

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 25/10/2024.

Universidade Estadual Paulista- Júlio de Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

LUDMILLA DA SILVA PEREIRA

**Investigação do perfil metabólico de células dendríticas durante a eferocitose de
células tumorais apoptóticas**

Araraquara-SP

2022

Universidade Estadual Paulista- Júlio de Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

LUDMILLA DA SILVA PEREIRA

Investigação do perfil metabólico de células dendríticas durante a eferocitose de células tumorais apoptóticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestra em Ciências, área de concentração: Imunologia

Orientanda: Ludmilla da Silva Pereira

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara-SP

2022

P928i

Pereira, Ludmilla da Silva.

Investigação do perfil metabólico de células dendríticas durante a eferocitose de células tumorais apoptóticas / Ludmilla da Silva Pereira. – Araraquara: [S.n.], 2022.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros.

1. Eferocitose. 2. Metabolismo. 3. Tumor. 4. Células Dendríticas. I. Medeiros, Alexandra Ivo de. orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Investigação do perfil metabólico de células dendríticas durante a eferocitose de células tumorais apoptóticas

AUTORA: LUDMILLA DA SILVA PEREIRA

ORIENTADORA: ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS FARIAS ALVES FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacologia / FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP

Profa. Dra. ALESSANDRA D' ALMEIDA FILARDY (Participação Virtual)
Departamento de Imunologia / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Araraquara, 25 de outubro de 2022

“O senhor mire, veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam, verdade maior. É o que a vida me ensinou.”

Guimarães Rosa, 1956, Grande Sertão Veredas

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cida e Alaor, que sempre me dedicaram a mais bonita forma de amor, me dando todo carinho, apoio e independência para trilhar os caminhos aos quais meus sonhos me levaram.

À minha avó, Dona Bete, a pernambucana mais brava que conheço, que mesmo sem ter frequentado uma escola, tem clareza da importância da Educação e sempre me incentivou e apoiou na caminhada acadêmica.

À minha querida orientadora, Alexandra. Obrigada por todos os anos de aprendizado e partilha. A ciência precisa de mentores como você, que entendem que a ciência é colaboração e não competição.

À minha companheira de trabalho e amiga da vida, Letícia. Obrigada por sua generosidade e amizade dentro e fora do lab. Você é um exemplo de cientista e ser humano e eu sou muito grata por compartilhar a vida com você.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório, Breno. Sua chegada ao imunolab foi um presente em minha vida, obrigada por todos os momentos que vivemos juntos.

Aos meus colegas de laboratório, Diego, Xê e Karen, pelas risadas, cafés e experimentos em grupo.

À minha família, por todo amor e suporte, em especial à minha irmã Laura, que com seus dezessete anos me faz querer acreditar na possibilidade de um mundo melhor.

Às minhas queridas amigas AnaLu e Mara, pelos ouvidos sempre disponíveis a ouvir as frustrações e dificuldades da vida acadêmica, pelos conselhos, broncas, risadas e, principalmente, pelos braços sempre abertos a acolher.

À minha amiga Estela, por toda companhia e irmandade durante os dias difíceis que compartilhamos isoladas em Araraquara durante pandemia.

Aos funcionários da FCFAr, especialmente Sr. Paulo, por cada “bom dia” repleto de gentileza e carinho.

Aos meus amigos de São Paulo, que nos oito anos em que estive em Araraquara nunca soltaram da minha mão e sempre se fizeram presentes em minha vida.

Aos meus amigos que passaram pelo imunolab e me ensinaram que juntos somos e fazemos melhor, Júlia, Marga, Pudico, Naiara Mandy e Ana Salina.

À Universidade Pública, gratuita e de qualidade, que me transformou como cientista e cidadã desde o momento em que coloquei os pés dentro dela.

Aos brasileiros e brasileiras que financiam nosso trabalho, especialmente aqueles que tiveram suas vidas tiradas precocemente em decorrência do negacionismo de um governo que não entende a seriedade e importância da ciência.

À FAPESP (PROCESSO 2020/09327-6), pelo auxílio financeiro oferecido ao meu projeto de mestrado, que foi fundamental para a realização desse trabalho.

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

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

RESUMO

Dentro do microambiente tumoral (TME, do inglês *tumor microenvironment*), a apoptose é um dos principais padrões de morte celular mediante os tratamentos antitumorais convencionais, como a quimioterapia e radioterapia. A remoção dessas células mortas por fagócitos, denominada eferocitose, torna-se um processo prejudicial para a resposta antitumoral, uma vez que células dendríticas (DCs) e os macrófagos adquirem um perfil imunossupressor após a internalização e digestão de corpos apoptóticos tumorais. Frente a isso, o objetivo desse projeto foi investigar quais vias metabólicas sustentariam o perfil tolerogênico adquirido por DCs após a eferocitose dentro do TME. Como fonte de células apoptóticas tumorais foram utilizadas células Renca (Adenocarcinoma de córtex renal murino) tratadas com doxorrubicina, um inibidor das topoisomerasas I e II, resultando em uma taxa de apoptose de cerca de 75%. Nossos dados demonstraram que a eferocitose de células Renca apoptóticas (Renca-ACs) resulta na geração de BMDCs com um perfil tolerogênico, observado pela redução na co-expressão de MHC II e CD86. Além disso, a internalização e digestão de corpos apoptóticos tumorais elevou significativamente a expressão de PD-L1, bem como a produção de IL-10 e IL-6, em comparação a condição controle. A deficiência de TIM-4, AXL e, principalmente, MertK, resultou em uma tendência de redução na MFI de PKH, sugerindo que BMDCs são menos hábeis em eferocitar subseqüentes Renca-ACs. Utilizando inibidores farmacológicos, observamos que a produção de IL-10 e IL-6 durante a eferocitose de Renca-ACs depende da ativação da via glicolítica e da glutaminólise. Além disso, a produção de IL-6 parece também depender da síntese de ácidos graxos, e a produção de IL-10 da oxidação de ácidos graxos. Após a eferocitose de Renca-ACs, BMDCs sofrem um aumento na expressão gênica de enzimas glicolíticas como *Glut1*, *Pkm2* e *Ldha*, e há uma tendência de aumento na expressão de *Cpt1a*, sugerindo também o envolvimento do metabolismo oxidativo no processo de eferocitose. Interessantemente, após 18h de co-cultura, foi observada uma diminuição da reserva e da capacidade glicolítica de BMDCs, sugerindo que a demanda glicolítica seja mais precoce e, em fases mais tardias, outras vias metabólicas podem estar envolvidas na manutenção do perfil tolerogênico dessas células. Ainda, a eferocitose de Renca-ACs mediada pelos receptores TIM-4, AXL e MertK parecem estar envolvida na ativação do metabolismo glicolítico, visto que a ausência desses receptores reduziu a expressão de *Glut1* e *Ldha*, comprovando que a interação com os receptores eferocíticos impacta diretamente na ativação das vias metabólicas envolvidas na geração do perfil tolerogênico de BMDCs adquirido durante a eferocitose de células tumorais apoptóticas. Em conjunto, os dados apresentados nesse trabalho sugerem que eferocitose de Renca-ACs gera BMDCs tolerogênicas, sendo esse perfil sustentado majoritariamente pelo metabolismo glicolítico e, em menor escala, pelo metabolismo oxidativo.

Palavras-chave: Eferocitose, Metabolismo, Tumor, Células Dendríticas.

ABSTRACT

In the tumor microenvironment (TME), apoptosis is one of the main cell death pathways through conventional antitumor treatments, such as chemotherapy and radiotherapy. The clearance of these dead cells by phagocytes, termed efferocytosis, becomes a harmful process for the antitumor response because dendritic cells (DCs) and macrophages acquire an immunosuppressive profile after the internalization and digestion of tumor apoptotic cells. Therefore, this project aimed to investigate which metabolic pathways support the tolerogenic profile acquired by DCs after the efferocytosis within the TME. Renca cells (murine renal cortex adenocarcinoma) treated with doxorubicin, an inhibitor of topoisomerases I and II, were used as a source of tumor apoptotic cells, resulting in an apoptosis rate of 75%. Our data demonstrated that efferocytosis of apoptotic Renca cells (Renca-ACs) results in the generation of BMDCs with a tolerogenic profile, observed by the reduction in the co-expression of MHC II and CD86. Furthermore, the internalization and digestion of tumor apoptotic bodies significantly increased the expression of PD-L1, as well as the production of IL-10 and IL-6, compared to the control condition. Deficiency of TIM-4, AXL, and especially MertK, resulted in a reduction of PKH MFI, suggesting that BMDCs lower phagocytic ability. Using pharmacological inhibitors, we observed that the production of IL-10 and IL-6 during efferocytosis of Renca-ACs depends on the activation of glycolysis and glutaminolysis. In addition, IL-6 production also appears to depend on the fatty acid synthesis, and IL-10 production on fatty acid oxidation. After the efferocytosis of Renca-ACs, BMDCs had an increase in the expression of glycolytic enzymes such as *Glut1*, *Pkm2*, and *Ldha*, and we also observed a tendency for an increase in the expression of *Cpt1a*, suggesting the involvement of oxidative metabolism in the efferocytosis process. Interestingly, after 18 h of co-culture, a decrease in the reserve and the glycolytic capacity of BMDCs was observed, suggesting that the glycolytic demand is earlier and, in later phases, other metabolic pathways may be involved in the maintenance of the tolerogenic profile of these cells. Furthermore, the efferocytosis of Renca-ACs mediated by TIM-4, AXL, and MertK receptors seems to be involved in the activation of glycolytic metabolism, since the absence of these receptors reduced the expression of *Glut1* and *Ldha*, proving that the interaction with efferocytic receptors impacts directly in the activation of metabolic pathways involved in the generation of the tolerogenic profile that BMDCs acquire during efferocytosis of apoptotic tumor cells. Taken together, these findings suggest that the efferocytosis of Renca-ACs generates tolerogenic BMDCs, that are supported mainly by glycolytic metabolism and, to a lesser extent, by oxidative metabolism.

Keywords: Efferocytosis, Metabolism, Tumor, Dendritic Cells.