J. L.; FELIPE, J. S.; PRAL, L. P.; DA SILVA, B. K.; CORREA, R. O.; DE ANDRADE, M. C. P.; DA FONSECA, D. M.; BASSO, P. J.; CAMARA, N. O. S.; DE SALES, E. S. E. L.; DOS SANTOS MARTINS, F.; GUIMA, S. E. S.; THOMAS, A. M.; SETUBAL, J. C.; MAGALHAES, Y. T.; FORTI, F. L.; CANDREVA, T.; RODRIGUES, H. G.; DE JESUS, M. B.; CONSONNI, S. R.; FARIAS, A. D. S.; VARGA-WEISZ, P.; VINOLO, M. A. R. Butyrate Protects Mice from *Clostridium difficile*-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep*, v. 27, n. 3, p. 750-761 e757, 2019 (FACHI et al., 2019).

OPEN  
ACCESS  
CellPress

Cell Reports  
Article

## Butyrate Protects Mice from *Clostridium difficile*-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism

José Luís Fachi,<sup>1</sup> Jaqueline de Souza Felipe,<sup>1</sup> Lais Passariello Pral,<sup>1</sup> Bruna Karadi da Silva,<sup>1</sup> Renan Oliveira Corrêa,<sup>1</sup> Mirella Cristiny Pereira de Andrade,<sup>1</sup> Denise Morais da Fonseca,<sup>2</sup> Paulo José Basso,<sup>2</sup> Niels Olsen Saraiva Câmara,<sup>2</sup> Éricka Lorenna de Sales e Souza,<sup>3</sup> Flaviano dos Santos Martins,<sup>3</sup> Suzana Eiko Sato Guima,<sup>4</sup> Andrew Maltez Thomas,<sup>4</sup> Joao Carlos Setubal,<sup>4,5</sup> Yuli Thamires Magalhães,<sup>4</sup> Fábio Luis Forti,<sup>4</sup> Thamiris Candreva,<sup>5</sup> Hosana Gomes Rodrigues,<sup>6</sup> Marcelo Bispo de Jesus,<sup>7</sup> Sílvio Roberto Consonni,<sup>8</sup> Alessandro dos Santos Farias,<sup>9</sup> Patrick Varga-Weisz,<sup>10,11</sup> and Marco Aurélio Ramirez Vinolo<sup>1,12,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP 13083-862, Brazil

<sup>2</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Biotherapeutics Agents, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

<sup>5</sup>Biocomplexity Institute, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA 24061, USA

<sup>6</sup>Laboratory of Nutrients and Tissue Repair, School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, SP 13484-350, Brazil

<sup>7</sup>Nano-Cell Interactions Lab, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP 13083-862, Brazil

<sup>8</sup>Laboratory of Citochemistry and Immunocitochemistry, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP 13083-862, Brazil

<sup>9</sup>Laboratory of Neuroimmunology, Department of Genetics, Evolution Microbiology, and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP 13083-862, Brazil

<sup>10</sup>Nuclear Dynamics Programme, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK

<sup>11</sup>School of Biological Sciences, University of Essex, Colchester CO4 3SQ, UK

<sup>12</sup>Lead Contact

\*Correspondence: mvinolo@unicamp.br

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.054>

### SUMMARY

Antibiotic-induced dysbiosis is a key factor predisposing intestinal infection by *Clostridium difficile*. Here, we show that interventions that restore butyrate intestinal levels mitigate clinical and pathological features of *C. difficile*-induced colitis. Butyrate has no effect on *C. difficile* colonization or toxin production. However, it attenuates intestinal inflammation and improves intestinal barrier function in infected mice, as shown by reduced intestinal epithelial permeability and bacterial translocation, effects associated with the increased expression of components of intestinal epithelial cell tight junctions. Activation of the transcription factor HIF-1 in intestinal epithelial cells exerts a protective effect in *C. difficile*-induced colitis, and it is required for butyrate effects. We conclude that butyrate protects intestinal epithelial cells from damage caused by *C. difficile* toxins via the stabilization of HIF-1, mitigating local inflammatory response and systemic consequences of the infection.

### INTRODUCTION

*Clostridium difficile* is a Gram-positive anaerobic bacillus that forms spores, conferring resistance to environmental factors and allowing persistence for several months on surfaces and food and in water. This bacterium is a common cause of intestinal infection, which mainly affects hospitalized patients, and is recognized as a serious public health problem (Martin et al., 2016). A continuous increase in the incidence, morbidity, and mortality of patients infected with *C. difficile* has been seen in recent decades (Martin et al., 2016). The development of clinical disease most commonly occurs after the ingestion of spores by a susceptible host. A major risk factor for *C. difficile* infection (CDI) is antibiotic use, which induces changes in indigenous intestinal microbiota, impairing resistance (Chen et al., 2008; Lamont and Hajshengallis, 2015; Rodriguez et al., 2015). Additional risk factors include age, immunological state, and comorbidities (Lamont and Hajshengallis, 2015; Rea et al., 2011).

CDI presents symptoms ranging from mild to moderate non-bloody diarrhea and intestinal discomfort to severe forms with intense diarrhea and abdominal pain, pseudomembranous colitis, and more serious complications such as toxic megacolon, peritonitis, respiratory distress, sepsis, and death (Johanesen et al., 2015; Lamont and Hajshengallis, 2015). These symptoms are



- 10.1.5. VIEIRA, R. S.; CASTOLDI, A.; BASSO, P. J.; HIYANE, M. I.; CAMARA, N. O. S.; ALMEIDA, R. R. Butyrate Attenuates Lung Inflammation by Negatively Modulating Th9 Cells. *Front Immunol*, v. 10, n., p. 67, 2019 (VIEIRA et al., 2019).



ORIGINAL RESEARCH  
published: 29 January 2019  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00067



## Butyrate Attenuates Lung Inflammation by Negatively Modulating Th9 Cells

Raquel de Souza Vieira<sup>1</sup>, Angela Castoldi<sup>1</sup>, Paulo José Basso<sup>1</sup>, Meire Ioshie Hiyane<sup>1</sup>, Niels Olsen Saraiva Câmara<sup>1,2,3†</sup> and Rafael Ribeiro Almeida<sup>1,4\*\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup> Nephrology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup> Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Clinical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>4</sup> Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor) School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Th9 cells orchestrate allergic lung inflammation by promoting recruitment and activation of eosinophils and mast cells, and by stimulating epithelial mucus production, which is known to be mainly dependent on IL-9. These cells share developmental pathways with induced regulatory T cells that may determine the generation of one over the other subset. In fact, the FOXP3 transcription factor has been shown to bind *Il9* locus and repress IL-9 production. The microbiota-derived short-chain fatty acids (SCFAs) butyrate and propionate have been described as FOXP3 inducers and are known to have anti-inflammatory properties. While SCFAs attenuate lung inflammation by inducing regulatory T cells and suppressing Th2 responses, their effects on Th9 cells have not been addressed yet. Therefore, we hypothesized that SCFAs would have a protective role in lung inflammation by negatively modulating differentiation and function of Th9 cells. Our results demonstrated that butyrate is more effective than propionate in promoting FOXP3 expression and IL-9 repression. In addition, propionate was found to negatively impact *in vitro* differentiation of IL-13-expressing T cells. Butyrate treatment attenuated lung inflammation and mucus production in OVA-challenged mice, which presented lower frequency of lung-infiltrated Th9 cells and eosinophils. Both Th9 cell adoptive transfer and IL-9 treatment restored lung inflammation in butyrate-treated OVA-challenged mice, indicating that the anti-inflammatory effects of butyrate may rely on suppressing Th9-mediated immune responses.

**Keywords:** butyrate, Th9 cells, tregs, eosinophils, lung inflammation

### INTRODUCTION

Helper T-cell differentiation takes place in secondary lymphoid organs, where the cytokine environment plays a key role in determining the fate of naïve T cells toward many CD4+ T-Cell subsets. These subsets include effector T helper 1 (Th1), Th2, Th9, and Th17 cells that secrete signature cytokines, and regulatory Foxp3 T (Treg) cells that help hold immune responses in check (1). Interleukin-4 (IL-4) is known to induce the differentiation of Th2 cells, characterized by expressing the transcription factors STAT6 and GATA-3, and by producing the cytokines IL-4, IL-5, and IL-13 (1). These cells are mainly involved in the pathogenesis of allergic diseases, promoting activation of eosinophils and mast cells, mucus production, and triggering antibody class switching to IgE in B cells, which can also be modulated by other T-cell subsets (2).

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Loretta Tuosto,  
Sapienza University of Rome, Italy

#### Reviewed by:

Xian Chang Li,  
Houston Methodist Hospital,  
United States  
Youcun Qian,  
Shanghai Institutes for Biological  
Sciences (CAS), China

#### \*Correspondence:

Rafael Ribeiro Almeida  
rafaelbio13@usp.br

† These authors share co-senior  
authorship

#### Specialty section:

This article was submitted to  
T Cell Biology,  
a section of the journal  
*Frontiers in Immunology*

Received: 05 July 2018

Accepted: 11 January 2019

Published: 29 January 2019

#### Citation:

Vieira RS, Castoldi A, Basso PJ,  
Hiyane MI, Câmara NOS and  
Almeida RR (2019) Butyrate  
Attenuates Lung Inflammation by  
Negatively Modulating Th9 Cells.  
*Front. Immunol.* 10:67.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00067

- 10.1.6. BASSO, P. J.; CAMARA, N. O. S.; SALES-CAMPOS, H. Microbial-Based Therapies in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease - An Overview of Human Studies. *Front Pharmacol*, v. 9, n., p. 1571, 2018 (BASSO, P. J.; CAMARA; SALES-CAMPOS, 2018).



## Microbial-Based Therapies in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease – An Overview of Human Studies

Paulo José Basso<sup>1†</sup>, Niels Olsen Saraiva Câmara<sup>1‡</sup> and Helioswilton Sales-Campos<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Luca Antonielli,  
University of Pisa, Italy

#### Reviewed by:

Carolina Pellegrini,  
University of Pisa, Italy  
Dapeng Chen,  
Dalian Medical University, China

#### \*Correspondence:

Helioswilton Sales-Campos  
tonsales@ufg.br;  
tonsales@hotmail.com  
orcid.org/0000-0003-3252-2834  
<sup>†</sup>orcid.org/0000-0003-4856-9207  
<sup>‡</sup>orcid.org/0000-0001-5436-1248

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Gastrointestinal and Hepatic  
Pharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 10 October 2018

**Accepted:** 24 December 2018

**Published:** 10 January 2019

#### Citation:

Basso PJ, Câmara NOS and  
Sales-Campos H (2019)  
Microbial-Based Therapies  
in the Treatment of Inflammatory  
Bowel Disease – An Overview  
of Human Studies.  
*Front. Pharmacol.* 9:1571.  
doi: 10.3389/fphar.2018.01571

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of multifactorial and inflammatory infirmities comprised of two main entities: Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Classic strategies to treat IBD are focused on decreasing inflammation besides inducing and extending disease remission. However, these approaches have several limitations such as low responsiveness, excessive immunosuppression, and refractoriness. Despite the multifactorial causality of IBD, immune disturbances and intestinal dysbiosis have been suggested as the central players in disease pathogenesis. Hence, therapies aiming at modulating intestinal microbial composition may represent a promising strategy in IBD control. Fecal microbiota transplantation (FMT) and probiotics have been explored as promising candidates to reestablish microbial balance in several immune-mediated diseases such as IBD. These microbial-based therapies have demonstrated the ability to reduce both the dysbiotic environment and production of inflammatory mediators, thus inducing remission, especially in UC. Despite these promising results, there is still no consensus on the relevance of such treatments in IBD as a potential clinical strategy. Thus, this review aims to critically review and describe the use of FMT and probiotics to treat patients with IBD.

**Keywords:** fecal microbiota transplantation, probiotics, Crohn's disease, Ulcerative colitis, dysbiosis

### INTRODUCTION

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a group of immune-mediated diseases mainly represented by Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) (Mao et al., 2018). IBD presents a multifactorial etiology driven by immunological disturbances, genetic alterations and the influence of environmental factors such as diet, lifestyle, socioeconomic development, intestinal dysbiotic microbiota, among other aspects (Basso et al., 2014). Current therapies are based on pharmacological approaches using traditional medicines such as aminosalicylates, corticosteroids, thiopurines, folic acid antagonists, or biological therapies, aiming at controlling inflammation besides reducing disease relapse (Sales-Campos et al., 2015). However, these approaches are not curative, and patients may become refractory or intolerant to them. In this context, therapies aiming at modulating the microbes inhabiting the human body, especially the intestine, have been suggested as one of the most promising strategies to treat immune-mediated diseases such as IBD

- 10.1.7. SALES-CAMPOS, H.; DE SOUZA, P. R.; BASSO, P. J.; NARDINI, V.; SILVA, A.; BANQUIERI, F.; ALVES, V. B.; CHICA, J. E.; NOMIZO, A.; CARDOSO, C. R. Amelioration of experimental colitis after short-term therapy with glucocorticoid and its relationship to the induction of different regulatory markers. *Immunology*, v. 150, n. 1, p. 115-126, 2017 (SALES-CAMPOS et al., 2017).

Immunology

The Journal of cells, molecules, systems and technologies

British Society for  
immunology

IMMUNOLOGY ORIGINAL ARTICLE

## Amelioration of experimental colitis after short-term therapy with glucocorticoid and its relationship to the induction of different regulatory markers

Helioswilton Sales-Campos,<sup>1\*</sup>  
Patrícia R. de Souza,<sup>1\*</sup>  
Paulo J. Basso,<sup>2</sup> Viviani Nardini,<sup>1</sup>  
Angelica Silva,<sup>1</sup> Fernanda  
Banquieri,<sup>1</sup> Vanessa B. F. Alves,<sup>1</sup>  
Javier E. L. Chica,<sup>3</sup> Auro Nomizo<sup>1</sup>  
and Cristina R. B. Cardoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto,  
<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto,  
and <sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil

doi:10.1111/imm.12672

Received 8 June 2016; revised 5 September 2016; accepted 6 September 2016.

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr Cristina R. B. Cardoso, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Sciences, Av. do Café, s/n – 14040-903 Ribeirão Preto/SP, Brazil.  
Email: cristina@fcfp.usp.br  
Senior author: Dr Cristina R. B. Cardoso

### Summary

The clinical benefits of short-term therapy with glucocorticoids (GC) in patients with inflammatory bowel disease (IBD) are widely known. However, the effects of this treatment towards the re-establishment of the regulatory network in IBD are not fully explored. We have evaluated the immunological effects of the abbreviated GC therapy in experimental colitis induced by 3% dextran sulphate sodium in C57BL/6 mice. Treatment with GC improved disease outcome, constrained circulating leucocytes and ameliorated intestinal inflammation. The control of the local inflammatory responses involved a reduction in the expression of interferon- $\gamma$  and interleukin-1 $\beta$ , associated with augmented mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptors ( $\alpha$  and  $\gamma$ ) in intestine. Furthermore, there was a reduction of CD4<sup>+</sup> T cells producing interferon- $\gamma$ , together with an increased frequency of the putative regulatory population of T cells producing interleukin-10, in spleen. These systemic alterations were accompanied by a decrease in the proliferative potential of splenocytes of mice treated *in vivo* with GC. Notably, treatment with GC also led to an increase in the frequency of the regulatory markers GITR, CTLA-4, PD-1, CD73 and FoxP3, more prominently in spleen. Taken together, our results pointed to a role of GC in the control of leucocyte responsiveness and re-establishment of a regulatory system, which probably contributed to disease control and the restoration of immune balance. Finally, this is the first time that GC treatment was associated with the modulation of a broad number of regulatory markers in an experimental model of colitis.

**Keywords:** dextran sulphate sodium-induced colitis; glucocorticoids; immune regulation; inflammatory bowel disease; regulatory cells.

### Introduction

The effect of glucocorticoids (GC) on the immune system was first described in 1924 when a relationship between adrenalectomy and thymus hyperplasia was portrayed in rats.<sup>1</sup> Since then, GC have become one of the most frequently prescribed drugs to treat patients with inflammatory disorders such as asthma,<sup>2</sup> rheumatoid arthritis<sup>3</sup> or inflammatory bowel disease (IBD).<sup>4,5</sup> Among these immune disturbances, those related to the gastrointestinal tract, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, are of special interest because they affect millions of people around the world and are responsible for various

physical, nutritional and immunological disabilities. In this context, Crohn's disease and ulcerative colitis, generally known as IBD, are characterized by their chronic course with alternating episodes of disease activity, varying severity and clinical remission periods.<sup>6</sup>

Corticosteroids represent one of the most effective options to treat acute exacerbations of IBD and are recognized by their ability to induce remission in patients with moderate to severe disease.<sup>7,8</sup> These drugs down-regulate key players in inflammation such as the nuclear factor- $\kappa$ B, nuclear factor of activated T cells and activator protein-1. These transcription factors are involved in the induction of a vast number of pro-inflammatory

- 10.1.8. DE SOUZA, P. R.; SALES-CAMPOS, H.; BASSO, P. J.; NARDINI, V.; SILVA, A.; BANQUIERI, F.; ALVES, V. B.; CHICA, J. E.; NOMIZO, A.; CARDOSO, C. R. Adrenal-Derived Hormones Differentially Modulate Intestinal Immunity in Experimental Colitis. *Mediators Inflamm*, v. 2016, n., p. 4936370, 2016 (DE SOUZA et al., 2016).

Hindawi Publishing Corporation  
Mediators of Inflammation  
Volume 2016, Article ID 4936370, 13 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4936370>

## Research Article

# Adrenal-Derived Hormones Differentially Modulate Intestinal Immunity in Experimental Colitis

Patrícia Reis de Souza,<sup>1</sup> Helioswilton Sales-Campos,<sup>1</sup> Paulo José Basso,<sup>2</sup> Viviani Nardini,<sup>1</sup> Angelica Silva,<sup>1</sup> Fernanda Banquiere,<sup>1</sup> Vanessa Beatriz Freitas Alves,<sup>1</sup> Javier Emílio Lazo Chica,<sup>3</sup> Auro Nomizo,<sup>1</sup> and Cristina Ribeiro de Barros Cardoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Cristina Ribeiro de Barros Cardoso; [cristina@fcrp.usp.br](mailto:cristina@fcrp.usp.br)

Received 26 March 2016; Accepted 19 May 2016

Academic Editor: Dezheng Zhao

Copyright © 2016 Patrícia Reis de Souza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The adrenal glands are able to modulate immune responses through neuroimmunoendocrine interactions and cortisol secretion that could suppress exacerbated inflammation such as in inflammatory bowel disease (IBD). Therefore, here we evaluated the role of these glands in experimental colitis induced by 3% dextran sulfate sodium (DSS) in C57BL/6 mice subjected to adrenalectomy, with or without glucocorticoid (GC) replacement. Mice succumbed to colitis without adrenals with a higher clinical score and augmented systemic levels of IL-6 and lower LPS. Furthermore, adrenalectomy negatively modulated systemic regulatory markers. The absence of adrenals resulted in augmented tolerogenic lamina propria dendritic cells but no compensatory local production of corticosterone and decreased mucosal inflammation associated with increased IFN- $\gamma$  and FasL in the intestine. To clarify the importance of GC in this scenario, GC replacement in adrenalectomized mice restored different markers to the same degree of that observed in DSS group. Finally, this is the first time that adrenal-derived hormones, especially GC, were associated with the differential local modulation of the gut infiltrate, also pointing to a relationship between adrenalectomy and the modulation of systemic regulatory markers. These findings may elucidate some neuroimmunoendocrine mechanisms that dictate colitis outcome.

## 1. Introduction

The immune and endocrine systems interact directly to maintain the homeostasis of the organism in face of aggressions such as stress, infectious diseases, or inflammatory processes. In this context, chronic stress may represent a potential risk factor for the development of autoimmune and inflammatory disorders such as inflammatory bowel diseases (IBD) [1]. IBD that comprise Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are characterized by their chronic course with alternating episodes of disease activity, severity, and clinical remission [2, 3]. UC and CD are believed to be multifactorial disorders [4] triggered by disturbances in environmental factors (microbiota and stress) [3, 5], genetic

susceptibility, and immunological imbalance [4]. Hence, gut dysbiosis [6], defects in the population of effector T cells that react against normal microbial antigens in the intestine, and a decrease in the population of regulatory T cells (Tregs) may account for the breakdown of mucosal tolerance in this scenario [7].

The endocrine system may also play an important immune regulatory role in inflammatory diseases by production of mediators such as the adrenal-derived hormones [8]. During homeostasis disturbance, the secretion of proinflammatory cytokines by immune cells stimulates the hypothalamus to synthesize corticotropin-releasing hormone (CRH), which in turn acts on the anterior pituitary promoting the production and release of adrenocorticotropin

- 10.1.9. ALVES, V. B.; BASSO, P. J.; NARDINI, V.; SILVA, A.; CHICA, J. E.; CARDOSO, C. R. Dehydroepiandrosterone (DHEA) restrains intestinal inflammation by rendering leukocytes hyporesponsive and balancing colitogenic inflammatory responses. *Immunobiology*, v. 221, n. 9, p. 934-943, 2016 (ALVES et al., 2016).

Immunobiology 221 (2016) 934–943



## Dehydroepiandrosterone (DHEA) restrains intestinal inflammation by rendering leukocytes hyporesponsive and balancing colitogenic inflammatory responses



Vanessa Beatriz Freitas Alves<sup>a</sup>, Paulo José Basso<sup>b</sup>, Viviani Nardini<sup>a</sup>, Angélica Silva<sup>a</sup>, Javier Emílio Lazo Chica<sup>c</sup>, Cristina Ribeiro de Barros Cardoso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Imunologia e Bioquímica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 March 2016

Received in revised form 6 May 2016

Accepted 23 May 2016

Available online 24 May 2016

#### Keywords:

Dehydroepiandrosterone  
Inflammatory bowel disease  
Immunomodulation  
Mice  
Colitis

### ABSTRACT

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a hormone that plays an important role in the modulation of inflammatory responses. However, the precise mechanisms that link the actions of this androgen with protection or susceptibility to inflammatory bowel diseases (IBD) remain unknown. Here we showed that low dose DHEA inhibited proliferation of spleen cells and IFN- $\gamma$  production. The hormone was not toxic to myeloid lineage cells, although it caused necrosis of spleen cells at the intermediate and highest doses in vitro (50 and 100  $\mu$ M). The treatment of C57BL/6 mice with DHEA during colitis induction by dextran sodium sulfate (DSS) led to a reduction in weight loss and clinical signs of disease. There were decreased peripheral blood monocytes on day 6 of DSS exposure and treatment, besides increase in circulating neutrophils in the tissue repair phase. DHEA also led to reduced lamina propria cellularity and restoration of normal colon length. These results were accompanied by decreased expression of IL-6 and TGF- $\beta$  mRNA, while IL-13 was augmented in the colon on day 6, which was probably related to attenuation of inflammation. There was retention of CD4<sup>+</sup> cells in the spleen after use of DHEA, along with augmented frequency of CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> cells, decreased CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> in spleen and constrained CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> population in the mesenteric lymph nodes. Moreover, splenocytes of mice treated with DHEA became hyporesponsive, as observed by reduced proliferation after re-stimulation ex-vivo. In conclusion, DHEA modifies leukocyte activity and balances the exacerbated immune responses which drive local and systemic damages in IBD.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

Increased inflammatory reactions during immune responses are under influence of different mechanisms including neuroendocrine interactions. The inflammatory response may lead to the activation

of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) that is capable to modulate the ongoing inflammation (Ruzek et al., 1999; Smith and Vale, 2006). Beyond the direct influence in the adrenal gland activity (Ehrhart-Bornstein et al., 1998; Price et al., 1996), inflammatory cytokines may stimulate the synthesis of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the hypothalamus, leading to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion by the pituitary gland and subsequent production of adrenal steroids such as glucocorticoids (GCs) and dehydroepiandrosterone (DHEA) (Silverman et al., 2005). The sulfated analogue of DHEA (DHEA-S) is the main form found in the body's circulation and it is enzymatically converted into DHEA, which is in turn the precursor of several sex steroids such as testosterone, estradiol and estrone (Miller and Auchus, 2011). Low serum levels of DHEA are associated with inflammatory diseases (Straub et al., 1998, 1996; Overman et al., 2012) and novel hormone-based therapies have been studied in recent years due to their putative

**Abbreviations:** DHEA, dehydroepiandrosterone; IBD, inflammatory bowel disease; CRH, corticotropin-releasing hormone; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; GCs, glucocorticoids; DSS, dextran sodium sulfate; LP, lamina propria; CD, crohn's disease; UC, ulcerative colitis; PG, propylene glycol; MLN, mesenteric lymph nodes; IEL, intraepithelial lymphocytes.

\* Corresponding author at: School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto—USP, Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Sciences, Av. do Café, s/n – 14040-903 Ribeirão Preto/SP, Brazil.

E-mail addresses: cristina@fcrp.usp.br, cribarros@hotmail.com (C.R.d.B. Cardoso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.05.013>

0171-2985/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## 10.2. MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

- 9.2.1 BASSO, P. J.; ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CÂMARA, N. O. S. Targeting immune cell metabolism in kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology*. [Manuscript ID: NRNEPH-19-285V1C](#)

## 10.3. MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

- 10.3.1. BASSO, P. J.; SALES-CAMPOS, H.; NARDINI, V.; ALVES, V. B. F.; BONFÁ, G.; RODRIGUES, C. C.; GHIROTTI, B.; CHICA, J. E. L.; NOMIZO, A; CARDOSO, C. R. B. Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha mediates the beneficial effects of Atorvastatin in experimental colitis. *Frontiers in Immunology*. [Manuscript ID: 618365](#)

## 10.4. CAPÍTULOS DE LIVROS

- 10.4.1. IGNACIO, A. A; TERRA, F. F.; WATANABE, I. K. M.; BASSO, P. J.; CÂMARA, N. O. S. Role of the microbiome in intestinal barrier function and immune defense. Livro: *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*. ISBN: 978-0-12-815249-2. 2019.
- 10.4.2. BASSO, P. J.; CÂMARA, N. O. S. Imunometabolismo: novas perspectivas para o tratamento de doenças renais. Livro: *Atualidades em Nefrologia 15*. ISBN: 8573782617. 2018.
- 10.4.3. BASSO, P. J.; CÂMARA, N. O. S. Aterosclerose e resposta inflamatória. Livro: N/A. (aguardando publicação).

## 10.5. PRÊMIOS

- 10.5.1. Prêmio de melhor resumo. *Southeastern Immunology Symposium, Emory University*. Atlanta, EUA, 2019.
- 10.5.2. Aluno selecionado pelo ICB/USP e pela *Tsukuba University* para apresentação oral na *Tsukuba Conference*. Tsukuba, Japão, 2019.
- 10.5.3. Um dos 15 estudantes selecionados em âmbito mundial para participar do *TwinnToInfect Spring School*. Lisboa, Portugal, 2018.
- 10.5.4. Menção honrosa de melhor trabalho científico de Doutorado no Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia de 2017. *B-cell specific AMPK deficiency promotes metabolic reprogramming and ameliorates experimental colitis. XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology*, Salvador, Bahia, Brasil. 2017.
- 10.5.5. Prêmio do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações de Métodos Alternativos à Experimentação Animal pelo trabalho científico publicado: *An alternative to the use of animals to teach diabetes mellitus*. *Advances in Physiology Education*, v. 38, p. 235-238, 2014. Brasília, Brasil, 2017.
- 10.5.6. I Prêmio BD pela apresentação de pôster no “VI encontro de Pós-Graduação em Imunologia”. Título do trabalho: *AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates glucose metabolism and activation status of B cells*. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil. 2017.
- 10.5.7. Menção honrosa pela apresentação de pôster no “VI encontro de Pós-Graduação em Imunologia”. Título do trabalho: *AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates glucose metabolism and activation status of B cells*. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil. 2017.