

PAULO JOSÉ BASSO

Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 α 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

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).

BASSO, P. J. **Avaliação dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 α 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 α , 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 α 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^{ΔB}) 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^{ΔB} diminuíram a massa, a atividade e a capacidade respiratória mitocondriais. Animais AMPK^{ΔB} 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 α diminuiu e aumentou, respectivamente, a TII para IgG1, sem influenciar a frequência de plasmócitos. Finalmente, a deleção de HIF-1 α em células B oito semanas após serem transferidas adotivamente para camundongos *Rag2*^{-/-} 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 α é importante para a manutenção de plasmócitos de vida longa e TII para IgG1.

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

BASSO, P. J. **Evaluation of AMPK and HIF-1 α 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 α 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 α 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^{ΔB}) 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^{ΔB} cells also decreased mitochondrial mass, activity and respiratory capacity. In addition, AMPK^{ΔB} 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 α overexpression or deletion decreased or increased, respectively, CSR to IgG1. At last, HIF-1 α deletion in B cells eight weeks after being adoptively transferred into Rag2^{-/-} 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 α , 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.

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- β), 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 linfoides (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 κ e λ) 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 5×10^{13} antígenos distintos (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013).

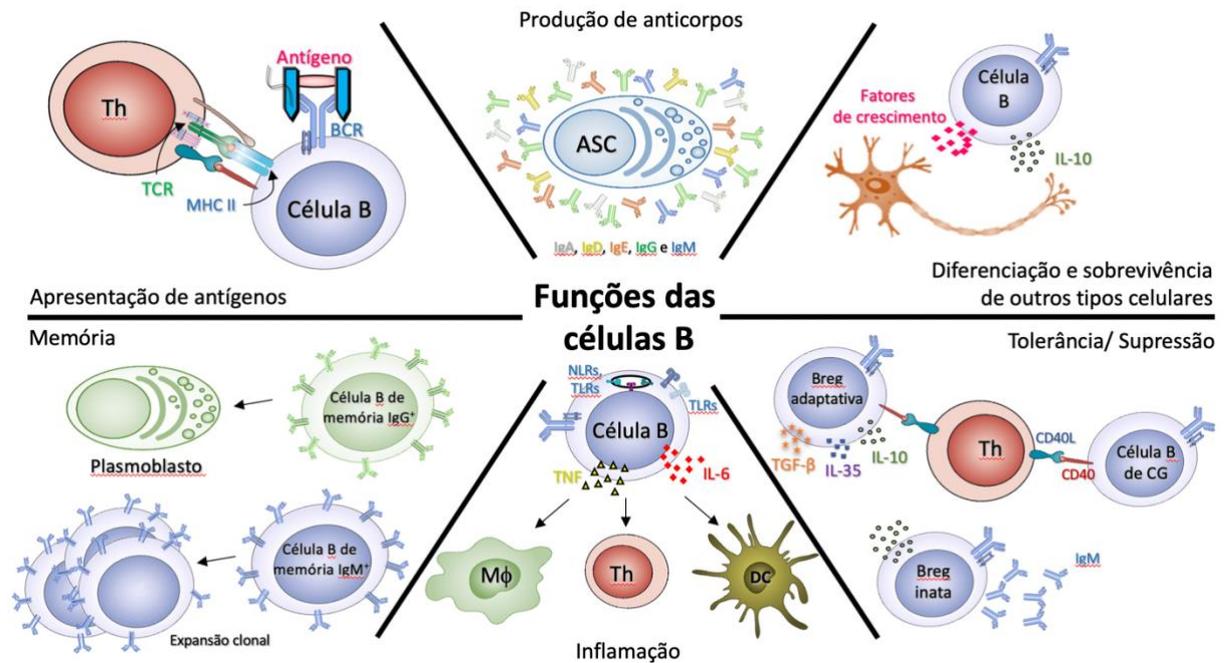


Figura 1. Funções das células B. Células B (ou linfócitos B) desempenham diversas funções na imunidade inata e adaptativa. Considerando que seus diferentes subtipos celulares podem privilegiar certas funções, de modo geral, elas têm a capacidade de apresentar antígenos para as células T, produzir e secretar 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; **M ϕ :** 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).

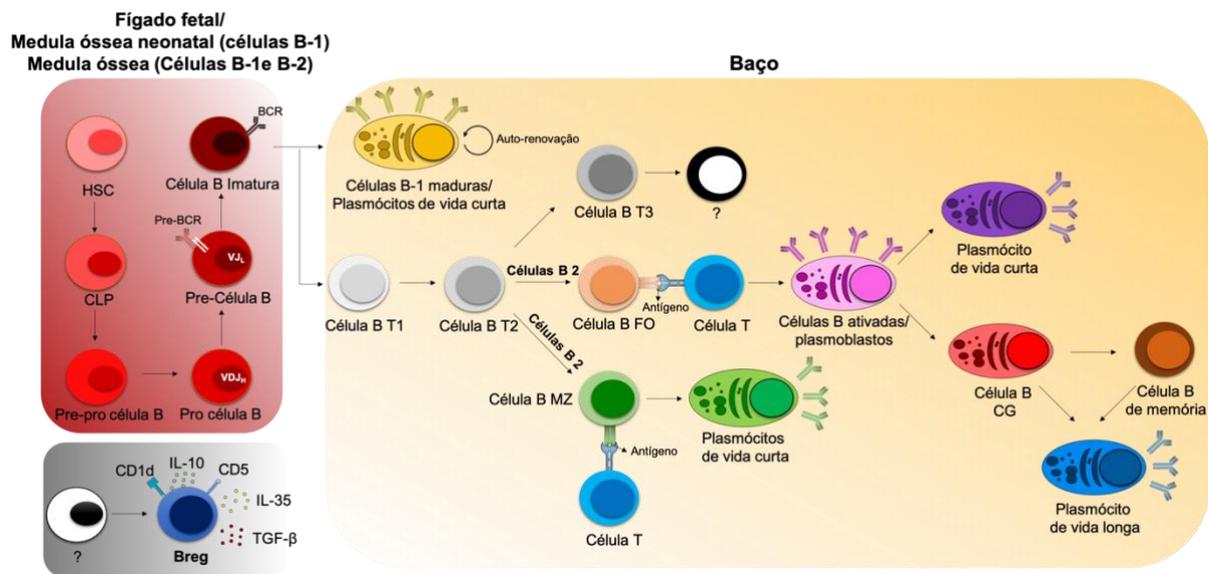


Figura 2. Desenvolvimento e subtipos de células B. Três subpopulações de células B são atualmente identificadas: B-1, B-2 e Breg. Células B-1 têm origem no fígado fetal e medula óssea neonatal, com capacidade de auto-renovação na periferia. Já as células B-2, compostas pelas células B FO e da MZ, são 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- β 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⁺, a anergia de células T CD8⁺, diminuir a polarização de células T CD4⁺ 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⁺Tim-1⁺; CD5⁺CD1d^{hi}, CD19⁺CD1d⁺, CD19⁺CD21^{hi}CD23⁻; CD138⁺CD44^{hi}), 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_{MEM} 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⁺ 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⁺ 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_{MEM}) 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 subdivida 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).

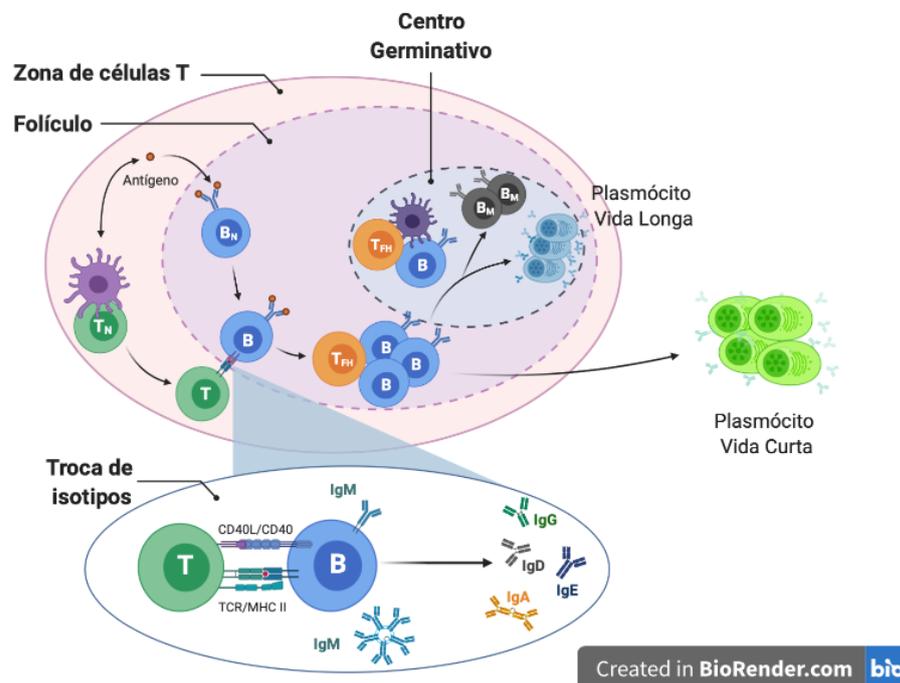


Figura 3. Reações extrafoliculares e de CG. Após o reconhecimento do antígeno cognato pelas células B, elas migram para borda do folículo justaposto à zona de células T onde interage com a respectiva célula T CD4⁺, que também foi ativada nas zonas das células T por meio da apresentação do mesmo antígeno 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_{FH}, 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_{MEM} e plasmócitos de vida longa. Essas etapas garantem a geração de anticorpos de alta afinidade contra antígenos. **B_{MEM}**: células B de memória; **CGs**: centros germinativos; **DCs**: células dendríticas; **T_{FH}**: 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.

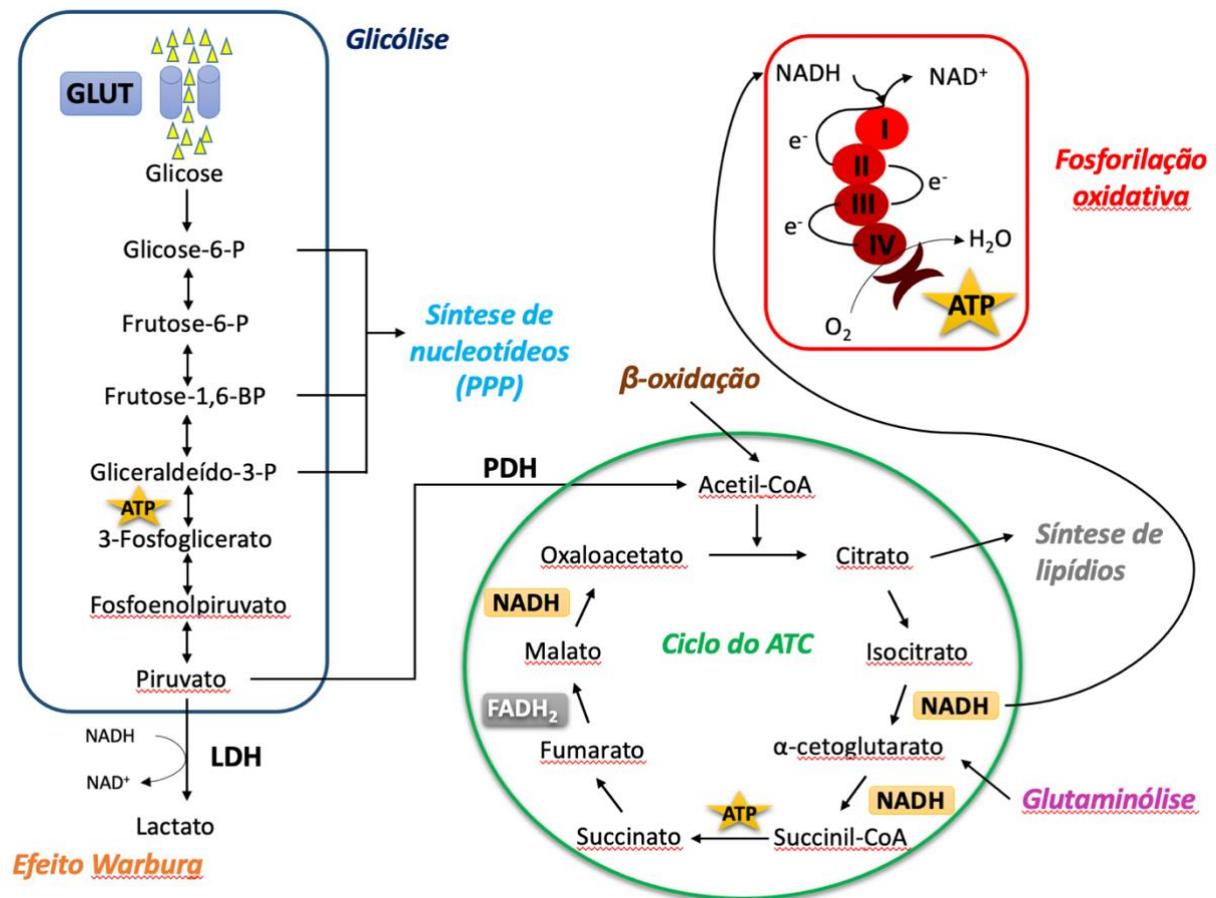


Figura 4. Principais vias metabólicas. A glicose é transportada para o citoplasma das células através de transportadores específicos (GLUTs) e sofre uma série de reações enzimáticas sequenciais para a produção de piruvato (glicólise). Em seguida, o piruvato pode ser convertido a lactato pela enzima LDH 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 FADH₂) 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 para biossíntese de 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; **FADH₂:** 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 α (HIF-1 α , do inglês *hypoxia-induced factor α*).

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 α ($\alpha 1$ ou $\alpha 2$) e duas subunidades reguladoras: β ($\beta 1$ ou $\beta 2$) e γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ 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 dependente de cálcio/ calmodulina (CAMKK2, do inglês *calcium/ calmodulin-dependent kinase 2*, ou CAMKK β). Ambas LKB1 e CAMKK2 são estruturalmente homólogas e fosforilam um resíduo de treonina (Thr¹⁷²) conservado localizado na subunidade α 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- β -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 γ 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 α do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α , do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α*), 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).

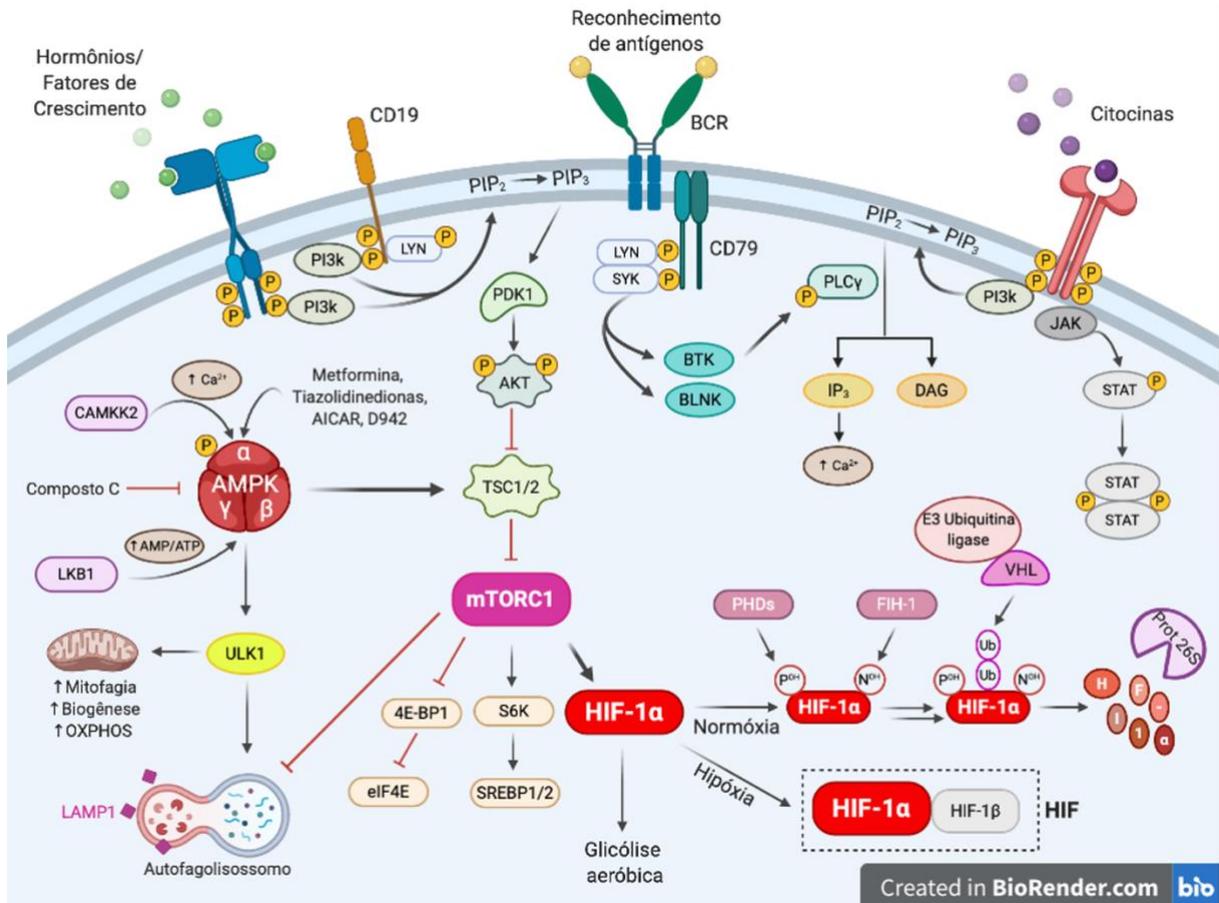


Figura 5. Vias de ativação de células B e AMPK-mTORC1-HIF-1 α . Após reconhecimento de antígeno pelo BCR e co-estimulação (ativação de CD19, citocinas, hormônios e/ou fatores de crescimento), uma cascata de sinalização é iniciada pelas proteínas que se associam aos resíduos citoplasmáticos fosforilados 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 heterotrimerica composta por 1 subunidade catalítica (α) e 2 subunidades reguladoras (β e γ). 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 α . Este fator de transcrição, que também é estabilizado em situações de hipóxia, se dimeriza com a subunidade citoplasmática constitutiva HIF-1 β 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 α 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- β -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 α ; **HIF**: fator induzido/induzível por hipóxia; **IP₃**: 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; **PIP₂**: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; **PIP₃**: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; **PLC γ** : fosfolipase C γ ; **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 α (Figura 5), cujos papéis serão descritos posteriormente.

Embora tenha sido descrito que o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) 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 (Thr³⁰⁸) e o segundo no motivo hidrofóbico C-terminal (Ser⁴⁷³). O sítio catalítico pode ser fosforilado por mensageiros secundários ativados por PI3K, enquanto a Ser⁴⁷³ 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 orquestra 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 α (HIF-1 α)

HIF-1 α é uma proteína que compõe o complexo dimérico HIF-1 juntamente com a outra subunidade β , 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 α é hidroxilado por proil hidroxilases (PHDs) e/ou asparaginil hidroxilases (fator inibidor de HIF-1 α - 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 α e permitindo a formação dos heterodímeros. A ativação de mTORC1 também é capaz de induzir a estabilização de HIF-1 α 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 α 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- γ , 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- α , ele é importante para regular a produção de IL-10 por células Bregs CD1d^{hi}CD5⁺ através da indução de glicólise. Como resultado, a deficiência de HIF-1 α 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 α produziram altos níveis de anticorpos IgG e IgM contra DNA de dupla fita, sugerindo um papel regulador de HIF-1 α 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 (pO₂) 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- γ) que induzem a proliferação e diferenciação em plasmócitos e células B_{MEM} (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_{MEM}) 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_{FH} (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_{MEM}. 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 α 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 α para se proteger do estresse metabólico (LIGHTMAN; UTLEY; LEE, 2019).

Em conjunto, este estudo avaliou o papel dos sensores metabólicos AMPK e HIF-1 α 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^{high} para camundongos linfopênicos SCID ou Rag^{-/-}) 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 α em células B poderia ser potencialmente determinante para a inflamação e/ou regeneração tecidual intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os papéis de AMPK e HIF-1 α 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 α na troca de isotipo de imunoglobulinas e na diferenciação em plasmócitos;
- 2.2.6. Avaliar o papel de HIF-1 α na longevidade de plasmócitos de vida longa.

3. CONCLUSÕES

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

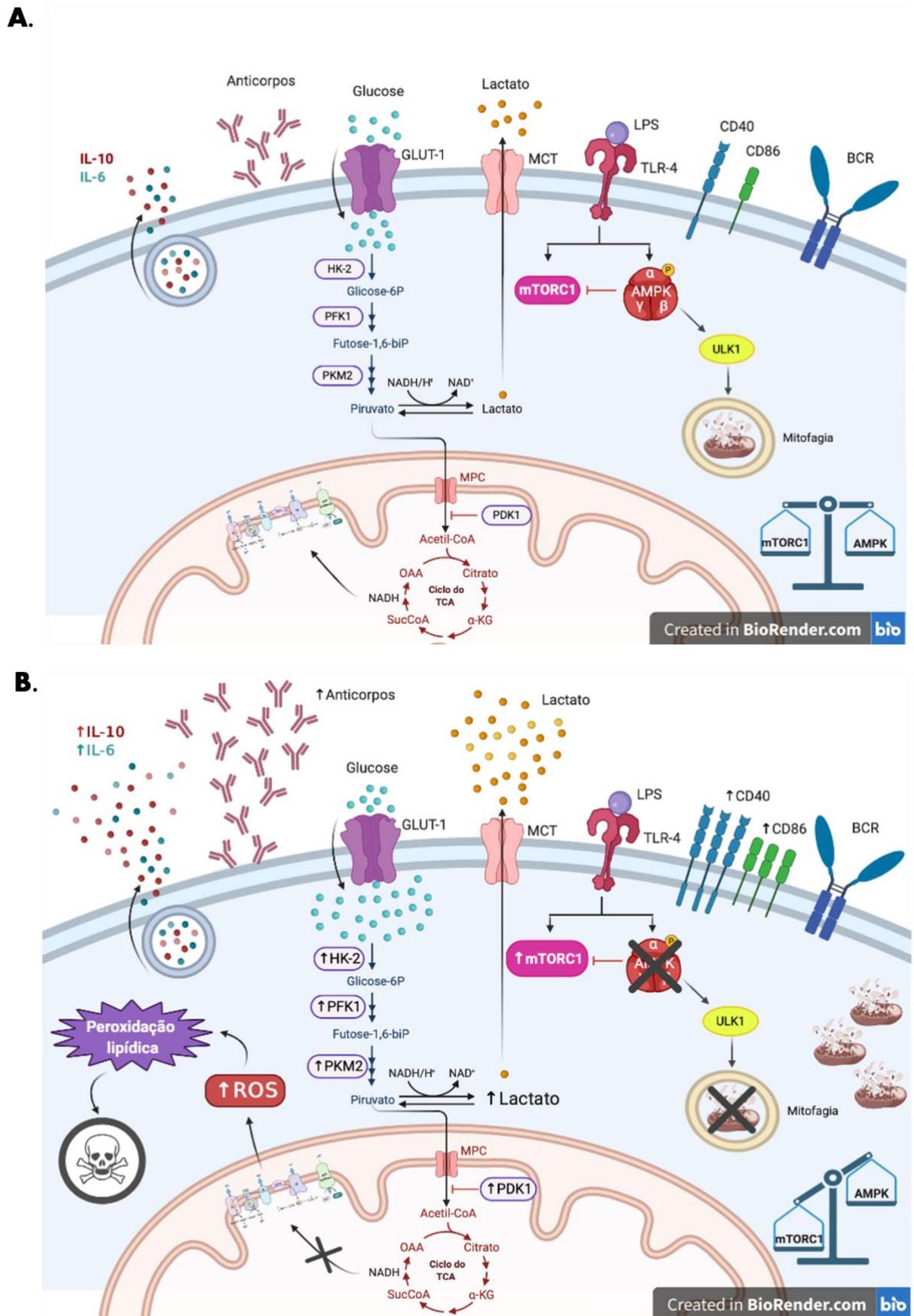


Figura 40. Conclusão. A. A ativação de AMPK em células B estimuladas com LPS regula a atividade de mTORC1 e a mitofagia. Esses processos parecem coordenar a síntese de citocinas

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. **α -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.

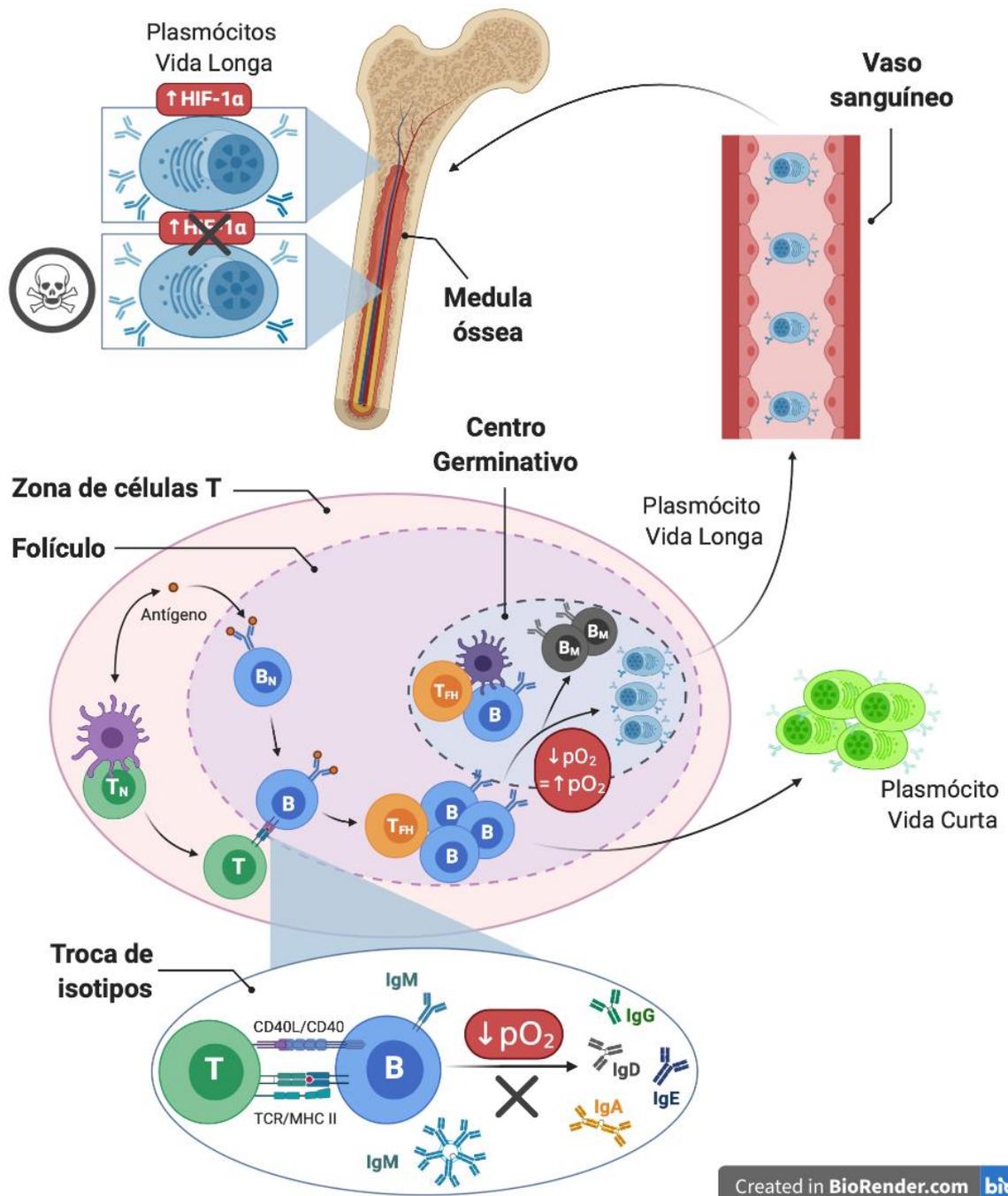


Figura 41. Conclusão. Células dendríticas apresentam antígenos para as células T CD4⁺ naive nas zonas de células T, permitindo a ativação bidirecional de ambas as células T CD4⁺ e células B na interface da zona de células T e do folículo. Durante este processo, a troca de classe de isotipos é iniciado. 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 α , 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_N:** células B naive; **B_{MEM}:** Células B de memória; **T:** células T CD4⁺ ativadas; **T_{FH}:** células T CD4⁺ foliculares; **T_N:** células T CD4⁺ naive. Figura criada com BioRender.com.

4. 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 α 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 α 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 Ca²⁺ 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 antiangioma 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.; CLAMBAY, 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.