

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.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 Função e metabolismo de células dendríticas.....	14
1.2 Imunometabolismo durante a eferocitose.....	17
1.3 Impacto da eferocitose no metabolismo celular no microambiente tumoral	21
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	25
3. OBJETIVO GERAL.....	27
3.1 <i>Objetivos específicos</i>	27
4. METODOLOGIA	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Cultura celular.....	27
4.3 Avaliação da taxa de apoptose a partir da marcação com Anexina V.....	28
4.4 Avaliação da taxa de apoptose a partir da expressão de caspase-3 clivada	28
4.5 Diferenciação de DCs a partir de células precursoras de Medula Óssea (BMDC) .	29
4.6 Determinação da taxa de eferocitose de Renca-ACs por DCs	29
4.7 Caracterização fenotípica das BMDCs após a eferocitose.....	29
4.8 Inibição das vias metabólicas.....	30
4.9 Avaliação da produção de mediadores solúveis produzidos durante o ensaio de eferocitose.....	31
4.10 qPCR	31
4.11 <i>Glycolysis Stress Test-Seahorse</i>	32
4.12 Análise Estatística	32
5.RESULTADOS	32
5.1 Doxorrubicina induz morte por apoptose em células Renca.....	32
5.2 A eferocitose de Renca-ACs induz um perfil tolerogênico em BMDCs	35

5.3 Envolvimento de receptores TIM 4 e TAM na eferocitose de Renca-ACs	40
5.4 A produção de mediadores químicos após a eferocitose de Renca-ACs depende majoritariamente da ativação da via glicolítica	43
5.5 Receptores eferocíticos envolvidos no reconhecimento de Renca-ACs impactam no metabolismo de BMDCs após a eferocitose.	51
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	61
8. FIGURAS SUPLEMENTARES	63
9. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipótese de estudo	26
Figura 2. Doxorubicina é capaz de induzir apoptose em células Renca	35
Figura 3. BMDCs são capazes de eferocitar Renca-ACs	36
Figura 4. A eferocitose de Renca-ACs gera BMDCs tolerogênicas	38
Figura 5. A eferocitose e Renca-ACs leva a um aumento na produção de IL-6 e IL-10	40
Figura 6. Receptores TIM4 e TAM participam da eferocitose de Renca-ACs.....	41
Figura 7. Receptores TIM4 e TAM colaboram para o perfil tolerogênico de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs	42
Figura 8. A via glicolítica participa da eferocitose de Renca-ACs por BMDCs	44
Figura 9. A produção de mediadores pró e antiinflamatório depende de diferentes vias metabólicas durante a eferocitose de Renca-AC por BMDCs.	47
Figura 10. BMDCs aumentam o metabolismo glicolítico durante a eferocitose de Renca-ACs	49
Figura 11. A capacidade e a reserva glicolítica de BMDCs é reduzida após a eferocitose de Renca-ACs	51
Figura 12. Receptores eferocíticos possuem influência no perfil metabólico de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs	53
Figura 13. Conclusão	62
Figura S1. Avaliação da taxa de apoptose de células Renca após o tratamento com doxorubicina	63
Figura S2. Estratégia de gate utilizada para análise da citometria de fluxo.....	64
Figura S3. Taxa de eferocitose de Renca-ACs por BMDCs após uso dos inibidores...	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo	30
Tabela 2. Inibidores das vias metabólicas	30
Tabela 3. Sequências dos primers utilizado nos experimentos de qPCR	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1 - *ATP-binding cassette transporter A1*

ABCG1 - *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1*

ACs – Células apoptóticas

AMP - *Adenosine monophosphate*

AMPK (*AMP-activated protein kinase*)

APCs - Células apresentadoras de antígenos

Arg1 - Arginase 1

ATP - Adenosina trifosfato

BMDCs – Células dendríticas derivadas da medula óssea

CD – Cluster of differentiation

cDCs – Células dendríticas convencionais

DAMP - *Damage Associated Molecular Pattern*

DC – Células dendríticas

GMP - *Guanosine Monophosphate*

HIF-1 α - *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

IL- Interleucina

IMP - *Inosine Monophosphate*

iNOS - Óxido nítrico sintase

LPC - Lisofosfatidilcolina

LPS – lipopolissacarídeo

LXR- α - *liver X receptor alpha*

MFG-E8 - *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*

MFI - *Median fluorescence intensity*

MoDCs - Células dendríticas derivadas de monócitos

mTOR - *Mammalian Target of Rapamycin*

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

ODC - Ornitina descarboxilase

OXPHOS - fosforilação oxidativa

PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PANX1 - *Pannexin1*

pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

PGE2 - Prostaglandina E2

PI3k - *Phosphoinositide 3-kinases*

PPAR - Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos

PRRs - *Pattern recognition receptors*

PS – Fosfatidilserina

Renca-ACs - Células Renca apoptóticas

S1P - Esfingosina-1-Fosfato

STAT - *Signal transducer and activator of transcription*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TLRs - *Toll-like receptors*

TME - *tumor microenvironment*

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TSC1 - *Tuberous sclerosis complex*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Função e metabolismo de células dendríticas

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos (APCs) e uma das principais células responsáveis pela ativação de células T, pois desempenham um papel-chave na interface entre a resposta imune inata e adaptativa (Du; Chapman; Chi, 2018). Essas células expressam diversos *Pattern recognition receptors* (PRRs), como Toll-like receptors (TLRs), que são capazes de interagir com uma gama de moléculas e rapidamente ativar diferentes vias de sinalização intracelular. As células do sistema imune, através desses receptores, são capazes de responder prontamente a

estímulos oriundos de patógenos pela interação com Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) ou do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMP, do inglês *Damage Associated Molecular Pattern*), oriundos de dano ou morte celular. Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que o processo a ativação dessas cascatas de sinalização está diretamente relacionado a inúmeras alterações metabólicas capazes de orquestrar a geração de metabólitos e energia requeridos para ativação e função celular (Everts; Amiel; Van Der Windt; Freitas *et al.*, 2012; Krawczyk; Holowka; Sun; Blagih *et al.*, 2010; Van Den Bossche; Baardman; Otto; Van Der Velden *et al.*, 2016). Além disso, os mecanismos de sobrevivência, proliferação e retorno à homeostase requerem uma constante e dinâmica adaptação metabólica das DCs após exercerem suas funções. Entretanto, as vias metabólicas envolvidas nesses processos vêm sendo extensamente estudadas em macrófagos e pouco se tem definido acerca do metabolismo de DCs.

A ativação das diferentes vias metabólicas depende de sensores de nutrientes e de energia que irão regular o anabolismo ou catabolismo celular. Dentre esses sensores, mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) destaca-se por ser responsável pela sinalização via receptores que respondem a fatores de crescimento, disposição de nutrientes e status energético da célula, relacionados principalmente ao metabolismo celular anabólico (Hackstein; Taner; Zahorchak; Morelli *et al.*, 2003; Howell; Ricoult; Ben-Sahra; Manning, 2013). Além disso, mTOR é um regulador-chave da ativação de HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), a subunidade α de um fator de transcrição heterodimérico, responsável pela transcrição de genes que codificam

enzimas associadas à glicólise. A ativação dessa via metabólica parece ter um papel chave na ativação e proliferação celular, devido a sua capacidade de gerar moléculas de adenosina trifosfato (ATP) rapidamente, além de precursores importantes para construção de aminoácidos e ácidos graxos (Haidinger; Poglitsch; Geyeregger; Kasturi *et al.*, 2010; Locasale; Cantley, 2011). Entretanto, a contribuição de mTOR na ativação e função de DCs ainda é contraditória. Amiel e colaboradores observaram que o tratamento de BMDCs (*Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) com a rapamicina, um inibidor de mTOR, juntamente com agonistas de TLR, levou a um aumento da sobrevivência celular e da função mitocondrial. Ainda, esse mesmo grupo mostrou que a inibição de mTOR em DCs foi capaz de aumentar a ativação de células TCD8⁺ específicas para antígenos tumorais e gerar uma resposta antitumoral mais efetiva, em um modelo animal de vacinação autóloga para tratamento de melanoma (Amiel; Everts; Freitas; King *et al.*, 2012; Amiel; Everts; Fritz; Beauchamp *et al.*, 2014). Por outro lado, Wang e colaboradores observaram que a deficiência do regulador negativo de mTOR em BMDCs, TSC1 (*tuberous sclerosis complex*), resulta no aumento da glicólise devido à ativação de HIF-1 α . Além disso, essas células apresentam um aumento na atividade mitocondrial e síntese de lipídeos, e tornam-se menos hábeis em promover a ativação e diferenciação de células Th1 *in vitro* (Wang; Huang; Zeng; Yang *et al.*, 2013). Um outro ponto chave no controle do metabolismo, que se opõe ao processo anabólico de mTOR, é a AMPK (*AMP-activated protein kinase*), que atua como um sensor da homeostase energética celular e é ativada em resposta ao aumento de AMP (*adenosine monophosphate*). Essa via antagoniza as vias biosintéticas mediante a ativação do complexo TSC1-TSC2, que leva à inibição de mTOR e reduz a atividade glicolítica. Ainda, AMPK promove a ativação de diversas vias que integram processos catabólicos, ativando enzimas que induzem a biogênese mitocondrial e a oxidação de ácidos graxos (Kelly; O'Neill, 2015; Vats; Mukundan; Odegaard; Zhang *et al.*, 2006).

Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR) também possuem um importante papel no metabolismo de células do sistema imune, sendo PPAR γ um fator de transcrição envolvido no controle do metabolismo lipídico. Zaccagnino e Saltarella mostraram a importância de PPAR γ no metabolismo de lipídeos durante a diferenciação de DCs derivadas de monócito, visto que há um aumento na expressão desse receptor concomitantemente ao aumento da oxidação de ácidos graxos e da função mitocondrial (Zaccagnino; Saltarella; Maiorano; Gaballo *et al.*, 2012).

Sabe-se que DCs imaturas utilizam majoritariamente a oxidação de ácidos graxos e a via de fosforilação oxidativa (OXPHOS) para obtenção das moléculas de ATP necessárias para as demandas energéticas celulares, que permitem a sobrevivência celular. Entretanto, a ativação por PRRs induz uma reprogramação glicolítica nessas células (Amiel; Everts; Fritz; Beauchamp *et al.*, 2014; Guak; Al Habyan; Ma; Aldossary *et al.*, 2018). Krawczyk e colaboradores demonstraram que após estímulo com LPS (lipopolissacarídeo), DCs sofrem um rápido aumento na glicólise aeróbica associada à atividade da via das pentoses-fosfato dependente da ativação de TLRs (Krawczyk; Holowka; Sun; Blagih *et al.*, 2010). Essa atividade glicolítica promove não somente a produção de metabólitos intermediários para geração de nucleotídeos, aminoácidos e NADPH em DCs ativadas por PAMPs, mas também leva a um aumento na concentração celular de piruvato, que é utilizado na alimentação do ciclo de Krebs, no interior da mitocôndria, para obtenção de citrato (Morrot; Da Fonseca; Salustiano; Gentile *et al.*, 2018). O citrato, por sua vez, é exportado para fora da matriz mitocondrial, onde participa na geração de acetil-CoA, molécula utilizada no processo de lipogênese *de novo*. Nesse contexto, a síntese lipídica está relacionada com a expansão da membrana do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, organelas importantes no processo de tráfego e secreção de citocinas e proteínas após a ativação celular (Everts; Amiel; Huang; Smith *et al.*, 2014). A ativação da glicólise, portanto, parece ser imprescindível para maturação de DCs, pois está relacionada com a expressão de moléculas associadas à ativação celular, como CD80 e CD86, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF- α e IL-6 (Jantsch; Chakravorty; Turza; Prechtel *et al.*, 2008; Krawczyk; Holowka; Sun; Blagih *et al.*, 2010).

A ativação de DCs através de TLRs leva a uma drástica inibição da atividade mitocondrial e, nesse contexto, as DCs rapidamente tornam-se dependentes da glicólise aeróbia para obtenção de ATP e sobrevivência. Há influência de dois eventos que levam à essa mudança metabólica: I) a inibição de componentes da cadeia transportadora de elétrons, através da indução de iNOS e produção de óxido nítrico e II) aumento da expressão de enzimas da via glicolítica por meio da sinalização de PI3k (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinases*), AKT, mTOR e HIF-1 α (Thwe; Amiel, 2018). Ainda, a produção de óxido nítrico inibe diretamente a OXPHOS e indiretamente age na estabilização de HIF-1 α , favorecendo o metabolismo glicolítico. Entretanto, a ativação

da via glicolítica nem sempre está associada a um perfil imunogênico de DCs, uma vez que a ativação da glicólise pela via de mTOR, por exemplo, pode também estar associada a um perfil tolerogênico (Ferreira; Vanherwegen; Eelen; Gutierrez *et al.*, 2015; Ohtani; Nagai; Kondo; Mizuno *et al.*, 2008). A reprogramação metabólica através da hiperglicemia foi correlacionada com um perfil tolerogênico de macrófagos, onde foi demonstrado que pacientes diabéticos com câncer colorretal possuem um aumento na população de macrófagos M2, em comparação com pacientes não diabéticos, o que pode favorecer a progressão tumoral (Rodrigues Mantuano; Stanczak; Oliveira; Kirchhammer *et al.*, 2020). Desta forma, a ativação da via glicolítica pode desempenhar papéis distintos na ativação celular, dependendo do microambiente em que a DC está inserida.

1.2 Imunometabolismo durante a eferocitose

A rápida e eficiente remoção de células apoptóticas (ACs) nos tecidos, denominada eferocitose, tem um papel chave na prevenção de doenças autoimunes e destruição tecidual (Decathelineau; Henson, 2003; Orban; Sosenko; Cuthbertson; Krischer *et al.*, 2009). A morte por apoptose preserva a integridade da membrana plasmática da célula, porém a deficiência ou ineficiência na remoção dessas ACs por fagócitos resulta na evolução para diversos tipos de morte celular, como necrose, piroptose e necroptose, em que a membrana celular é rompida e o conteúdo intracelular é liberado. Diferentes DAMPS como DNA, RNA, histonas e proteínas intracelulares, quando liberados do ambiente intracelular levam a uma inflamação tecidual favorecendo um microambiente propício para ativação de clones autorreativos de linfócitos T, possibilitando o desenvolvimento de autoimunidades, como diabetes do tipo I, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (Ait-Oufella; Pouresmail; Simon; Blanc-Brude *et al.*, 2008; Biermann; Boeltz; Pieterse; Knopf *et al.*, 2018; O'brien; Geng; Orteu; Huang *et al.*, 2006; Pieterse; Hofstra; Berden; Herrmann *et al.*, 2015).

No início do processo de apoptose, a célula passa a secretar mediadores solúveis quimiotáticos, como ATP, ligante 1 de quimiocina CX3C (CX3CL1), lisofosfatidilcolina (LPC) e esfingosina-1-Fosfato (S1P), que são conhecidos como sinais de “*find-me*” e que atraem os fagócitos mediante a geração de um gradiente quimiotático. Juntamente com esses sinais, as ACs passam também a expressar sinais conhecidos como “*eat-me*”, principalmente a fosfatidilserina (PS), um fosfolípido que

normalmente está presente na interface interna da membrana plasmática de células saudáveis, mas que é rapidamente translocado para a interface externa após o início do processo de apoptose (Ravichandran, 2011). Os fagócitos expressam diversos receptores, como BAI-1, TIM-4 e Stabilin-2, que são capazes de se ligar diretamente à PS expressa nas ACs, facilitando a eferocitose dessas células (Kobayashi; Karisola; Pena-Cruz; Dorfman *et al.*, 2007; Park; Tosello-Trampont; Elliott; Lu *et al.*, 2007). Além disso, alguns receptores como MertK, AXL e Tyro3 reconhecem indiretamente a PS via interação com moléculas ponte (*bridge molecules*) como Gas6, PROS1 e MFG-E8 (Akakura; Singh; Spataro; Akakura *et al.*, 2004; Lumbroso; Soboh; Maimon; Schiff-Zuck *et al.*, 2018; Morizono; Xie; Olafsen; Lee *et al.*, 2011). Ainda, os receptores eferocíticos podem contribuir entre si para o aumento da capacidade eferocítica. Moon e colaboradores mostraram que MertK e TIM-4 são expressos em regiões muito próximas na membrana celular e a interação física entre esses receptores aumenta a capacidade de macrófagos em internalizar timócitos apoptóticos via TIM-4 (Moon; Lee; Lee; Min *et al.*, 2020). Além disso, a expressão de sinais de “*don't eat-me*”, como CD31 e CD47, expressos por células saudáveis impede a internalização equivocada dessas células por fagócitos (Brown; Heinisch; Ross; Shaw *et al.*, 2002; Kojima; Volkmer; Mckenna; Civelek *et al.*, 2016). Desta forma, para que ocorra uma eficiente eferocitose, é imprescindível que as diferentes etapas ocorram de maneira sincronizada, ou seja, liberação de sinais de “*find-me*” e “*eat-me*” e diminuição da expressão de moléculas de “*don't eat-me*”.

Além da liberação de sinais de “*find-me*”, um recente trabalho mostrou que a célula em processo de apoptose também sofre alterações metabólicas que levam à liberação de moléculas que modulam o microambiente, como, por exemplo, a espermidina, que é liberada mediante a ativação do metabolismo celular de arginina. Esse metabólito, liberado através do canal de PANX1 (*Pannexin1*), influencia a expressão gênica de células adjacentes, promovendo a diferenciação de macrófagos a um perfil anti-inflamatório com produção de IL-10. De maneira interessante, utilizando um modelo experimental de artrite reumatoide, o tratamento de animais com espermidina, juntamente com outros dois metabólitos produzidos pelas ACs, (GMP) *Guanosine Monophosphate*) e IMP (*Inosine Monophosphate*), foi capaz de reduzir o edema e o acúmulo de células inflamatórias nas articulações (Medina; Mehrotra; Arandjelovic; Perry *et al.*, 2020). Dessa maneira, além do conhecido efeito anti-

inflamatório de ACs mediado pela eferocitose, essas células “*per se*” são ativas metabolicamente e hábeis em modular diretamente células imunes presentes no tecido, contribuindo para a geração de um perfil anti-inflamatório no microambiente.

Ao contrário do efeito do estímulo de DCs na presença de PAMPs e DAMPs, a eferocitose de células estéreis, como células B (A20), resulta na ativação de DCs tolerogênicas, com reduzida expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC-II (Blander; Medzhitov, 2006). Além disso, a eferocitose por DCs e macrófagos também leva à ativação de vias de sinalização que culminam na produção de PGE2, TGF- β e IL-10 e geração de um microambiente anti-inflamatório (Medeiros; Serezani; Lee; Peters-Golden, 2009; Morioka; Perry; Raymond; Medina *et al.*, 2018; Penteado; Dejana; Verdan; Orlando *et al.*, 2017), favorecendo a geração de linfócitos T-reguladores e impedindo o reconhecimento de antígenos próprios por linfócitos efetores autorreativos (Blander; Medzhitov, 2006). Entretanto, apesar do metabolismo de DCs imunogênicas ser extensamente estudado, o perfil metabólico de DCs tolerogênicas permanece indefinido.

Os diversos ciclos de eferocitose realizados pelo mesmo fagócito e a digestão do corpo apoptótico no interior do fagolisossomo resultam no acúmulo de nutrientes que levam a alterações no metabolismo celular. Em macrófagos, o excesso lipídico decorrente da digestão de corpos apoptóticos leva à ativação de fatores de transcrição e de receptores nucleares como PPAR γ e LXR- α (*liver X receptor alpha*), que promovem a transcrição dos genes que codificam a produção de PGE2, bem como citocinas imunossupressoras, como TGF- β 1, IL-10 e IL-13 (N; Bensinger; Hong; Beceiro *et al.*, 2009; Roszer; Menendez-Gutierrez; Lefterova; Alameda *et al.*, 2011). Esses subsequentes ciclos de fagocitose resultam no aumento da transcrição dos genes que codificam receptores eferocíticos, como MerTK, Tyro3 e Axl, e *bridge molecules* como MFG-E8, Gas6 e Rac1, tornando esses fagócitos ainda mais hábeis em internalizar novos corpos apoptóticos. Além disso, há o aumento na expressão de componentes lisossômicos e fatores relacionados com a exocitose do material degradado como ABCA1 e ABCG1, que são proteínas de efluxo do excesso de colesterol intracelular (Han; Shi; Liu, 2016; N; Bensinger; Hong; Beceiro *et al.*, 2009). Yoon e Kim demonstraram que a instilação de ACs, em um modelo animal de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, causou um aumento na expressão e atividade de PPAR γ em macrófagos alveolares e esse aumento parece estar relacionado à uma maior capacidade

eferocítica destes fagócitos e uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias (Yoon; Kim; Kim; Lim *et al.*, 2015). A ativação de PPAR γ está também relacionada com a indução da biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo de lipídeos, o que sugere que as vias de β -oxidação e de OXPHOS são as prioritárias na geração de ATP necessário para suprimento da demanda metabólica do processo de eferocitose (Han; Ravichandran, 2011; Mukundan; Odegaard; Morel; Heredia *et al.*, 2009; Zaccagnino; Saltarella; Maiorano; Gaballo *et al.*, 2012).

O reconhecimento, internalização e digestão de corpos apoptóticos ocorrem de forma dinâmica e as diferentes etapas desse processo podem regular o metabolismo celular de fagócitos. Durante a digestão por exemplo, a arginina derivada da AC ganha acesso ao compartimento citoplasmático de macrófagos e é metabolizada pela maquinaria de Arg1 e ODC. A ativação de Arg1 e ODC leva à geração de putrescina, que, por sua vez, estabiliza a maquinaria utilizada para a remodelação da actina e projeção da membrana plasmática, um processo que é imprescindível para a fagocitose de corpos apoptóticos subsequentes (Yurdagul; Subramanian; Wang; Crown *et al.*, 2020). Além disso, nas primeiras horas de eferocitose, macrófagos e fagócitos não profissionais aumentam a expressão de GLUT1, um transportador que facilita a captação de glicose do meio extracelular para o citoplasma. Essa regulação positiva de GLUT1 leva ao aumento na captação de glicose, favorecendo a glicólise aeróbia em detrimento da oxidação de ácidos graxos, com aumento na liberação de lactato e outros mediadores, levando à polarização de macrófagos peritoneais adjacentes para um perfil anti-inflamatório (Morioka; Perry; Raymond; Medina *et al.*, 2018). De maneira semelhante, foi demonstrado que a obtenção de glicose extracelular através de GLUT1 é utilizada no processo de glicólise aeróbia para geração de energia e também para a polimerização da actina necessária para a internalização de corpos apoptóticos (Morioka; Perry; Raymond; Medina *et al.*, 2018). Em contrapartida, Zhang e colaboradores mostraram que o excesso de ácidos graxos decorrentes da digestão de corpos apoptóticos leva a um aumento da β -oxidação e da respiração mitocondrial em macrófagos, causando um aumento na produção de NAD⁺, substrato necessário para a produção de IL-10 (Zhang; Weinberg; Deberge; Gainullina *et al.*, 2019), reafirmando a natureza anti-inflamatória da eferocitose, porém relacionada a um perfil metabólico diferente. Sabe-se que assim como macrófagos, DCs são fagócitos distribuídos pelos diferentes tecidos e possuem um papel chave na eferocitose de ACs e ativação e

diferenciação de células da imunidade adaptativa. No entanto, até o momento, pouco se sabe sobre o impacto da eferocitose no metabolismo celular de DCs e como essa ativação metabólica contribui para o perfil tolerogênico adquirido pelas DCs após a eferocitose.

1.3 Impacto da eferocitose no metabolismo celular no microambiente tumoral

Dentro do microambiente tumoral (TME, *Tumor Microenvironment*), os macrófagos representam a parcela mais abundante de células mieloides e a migração dessas células para o tumor parece estar associada a um pior prognóstico em diversos tipos de tumores, como câncer de mama, gástrico e de ovário (Brenot; Knolhoff; Denardo; Longmore, 2018; Zhang; Wang; Gao; Chen *et al.*, 2018). Entretanto, apesar dos macrófagos serem uma das principais células do sistema imune presentes no TME, as DCs são as responsáveis por internalizar, processar e apresentar antígenos tumorais para a ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ específicos em uma resposta antitumoral.

As DCs são divididas em diferentes subpopulações através de critérios relacionados ao desenvolvimento, fenótipo e funções. DCs derivadas de monócitos são geradas normalmente em resposta a inflamação, são caracterizadas pela apresentação de antígenos no ambiente tumoral e estão relacionadas a resposta de células Th1, Th2 e Th17 (Ma; Adjemian; Mattarollo; Yamazaki *et al.*, 2013; Segura; Touzot; Bohineust; Cappuccio *et al.*, 2013). As DCs plasmocitóides (pDCs) são caracterizadas pela produção de IFN- γ e uma baixa habilidade na apresentação de antígenos. Por outro lado, as DCs convencionais (cDCs) caracterizam-se pela sua capacidade de apresentar antígenos exógenos e endógenos às células T e são divididas em dois subgrupos, cDC1 e cDC2. cDC1s são especializadas na apresentação cruzada e na ativação e diferenciação de linfócitos TCD8⁺ enquanto que as cDC2s estão mais associadas à ativação de linfócitos TCD4⁺ (Hildner; Edelson; Purtha; Diamond *et al.*, 2008; Salmon; Idoyaga; Rahman; Leboeuf *et al.*, 2016). Já foi demonstrado, em um modelo animal de melanoma, que as DCs CD103⁺, consideradas cDC1s, migram até o linfonodo proximal e ativam de linfócitos TCD8⁺ via apresentação de antígenos oriundos da fagocitose de ACs tumorais (Roberts; Broz; Binnewies; Headley *et al.*, 2016). O recrutamento desse subgrupo de cDCs para TME foi relacionado a um melhor prognóstico em modelo de melanoma devido a sua capacidade de ativar linfócitos TCD8⁺ específicos para o tumor (Fuertes; Kacha; Kline; Woo *et al.*, 2011). Além de apresentar antígenos, cDC1s e pDCs são importantes células produtoras de quimiocinas, como CXCL9 e CXCL10,

dentro do TME, o que favorece o recrutamento e ativação de células TCD8⁺ (Spranger; Dai; Horton; Gajewski, 2017). Entretanto, características do microambiente tumoral impedem que diversas células do sistema imunológico, dentre essas as DCs, desenvolvam efetivamente suas funções. A expressão de MHC-II e de moléculas co-estimulatórias é fundamental para a apresentação de antígenos tumorais, entretanto, já foi descrito que macrófagos associados ao tumor possuem baixa expressão de CD86 e MHC-II, o que associado a produção de mediadores anti-inflamatórios, reduz a capacidade desses fagócitos em apresentar antígenos para células TCD4⁺, em um modelo de carcinoma colorretal (Coletta; Lonardi; Sensi; D'angelo *et al.*, 2021). Uma vez que as DCs, através da ativação de células TCD4⁺ e T CD8⁺ efectoras, são fundamentais para a geração de uma imunidade antitumoral eficiente, o microambiente tumoral e os mecanismos de escape desses tumores podem alterar as funções dessas células com o objetivo de evitar o controle imunológico (Stach; Turnay; Voll; Kern *et al.*, 2000). Em um modelo murino de câncer pulmonar, foi demonstrado que cDC1s são importantes fagócitos nos estágios iniciais do crescimento tumoral, entretanto, em tumores tardios essas células deixam de fagocitar e apresentar antígenos tumorais devido a uma redução na expressão do receptor TIM-4, e essa perda de função de cDC1s está relacionada com um prejuízo da resposta antitumoral de células TCD8⁺ e, consequentemente com um declínio da sobrevida (Caronni; Piperno; Simoncello; Romano *et al.*, 2021).

Dentre as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de tumores, sabe-se que alguns quimioterápicos e radioterápicos podem induzir diversos padrões de morte celular, como apoptose, necrose, necroptose ou piroptose, e os receptores efecocíticos envolvidos na eliminação dessas células pelos fagócitos parecem ter grande impacto no perfil de ativação de células imunes no TME (Apetoh; Ghiringhelli; Tesniere; Obeid *et al.*, 2007). Muitas drogas antitumorais frequentemente utilizadas na clínica, como a doxorrubicina e everolimus, levam a um perfil de morte celular por apoptose, que resulta na geração de um TME imunossupressor mediante a efecocitose desses corpos apoptóticos (Casares; Pequignot; Tesniere; Ghiringhelli *et al.*, 2005; Du; Li; Zhen; Chen *et al.*, 2018). Dessa maneira, o *clearance* desses corpos apoptóticos, realizado principalmente por macrófagos e DCs, representa um importante mecanismo de tolerância tumoral, levando à produção de IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β e PGE2 (Stanford; Young; Hicks; Owens *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que a expressão e a atividade funcional de receptores efecocíticos, como MerTK, Axl, e Tyro3, estão aumentadas em

DCs e macrófagos associados a tumores de mama, colorretal e melanoma, mediante ao tratamento com radiação γ . O aumento na expressão desses receptores favorece o aumento da eferocitose dessas células tumorais apoptóticas, promovendo um fenótipo tolerogênico nesses fagócitos e a geração de um TME supressor (Crittenden; Baird; Friedman; Savage *et al.*, 2016; Keating; Salzberg; Sather; Liang *et al.*, 2006; Wang; Moncayo; Morin; Xue *et al.*, 2013). A ativação de PPAR γ e LXR α após a eferocitose polariza os macrófagos associados a tumores para um perfil M2, caracterizado por suas funções anti-inflamatórias e voltadas ao reparo tecidual (Zizzo; Cohen, 2015). Ainda, ensaios clínicos em fase I e II sugerem que pacientes com câncer de próstata possuem um aumento na expressão e secreção de *Milk fat globule-EGF factor 8 protein* (MFG-E8), uma *bridge molecule* no TME, favorecendo a eferocitose via integrina $\alpha v \beta 3$ e consequentemente a polarização de macrófagos M2. Nesse contexto, o tratamento com anti-MFG-E8 foi capaz de aumentar a diferenciação macrófagos para um perfil M1 (Soki; Koh; Jones; Kim *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que a expressão de algumas moléculas, como é o caso de PD-L1, impactam na produção de citocinas e na ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺, prejudicando a resposta antitumoral (Jiang; Wang; Deng; Xiong *et al.*, 2019). PD-L1 é expresso tanto por células tumorais quanto por células imunes infiltradas no TME e o bloqueio desse ligante é frequentemente utilizado como estratégia terapêutica para o tratamento de diferentes tumores, como melanoma, linfoma, câncer renal, câncer de pulmão, fígado e gástrico (Muro; Chung; Shankaran; Geva *et al.*, 2016; Reck; Rodriguez-Abreu; Robinson; Hui *et al.*, 2016; Robert; Ribas; Schachter; Arance *et al.*, 2019). DCs associadas ao tumor têm um aumento na expressão de PD-L1 frente ao tratamento com everolimus, estratégia de primeira escolha para carcinomas renais. A terapia com anticorpos anti-PD-L1 associada a terapia convencional é capaz de otimizar a ativação de células TCD8⁺, melhorando a resposta antitumoral (Mayoux; Roller; Pulko; Sammiceli *et al.*, 2020).

Uma vez que as DCs são o elo entre a imunidade inata e adaptativa, o fenótipo regulador adquirido por essas células após a eferocitose de células tumorais apoptóticas pode resultar na diminuição da função apresentadora de antígenos dessas células e, consequentemente, reduzir a expansão clonal de células T antitumorais. Desta forma, o tumor parece utilizar o perfil tolerogênico de DCs adquirido mediante a eferocitose para progredir e escapar dos mecanismos de vigilância do sistema imunológico. Frente a isso, recentes estudos utilizando diferentes modelos experimentais trazem como uma

nova proposta de tratamento o bloqueio da interação entre as ACs e os fagócitos no TME. A inibição da interação da célula tumoral apoptótica com a maquinaria eferocítica, através do bloqueio com anticorpos anti-PS leva a uma menor taxa de metástase e progressão do tumor em um modelo animal de linfoma (Bondanza; Zimmermann; Rovere-Querini; Turnay *et al.*, 2004; Stach; Turnay; Voll; Kern *et al.*, 2000). Um outro estudo, utilizando um modelo experimental de câncer de próstata, também mostrou que o tratamento de animais com Bavituximab, um anticorpo anti-PS, induz a uma polarização de macrófagos M1, restaura a maturação e apresentação de antígenos por DCs e, conseqüentemente, leva a um aumento no número de células TCD8⁺ no TME (Yin; Huang; Lynn; Thorpe, 2013). Ainda, também foi demonstrado que a sinalização de MerTK é necessária para geração de um microambiente tolerogênico, uma vez que o bloqueio desse receptor levou a um aumento da imunogenicidade do tumor colorretal e uma potencialização da imunidade antitumoral, em macrófagos (Zhou; Fei; Zhang; Liang *et al.*, 2020). Dessa maneira, a tentativa de inibir o escape tumoral através do microambiente anti-inflamatório gerado pela eferocitose teve como foco, até agora, a inibição da fagocitose de ACs tumorais via anticorpos monoclonais anti-PS. Entretanto, essa abordagem terapêutica apresenta possíveis efeitos adversos como o bloqueio sistêmico da eferocitose, que resultaria no acúmulo de células necróticas em diferentes tecidos, predispondo o paciente ao desenvolvimento de doenças crônicas e autoimunes. Dessa forma, uma proposta alternativa seria a busca de opções terapêuticas que preservem a eferocitose de células tumorais e re programe o perfil tolerogênico de DC permitindo a ativação de linfócitos T efetores.

Novas abordagens terapêuticas que visam a caracterização das vias metabólicas vêm sendo amplamente estudadas em diferentes patologias e como opção de tratamento antitumoral, visando a modulação de células do sistema imune presentes no TME. A capacidade eferocítica de macrófagos e a resposta antitumoral foram otimizadas em um modelo de adenocarcinoma hepático utilizando CpG, um agonista TLR9, que induz alterações no metabolismo do carbono, promovendo uma reprogramação metabólica levando a ativação da via da β -oxidação e a biossíntese lipídica *de novo* (Liu; O'connor; Trefely; Graham *et al.*, 2019). Em um modelo animal de melanoma, a ativação da via da β -oxidação devido a fatores solúveis produzidos no microambiente tumoral foi revertida através da modulação do metabolismo celular. Nesse estudo, o tratamento de DCs com

etomoxir, um bloqueador da β -oxidação, juntamente com administração de anti-PD1, foi capaz reverter o padrão de citocinas, aumentar a resposta antitumoral e reduzir o tamanho do tumor (Zhao; Xiao; Evans; Theivanthiran *et al.*, 2018). No entanto, até o momento nada se tem descrito quanto ao potencial dessas drogas em modular as vias metabólicas envolvidas na ativação do perfil anti-inflamatório e do fenótipo tolerogênico de DCs após a eferocitose, contribuindo, em associação com outros quimioterápicos, na reprogramação desses fagócitos e restauração da imunidade antitumoral.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os quimioterápicos em associação com a radioterapia são indicados como a primeira opção de tratamento contra diversos tipos de tumores. No entanto, o uso dessa abordagem terapêutica tem como consequência um intenso acúmulo de morte celular, sendo a morte por apoptose um dos padrões de morte de células tumorais no microambiente tumoral. DCs, assim como macrófagos, são os principais fagócitos responsáveis pela remoção dessas células mortas, porém esse processo resulta na geração de mediadores anti-inflamatórios e conferem um perfil tolerogênico às DCs no TME, comprometendo a ativação de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. Apesar de estratégias visando o bloqueio do processo eferocítico terem apresentado resultados favoráveis em modelos experimentais de diferentes tipos de tumores, como de próstata, mama e pulmão (Chalasani; Marron; Roe; Clarke *et al.*, 2015; Digumarti; Bapsy; Suresh; Bhattacharyya *et al.*, 2014), esse tipo de abordagem terapêutica é realizada de maneira sistêmica, o que pode levar a deficiências na eferocitose de diversos tecidos, causando a liberação de DAMPs, inflamação e geração de autoanticorpos, com consequente desenvolvimento de autoimunidades. Desta forma, recentes estudos na área de imunometabolismo trazem uma nova abordagem quanto à modulação do perfil fenotípico de DCs associado a alterações metabólicas durante o processo de diferenciação, ativação e funcionalidade dessas células. Apesar de nada se ter descrito acerca do perfil metabólico de DCs durante a eferocitose de células tumorais, a modulação do metabolismo celular no contexto tumoral vem apresentando resultados promissores. A inibição da β -oxidação em DCs, utilizando etomoxir foi capaz de reduzir o tamanho do melanoma em um modelo murino (Zhao; Xiao; Evans; Theivanthiran *et al.*, 2018), ao passo que em um modelo de hepatocarcinoma, a indução

do metabolismo oxidativo, utilizando CpG, foi capaz de estimular a capacidade eferocítica de macrófagos e melhorar a resposta antitumoral (Liu; O'connor; Trefely; Graham *et al.*, 2019). Portanto, o entendimento das vias metabólicas ativadas durante o processo de eferocitose de células tumorais apoptóticas por DCs pode auxiliar na busca de promissoras terapias capazes de reprogramar seletivamente o metabolismo celular dessas DCs, gerando células imunogênicas e, portanto, hábeis em reestabelecer a resposta antitumoral de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Desta forma, *a hipótese deste estudo foi que a indução de morte celular por drogas antitumorais levaria ao acúmulo de ACs no TME, o que favoreceria a geração de DCs tolerogências mediante a eferocitose. A ingestão desses corpos apoptóticos e o aumento da disponibilidade de ácidos graxos resultariam na ativação da via de β -oxidação e de OXPHOS. A ativação dessas vias metabólicas impediria a expressão de marcadores de ativação e maturação de DCs, e induziria a produção de mediadores anti-inflamatórios, impedindo a ativação de linfócitos T antitumorais (Figura 1).*

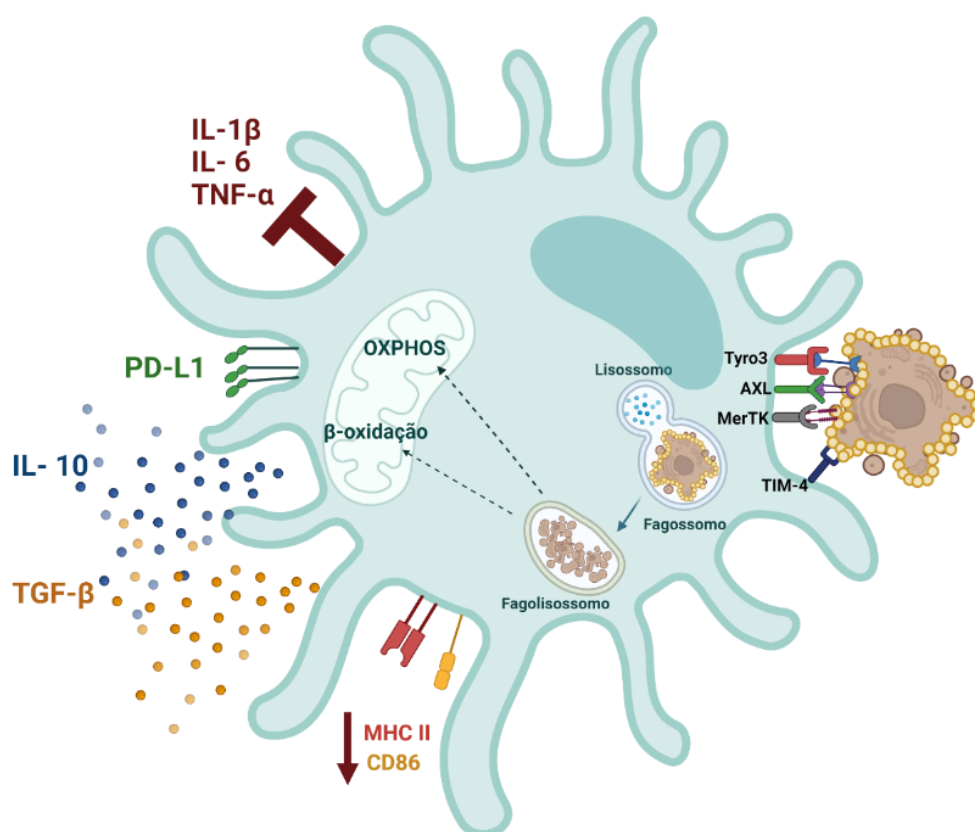


Figura 1. Hipótese de estudo A eferocitose de células tumorais apoptóticas resulta na ativação da via de β -oxidação e oxidação fosforilativa, induzindo um perfil tolerogênico em DCs, com produção de mediadores anti-inflamatórios.

3. Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil metabólico de DCs durante a eferocitose de células de adenocarcinoma renal apoptóticas.

3.1 Objetivos específicos

- I. *Determinar o padrão de morte celular de Renca-ACs. usando diferentes abordagens terapêuticas antitumorais.*
- II. *Caracterizar o perfil fenotípico de DCs durante a eferocitose de Renca-ACs.*
- III. *Identificar e validar o perfil metabólico de ativação de DCs durante a eferocitose de Renca-ACs.*

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Os camundongos C57BL/6 WT utilizados foram obtidos no Biotério Central da UNESP, localizado em Botucatu, São Paulo, com idades entre 5 a 10 semanas e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Biológicas – FCFAr/UNESP. Os animais *TIM-4^{-/-}* (Vijay Kuchroo, Harvard University) foram cedidos pela Profa. Dra. Larissa Dias da Cunha, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Os animais *AXL^{-/-}* e *MertK^{-/-}* (The Jackson Laboratory) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Diego Luís Costa, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Departamento de imunologia. Como controles foram utilizados animais C57BL/6. Os animais foram mantidos em mini-isoladores com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados e livre acesso à água e ração, previamente esterilizados. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas CEUA/FCFAr nº 05/2021, Universidade Estadual Paulista-UNESP.

4.2 Cultura celular

As células Renca foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ-/ATCC-CRL-2947) e cultivadas em meio RPMI-1640 (Lonza), suplementado com 10%

de SBF (Soro Bovino Fetal) e 0,1% de gentamicina (RPMIc) até atingirem 80% de confluência. Após esse período, as células foram coletadas utilizando tripsina (0.25% EDTA, Gibico), lavadas com RPMIc e o número de células viáveis foi estimado utilizando Azul de Trypan (Gibico) para utilização nos ensaios subsequentes.

4.3 Avaliação da taxa de apoptose a partir da marcação com Anexina V

As células Renca foram cultivadas em meio RPMIc até atingirem 80% de confluência. Em seguida, 5×10^6 células foram transferidas para garrafas por 24h para adesão celular, e então, tratadas 1 μ M, 2 μ M e 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M de doxorrubicina, por 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas, deixadas em repouso por 1 hora, em RPMIc a 37°C. A taxa de apoptose foi avaliada através da marcação com *Fixable Viability Stain 450* (BD, #562247), na concentração de 1:200, por 10 minutos, em temperatura ambiente, seguida de marcação com Anexina V (BD, #550474), por 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução 1X de *Annexin V Binding Buffer* (BD, # 556454) e fixadas com Paraformaldeído 4%, em 1X de *Annexin V Binding Buffer*. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa FlowJo (BD).

4.4 Avaliação da taxa de apoptose a partir da expressão de caspase-3 clivada

Após o tratamento com 1 μ M, 2 μ M e 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M de doxorrubicina por 24 horas, as células Renca foram coletadas e fixadas com *CytofixCytoPerm* (BD) e, em seguida, ligações inespecíficas foram bloqueadas utilizando uma solução proteica de 2% de BSA em PBS, por 40 minutos. A avaliação da taxa de apoptose foi realizada através da marcação com um anticorpo primário anti-caspase-3 clivada (*Cell Signaling*, #9661S), na concentração de 1:800, durante uma hora, em temperatura ambiente, seguida de um anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo *AlexaFluor 647* (*ThermoFisher*, #A-21244), na concentração de 1:2000 durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa *FlowJo* (BD).

4.5 Diferenciação de DCs a partir de células precursoras de Medula Óssea (BMDC)

As BMDCs foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea do fêmur e tíbia dos animais C57BL/6 selvagens, segundo protocolo preconizado por Lutz e previamente padronizado por nosso grupo de pesquisa (Lutz; Kukutsch; Ogilvie; Rossner *et al.*, 1999). As células precursoras foram cultivadas em placas de Petri na concentração de 1×10^6 células/mL, em volume final de 10 mL de meio RPMIc, adicionado de 20 ng/mL de GM-CSF (PeproTech. Inc.), por sete dias em estufa de CO₂ a 37°C, com reestimulação no terceiro e no sexto dia. No sétimo dia, as DCs foram coletadas, contadas pelo método de exclusão de células mortas por Azul de Trypan (Gibico) e ajustadas para o número de células necessárias para realização do ensaio de eferocitose.

4.6 Determinação da taxa de eferocitose de Renca-ACs por DCs

As BMDCs foram co-cultivadas com células Renca apoptóticas previamente fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS e marcadas com PKH67 ou PKH26, na proporção de 1:3, respectivamente. Após 18h de co-cultivo, as células foram coletadas, marcadas com anticorpo anti-CD11c e analisadas por citometria de fluxo para quantificação da porcentagem de células CD11c⁺PKH⁺. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa *FlowJo* (BD).

4.7 Caracterização fenotípica das BMDCs após a eferocitose

Para avaliar o perfil fenotípico de BMDCs após a eferocitose, o ensaio foi realizado pelo período de 18h e, em seguida, as mesmas foram avaliadas segundo a expressão de moléculas de superfície associadas à caracterização e maturação de DCs através de citometria de fluxo. Para exclusão de células mortas, as mesmas foram incubadas com *Fixable Viability Stain 780* (BD, #565388), de acordo com instruções do fabricante, e em seguida, incubadas com os anticorpos marcados com diferentes fluorocromos para avaliar, em células CD11c⁺ e viáveis, a expressão de moléculas de MHC-II, CD86 e PD-L1. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa *FlowJo* (BD).

Tabela 1. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo

Anticorpo	Marca	Catálogo
<i>APC Anti-mouse CD11c</i>	<i>BioLegend</i>	117309
<i>Pacific Blue Anti-mouse I-A[b]</i>	<i>BioLegend</i>	116421
<i>FITC Mouse Anti-Mouse I-A[b]</i>	<i>BD</i>	553551
<i>Alexa Fluor 700 Rat Anti-Mouse CD86</i>	<i>BD</i>	560581
<i>PeCy7 Anti-mouse CD86</i>	<i>BioLegend</i>	105013
<i>PerCP/Cyanine5.5 Anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)</i>	<i>BioLegend</i>	124333

4.8 Inibição das vias metabólicas

Os inibidores farmacológicos referentes as diferentes vias metabólicas estão listados na Tabela 1. Após a diferenciação das BMDCs, as células foram pré-tratadas durante 1h com os respectivos inibidores antes da adição das Renca-ACs. O impacto desses inibidores durante o processo de eferocitose de Renca-ACS, bem como a modulação do perfil fenotípico de ativação de DC foram determinados pela avaliação da expressão de moléculas de superfície previamente citadas.

Tabela 2. Inibidores das vias metabólicas

Inibidor	Alvo	Concentração	Via metabólica
Etomoxir	CPT1a	3µM	β-oxidação
2-DG	HK2	2mM	Glicólise
UK5099	MPC	5µM	Entrada de piruvato na mitocôndria
C75	FAS	20µM	Síntese de ácidos graxos
Oxamato de sódio	LDH	20Mm	Glicólise
CB-839	GLS	1µM	Glutaminólise

4.9 Avaliação da produção de mediadores solúveis produzidos durante o ensaio de eferocitose

O sobrenadante oriundo da co-cultura de BMDCs e Renca-ACs em todas as condições experimentais foi coletado após 18h e avaliado em relação a produção de nitrito e lactato, bem como mediadores pró e anti-inflamatórios IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10. A detecção de citocinas e lactato foi realizada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (BD). O limite de detecção dos ensaios são: 15,6 pg/mL para TNF- α , IL-6 e IL-1 β e 31,25 pg/mL para IL-10. O óxido nítrico no sobrenadante de cultura celular foi quantificado indiretamente pela produção de NO₂, a partir da reação de Griess (solução estoque de NEED a 0,1% e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%). A quantificação de lactato foi determinada utilizando o kit enzimático comercial Lactato Enzimático (LabTest), de acordo com instruções do fabricante.

4.10 qPCR

Após as 18 horas de co-cultura, RNA foi obtido e isolado utilizando *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e transcrito para cDNA utilizando *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad), de acordo com as instruções dos fabricantes. A determinação da expressão gênica foi realizada por qPCR utilizando *SybrGreen* e primers específicos para os genes de interesse (Tabela 3). A análise expressão relativa do gene de interesse foi realizada utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$, utilizando como controle a expressão do gene endógeno 18S.

Tabela 3. Sequências dos primers utilizado nos experimentos de qPCR.

Gene	Oligonucleotídeo F 5' – 3'	Oligonucleotídeo R' – 3'
<i>Ldha</i>	AGTAAGTCCTCAGGCGGCTA	GGACTTTGAATCTTTTGAGACCTT
<i>Glut1</i>	GCTGTGCTTATGGGCTTCTC	CACATACATGGGCACAAAGC
<i>Pkm2</i>	TCGCATGCAGCACCTGATT	CCTCGAATAGCTGCAAGTG GTA
<i>HK2</i>	TGATCGCCTGCTTATTCACGG	AACCGCCTAGAAATCTCCAGA
<i>18s</i>	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG

4.11 Glycolysis Stress Test-Seahorse

BMDCs de animais WT foram coletadas no sexto dia de diferenciação, plaqueadas em placa *Seahorse* em meio RPMI completo e 20 ng/mL de GM-CSF, na concentração de 4×10^5 células por poço e incubadas a 37°C e 5% CO₂, por 24 horas. Após 24 horas, $1,2 \times 10^6$ Renca-ACs foram adicionadas e a placa foi novamente incubada por 18 horas para o ensaio de eferocitose. Após esse período, as Renca-ACs não internalizadas foram cuidadosamente removidas através de lavagem com PBS 1X. O ensaio foi realizado em meio RPMI Seahorse suplementado com 1 mM de piruvato e 2 mM de glutamina e antes do início da leitura, a placa incubada por 1 hora em estufa a 37°C na ausência de CO₂. Durante o ensaio, nos intervalos entre as adições de 10 mM de glicose, 1,5 µM de Oligomicina e 50 mM de 2-DG, o equipamento realizou ciclos de homogeneização e medição do ECAR.

4.12 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SEM e analisados utilizando o programa estatístico Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Foram realizadas análises utilizando teste T student para comparações entre dos grupos experimentais ou análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni ou Tukey com múltiplas comparações para grupos experimentais maiores ou iguais a três. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Doxorrubicina induz morte por apoptose em células Renca

A escolha da terapia antitumoral mais adequada depende do tipo de tumor e do estágio de avanço da doença, desta forma, diferentes protocolos terapêuticos podem ser utilizados, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, ou ainda a combinação de duas ou mais metodologias. Os quimioterápicos e radioterápicos representam uma classe terapêutica amplamente utilizada para o tratamento de diferentes tipos de tumores e agem induzindo diversos padrões de morte celular, como apoptose, necrose, necroptose ou piroptose (Denisenko; Budkevich; Zhivotovsky, 2018). A eliminação dessas células tumorais mortas, por fagócitos profissionais e não

profissionais, parece ter grande impacto no perfil de ativação de células imunes associadas ao TME (Apetoh; Ghiringhelli; Tesniere; Obeid *et al.*, 2007). Apesar de algumas drogas antitumorais, como cisplatina e paclitaxel, induzirem padrões de morte inflamatórios, como necrose ou piroptose, grande parte dos quimioterápicos usualmente utilizados, como a doxorrubicina e everolimus, levam a um perfil de morte celular por apoptose, o que favorece o reconhecimento e internalização dessas células mortas por fagócitos associados ao tumor e, conseqüentemente, a geração de um TME supressor. (Casares; Pequignot; Tesniere; Ghiringhelli *et al.*, 2005; Du; Li; Zhen; Chen *et al.*, 2018; Pilco-Ferreto; Calaf, 2016; Wang; Ding; Li; He *et al.*, 2018; Xu; Ma; Fang; Zhang *et al.*, 2017; Zhang; Li; Wang; Xu *et al.*, 2019).

Desta forma, para obter uma boa fonte de células tumorais apoptóticas, utilizamos diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento de células Renca (BCRJ- 0346). Os tratamentos com AZD8186, pazopanibe e TGX221, que inibem PI3K β e PI3K δ , VEGFR e PI3K, respectivamente, não foram capazes de induzir uma taxa satisfatória de apoptose em células Renca (dados não mostrados). Na busca por drogas mais eficazes na indução de apoptose, as células Renca foram tratadas com doxorrubicina, uma antraciclina amplamente utilizada no tratamento clínico de tumores de bexiga, mama, estômago, pulmão, ovários e tireoide (Nomura; Aoki; Michimae; Mizuno *et al.*, 2019; Tap; Wagner; Schoffski; Martin-Broto *et al.*, 2020). Esse quimioterápico inibe a topoisomerase I e II e é capaz de induzir morte por apoptose em linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), avaliada pela ativação de caspase-3, caspase-8 e regulação negativa de bcl-2, *in vitro* (Pilco-Ferreto; Calaf, 2016). Com o intuito de determinar uma concentração do fármaco capaz de induzir a apoptose celular com mínima interferência de células necróticas, as células Renca foram tratadas com doxorrubicina nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M, durante 24h. A expressão de caspase-3 clivada, uma das principais proteases ativadas no início do processo apoptótico (Brentnall; Rodriguez-Menocal; De Guevara; Cepero *et al.*, 2013), foi avaliada para determinar a capacidade da doxorrubicina em induzir apoptose em células Renca. O tratamento com a droga a 1 μ M não foi capaz de aumentar a porcentagem de células expressando caspase-3 clivada, entretanto, todas as demais concentrações testadas (2 μ M 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) levaram a um aumento significativo no número de células expressando essa protease (58,72%, 75,82%, 76,26%, 77,1%, respectivamente), em comparação com as células que não receberam tratamento (Fig. 2

a-b). De acordo com o observado quanto a porcentagem de células positivas para caspase-3 clivada, também houve um aumento na intensidade de expressão dessa protease, em comparação com as células não tratadas. Desta forma, com base no rendimento de células após o tratamento, a condição de 5 μ M de doxorrubicina, por 24 horas, foi estabelecida como o melhor protocolo de geração de células Renca apoptóticas (Renca-ACs) para os experimentos subsequentes.

Uma vez que o processo de reconhecimento e internalização de células apoptóticas depende da expressão de PS, avaliamos também a expressão desse fosfolípido através da marcação com anexina V. Após 24 horas de tratamento com doxorrubicina nas concentrações de 2 μ M 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M, observamos aproximadamente 29,3%, 39.3%, 37,27% e 54,7% de células positivas para anexina V, respectivamente (Fig. Suplementar S1). Além disso, também observamos um aumento na intensidade de fluorescência de anexina V nessas células, em comparação com as células não tratadas. Apesar da quantidade de células expressando PS não ser semelhante a população de células expressando caspase-3 clivada, é importante pontuar que a apoptose é um processo dinâmico e que a exposição de PS ocorre em uma etapa posterior a clivagem de caspase-3, pois depende da ativação de *scramblases* e inativação de flipases, que por sua vez dependem da clivagem de caspase-3 (Segawa; Kurata; Yanagihashi; Brummelkamp *et al.*, 2014). Desta forma, o momento do processo apoptótico no qual a expressão de caspase-3 e PS possui influência direta nos fenômenos observados.

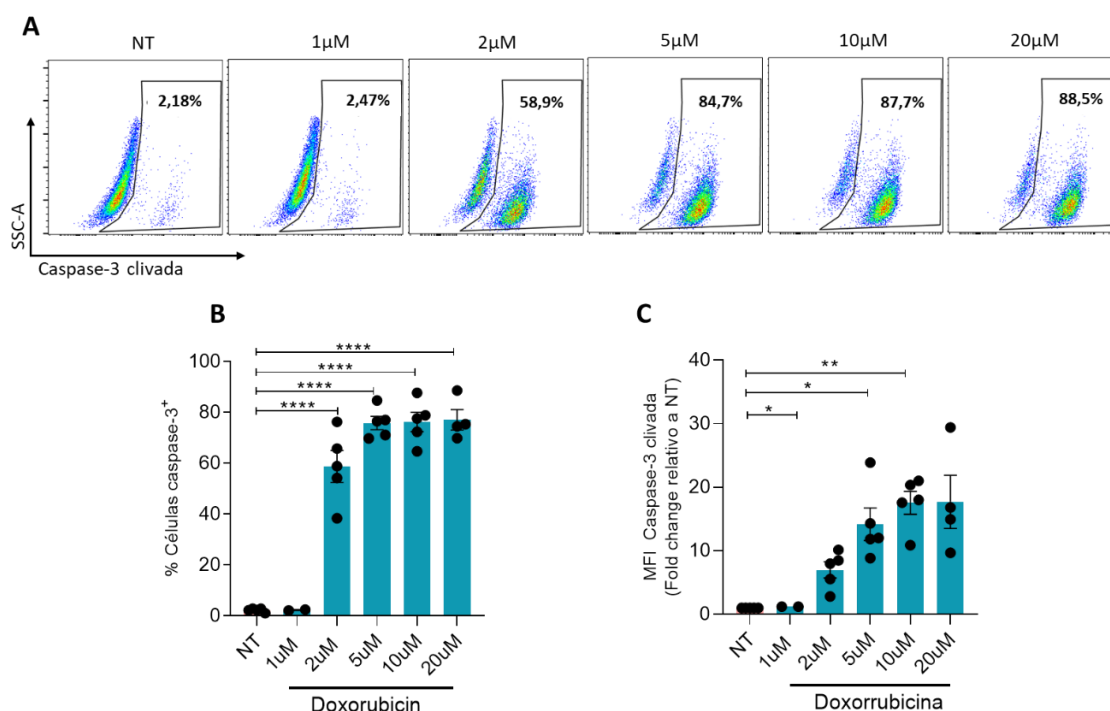


Figura 2. Doxorubicina é capaz de induzir apoptose em células Renca. Células Renca foram cultivadas em meio RPMIc até atingirem 80% de confluência. Em seguida, 5×10^6 células foram plaqueadas e, após 24h para adesão celular, as células foram tratadas com 1μM, 2μM, 5μM, 10μM e 20μM de doxorubicina. Após 24 horas de tratamento, a porcentagem de apoptose foi confirmada por citometria de fluxo utilizando a marcação de e caspase-3 clivada **(A)** Dot-plot representativo da porcentagem de células Renca positivas para caspase-3 clivada. Gráfico de barras apresentando porcentagem de células positivas para caspase-3 clivada **(B)** e gráfico de barras apresentando a MFI de caspase-3 clivada em células Renca **(C)**. Os dados representam a média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes, ** $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

5.2 A eferocitose de Renca-ACs induz um perfil tolerogênico em BMDCs

O TME é composto não somente por células tumorais, mas também por uma variedade de células imunes que migram para o tumor e são responsáveis pela geração da imunidade antitumoral. Ainda assim, a presença de algumas populações nesse microambiente, como é o caso dos macrófagos, é frequentemente associada a progressão tumoral (Brenot; Knolhoff; Denardo; Longmore, 2018; Zhang; Wang; Gao; Chen *et al.*, 2018). Como discutido anteriormente, dentro do TME há um intenso acúmulo de ACs mediante aos tratamentos quimio e radioterápicos e, nesse contexto, macrófagos e DCs tornam-se fagócitos essenciais para o *clearance* de corpos tumorais

apoptóticos. Entretanto, diversos estudos demonstraram previamente que a eferocitose de células tumorais apoptóticas contribui para a geração de um TME tolerogênico prejudicial para a resposta antitumoral, favorecendo a progressão do tumor (Soki; Koh; Jones; Kim *et al.*, 2014; Stanford; Young; Hicks; Owens *et al.*, 2014; Yin; Huang; Lynn; Thorpe, 2013).

Embora os macrófagos componham a principal população mieloide presente no TME, as DCs protagonizam o processamento e apresentação de antígenos tumorais para a ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺. Desta forma, para avaliar o efeito da eferocitose de células tumorais apoptóticas no perfil de ativação de DCs, BMDCs foram co-cultivadas com Renca-ACs, na proporção de 1:3, durante 18 horas. As Renca-ACs foram previamente marcadas com PKH26 ou PKH67 e a determinação da taxa de eferocitose por citometria de fluxo mostrou que cerca de 90% das BMDCs foram capazes de eferocitar ao menos uma Renca-AC, representadas pela porcentagem de células CD11C⁺/ PKH⁺ e pela MFI (do inglês, *median fluorescence intensity*) de PKH (Fig 3 a-c).

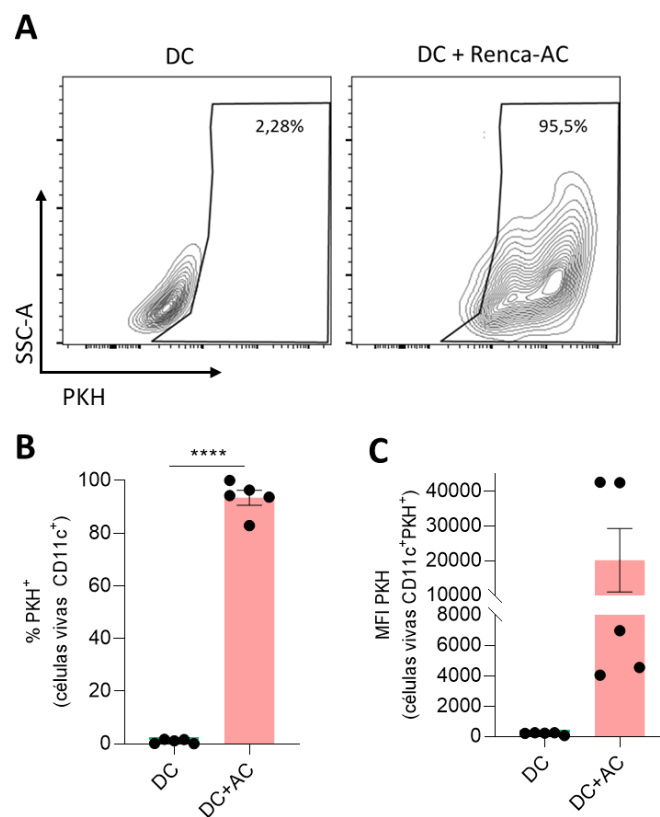


Figura 3. BMDCs são capazes de eferocitar Renca-ACs. Células Renca apoptóticas marcadas com PKH26 ou PKH67 foram co-cultivadas com BMDCs na proporção de 1:3,

durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a taxa de eferocitose através da marcação CD11C⁺/PKH⁺. **(A)** Dot-plot representativo da porcentagem de BMDC positivas para PKH **(B)** Gráfico de barras apresentando a porcentagem de células CD11c⁺PKH⁺. **(C)** Gráfico de barras apresentando a MFI de PKH em células CD11c⁺ PKH⁺ viáveis. Os dados apresentados representam a média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes, *p<0,0001.

Além de determinar a capacidade BMDCs em internalizar Renca-ACs, buscamos também avaliar o fenótipo dessas células após a digestão de corpos apoptóticos tumorais. Para tal, a expressão de marcadores associados a maturação celular foi determinada por citometria de fluxo segundo a seleção populacional esquematizada na Figura suplementar S2. A fagocitose de Renca-ACs levou a um perfil tolerogênico de BMDCs, como pode ser observado pela diminuição significativa na porcentagem de células duplo positivas para MHC-II⁺/CD86⁺, sem alterações na intensidade de expressão da molécula (MFI), quando comparado à condição de BMDC controle (Fig 4 a-c). Além disso, concomitantemente a diminuição na população de células expressando esses dois marcadores de maturação celular, a internalização de corpos apoptóticos tumorais causou um aumento significativo na expressão de PD-L1 em BMDCs, tanto em porcentagem de células positivas, quanto em intensidade de expressão do marcador (Fig 4b-c).

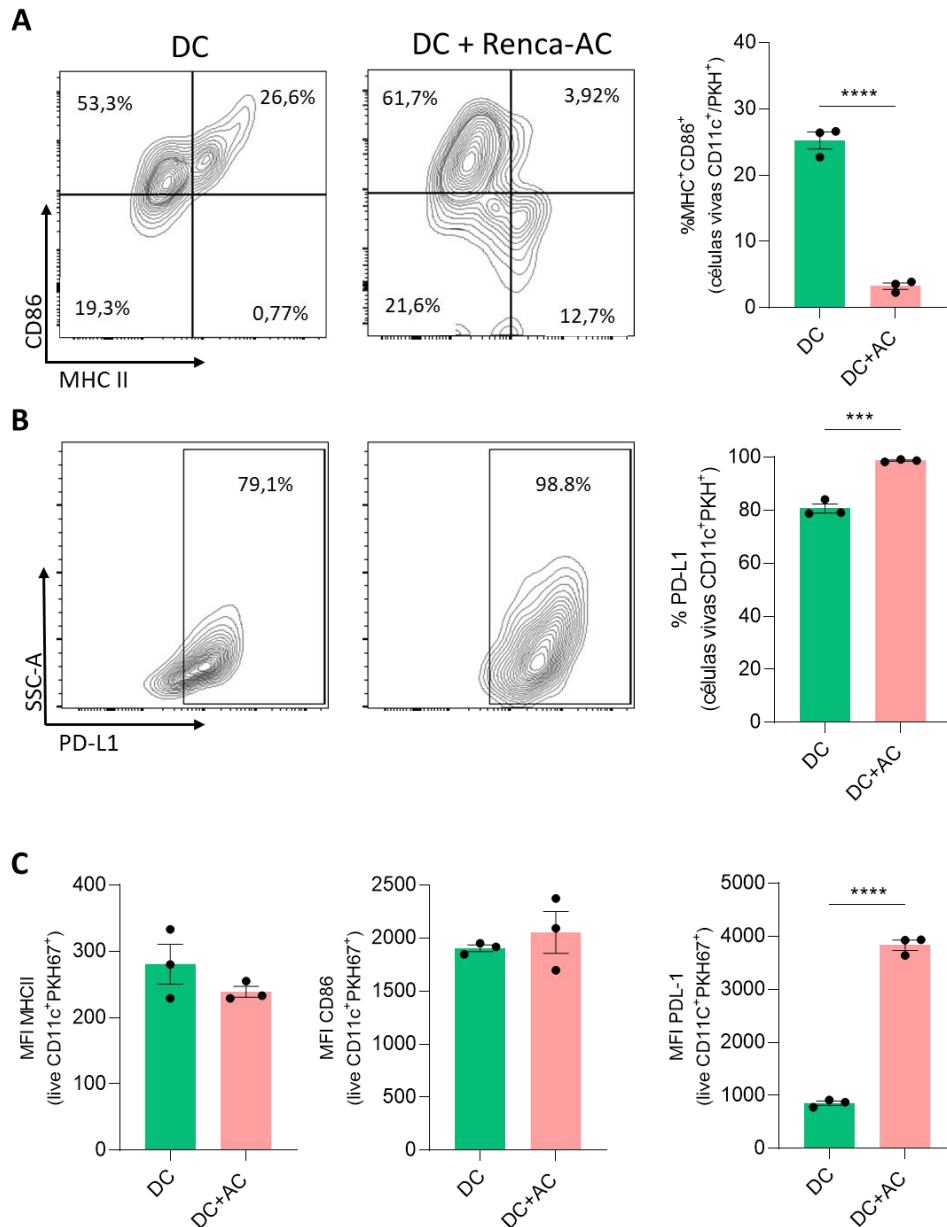


Figura 4. A eferocitose de Renca-ACs gera BMDCs tolerogênicas. Células Renca apoptóticas marcadas com PKH foram co-cultivadas com BMDCs na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão dos marcadores CD86, MHC-II e PD-L1. **(A)** Dot plot representativo e gráfico de barras apresentando a porcentagem de células expressando CD86, MHC-II e, dentro da população de células CD11c⁺PKH⁺ vivas. **(B)** Dot-plot representativo e gráfico de barras apresentando a porcentagem de células expressando PD-L1, dentro da população de células CD11c⁺PKH⁺ vivas. **(C)** Gráfico de barras apresentando a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de CD86, MHC-II e PD-L1. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM de um experimento representativo, realizado em triplicada, de ao menos seis experimentos independentes, ***p<0,0005, **** p > 0,001.

A caracterização de uma célula dendrítica com fenótipo tolerogênico depende não somente da expressão de marcadores associados a maturação celular, mas também do microambiente gerado por essa célula. Desta forma, avaliamos os mediadores solúveis produzidos por BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. Vale ressaltar que, uma vez que nossa fonte de células apoptóticas tem origem murina, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS antes da co-cultura, para evitar que os mediadores solúveis produzidos pelas Renca-ACs interferissem na avaliação do microambiente gerado pelas BMDCs. Após 18 horas, corroborando com os dados obtidos acerca do fenótipo adquirido pelas BMDCs, a eferocitose de Renca-ACs resultou em uma modesta inibição na produção de IL-1 β (Fig. 5a), sem modulação significativa na produção de mediadores como TNF- α , lactato e NO, quando comparado à condição BMDC controle (Fig. 5 d-f). Entretanto, observamos que após a eferocitose de Renca-ACs, BMDCs houve um aumento não somente na produção de IL-10, mas também de IL-6, uma citocina usualmente caracterizada como um mediador inflamatório, quando comparado à condição BMDC controle (Fig. 5 b-c).

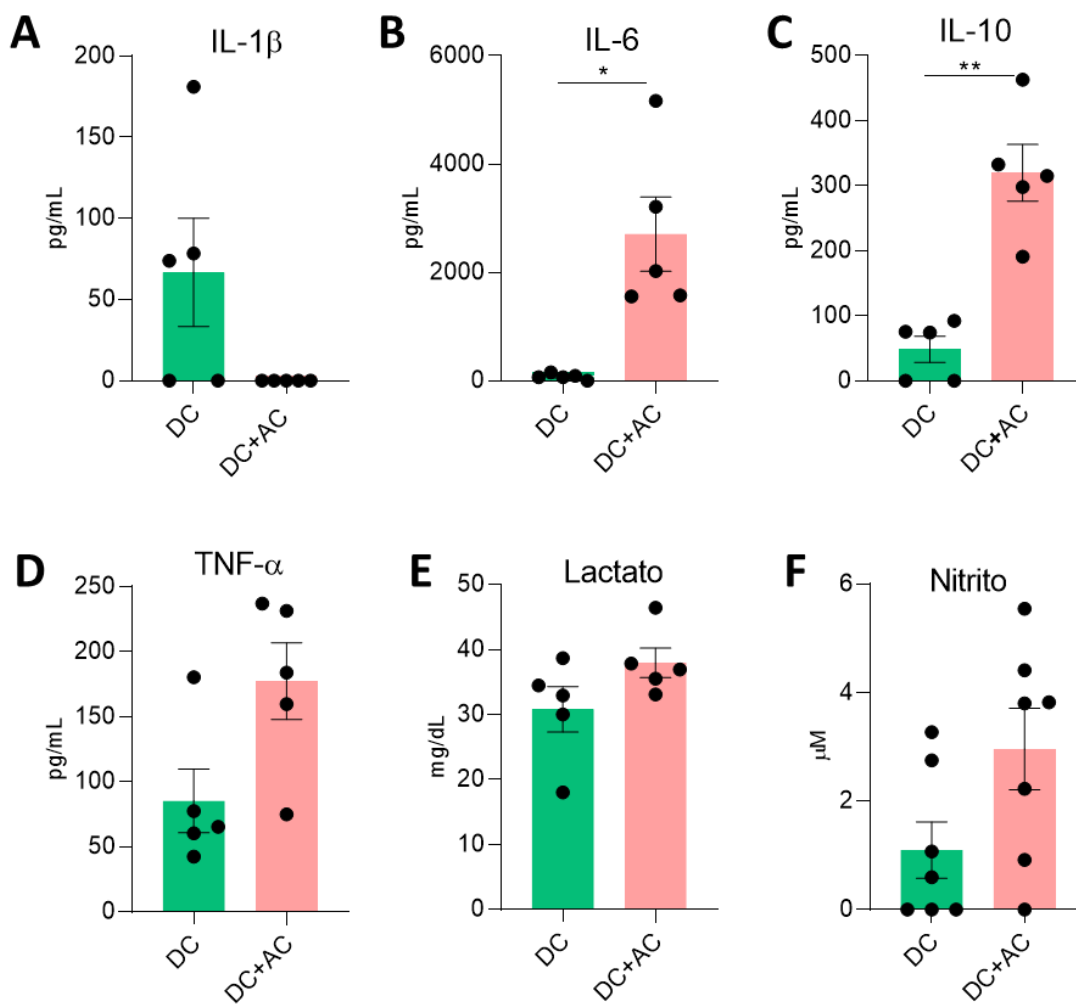


Figura 5. A eferocitose de Renca-ACs leva a um aumento na produção de IL-6 e IL-10. Células Renca apoptóticas foram co-cultivadas com BMDCs na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para dosagem por ELISA dos mediadores IL-6, IL-1β, IL-10, TNF- α, além dosagem de lactato e nitrito. Gráficos de barras apresentando a média da concentração de (A) IL-1β, (B) IL-6, (C) IL-10, (D)TNF- α, (E) lactato e (F) nitrito. Os dados são expressos como média ± SEM de ao menos cinco experimentos independentes, * p > 0,01 **p<0,001.

5.3 Envolvimento de receptores TIM 4 e TAM na eferocitose de Renca-ACs

O reconhecimento e internalização de corpos apoptóticos ocorre através de diversos receptores expressos nos fagócitos. Desta forma, na tentativa de avaliar quais receptores estão envolvidos na remoção de Renca-ACs, utilizamos animais deficientes

de receptores eferocíticos. Para tanto, BMDCs oriundas de animais *TIM-4*^{-/-}, *AXL*^{-/-} e *MertK*^{-/-} foram diferenciadas e então co-cultivadas por 18h na presença de Renca-ACs. De maneira interessante, apesar de não observarmos alterações na taxa de eferocitose (Fig. 6a), a deficiência de TIM-4, AXL e, principalmente, MertK, parece levar a uma tendência de redução na MFI de PKH, o que sugere que BMDCs são menos hábeis em eferocitar novos “rounds”, ou subseqüentes fagocitoses, de Renca-ACs na ausência desses receptores, em comparação com BMDCs de animais WT (Fig 6b).

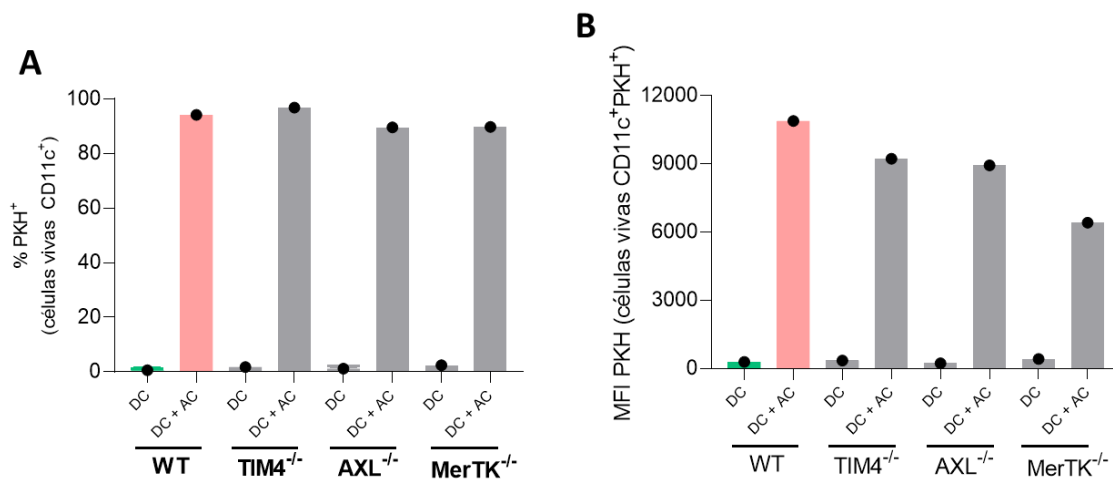


Figura 6. Receptores TIM-4 e TAM participam da eferocitose de Renca-ACs. BMDCs foram diferenciadas a partir de células precursoras da medula óssea de animais WT e *TIM-4*^{-/-} *AXL*^{-/-} e *MertK*^{-/-} e, em seguida, foram co-cultivadas com células Renca apoptóticas marcadas com PKH26 ou PKH67, na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da taxa de eferocitose **(A)** Gráfico de barras apresentando a porcentagem de células PKH⁺ dentro da população de células CD11c⁺ vivas. **(B)** Gráfico de barras apresentando a MFI de PKH dentro da população de células CD11c⁺ PKH⁺ vivas. Os dados são expressos como média ± SEM e representam um experimento representativo de quatro experimentos independentes.

Com relação a expressão de marcadores associados a maturação de BMDCs, observamos que a ausência de TIM-4 durante a eferocitose leva a uma tendência de redução na intensidade de expressão de CD86, quando comparado à BMDCs WT na presença de Renca -ACs (Fig. 7 c-d). Além disso, CD86 também possui uma tendência de redução quando MertK ou AXL estão ausentes (Fig. 7d). A expressão de PD-L1

também parece estar ligeiramente reduzida na ausência de TIM-4, AXL e MertK (Fig. 7 d). Não foram observadas alterações na produção de IL-6 na ausência desses receptores, entretanto, de maneira interessante, a ausência de MertK parece inibir parcialmente a produção de IL-10 (Fig. 7f-g), em comparação com a condição de BMDCs WT + ACs. Uma vez que a ausência desse receptor também parece reduzir a capacidade eferocítica de BMDCs, nossos dados sugerem que a quantidade de células apoptóticas fagocitadas pode impactar na produção de IL-10.

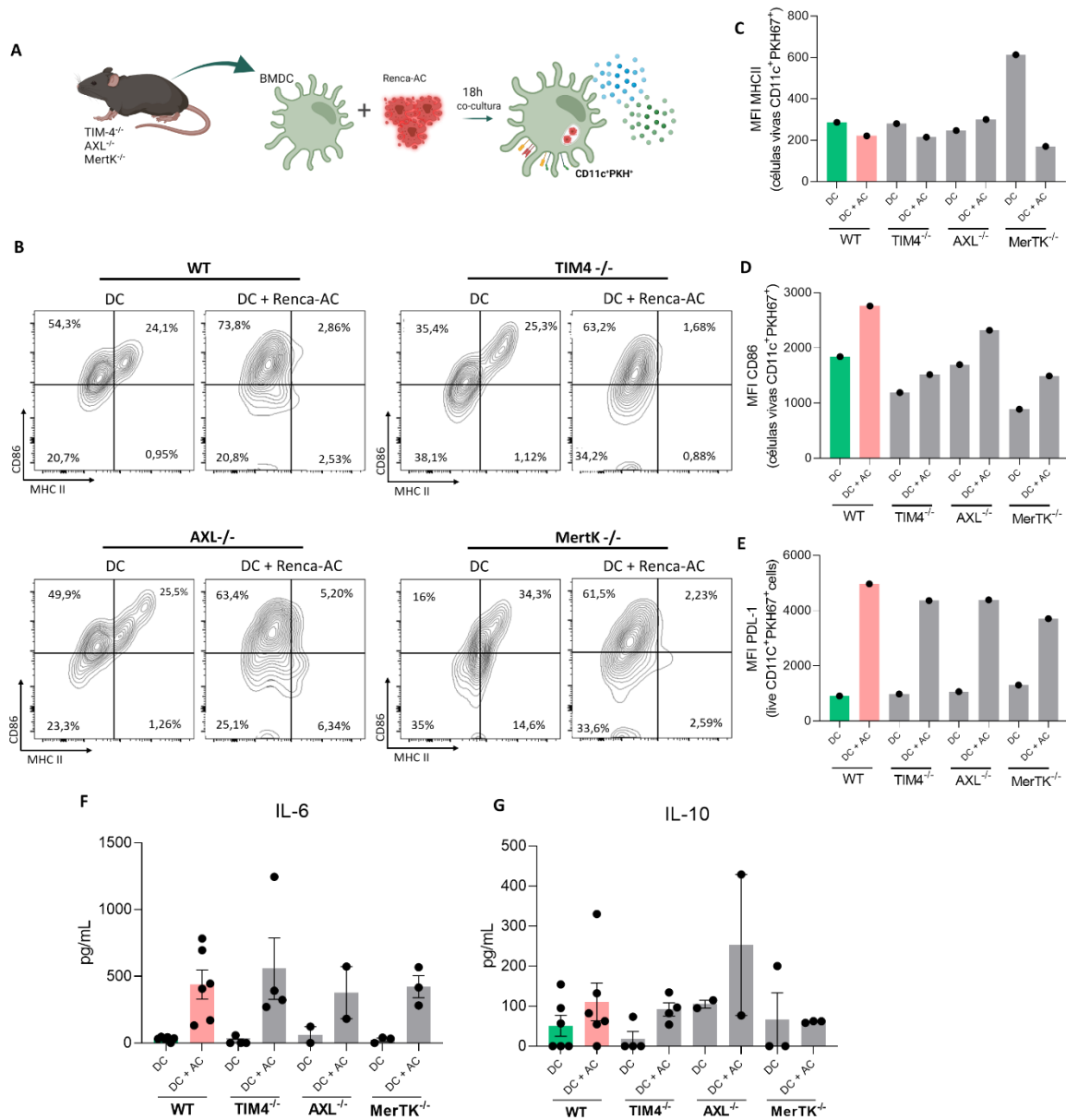


Figura 7. Receptores TIM-4 e TAM colaboram para o perfil tolerogênico de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. (A) BMDCs foram diferenciadas a partir de células precursoras da medula óssea de animais WT e *TIM-4^{-/-}* *AXL^{-/-}* e *MertK^{-/-}* e, em seguida, foram co-cultivadas

com células Renca apoptóticas marcadas com PKH, na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da taxa de eferocitose e ativação celular. **(B)** Dot plot representativo apresentando a porcentagem de células CD86⁺ e/ou MHC-II⁺, dentro da população de células CD11c⁺PKH⁺ vivas. Gráficos de barras apresentando a expressão (MFI) de **(C)** MHC **(D)** CD86 e **(E)** PD-L1, dentro da população de células CD11c⁺ PKH⁺ vivas. Gráficos de barras apresentando as quantidades produzidas de **(F)** IL-6 e **(G)** IL-10. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM e representam **(B-E)** um experimento representativo de quatro experimentos independentes ou **(F-G)** quatro experimentos independentes.

5.4 A produção de mediadores químicos após a eferocitose de Renca-ACs depende majoritariamente da ativação da via glicolítica

Para tentar entender quais seriam as vias metabólicas envolvidas na expressão de moléculas e mediadores que caracterizam o perfil tolerogênico de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs, utilizamos inibidores que atuam em moléculas chave do funcionamento das diferentes vias metabólicas. Como já descrito na literatura, apenas os sinais de *find-me* e o reconhecimento e ligação da célula apoptótica ao fagócito já são capazes de modular o metabolismo celular. Desta forma, para determinar a contribuição das diferentes vias metabólicas na geração do microambiente tolerogênico, BMDCs foram pré-tratadas com os respectivos inibidores por 1h e então co-cultivadas com Renca-ACs por 18h. Primeiramente avaliamos se o uso dessas drogas afeta a viabilidade de BMDCs e, como observado na figura suplementar S3, não houve alterações na porcentagem de BMDC viáveis após o tratamento. Além disso, o tratamento com esses inibidores também não alterou taxa de eferocitose de Renca-ACs por BMDCs (Fig. 8b) quando comparado à condição controle, DC+ACs. Entretanto, a inibição da via glicolítica utilizando o oxamato de sódio, 2-DG e a condição sem glicose (GF) resultou em uma tendência de redução na MFI de PKH dentro da população CD11c⁺PKH⁺, indicando que inibição dessa via metabólica reduz a capacidade eferocítica de Renca-ACs por BMDCs (Fig 8c). Além disso, a inibição da glutaminólise, utilizando CB-839, bem como a inibição da síntese de ácidos graxos, utilizando C75, também parecem reduzir a capacidade eferocítica de BMDCs (Fig. 8c), sugerindo que essas vias metabólicas também possam estar envolvidas na internalização de Renca-ACs.

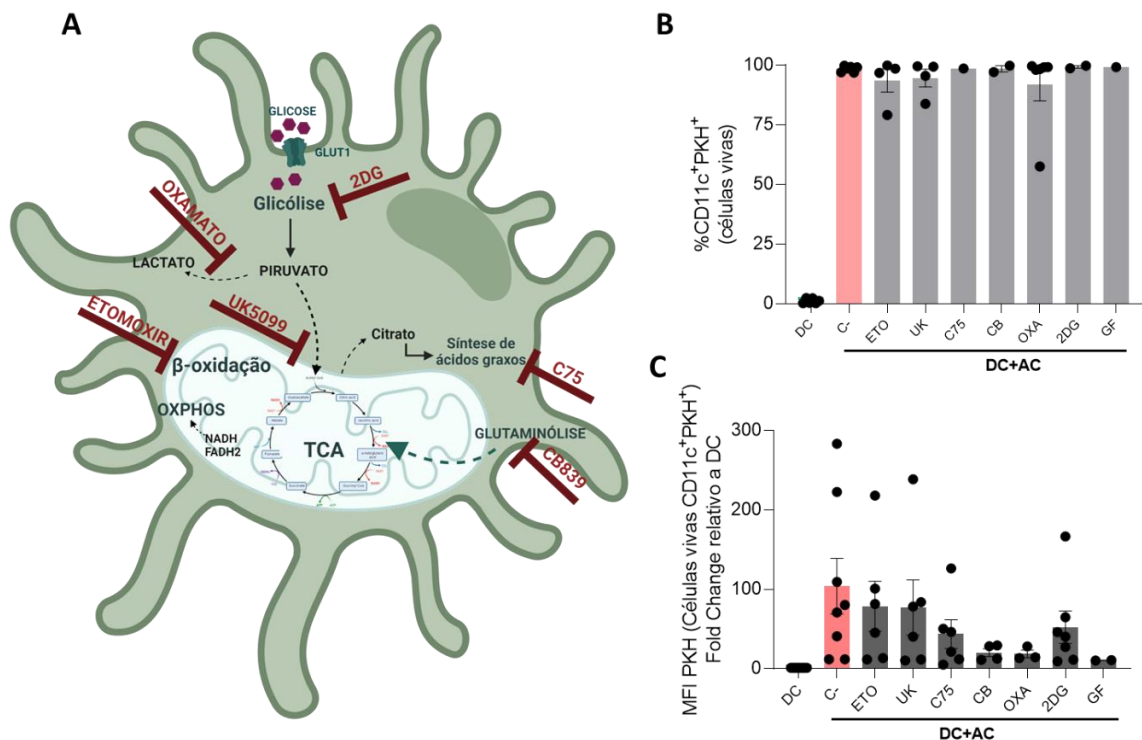


Figura 8. A via glicolítica participa da eferocitose de Renca-ACs por BMDCs. BMDCs foram pré-tratadas com etomoxir (3μM) ou 2DG (2mM) ou UK5099 (5μM) ou C75 920μM) ou oxamato de sódio (20mM), por uma hora. Em seguida, foram co-cultivadas com Renca-ACs na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a taxa de eferocitose através da marcação CD11c⁺/PKH⁺. **(A)** Esquema ilustrativo das moléculas alvo dos inibidores metabólicos utilizados. **(B)** Gráfico de barras representando a porcentagem de células CD11c⁺PKH⁺ **(c)** Gráfico de barras apresentando a média da intensidade de fluorescência de PKH dentro da população CD11c⁺PKH⁺. Os dados são expressos como média ± SEM e representam pelo menos dois experimentos independentes.

De maneira geral, a inibição das vias metabólicas não levou a alterações na expressão de CD86, quando comparado com a condição sem tratamento na presença de Renca-ACs (Fig 9b). Entretanto, foi observada uma tendência de redução na expressão de MHC-II e PD-L1 mediante a inibição da via glicolítica utilizando oxamato de sódio e condição ausente de glicose, assim como mediante a inibição da glutaminólise utilizando CB-839 (Fig. 9a-c), sugerindo que a expressão desses marcadores depende, ao menos parcialmente, da atividade dessas duas vias metabólicas.

Um segundo ponto importante em nosso modelo foi avaliar a contribuição das diferentes vias metabólicas para a geração do microambiente supressor. Frente a determinação da produção de mediadores solúveis, nossos resultados indicam que vias metabólicas distintas participam do microambiente gerado por BMDCs durante a eferocitose de Renca-ACs. A inibição da glicólise e da glutaminólise, utilizando oxamato de sódio ou meio sem glicose e CB-839, respectivamente, gerou uma redução expressiva na produção de IL-10 e IL-6 (Fig. 9d-e). A produção dessas citocinas por BMDCs durante a eferocitose também foi inibida com o uso do UK5099, que inibe a entrada de piruvato na mitocôndria, bem com o pelo 2DG, quando comparado à condição sem tratamento na presença de Renca-ACs. Além disso, a inibição da via de síntese de ácidos graxos pelo uso do C57 demonstrou uma tendência de inibição na produção de IL-6 (Fig. 9d-e). Esses resultados sugerem que a via glicolítica e síntese de ácidos graxos atuam em conjunto para a produção de IL-6, uma vez que a glicose parece ser uma importante fonte de carbono para a síntese de piruvato e alimentação do ciclo do ácido cítrico que, por sua vez, gera substratos importantes para a síntese de ácidos graxos, o que favoreceria o transporte e liberação desse mediador. Esse fenômeno foi primeiramente descrito em BMDCs ativadas com LPS (Everts; Amiel; Huang; Smith *et al.*, 2014) e, no entanto, também pode representar uma via comum para produção de citocinas por BMDCs tolerogênicas durante a eferocitose de Renca-ACs. Ainda, a via glicolítica e a glutaminólise parecem ser fundamentais para a geração do microambiente tolerogênico com alta produção de IL-10 e IL-6, corroborando nossos dados que mostraram que a atividade dessas vias é importante para o fenótipo imunossupressor de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. Como comentado anteriormente, o metabolismo que sustenta o caráter tolerogênico da eferocitose é um mecanismo dinâmico que não está atrelado a atividade de apenas uma via metabólica. A natureza anti-inflamatória desse processo já foi correlacionada com a atividade oxidativa, onde o

excesso de ácidos graxos decorrentes da digestão de corpos apoptóticos levou a um aumento na respiração mitocondrial em macrófagos, e a inibição da β -oxidação, utilizando etomoxir foi capaz de reverter o fenótipo tolerogênico através da redução na produção de IL-10 (Zhang; Weinberg; Deberge; Gainullina *et al.*, 2019). Corroborando esse dado, nós observamos em nosso modelo que a inibição da β -oxidação, também utilizando etomoxir, leva a uma leve tendência de redução na produção de IL-10 e IL-6, sugerindo o envolvimento do metabolismo oxidativo, ao menos parcialmente, na produção desses mediadores.

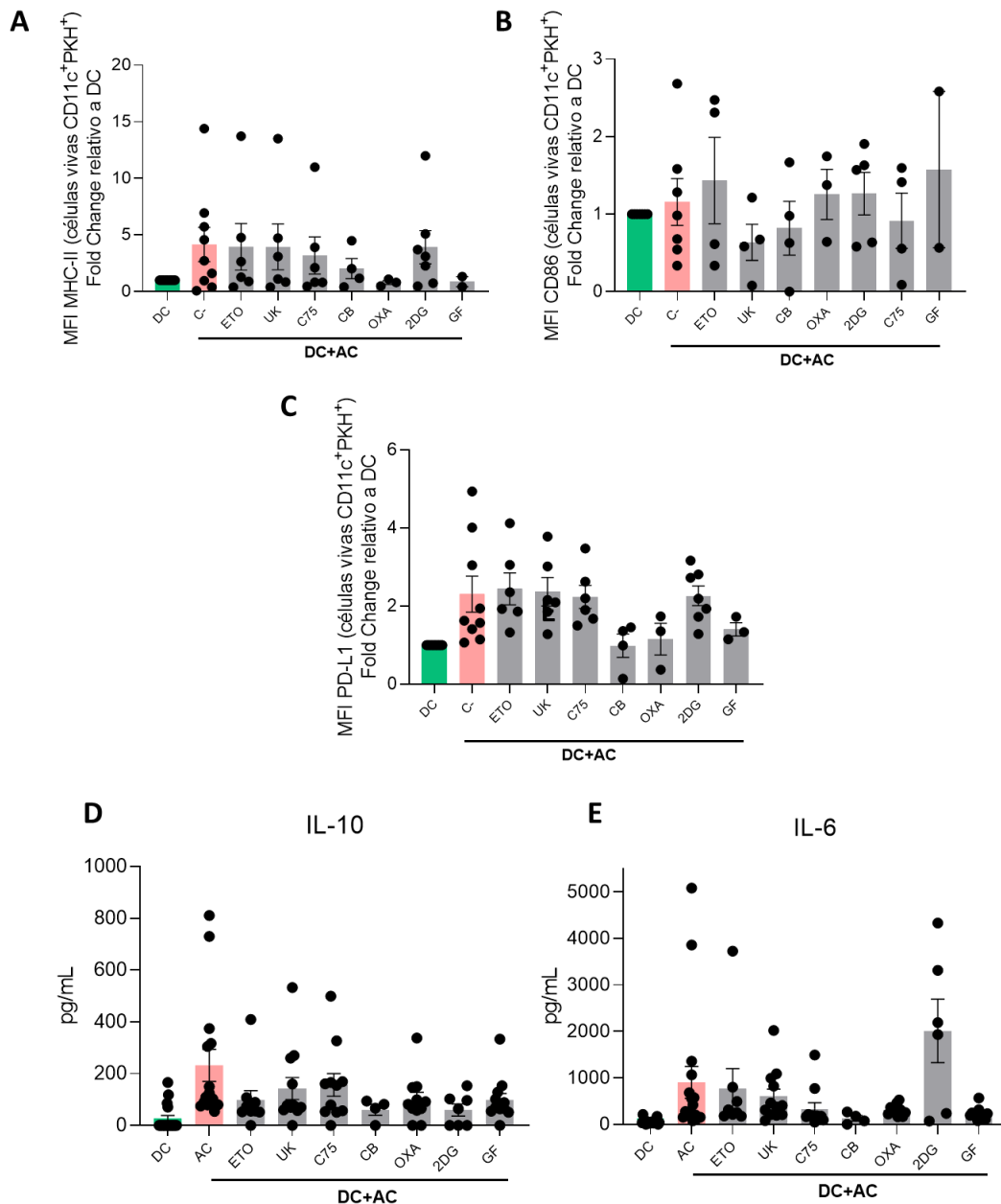


Figura 9. A produção de mediadores pró e antiinflamatório depende de diferentes vias metabólicas durante a eferocitose de Renca-AC por BMDCs. BMDCs foram pré-tratadas com etomoxir (3 μ M) ou 2DG (2mM) ou UK5099 (5 μ M) ou C75 920 μ M ou oxamato de sódio (20mM). Em seguida, foram co-cultivadas com Renca-ACs na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a taxa de eferocitose através da marcação CD11C⁺/PKH⁺. Gráfico de barras apresentando a média da intensidade de fluorescência (MFI) de **(A)** MHC II, **(B)** CD86 e **(C)** PD-L1 dentro da população CD11c⁺PKH⁺. Gráfico de barras apresentando a quantidade produzida de **(D)** IL-6 e **(E)** IL-10. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM e representam pelo menos dois experimentos independentes.

Levando em consideração os dados obtidos acerca da importância da via glicolítica para a produção de mediadores químicos após a eferocitose, nosso próximo passo foi avaliar a expressão gênica de genes associados à essa via. A eferocitose de Renca-ACs levou a um aumento significativo na expressão de Glut1, um dos principais carreadores responsáveis pela captação de glicose do meio extracelular para o meio intracelular, em BMDCs (Fig. 10a). Além disso, após a internalização e digestão desses corpos apoptóticos foi observada uma modulação positiva, em comparação ao controle negativo, na expressão gênica de *Ldha* e *Pkm2* (Fig. 10b-c), outras duas enzimas chave do metabolismo glicolítica. A expressão de HK2, por outro lado, não apresentou diferença significativa após a eferocitose de Renca-ACs (Fig. 10d). Interessantemente, foi observada uma tendência de aumento na expressão de *Cpt1a*, uma enzima fundamental para o metabolismo oxidativo (Fig. 10e).

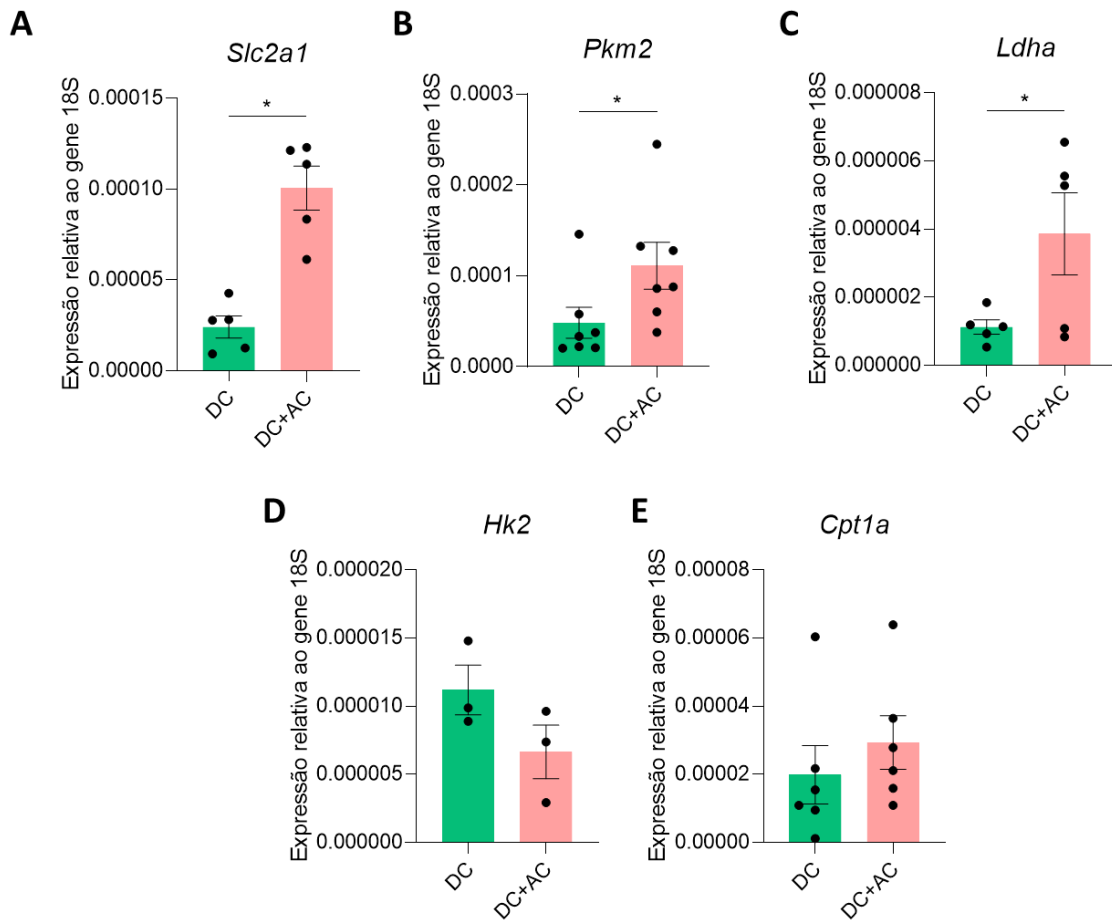


Figura 10. BMDCs aumentam o metabolismo glicolítico durante a eferocitose de Renca-ACs. BMDCs foram co-cultivadas com Renca-ACs na proporção 1:3 durante 18h. As células não fagocitadas foram removidas e a expressão do RNAm de genes associados à glicólise (*Slc2a1*, *Pkm2*, *HK2*), à produção de lactato (*Ldha*) e à B-oxidação (*Cpt1a*) foi analisada nas BMDCs. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. Cada símbolo representa o resultado de pelo menos 3 experimentos realizados independentemente, * $p > 0,05$.

Para confirmar a ativação da via glicolítica observada na expressão gênica e no perfil de produção de mediadores após o uso dos inibidores, realizamos o ensaio de GlycoStress utilizando condições normoglicêmicas e com ausência de glicose. Neste ensaio, são realizadas injeções consecutivas de glicose, oligomicina e 2-DG, o que nos permite avaliar em tempo real, através da mensuração da taxa de acidificação do meio, parâmetros associados à atividade da via glicolítica, como a glicólise basal, a capacidade glicolítica e a reserva glicolítica. Interessantemente, após as 18 horas de co-cultura, observamos que a eferocitose de Renca-ACs levou a uma redução na reserva glicolítica de BMDCs tanto na presença quanto na ausência de glicose, comparado às

condições de BMDC controle (Fig 11b). Além disso, a capacidade glicolítica de BMDCs parece ter uma tendência de redução na condição de ausência de glicose (Fig. 11c). Esses dados corroboram estudos prévios que demonstram que o metabolismo glicolítico utilizado por DCs para o desenvolvimento de suas funções efetoras iniciais é alimentado por reservas intracelulares de glicose em forma de glicogênio (Thwe; Pelgrom; Cooper; Beauchamp *et al.*, 2017). Entretanto, não foram constatadas diferenças em nosso modelo quando observamos as condições de co-cultura com RencaACs (11a-b). Curiosamente, a glicólise basal se mostrou menor nas condições com Renca-ACs. Vale ressaltar que o ensaio de *Seahorse* foi realizado após 18 horas de co-cultura e nossos dados demonstraram que o metabolismo glicolítico é importante para a capacidade eferocítica de BMDCs (Fig. 8b-c), desta forma, torna-se interessante avaliar o caráter metabólico de BMDCs em períodos mais precoces, pois é possível que a glicólise esteja mais ativada nas etapas iniciais do processo eferocítico, mas que o metabolismo oxidativo seja o responsável por sustentar o fenótipo imunossupressor dessas células em etapas mais tardias.

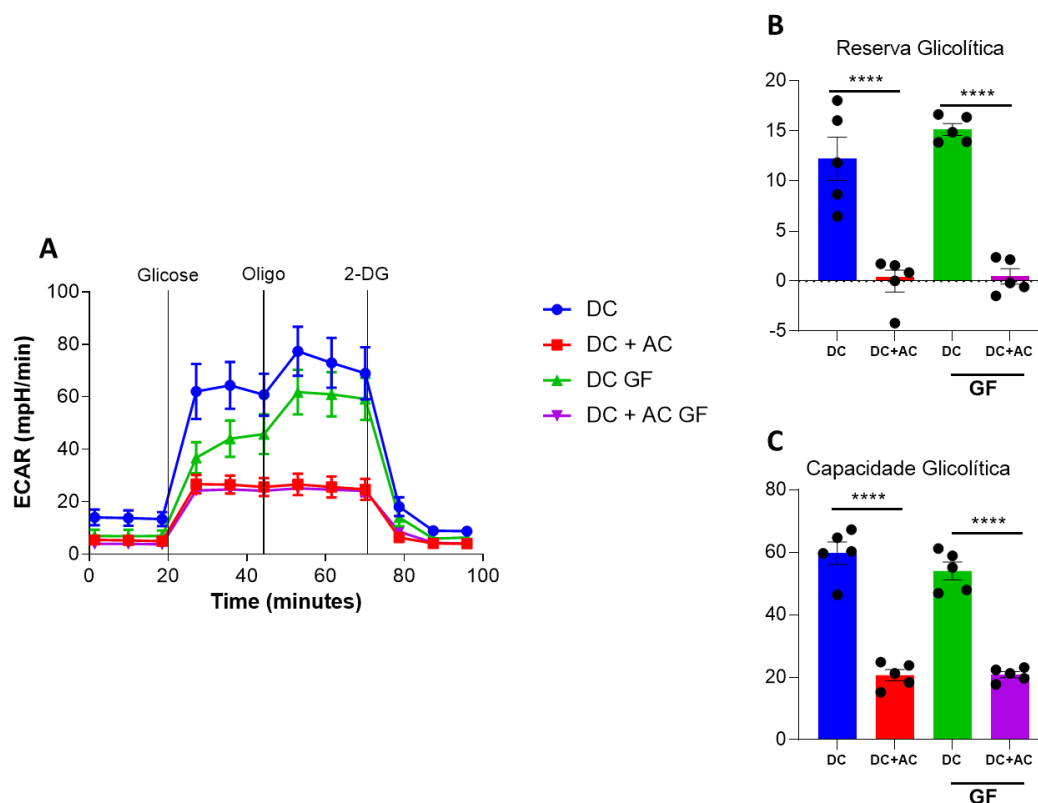


Figura 11. A capacidade e a reserva glicolítica de BMDCs é reduzida após a eferocitose de Renca-ACs, BMDCs foram incubadas com Renca-ACs na proporção 1:3 durante 18h. As células não fagocitadas foram removidas e o (a) ECAR foi determinado através dos tratamentos sequenciais com Glicose (10 mM), Oligomicina (1.5 μ M) ou 2-DG (50 mM) para determinar (b) capacidade e (c) reserva glicolítica. Os dados representam um experimento individual realizado em quintuplicata, $p > 0,001$.

5.5 Receptores eferocíticos envolvidos no reconhecimento de Renca-ACs impactam no metabolismo de BMDCs após a eferocitose.

Buscando entender que outros fatores influenciam o metabolismo da eferocitose de células tumorais apoptóticas, avaliamos se a ausência de algum dos receptores eferocíticos envolvidos na internalização de Renca-ACs poderia influenciar no perfil metabólico de BMDCs. Utilizando BMDCs de animais *TIM-4*^{-/-}, *AXL*^{-/-} e *MertK*^{-/-}, observamos que a ausência de TIM-4 e AXL parece reduzir a expressão gênica de GLUT1, em comparação com BMDCs de animais WT na presença de Renca-ACs (Fig 12a). Além disso, a ausência TIM-4, bem como a de AXL e MertK, parecem reverter expressivamente o aumento na expressão gênica de *Ldha* observada após a eferocitose de Renca-ACs por BMDCs de animais WT (Fig 12b). Interessantemente, a ausência de

AXL e MertK parece levar a um aumento na expressão de *Pkm2* após a eferocitose, em comparação a BMDCs WT, entretanto, BMDCs knockout para esses receptores já apresentaram uma maior expressão de *Pkm2* mesmo na ausência de Renca-ACs (Fig 12c). Além disso, a ausência de TIM-4 causou uma tendência de redução na expressão de *Hk2*, ao passo que a ausência de AXL e MertK parece levar a um aumento na expressão gênica dessa molécula após a eferocitose de Renca-ACs, em comparação com BMDCs controle (DC+ACs) (Fig. 12d). A ausência de AXL parece reverter parcialmente o aumento na expressão gênica de *Cpt1a* observado em BMDCs de animais WT após a eferocitose de Renca-ACs (Fig 12e). Esses dados sugerem que o receptor eferocítico possui impacto direto no perfil metabólico adquirido pela DC após o processo de eferocitose. Portanto, esses dados sugerem que a internalização de Renca-ACs mediada por TIM-4, AXL e MertK parece desempenhar um papel fundamental na atividade glicolítica de BMDCs, que, como demonstrado previamente em nossos resultados, é a via metabólica majoritariamente responsável por sustentar o perfil tolerogênico da eferocitose.

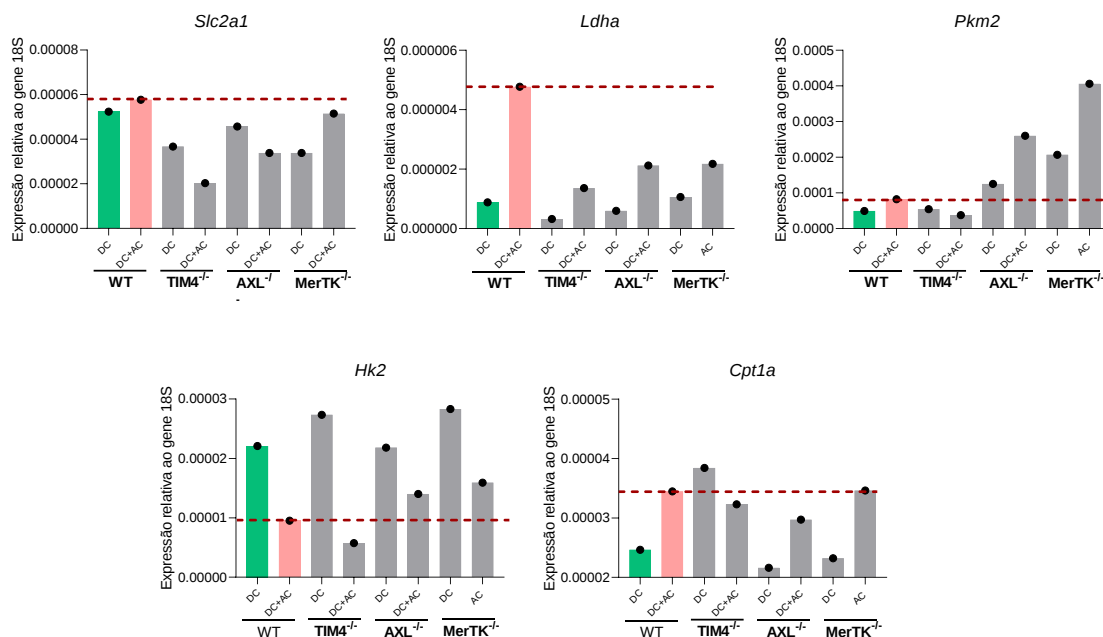


Figura 12. Receptores eferocíticos possuem influência no perfil metabólico de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. BMDCs de animais WT, *TIM4*^{-/-}, *AXL*^{-/-} e *MertK*^{-/-} foram co-cultivadas com Renca-ACs na proporção 1:3 durante 18h. As células não fagocitadas foram removidas e a expressão do RNAm de genes associados à glicólise (*Slc2a1*, *Pkm2*, *HK2*), à produção de lactato (*Ldha*) e à B-oxidação (*Cpt1a*) foi analisada nas BMDCs. A linha tracejada vermelha representa a expressão relativa dos genes na condição controle de BMDCs + Renca-ACs. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM e representam um experimento representativo de quatro experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

Embora a eferocitose seja um processo fisiológico essencial para os diferentes tecidos, dentro do TME o *clearance* de células tumorais apoptóticas contribui para a geração de um microambiente tolerogênico, que é prejudicial para a resposta antitumoral e que, portanto, favorece a progressão do tumor (Soki; Koh; Jones; Kim *et al.*, 2014; Stanford; Young; Hicks; Owens *et al.*, 2014; Yin; Huang; Lynn; Thorpe, 2013). Nesse trabalho, buscamos entender quais as vias metabólicas ativadas durante o processo eferocítico que sustentam o perfil tolerogênico de DCs no TME. Nossos resultados demonstraram que durante a eferocitose de Renca-ACs, BMDCs adquiriram um perfil tolerogênico, com uma redução na co-expressão de moléculas de MHC-II e CD86, que foi acompanhada da alta expressão de PD-L1. Prévios estudos demonstram

que a expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias, dentre elas CD86, é crucial para a ativação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ específicos em uma resposta antitumoral, entretanto, a expressão desses marcadores é usualmente reduzida em tumores. Foi demonstrado que a administração do fármaco usualmente utilizado no tratamento de câncer renal metastático, everolimus, um análogo da rapamicina, que portanto inibe mTOR, , leva a uma redução na expressão de CD86 em cDC1. O tratamento combinado com ciclofosfamida, que atua desfragmentando bases de DNA e RNA, foi capaz de reverter a redução na expressão desse de CD86 e aumentar a população de células TCD8⁺ (Huijts; Lougheed; Bodalal; Van Herpen *et al.*, 2019), mostrando que terapias que tenham como alvo essa molécula co-estimulatória podem representar uma estratégia promissora no tratamento de tumores.

Apesar do aumento na expressão de PD-L1 dentro do TME ser usualmente associado às células cancerígenas, células imunes como macrófagos, DCs e fibroblastos associados ao tumor também expressam esse ligante. A interação de PD-1/PD-L1 inibe a ativação de linfócitos T impedindo a proliferação, a produção de citocinas, bem como a ativação das suas funções efectoras, favorecendo progressão tumoral (Jiang; Wang; Deng; Xiong *et al.*, 2019). Desta forma, bloqueio da interação PD-1/PD-L1 através de anticorpos monoclonais vem sendo utilizado na última década como excelente estratégia terapêutica para otimizar a resposta antitumoral contra diversos tipos de câncer, como melanoma, linfoma, câncer renal, câncer de pulmão, fígado e gástrico (Muro; Chung; Shankaran; Geva *et al.*, 2016; Reck; Rodriguez-Abreu; Robinson; Hui *et al.*, 2016; Robert; Ribas; Schachter; Arance *et al.*, 2019). Além disso, foi demonstrado recentemente que DCs associadas ao tumor de pacientes com carcinoma renal possuem um aumento na expressão de PD-L1 e o tratamento com atezolizumabe, um anticorpo anti-PD-L1, além de impedir a interação PD-1/PD-L1, melhora a função co-estimuladora desses fagócitos. O bloqueio de PD-L1 impede interação desse ligante com moléculas de CD80, e favorece a interação de CD80 com CD28, aumentando a ativação de células T CD8⁺ (Mayoux; Roller; Pulko; Sammiceli *et al.*, 2020). Nesse sentido, a utilização de drogas capazes de promover a inibição de PD-L1, torna-se um alvo interessante para a reprogramação do fenótipo imunossupressor que BMDCs adquirem após a eferocitose de Renca-ACs.

Já é descrito que a internalização e digestão de corpos tumorais apoptóticos leva macrófagos associados ao tumor a adquirirem um perfil anti-inflamatório, caracterizado

pela produção de mediadores como IL-10, TGF- β e IL-4 que favorecem a manutenção de células T reguladoras (Stanford; Young; Hicks; Owens *et al.*, 2014). Em nossos dados, além da alta expressão de PD-L1, demonstramos que após a eferocitose de Renca-ACs, BMDCs aumentaram a produção não somente de IL-10, mas também de IL-6. Esses dados corroboram um estudo clínico no qual foi demonstrado que pacientes com câncer pancreático possuem altos níveis de IL-10 e IL-6 no soro, um fenômeno que foi correlacionado com um pior prognóstico e uma menor sobrevida (Feng; Qi; Wang; Chen *et al.*, 2018). Apesar de sua função pró-inflamatória bem estabelecida em contextos infecciosos, a IL-6 possui um perfil pleiotrópico. Alguns estudos demonstram que altos níveis de IL-6 são frequentemente correlacionados com rápida progressão tumoral e evasão do sistema imune em diversos tipos de tumores sólidos (Chen; Chen; Lu; Lin *et al.*, 2013; Jinno; Kawano; Maruse; Matsubara *et al.*, 2015; Kotowicz; Fuksiewicz; Jonska-Gmyrek; Bidzinski *et al.*, 2016). A interação de IL-6 com seu receptor, IL-6R, leva a indução e ativação de STAT3, resultando na regulação positiva de genes que promovem a sobrevivência de células tumorais (Lin; He; Ye; Liu *et al.*, 2020). Além disso, foi demonstrado que a liberação de IL-6 por células tumorais de glioblastoma induz a expressão de PD-L1 em células mieloides humanas, de maneira dependente da ativação de STAT3. Utilizando um modelo murino, o tratamento com anticorpos anti-IL-6 foi capaz de inibir a expressão de PD-L1, além de reduzir o crescimento do tumor e aumentar a sobrevida (Lamano; Lamano; Li; Didomenico *et al.*, 2019). Nossos resultados demonstram que o aumento da expressão de PD-L1, juntamente com a elevada produção de IL-10 e IL-6, resultou na geração de um perfil tolerogênico após a eferocitose de Renca-ACs, o que pode ser prejudicial para a construção da resposta antitumoral de células TCD4⁺ e TCD8⁺. Somado a isso, os dados obtidos acerca da redução na co-expressão de CD86 e MHC-II vão ao encontro de outro estudo, no qual foi demonstrado que a produção de IL-6 induz a ativação de STAT-3, que leva a uma redução na expressão de moléculas de HLA-DR em MoDCs (células dendríticas derivadas de monócitos). Ainda, foi observado em pacientes com câncer colorretal que DCs associadas ao tumor apresentam uma menor expressão de HLA-DR e CD86, bem como uma menor capacidade de ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Ohno; Kitamura; Takahashi; Ohtake *et al.*, 2016), embora não no contexto da eferocitose. Frente a isso, nossos resultados sugerem que, no contexto da eferocitose de Renca-ACs, a IL-6 produzida por BMDCs pode estar agindo de maneira autócrina, auxiliando na manutenção de um perfil tolerogênico associado a um aumento na

expressão de PD-L1 e uma redução na expressão de marcadores associados a maturação celular.

Para entender quais receptores estão envolvidos no reconhecimento e internalização de Renca-ACs e atribuir o perfil tolerogênico observado em BMDCs à eferocitose, utilizamos animais *knockout* para os principais receptores eferocíticos envolvidos no reconhecimento de ACs por DCs (Zagorska; Traves; Lew; Dransfield *et al.*, 2014). A ausência de TIM-4, bem como de AXL e principalmente de MertK, reduziu a eficiência fagocítica de BMDCs, impactando dessa forma no número de células apoptóticas internalizadas, mostrando que, em maior ou menor escala, todos esses receptores, estão envolvidos na eferocitose de Renca-ACs. Caronni e colaboradores demonstraram, em modelo experimental de tumor pulmonar, que a alta expressão de TIM-4 por cDC1 em tumores precoces, favorece a captura e apresentação de antígenos tumorais. Enquanto que a expressão desse mesmo receptor por cDC1s em tumores tardios é reduzida, o que parece estar diretamente associado ao prejuízo da resposta antitumoral de células TCD8⁺, bem como à redução da sobrevida dos animais (Caronni; Piperno; Simoncello; Romano *et al.*, 2021). Além disso, já foi demonstrado em um modelo in vivo de câncer colorretal que, após o tratamento com radiação, há um aumento na expressão do receptor MerTK, bem como de Proteína S e Gas6, em macrófagos associados ao tumor, fenômeno que foi associado a um pior prognóstico de cura. O impacto de MerTK na progressão do tumor foi comprovado nesse estudo utilizando animais MerTK^{-/-}, mediante ao aumento da sobrevida dos animais irradiados, quando comparados aos animais WT (Crittenden; Baird; Friedman; Savage *et al.*, 2016). Os dados obtidos em nosso estudo vão ao encontro desses achados da literatura e sugerem que tanto TIM-4 como a família de receptores TAM parecem estar envolvidos na eferocitose de Renca-ACs. No entanto, uma vez que não observamos uma inibição total da eferocitose, nossos dados sugerem que a internalização desses corpos tumorais apoptóticos não ocorre exclusivamente através de um único receptor e que, possivelmente, a ausência de um receptor seja compensada pelos demais receptores envolvidos na eferocitose de Renca-ACs. Uma observação interessante em nossos dados é que a ausência de TIM-4, bem como de AXL e MertK parece reduzir a expressão de PD-L1 após a co-cultura com Renca-ACs. Além disso, a expressão de CD86 parece estar reduzida quando TIM-4 ou MertK estão ausentes. Isso provavelmente se deve ao fato de a ausência desses receptores reduzir a capacidade

eferocítica de BMDCs. A alta produção de IL-10 observada em BMDCs de animais WT parece ser parcialmente revertida na ausência de MertK, o que sugere que esse é o receptor eferocítico mais envolvido na produção de IL-10. A ausência de nenhum dos receptores estudados gerou alterações na produção de IL-6, bem como na expressão de MHC-II, o que pode novamente ser atribuído a mecanismos compensatórios dos demais receptores eferocíticos envolvidos.

Buscando entender qual a reprogramação metabólica desencadeada mediante a eferocitose de Renca-ACs por BMDCs para sustentar o perfil tolerogênico dessas células, nós investigamos a participação das diferentes vias metabólicas (glicólise, síntese de ácidos graxos, β -oxidação e glutaminólise), utilizando inicialmente estratégias farmacológicas. Nossos dados sugerem que o metabolismo glicolítico, a glutaminólise e, em menor escala, a síntese de ácidos graxos, são importantes para a internalização desses corpos apoptóticos por BMDCs. Apesar de análises mais complexas serem necessárias para entender melhor como e em quais etapas a glicólise está envolvida no processo eferocítico, nossos dados corroboram Morioka e colaboradores, que demonstram que durante a eferocitose, a atividade glicolítica é essencial para a geração da energia utilizada na polimerização dos filamentos de actina necessários para a internalização de corpos apoptóticos subsequentes (Morioka; Perry; Raymond; Medina *et al.*, 2018).

A inibição do metabolismo glicolítico, utilizando meio sem glicose ou oxamato de sódio, assim como da via da glutaminólise, utilizando o CB-839, causaram uma tendência de redução na expressão de MHC-II e PD-L1 após a eferocitose de Renca-ACs. Desta forma, pensando em uma estratégia terapêutica mais eficiente para o tratamento de tumores, a associação de inibidores da via glicolítica e da via de glutaminólise, em conjunto com a terapia antitumoral convencional, torna-se uma abordagem interessante para melhorar resposta antitumoral, através da redução na expressão de PD-L1 e MHC-II, por exemplo. Além disso, para validar a capacidade da reprogramação metabólica na reversão do perfil tolerogênico e na melhora da função efetora de BMDCs, é imprescindível que, em conjunto com a inibição dessas vias, realizemos experimentos utilizando linfócitos T CD4⁺ *naive* provenientes de camundongos OT-II, linhagem que expressa o receptor antigênico (TCR) específicos para OVA323-339, em co-cultura com BMDCs que eferocitaram Renca-ACs transfectadas com ovalbumina (OVA).

Um segundo ponto importante em nosso modelo foi avaliar a contribuição das diferentes vias metabólicas para a geração do microambiente supressor. Uma observação interessante em nossos dados é que vias metabólicas distintas parecem participar do microambiente gerado por BMDCs durante a eferocitose de Renca-ACs. A inibição da glicólise e da glutaminólise, utilizando oxamato de sódio ou meio sem glicose e CB-839, respectivamente, gerou uma tendência de redução produção de IL-10 e IL-6. Além disso, a entrada de piruvato na mitocôndria também parece ser importante para a síntese dessas citocinas por BMDCs e a inibição da síntese de ácidos graxos, com C57, demonstrou uma tendência de inibição na produção de IL-6. Esses resultados sugerem que a via glicolítica e síntese de ácidos graxos podem estar atuando conjuntamente para a produção de IL-6, uma vez que a glicose parece ser uma importante fonte de carbono para a síntese de piruvato e alimentação do ciclo do ácido cítrico. Essa fonte de carbono é necessária para gerar substratos importantes para a síntese de ácidos graxos, como o citrato, o que favoreceria o transporte e liberação desse mediador devido à expansão de membrana do retículo endoplasmático e do complexo de golgi. Esse fenômeno foi primeiramente descrito em BMDCs ativadas com LPS (Everts; Amiel; Huang; Smith *et al.*, 2014; Thwe; Pelgrom; Cooper; Beauchamp *et al.*, 2017) e, no entanto, também pode representar uma via comum para produção de citocinas por BMDCs tolerogênicas durante a eferocitose de Renca-ACs. Ainda, a via glicolítica e a glutaminólise parecem ser fundamentais para a geração do microambiente tolerogênico com alta produção de IL-10 e IL-6, corroborando nossos dados anteriores que mostraram que a atividade dessas vias é importante para o fenótipo imunossupressor de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. Como comentado anteriormente, o metabolismo que sustenta o perfil tolerogênico da eferocitose é um mecanismo dinâmico que não está atrelado a atividade de apenas uma via metabólica. A natureza anti-inflamatória desse processo foi previamente correlacionada com a atividade oxidativa, onde o excesso de ácidos graxos oriundos da digestão de corpos apoptóticos leva a um aumento na respiração mitocondrial em macrófagos. A importância dessas vias foi comprovada em estudos prévios utilizando etomoxir, um inibidor da β -oxidação, foi capaz de reverter o fenótipo tolerogênico através da redução na produção de IL-10 (Zhang; Weinberg; Deberge; Gainullina *et al.*, 2019). Em nosso estudo, a inibição da β -oxidação, também utilizando etomoxir, leva a uma leve tendência de redução na produção de IL-10 e IL-6, sugerindo o envolvimento do metabolismo oxidativo, ao menos parcialmente, na produção desses mediadores.

Levando em consideração a inibição apenas parcial dos mediadores avaliados, a inibição concomitante de duas ou mais vias metabólicas torna-se uma estratégia interessante para avaliar a possível atividade compensatória de uma via frente a inatividade de outra. Ademais, uma vez que a utilização de inibidores farmacológicos possibilita a ocorrência de efeito “*off-target*”, onde o inibidor farmacológico pode interagir com outras proteínas além da enzima-alvo, experimentos mais robustos, como uso de animais *knockout* para as enzimas chave do metabolismo, são importantes para validar o envolvimento dessas vias metabólicas no perfil de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs.

Durante a eferocitose de linfócitos T apoptóticos, macrófagos e fibroblastos têm um aumento na expressão de GLUT1 e, conseqüentemente na captação de glicose, havendo, portanto, o favorecimento da glicólise aeróbia e produção de lactato, em detrimento da oxidação de ácidos graxos (Morioka; Perry; Raymond; Medina *et al.*, 2018). A avaliação da expressão de moléculas-chave do metabolismo celular mostrou que após a eferocitose de Renca-ACs, BMDCs houve um aumento na expressão gênica de enzimas glicolíticas como *Glut1*, *Ldha* e *Pkm2*. Além disso, a internalização e digestão desses corpos apoptóticos parece aumentar a expressão de *Cpt1a*, o que vai ao encontro de nossos dados anteriores, mostrando que o fenótipo tolerogênico de BMDCs parece ser sustentado majoritariamente pelo metabolismo glicolítico. Entretanto, frente a tendência de aumento na expressão de *Cpt1a* e a importância da β -oxidação para a produção de IL-10, como mostrado previamente, não descartamos a contribuição do metabolismo oxidativo na manutenção do fenótipo imunossupressor de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. Interessantemente, observamos que BMDCs possuem uma redução na reserva glicolítica tanto na presença quanto na ausência de glicose, comparado às condições de BMDC controle. Além disso, a capacidade glicolítica dessas células parece ter uma tendência de redução na ausência de glicose. Esses dados corroboram Thwe e colaboradores, que demonstraram que o metabolismo glicolítico utilizado por DCs para o desenvolvimento de suas funções efetoras iniciais é alimentado por reservas intracelulares de glicose em forma de glicogênio (Thwe; Pelgrom; Cooper; Beauchamp *et al.*, 2017). Entretanto, não foram constatadas diferenças em nosso modelo quando observamos as condições de co-cultura com RencaACs. Curiosamente, a glicólise basal se mostrou menor nas condições com Renca-AC. Vale ressaltar que o ensaio de *Seahorse* foi realizado após 18 horas de co-cultura e, uma vez que nossos

dados demonstraram que o metabolismo glicolítico é importante para a capacidade eferocítica de BMDCs, torna-se interessante avaliar o caráter metabólico desses fagócitos em períodos mais precoces. Mediante aos resultados obtidos durante a eferocitose e inibição da via glicolítica, é possível que essa via metabólica seja mais necessária em etapas iniciais do processo eferocítico, mas que o metabolismo oxidativo seja o responsável por sustentar o fenótipo imunossupressor de BMDCs em etapas mais tardias. Além disso, para refinar nossos dados, novos experimentos serão realizados privando BMDCs de glicose por um período prolongado antes da co-cultura com Renca-ACs. Essa estratégia nos permitirá eliminar a atuação das reservas de glicogênio na alimentação do metabolismo glicolítico de BMDCs.

Considerando que apenas os sinais de *find-me* e o reconhecimento e ligação da célula apoptótica ao fagócito já são capazes de modular o metabolismo celular, avaliamos se o receptor eferocítico utilizado para o reconhecimento e internalização de Renca-ACs impacta no perfil metabólico adquirido por BMDCs após a eferocitose. BMDCs ausentes de AXL, bem como de MertK e, especialmente de TIM-4 demonstraram uma tendência de redução na expressão de *Glut1* e *Ldha*, em comparação a BMDCs de animais WT, sugerindo uma reversão, ao menos parcial do caráter glicolítico dessas células. Além disso, a ausência de AXL ou MertK parece reverter parcialmente o aumento na expressão gênica de *Cpt1a* observado em BMDCs de animais WT, sugerindo a participação do metabolismo oxidativo na reprogramação metabólica que BMDCs sofrem após a eferocitose. Mediante a esses resultados, TIM-4 parece ser o principal receptor eferocítico envolvido na ativação do metabolismo glicolítico que sustenta o perfil tolergênico adquirido por BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. Entretanto, o mecanismo de internalização de ACs pode ser modulado por diferentes fatores dentro do TME. Estratégias terapêuticas como a radiação γ , por exemplo, levam a um aumento na expressão de receptores da família TAM em macrófagos, o que pode favorecer a entrada de ACs via esses receptores e/ou aumentar a taxa de eferocitose desses fagócitos (Crittenden; Baird; Friedman; Savage *et al.*, 2016). Desta forma, é necessário investigar se as alterações observadas frente a ausência desses receptores eferocíticos ocorreram apenas devido a uma redução no *cargo* de Renca-ACs dentro das BMDCs ou por uma influência direta do receptor eferocítico envolvido no reconhecimento e internalização de Renca-ACs. A realização de experimentos utilizando *beads* recobertas com moléculas de PS será importante para

mostrarmos como BMDCs se comportam ao internalizar um corpo inerte, o que nos permitirá avaliar a influência do *cargo* nas alterações observadas em nosso modelo.

Frente aos dados observados em nosso trabalho e avaliando a contraposição dos dados encontrados na literatura acerca das vias metabólicas ativadas durante o processo de eferocitose somos instigados a ponderar vários questionamentos; *i) os diferentes receptores eferocíticos podem interferir na via metabólica que será ativada após a internalização do corpo apoptótico? ii) o perfil tolerogênico da eferocitose dependeria apenas de uma via metabólica ou diferentes vias orquestram conjuntamente a criação desse microambiente imunossupressor? iii) a ativação metabólica do fagócito está diretamente relacionada com o tipo de célula apoptótica que foi internalizada e com o microambiente tumoral em questão? iv) é possível que ao inibir uma via metabólica o metabolismo celular seja desviado para outras vias na tentativa de suprir a demanda energética?* Fica claro que o contexto em que se estuda a eferocitose, o tipo de célula apoptótica, os receptores envolvidos no reconhecimento do corpo apoptótico e o fagócito estudado são variáveis que possuem influência direta no perfil metabólico que será observado. Desta forma, em nosso contexto, a glicólise parece ser a principal via metabólica responsável por sustentar o perfil tolerogênico de BMDCs após a eferocitose de Renca-ACs. Entretanto, a atuação em menor escala, de outras vias metabólicas, como é o caso da β -oxidação, não pode ser descartada em nosso modelo.

7. CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados obtidos nesse trabalho sugerem que a eferocitose de Renca-ACs gera BMDCs tolerogênicas, caracterizadas pelo aumento na expressão de PD-L1 e pela redução na co-expressão de CD86/MHC-II, além do aumento na produção de IL-6 e IL-10. O perfil tolerogênico adquirido por essas células parece ser sustentado majoritariamente pelo metabolismo glicolítico e, em menor escala, pelo metabolismo oxidativo. A internalização e digestão de Renca-ACs leva a um aumento na expressão de enzimas glicolíticas como *Glut1*, *Ldha* e *Pkm2*. O funcionamento da via glicolítica, da glutaminólise e o metabolismo oxidativo parecem ser importantes para a produção de IL-10 e IL-6 durante o processo eferocítico.

Ainda, diferentes receptores estão envolvidos na internalização de Renca-ACs por BMDCs. A ausência do receptor TIM-4, assim como da família dos receptores TAM,

principalmente de MertK, leva a uma redução da capacidade eferocítica de BMDCs e a ausência de MertK reduz a produção de IL-10 após a eferocitose. Além disso, a internalização de Renca-ACs mediada por esses receptores parece ser importante para o perfil glicolítico adquirido por BMDCs após a eferocitose.

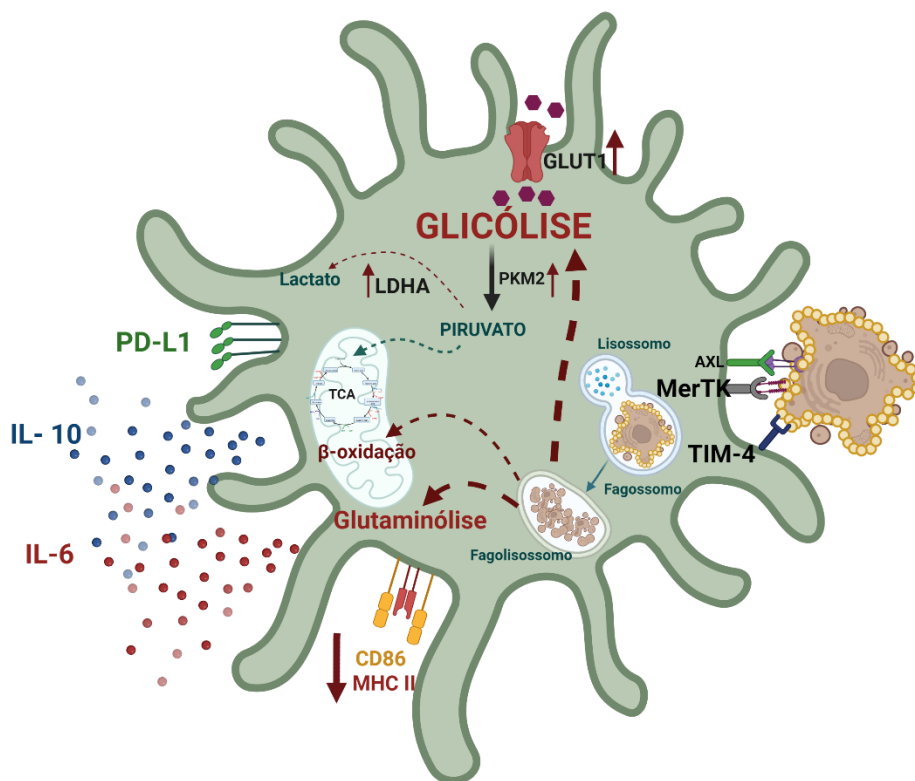


Figura 13. Conclusão. A eferocitose de Renca-ACs por BMDCs é mediada por receptores TIM-4 e TAM e leva a ativação da via glicolítica, via da glutaminólise e, em menor escala, da β-oxidação. Essa reprogramação metabólica gera BMDCs tolerogênicas, caracterizadas por uma redução na co-expressão de MHC-II e CD86 e um aumento na expressão de PD-L1 e produção de IL-6 e IL-10.

8. FIGURAS SUPLEMENTARES

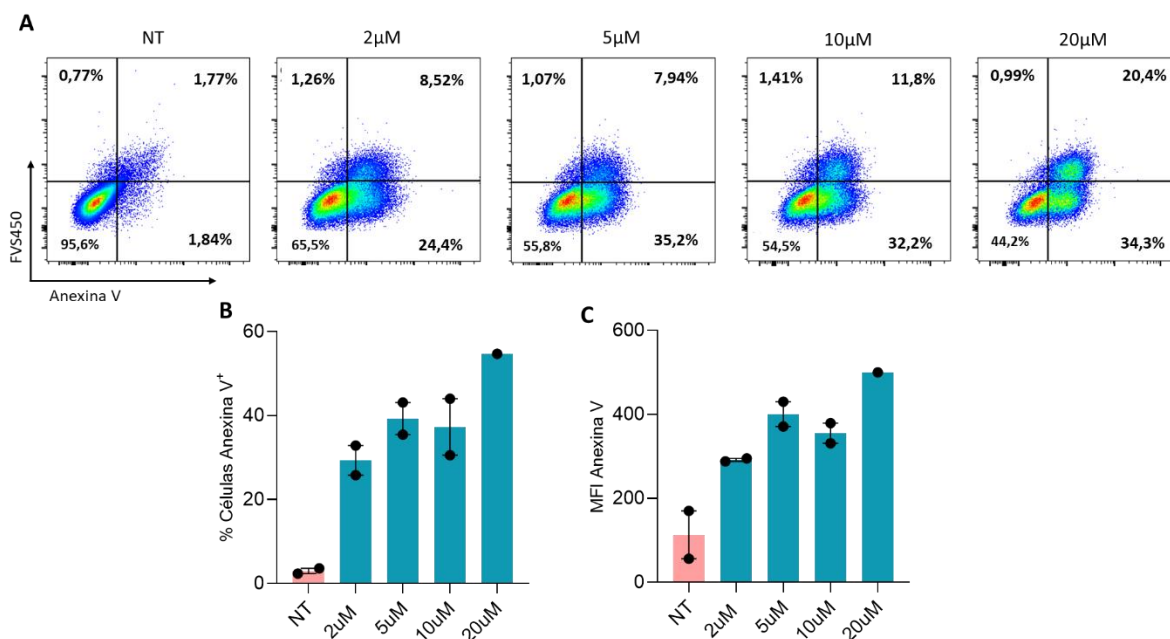


Figura S1. Avaliação da taxa de apoptose de células Renca após o tratamento com doxorubicina. Células Renca foram cultivadas em meio RPMIc até atingirem 80% de confluência. Em seguida, 5×10^6 células foram plaqueadas e, após 24h para adesão celular, as células foram tratadas com 2µM, 5µM, 10µM e 20µM de doxorubicina. Após 24 horas de tratamento, a porcentagem de apoptose foi confirmada por citometria de fluxo utilizando a marcação Anexina-V⁺/FVS450⁺ **(A)** Dot-plot representativo da porcentagem de células Renca positivas para anexina V e FVS450. Gráfico de barras apresentando porcentagem de células positivas para anexina V **(B)** e gráfico de barras apresentando a MFI de anexina V em células Renca **(C)**. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM e representam dois experimentos independentes.

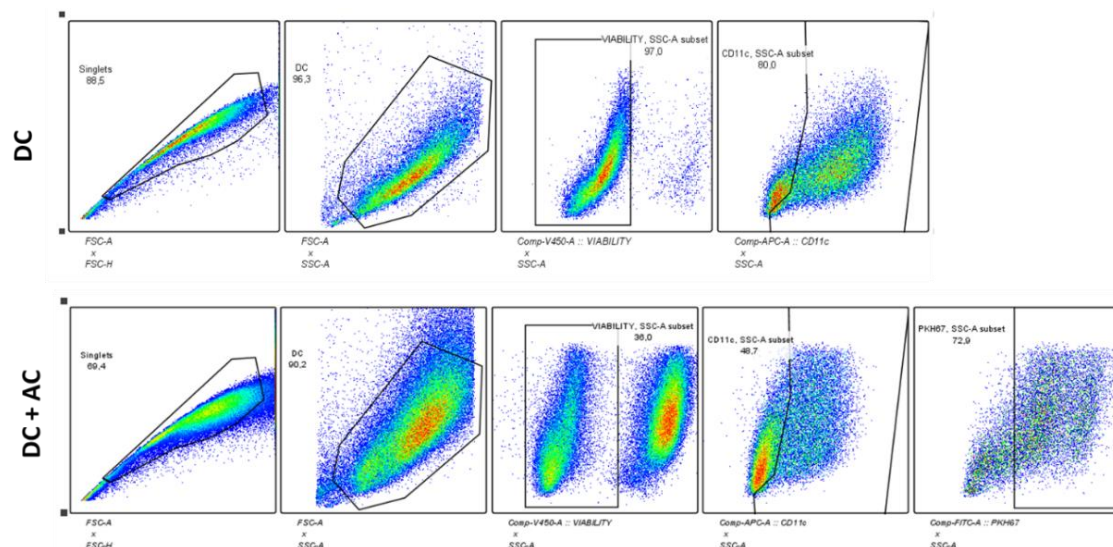


Figura S2. Estratégia de gate utilizada para análise da citometria de fluxo. BMDCs foram pré-tratadas com 3 μ M de etomoxir ou 2mM de 2DG ou 5 μ M de UK5099 ou 20 μ M de C75B ou μ M de oxamato de sódio, por uma hora. Em seguida, foram co-cultivadas com Renca-ACs na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria. Células mortas foram excluídas através da marcação com FVS450. Em seguida, foram selecionadas as células CD11c⁺ e dentro desta população a eferocitose foi avaliada pela marcação com PKH. Dentro da população CD11c⁺ e dentro da população CD11c⁺PKH⁺ foi avaliada a expressão de MHC-II, CD86 e PD-L1.

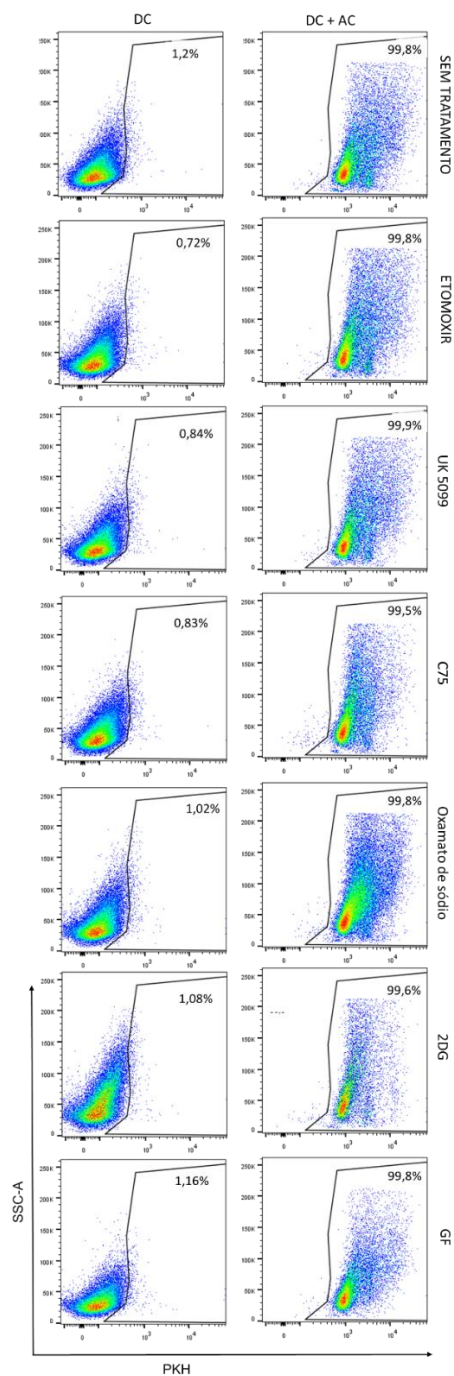


Figura S3. Taxa de eferocitose de Renca-ACs por BMDCs após uso dos inibidores. BMDCs foram pré-tratadas com 3 μ M de etomoxir ou 2mM de 2DG ou 5 μ M de UK5099 ou 20 μ M de C75B ou 20mM de oxamato de sódio, por uma hora. Em seguida, foram co cultivadas com Renca-ACs na proporção de 1:3, durante 18 horas. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a taxa de eferocitose através da marcação CD11c⁺/PKH⁺. **(A)** Dot-plot representativo da porcentagem de células CD11c⁺PKH⁺.

9 . REFERÊNCIAS

- AIT-OUFELLA, H.; POURESMAIL, V.; SIMON, T.; BLANC-BRUDE, O. *et al.* Defective mer receptor tyrosine kinase signaling in bone marrow cells promotes apoptotic cell accumulation and accelerates atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 8, p. 1429-1431, Aug 2008.
- AKAKURA, S.; SINGH, S.; SPATARO, M.; AKAKURA, R. *et al.* The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. **Exp Cell Res**, v. 292, n. 2, p. 403-416, Jan 15 2004.
- AMIEL, E.; EVERTS, B.; FREITAS, T. C.; KING, I. L. *et al.* Inhibition of mechanistic target of rapamycin promotes dendritic cell activation and enhances therapeutic autologous vaccination in mice. **J Immunol**, v. 189, n. 5, p. 2151-2158, Sep 1 2012.
- AMIEL, E.; EVERTS, B.; FRITZ, D.; BEAUCHAMP, S. *et al.* Mechanistic target of rapamycin inhibition extends cellular lifespan in dendritic cells by preserving mitochondrial function. **J Immunol**, v. 193, n. 6, p. 2821-2830, Sep 15 2014.
- APETO, L.; GHIRINGHELLI, F.; TESNIERE, A.; OBEID, M. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat Med**, v. 13, n. 9, p. 1050-1059, Sep 2007.
- BIERMANN, M. H. C.; BOELTZ, S.; PIETERSE, E.; KNOFF, J. *et al.* Autoantibodies Recognizing Secondary Necrotic Cells Promote Neutrophilic Phagocytosis and Identify Patients With Systemic Lupus Erythematosus. **Front Immunol**, v. 9, p. 989, 2018.
- BLANDER, J. M.; MEDZHITOV, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 808-812, Apr 6 2006.
- BONDANZA, A.; ZIMMERMANN, V. S.; ROVERE-QUERINI, P.; TURNAY, J. *et al.* Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo. **J Exp Med**, v. 200, n. 9, p. 1157-1165, Nov 1 2004.
- BRENOT, A.; KNOLHOFF, B. L.; DENARDO, D. G.; LONGMORE, G. D. SNAIL1 action in tumor cells influences macrophage polarization and metastasis in breast cancer through altered GM-CSF secretion. **Oncogenesis**, v. 7, n. 3, p. 32, Mar 29 2018.
- BRENTNALL, M.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; DE GUEVARA, R. L.; CEPERO, E. *et al.* Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biol**, v. 14, p. 32, Jul 9 2013.

BROWN, S.; HEINISCH, I.; ROSS, E.; SHAW, K. *et al.* Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 200-203, Jul 11 2002.

CARONNI, N.; PIPERNO, G. M.; SIMONCELLO, F.; ROMANO, O. *et al.* TIM-4 expression by dendritic cells mediates uptake of tumor-associated antigens and anti-tumor responses. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 2237, Apr 14 2021.

CASARES, N.; PEQUIGNOT, M. O.; TESNIERE, A.; GHIRINGHELLI, F. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1691-1701, Dec 19 2005.

CHALASANI, P.; MARRON, M.; ROE, D.; CLARKE, K. *et al.* A phase I clinical trial of bavituximab and paclitaxel in patients with HER2 negative metastatic breast cancer. **Cancer Med**, v. 4, n. 7, p. 1051-1059, Jul 2015.

CHEN, M. F.; CHEN, P. T.; LU, M. S.; LIN, P. Y. *et al.* IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mol Cancer**, v. 12, p. 26, Apr 5 2013.

COLETTA, S.; LONARDI, S.; SENSI, F.; D'ANGELO, E. *et al.* Tumor Cells and the Extracellular Matrix Dictate the Pro-Tumoral Profile of Macrophages in CRC. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 20, Oct 16 2021.

CRITTENDEN, M. R.; BAIRD, J.; FRIEDMAN, D.; SAVAGE, T. *et al.* MERTK on tumor macrophages is a therapeutic target to prevent tumor recurrence following radiation therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, p. 78653-78666, Nov 29 2016.

DECATHELINEAU, A. M.; HENSON, P. M. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. **Essays Biochem**, v. 39, p. 105-117, 2003.

DENISENKO, T. V.; BUDKEVICH, I. N.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. **Cell Death Dis**, 9, n. 2, p. 117, Jan 25 2018.

DIGUMARTI, R.; BAPSY, P. P.; SURESH, A. V.; BHATTACHARYYA, G. S. *et al.* Bavituximab plus paclitaxel and carboplatin for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer**, 86, n. 2, p. 231-236, Nov 2014.

DU, L.; LI, X.; ZHEN, L.; CHEN, W. *et al.* Everolimus inhibits breast cancer cell growth through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Mol Med Rep**, v. 17, n. 5, p. 7163-7169, May 2018.

DU, X.; CHAPMAN, N. M.; CHI, H. Emerging Roles of Cellular Metabolism in Regulating Dendritic Cell Subsets and Function. **Front Cell Dev Biol**, v. 6, p. 152, 2018.

EVERTS, B.; AMIEL, E.; HUANG, S. C.; SMITH, A. M. *et al.* TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKvarepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. **Nat Immunol**, v. 15, n. 4, p. 323-332, Apr 2014.

EVERTS, B.; AMIEL, E.; VAN DER WINDT, G. J.; FREITAS, T. C. *et al.* Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. **Blood**, v. 120, n. 7, p. 1422-1431, Aug 16 2012.

FENG, L.; QI, Q.; WANG, P.; CHEN, H. *et al.* Serum levels of IL-6, IL-8, and IL-10 are indicators of prognosis in pancreatic cancer. **J Int Med Res**, v. 46, n. 12, p. 5228-5236, Dec 2018.

FERREIRA, G. B.; VANHERWEGEN, A. S.; EELEN, G.; GUTIERREZ, A. C. F. *et al.* Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. **Cell Rep**, v. 10, n. 5, p. 711-725, Feb 10 2015.

FUERTE, M. B.; KACHA, A. K.; KLINE, J.; WOO, S. R. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. **J Exp Med**, v. 208, n. 10, p. 2005-2016, Sep 26 2011.

GUAK, H.; AL HABYAN, S.; MA, E. H.; ALDOSSARY, H. *et al.* Glycolytic metabolism is essential for CCR7 oligomerization and dendritic cell migration. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 2463, Jun 25 2018.

HACKSTEIN, H.; TANER, T.; ZAHORCHAK, A. F.; MORELLI, A. E. *et al.* Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4457-4463, Jun 1 2003.

HAIDINGER, M.; POGLITSCH, M.; GEYEREGGER, R.; KASTURI, S. *et al.* A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 3919-3931, Oct 1 2010.

HAN, C. Z.; RAVICHANDRAN, K. S. Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1442-1445, Dec 23 2011.

HAN, Q.; SHI, H.; LIU, F. CD163(+) M2-type tumor-associated macrophage support the suppression of tumor-infiltrating T cells in osteosarcoma. **Int Immunopharmacol**, v. 34, p. 101-106, May 2016.

HILDNER, K.; EDELSON, B. T.; PURTHA, W. E.; DIAMOND, M. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. **Science**, v. 322, n. 5904, p. 1097-1100, Nov 14 2008.

HOWELL, J. J.; RICOULT, S. J.; BEN-SAHRA, I.; MANNING, B. D. A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. **Biochem Soc Trans**, v. 41, n. 4, p. 906-912, Aug 2013.

HUIJTS, C. M.; LOUGHEED, S. M.; BODALAL, Z.; VAN HERPEN, C. M. *et al.* The effect of everolimus and low-dose cyclophosphamide on immune cell subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase I clinical trial. **Cancer Immunol Immunother**, v. 68, n. 3, p. 503-515, Mar 2019.

JANTSCH, J.; CHAKRAVORTTY, D.; TURZA, N.; PRECHTEL, A. T. *et al.* Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. **J Immunol**, v. 180, n. 7, p. 4697-4705, Apr 1 2008.

JIANG, X.; WANG, J.; DENG, X.; XIONG, F. *et al.* Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. **Mol Cancer**, v. 18, n. 1, p. 10, Jan 15 2019.

JINNO, T.; KAWANO, S.; MARUSE, Y.; MATSUBARA, R. *et al.* Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 33, n. 5, p. 2161-2168, May 2015.

KEATING, A. K.; SALZBERG, D. B.; SATHER, S.; LIANG, X. *et al.* Lymphoblastic leukemia/lymphoma in mice overexpressing the Mer (MerTK) receptor tyrosine kinase. **Oncogene**, v. 25, n. 45, p. 6092-6100, Oct 5 2006.

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, Jul 2015.

KOBAYASHI, N.; KARISOLA, P.; PENA-CRUZ, V.; DORFMAN, D. M. *et al.* TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. **Immunity**, v. 27, n. 6, p. 927-940, Dec 2007.

KOJIMA, Y.; VOLKMER, J. P.; MCKENNA, K.; CIVELEK, M. *et al.* CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 86-90, Aug 4 2016.

KOTOWICZ, B.; FUKSIEWICZ, M.; JONSKA-GMYREK, J.; BIDZINSKI, M. *et al.* The assessment of the prognostic value of tumor markers and cytokines as SCCAg, CYFRA 21.1, IL-6, VEGF and sTNF receptors in patients with squamous cell cervical

cancer, particularly with early stage of the disease. **Tumour Biol**, v. 37, n. 1, p. 1271-1278, Jan 2016.

KRAWCZYK, C. M.; HOLOWKA, T.; SUN, J.; BLAGIH, J. *et al.* Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4742-4749, Jun 10 2010.

LAMANO, J. B.; LAMANO, J. B.; LI, Y. D.; DIDOMENICO, J. D. *et al.* Glioblastoma-Derived IL6 Induces Immunosuppressive Peripheral Myeloid Cell PD-L1 and Promotes Tumor Growth. **Clin Cancer Res**, v. 25, n. 12, p. 3643-3657, Jun 15 2019.

LIN, Y.; HE, Z.; YE, J.; LIU, Z. *et al.* Progress in Understanding the IL-6/STAT3 Pathway in Colorectal Cancer. **Onco Targets Ther**, v. 13, p. 13023-13032, 2020.

LIU, M.; O'CONNOR, R. S.; TREFELY, S.; GRAHAM, K. *et al.* Metabolic rewiring of macrophages by CpG potentiates clearance of cancer cells and overcomes tumor-expressed CD47-mediated 'don't-eat-me' signal. **Nat Immunol**, v. 20, n. 3, p. 265-275, Jan 21 2019.

LOCASALE, J. W.; CANTLEY, L. C. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. **Cell Metab**, v. 14, n. 4, p. 443-451, Oct 5 2011.

LUMBROSO, D.; SOBOH, S.; MAIMON, A.; SCHIF-ZUCK, S. *et al.* Macrophage-Derived Protein S Facilitates Apoptotic Polymorphonuclear Cell Clearance by Resolution Phase Macrophages and Supports Their Reprogramming. **Front Immunol**, v. 9, p. 358, 2018.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; ROSSNER, S. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J Immunol Methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, Feb 1 1999.

MA, Y.; ADJEMIAN, S.; MATTAROLLO, S. R.; YAMAZAKI, T. *et al.* Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 729-741, Apr 18 2013.

MAYOUX, M.; ROLLER, A.; PULKO, V.; SAMMICHELI, S. *et al.* Dendritic cells dictate responses to PD-L1 blockade cancer immunotherapy. **Sci Transl Med**, v. 12, n. 534, Mar 11 2020.

MEDEIROS, A. I.; SEREZANI, C. H.; LEE, S. P.; PETERS-GOLDEN, M. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. **J Exp Med**, v. 206, n. 1, p. 61-68, Jan 16 2009.

MEDINA, C. B.; MEHROTRA, P.; ARANDJELOVIC, S.; PERRY, J. S. A. *et al.* Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. **Nature**, v. 580, n. 7801, p. 130-135, Apr 2020.

MOON, B.; LEE, J.; LEE, S. A.; MIN, C. *et al.* Mertk Interacts with Tim-4 to Enhance Tim-4-Mediated Efferocytosis. **Cells**, v. 9, n. 7, Jul 6 2020.

MORIOKA, S.; PERRY, J. S. A.; RAYMOND, M. H.; MEDINA, C. B. *et al.* Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. **Nature**, v. 563, n. 7733, p. 714-718, Nov 2018.

MORIZONO, K.; XIE, Y.; OLAFSEN, T.; LEE, B. *et al.* The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 4, p. 286-298, Apr 21 2011.

MORROT, A.; DA FONSECA, L. M.; SALUSTIANO, E. J.; GENTILE, L. B. *et al.* Metabolic Symbiosis and Immunomodulation: How Tumor Cell-Derived Lactate May Disturb Innate and Adaptive Immune Responses. **Front Oncol**, v. 8, p. 81, 2018.

MUKUNDAN, L.; ODEGAARD, J. I.; MOREL, C. R.; HEREDIA, J. E. *et al.* PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. **Nat Med**, v. 15, n. 11, p. 1266-1272, Nov 2009.

MURO, K.; CHUNG, H. C.; SHANKARAN, V.; GEVA, R. *et al.* Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. **Lancet Oncol**, v. 17, n. 6, p. 717-726, Jun 2016.

N, A. G.; BENSINGER, S. J.; HONG, C.; BECEIRO, S. *et al.* Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 245-258, Aug 21 2009.

NOMURA, H.; AOKI, D.; MICHIMAE, H.; MIZUNO, M. *et al.* Effect of Taxane Plus Platinum Regimens vs Doxorubicin Plus Cisplatin as Adjuvant Chemotherapy for Endometrial Cancer at a High Risk of Progression: A Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncol**, v. 5, n. 6, p. 833-840, Jun 1 2019.

O'BRIEN, B. A.; GENG, X.; ORTEU, C. H.; HUANG, Y. *et al.* A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. **J Autoimmun**, v. 26, n. 2, p. 104-115, Mar 2006.

OHNO, Y.; KITAMURA, H.; TAKAHASHI, N.; OHTAKE, J. *et al.* IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. **Cancer Immunol Immunother**, v. 65, n. 2, p. 193-204, Feb 2016.

OHTANI, M.; NAGAI, S.; KONDO, S.; MIZUNO, S. *et al.* Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 635-643, Aug 1 2008.

ORBAN, T.; SOSENKO, J. M.; CUTHBERTSON, D.; KRISCHER, J. P. *et al.* Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. **Diabetes Care**, 32, n. 12, p. 2269-2274, Dec 2009.

PARK, D.; TOSELLO-TRAMPONT, A. C.; ELLIOTT, M. R.; LU, M. *et al.* BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. **Nature**, v. 450, n. 7168, p. 430-434, Nov 15 2007.

PENTEADO, L. A.; DEJANI, N. N.; VERDAN, F. F.; ORLANDO, A. B. *et al.* Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. **Immunology**, v. 151, n. 3, p. 304-313, Jul 2017.

PIETERSE, E.; HOFSTRA, J.; BERDEN, J.; HERRMANN, M. *et al.* Acetylated histones contribute to the immunostimulatory potential of neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Immunol**, v. 179, n. 1, p. 68-74, Jan 2015.

PILCO-FERRETO, N.; CALAF, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **Int J Oncol**, v. 49, n. 2, p. 753-762, Aug 2016.

RAVICHANDRAN, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 445-455, Oct 28 2011.

RECK, M.; RODRIGUEZ-ABREU, D.; ROBINSON, A. G.; HUI, R. *et al.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, v. 375, n. 19, p. 1823-1833, Nov 10 2016.

ROBERT, C.; RIBAS, A.; SCHACHTER, J.; ARANCE, A. *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. **Lancet Oncol**, v. 20, n. 9, p. 1239-1251, Sep 2019.

ROBERTS, E. W.; BROZ, M. L.; BINNEWIES, M.; HEADLEY, M. B. *et al.* Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. **Cancer Cell**, v. 30, n. 2, p. 324-336, Aug 8 2016.

RODRIGUES MANTUANO, N.; STANCZAK, M. A.; OLIVEIRA, I. A.; KIRCHHAMMER, N. *et al.* Hyperglycemia Enhances Cancer Immune Evasion by Inducing Alternative Macrophage Polarization through Increased O-GlcNAcylation. **Cancer Immunol Res**, v. 8, n. 10, p. 1262-1272, Oct 2020.

ROSZER, T.; MENENDEZ-GUTIERREZ, M. P.; LEFTEROVA, M. I.; ALAMEDA, D. *et al.* Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. **J Immunol**, v. 186, n. 1, p. 621-631, Jan 1 2011.

SALMON, H.; IDOYAGA, J.; RAHMAN, A.; LEBOEUF, M. *et al.* Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. **Immunity**, v. 44, n. 4, p. 924-938, Apr 19 2016.

SEGAWA, K.; KURATA, S.; YANAGIHASHI, Y.; BRUMMELKAMP, T. R. *et al.* Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. **Science**, v. 344, n. 6188, p. 1164-1168, Jun 6 2014.

SEGURA, E.; TOUZOT, M.; BOHINEUST, A.; CAPPUCCIO, A. *et al.* Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 336-348, Feb 21 2013.

SOKI, F. N.; KOH, A. J.; JONES, J. D.; KIM, Y. W. *et al.* Polarization of prostate cancer-associated macrophages is induced by milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)-mediated efferocytosis. **J Biol Chem**, v. 289, n. 35, p. 24560-24572, Aug 29 2014.

SPRANGER, S.; DAI, D.; HORTON, B.; GAJEWSKI, T. F. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. **Cancer Cell**, v. 31, n. 5, p. 711-723 e714, May 8 2017.

STACH, C. M.; TURNAY, X.; VOLL, R. E.; KERN, P. M. *et al.* Treatment with annexin V increases immunogenicity of apoptotic human T-cells in Balb/c mice. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 10, p. 911-915, Oct 2000.

STANFORD, J. C.; YOUNG, C.; HICKS, D.; OWENS, P. *et al.* Efferocytosis produces a prometastatic landscape during postpartum mammary gland involution. **J Clin Invest**, v. 124, n. 11, p. 4737-4752, Nov 2014.

TAP, W. D.; WAGNER, A. J.; SCHOFFSKI, P.; MARTIN-BROTO, J. *et al.* Effect of Doxorubicin Plus Olaratumab vs Doxorubicin Plus Placebo on Survival in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcomas: The ANNOUNCE Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1266-1276, Apr 7 2020.

THWE, P. M.; AMIEL, E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. **Cancer Lett**, v. 412, p. 236-242, Jan 1 2018.

THWE, P. M.; PELGROM, L. R.; COOPER, R.; BEAUCHAMP, S. *et al.* Cell-Intrinsic Glycogen Metabolism Supports Early Glycolytic Reprogramming Required for Dendritic Cell Immune Responses. **Cell Metab**, v. 26, n. 3, p. 558-567 e555, Sep 5 2017.

VAN DEN BOSSCHE, J.; BAARDMAN, J.; OTTO, N. A.; VAN DER VELDEN, S. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. **Cell Rep**, v. 17, n. 3, p. 684-696, Oct 11 2016.

VATS, D.; MUKUNDAN, L.; ODEGAARD, J. I.; ZHANG, L. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metab**, v. 4, n. 1, p. 13-24, Jul 2006.

WANG, X. S.; DING, X. Z.; LI, X. C.; HE, Y. *et al.* A highly integrated precision nanomedicine strategy to target esophageal squamous cell cancer molecularly and physically. **Nanomedicine**, v. 14, n. 7, p. 2103-2114, Oct 2018.

WANG, Y.; HUANG, G.; ZENG, H.; YANG, K. *et al.* Tuberous sclerosis 1 (Tsc1)-dependent metabolic checkpoint controls development of dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 50, p. E4894-4903, Dec 10 2013.

WANG, Y.; MONCAYO, G.; MORIN, P., Jr.; XUE, G. *et al.* Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. **Oncogene**, v. 32, n. 7, p. 872-882, Feb 14 2013.

XU, Y.; MA, H. B.; FANG, Y. L.; ZHANG, Z. R. *et al.* Cisplatin-induced necroptosis in TNFalpha dependent and independent pathways. **Cell Signal**, v. 31, p. 112-123, Feb 2017.

YIN, Y.; HUANG, X.; LYNN, K. D.; THORPE, P. E. Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation. **Cancer Immunol Res**, v. 1, n. 4, p. 256-268, Oct 2013.

YOON, Y. S.; KIM, S. Y.; KIM, M. J.; LIM, J. H. *et al.* PPARgamma activation following apoptotic cell instillation promotes resolution of lung inflammation and fibrosis via regulation of efferocytosis and proresolving cytokines. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 5, p. 1031-1046, Sep 2015.

YURDAGUL, A., Jr.; SUBRAMANIAN, M.; WANG, X.; CROWN, S. B. *et al.* Macrophage Metabolism of Apoptotic Cell-Derived Arginine Promotes Continual

Efferocytosis and Resolution of Injury. **Cell Metab**, v. 31, n. 3, p. 518-533 e510, Mar 3 2020.

ZACCAGNINO, P.; SALTARELLA, M.; MAIORANO, S.; GABALLO, A. *et al.* An active mitochondrial biogenesis occurs during dendritic cell differentiation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 11, p. 1962-1969, Nov 2012.

ZAGORSKA, A.; TRAVES, P. G.; LEW, E. D.; DRANSFIELD, I. *et al.* Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. **Nat Immunol**, v. 15, n. 10, p. 920-928, Oct 2014.

ZHANG, C. C.; LI, C. G.; WANG, Y. F.; XU, L. H. *et al.* Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation. **Apoptosis**, v. 24, n. 3-4, p. 312-325, Apr 2019.

ZHANG, S.; WEINBERG, S.; DEBERGE, M.; GAINULLINA, A. *et al.* Efferocytosis Fuels Requirements of Fatty Acid Oxidation and the Electron Transport Chain to Polarize Macrophages for Tissue Repair. **Cell Metab**, v. 29, n. 2, p. 443-456 e445, Feb 5 2019.

ZHANG, W. J.; WANG, X. H.; GAO, S. T.; CHEN, C. *et al.* Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. **J Surg Res**, v. 222, p. 93-101, Feb 2018.

ZHAO, F.; XIAO, C.; EVANS, K. S.; THEIVANTHIRAN, T. *et al.* Paracrine Wnt5a-beta-Catenin Signaling Triggers a Metabolic Program that Drives Dendritic Cell Tolerization. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 147-160 e147, Jan 16 2018.

ZHOU, Y.; FEI, M.; ZHANG, G.; LIANG, W. C. *et al.* Blockade of the Phagocytic Receptor MerTK on Tumor-Associated Macrophages Enhances P2X7R-Dependent STING Activation by Tumor-Derived cGAMP. **Immunity**, v. 52, n. 2, p. 357-373 e359, Feb 18 2020.

ZIZZO, G.; COHEN, P. L. The PPAR-gamma antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and upregulation of the MerTK/Gas6 axis: a key role for PPAR-gamma in human macrophage polarization. **J Inflamm (Lond)**, v. 12, p. 36, 2015.