



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

FELIPE CEZAR PINHEIRO DE MATO

RELEVÂNCIA DA ATIVAÇÃO DO FATOR INDUZÍDO POR HIPÓXIA (HIF)
NA RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*:
POSSÍVEL IMPLICAÇÃO NO EFEITO DOS AGCCs.

RELEVANCE OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR (HIF) ACTIVATION IN
NEUTROPHIL RESPONSE TO *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*:
POSSIBLE IMPLICATION IN THE EFFECT OF SCFAs.

CAMPINAS
2018

FELIPE CEZAR PINHEIRO DE MATO

RELEVÂNCIA DA ATIVAÇÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF) NA
RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: POSSÍVEL
IMPLICAÇÃO NO EFEITO DOS AGCCS.

RELEVANCE OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR (HIF) ACTIVATION IN NEUTROPHIL
RESPONSE TO *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: POSSIBLE IMPLICATION IN THE
EFFECT OF SCFCS".

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área
de Imunologia.

Dissertation presented to the Biology Institute of
the State University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree of
Master's Degree in Genetics and Molecular
Biology in the Immunology Area.

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida pelo aluno Felipe Cezar
Pinheiro de Mato e orientado pelo Prof. Dr Marco
Aurélio Ramirez Vinollo.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES; FAPESP, 2012/10653-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M427r Mato, Felipe Cezar Pinheiro de, 1993-
Relevância da ativação do fator induzido por hipóxia (HIF) na resposta de neutrófilos a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : possível implicação no efeito dos AGCCs / Felipe Cezar Pinheiro de Mato. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marco Aurélio Ramirez Vinolo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neutrófilos. 2. Hipóxia. 3. Fator induzível por hipóxia. 4. Ácidos graxos de cadeia curta. I. Vinolo, Marco Aurélio Ramirez, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Relevance of hypoxia-inducible factor (HIF) activation in neutrophil response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : possible implication in the effect of SCFAs

Palavras-chave em inglês:

Neutrophils

Hypoxia

Hypoxia inducible factor family

Short chain fatty acids

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marco Aurélio Ramirez Vinolo [Orientador]

Marcia Pinto Alves Mayer

Leonardo dos Reis Silveira

Data de defesa: 21-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 21 de agosto de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinollo

Prof. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Amarildo e Ana Maria, por todo apoio, compreensão e amor incondicional, a realização deste sonho é graças a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me acompanhado durante toda esta fase difícil e desafiadora da minha história, me agradando com seu amor todo tempo.

Aos meus pais, Ana Maria e Amarildo, por sempre acreditarem no meu potencial e partilharem comigo minhas ambições e objetivos. Sinto-me privilegiado por Deus ter colocado pessoas tão fantásticas como vocês para viver estas aventuras comigo.

À minha irmã Cindy, por mesmo distante, demonstrar seu amor e carinho.

Aos amigos que Campinas me deu, Amanda Bonfanti, Raíssa Carolina e José Luís Fachi, por todos os momentos felizes compartilhados, vocês fizeram toda a diferença em minha vida.

Ao Rollan Hirano, pessoa especial que tive a oportunidade de conhecer nesta fase da minha vida, um muito obrigado por toda parceria, conselhos, e momentos compartilhados.

Aos meus amigos de longa data, Carolina Gazola, Nathan Arantes, Luiz Felipe Kufta, Bianca Ruzza, Isabela Raymundo e Adilson Quero, pessoas fantásticas que sempre estiveram comigo, partilhando de momentos bons ou ruins, minha sincera gratidão a todos vocês.

A todos os amigos que a Biomedicina me deu, Natália Polimeno, Khatinny Amanda, Thilara Alessandra e Renata Dalossa, por sempre torcerem pelo meu sucesso, e me mostrarem que o vínculo que criamos durante a graduação, permanece firmemente conexo.

Ao Professor Dr. Marco Aurélio Vinolo, por ter me aberto às portas da Unicamp e de seu laboratório, para que pudesse vivenciar todas essas experiências. Sou grato a você, por contribuir para que hoje eu seja um profissional melhor e mais convicto.

Aos amigos de laboratório, por todos, sem exceções, terem contribuído de forma direta em meu desenvolvimento e amadurecimento, tanto pessoal, quanto profissional. Passar todos estes anos dividindo bancada com vocês, foi com certeza um privilégio, meu muito obrigado a todos vocês.

À professora Dra. Liana Verinaud, por todos os conselhos, momentos compartilhados, e confiança que a mim depositou neste tempo, uma profissional brilhante que admirarei sempre. Juntamente, toda sua equipe, por todo auxílio e momentos vividos.

Ao professor Dr. Marcelo Bispo de Jesus e sua equipe, pelo suporte e auxílio na realização de vários experimentos, meu sincero obrigado.

Ao professor Dr. Alessandro Farias e Dra. Leonilda Maria Barbosa e suas respectivas equipes, por toda ajuda e companheirismo ao longo destes anos. Em especial, a Ms. Verônica Almeida, pela sua humanidade e gentileza com minha pessoa em um momento difícil e frustrante.

Ao bioterista Marcos César Meneghetti, por partilhar suas experiências e conhecimento.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por me ter propiciado desenvolver este projeto da melhor forma possível, me cedendo espaço, estrutura, e um ambiente rico de conhecimento.

Agradeço as agências de fomento, FAPESP, CAPES e CNPQ, por investirem e contribuírem com a ciência e desenvolvimento científico no Brasil.

“Não é o cérebro que mais importa, mas sim o que o orienta: o caráter, o coração, a generosidade e as ideias progressivas.”

Fiodor Dostoiévski

RESUMO

O fator induzível por hipóxia (HIF) é um componente chave na adaptação das células à redução da demanda de oxigênio tecidual. Esta condição é frequentemente associada a infecções por bactérias e está associada a alterações de mecanismos efetores das células imunes. Contudo, há pouca informação a respeito da participação desse fator na resposta imune a bactérias envolvidas no desenvolvimento de periodontite, como a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar a relevância do HIF-1 na função efetora de neutrófilos frente à bactéria Aa e, juntamente, analisar a ação dos produtos derivados da fermentação bacteriana, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), na ativação deste fator de transcrição em neutrófilos. Para tal, utilizamos *in vitro* compostos que modificam a estabilidade de HIF-1 na presença de oxigênio, assim como à incubação das células em condições de hipóxia. Além disso, foram realizadas análises *in vivo*, utilizando animais com deleção tecido específico de HIF-1 em células mielóides. Vimos que a ativação da via do HIF-1 em neutrófilos por meio de estabilizadores sintéticos ou através da redução de oxigênio aumenta a produção do mediador IL-1 β após estimulação com Aa. Para a capacidade fagocítica observou-se redução dessa função de neutrófilos frente a bactéria Aa sob condição de hipóxia, mas não nos ensaios com estabilizador sintético de HIF-1. Ao avaliarmos a capacidade de *killing* vimos que a ativação da via de HIF em neutrófilos acentuou sua ação microbicida. Ao avaliarmos a ação dos AGCCs na ativação de HIF-1, observamos esses compostos reduziram a estabilidade de HIF-1 e que a hipóxia alterou a resposta de neutrófilos a bactérias na presença de AGCCs. No modelo de infecção em animais com deleção de HIF-1 em células mielóides, vimos aumento na produção de IL-10 e redução de TNF- α . Entretanto, não observamos diferenças em outros parâmetros dos grupos avaliados. Desta forma, concluímos que a hipóxia e ativação de HIF-1 em neutrófilos são importantes para as suas funções efectoras durante a infecção por Aa, e os AGCCs, principalmente o butirato, interferem negativamente nesta ativação de HIF-1, podendo assim modular a resposta durante quadro infeccioso.

Palavras-chave: Fator induzido por hipóxia, neutrófilos, hipóxia, ácidos graxos de cadeia curta.

ABSTRACT

The hypoxia-inducible factor (HIF) is a key component in the adaptation of cells to the reduction of tissue oxygen demand. This condition is often associated with bacterial infections and with changes in the effector mechanisms of immune cells. However, there is a limited amount of information regarding the participation of this factor in the immune response to bacteria involved in the development of periodontitis, such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). The aim of this study was to evaluate the relevance of HIF-1 to the effector function of neutrophils against Aa bacteria and to analyze the action of products derived from bacterial fermentation, short chain fatty acids (SCFAs), in the activation of this transcription factor in neutrophils. For this, we used in vitro compounds that modify the stability of HIF-1 in the presence of oxygen, as well as the incubation of the cells on hypoxia. In addition, in vivo analyses were performed using animals with tissue-specific deletion of HIF-1 in myeloid cells. We saw that the activation of the HIF-1 pathway in neutrophils by synthetic stabilizers or by reduction of the oxygen levels increases the production of IL-1 β after Aa stimulation. Regarding the phagocytic capacity, we observed a reduction on this neutrophil function against the Aa bacterium under hypoxic condition, but not in the HIF-1 synthetic stabilizer assays. When evaluating the killing capacity, we saw that the activation of the HIF pathway in neutrophils accentuated their microbicidal action. When assessing the action of SCFAs on the activation of HIF-1, we observed that these compounds reduced the stability of HIF-1 and that hypoxia altered the neutrophil response to bacteria in the presence of SCFAs. In the model of infection in animals with deletion of HIF-1 in myeloid cells, we saw an increase in the production of IL-10 and reduction of TNF- α . However, we did not observe differences in other parameters among the evaluated groups. Thus, we conclude that hypoxia and activation of HIF-1 in neutrophils are important for their effector functions during Aa infection, and SCFAs, especially butyrate, interfere negatively with this activation of HIF-1, thus modulating the response during an infectious disease.

Key words: Hypoxia-inducible factor, neutrophils, hypoxia, short chain fatty acids.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Ac: Acetato
AGCCS: Ácidos graxos de cadeia curta
BHI: Infusão cérebro-coração
Bt: Butirato
CN: Controle negativo
CO₂: Dióxido de carbono
CXCL1: (C-X-C Motif) <i>chemokine ligand 1</i>
CXCL8: (C-X-C motif) <i>chemokine ligand 8</i>
CXCL10: (C-X-C motif) <i>chemokine ligand 10</i>
EC: <i>Escherichia coli</i>
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPO: Eritropoetina
GPCRs: Receptores acoplados à proteína G
GPR109a: <i>G-protein coupled receptor 109a</i>
GPR41: <i>G-protein coupled receptor 41</i>
GPR43: <i>G-protein coupled receptor 43</i>
HATs: Histonas acetil-transferases
HDACs: Histonas deacetilases
HIF: Fator induzível por hipóxia
HRE: Elemento responsável a hipóxia
IL-1β: Interleucina 1 β
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina 10
IL-17: Interleucina 17
KO: <i>Knockout</i>
LPS: Lipopolissacarídeo

LtxA: Leucotoxina
MOI: <i>Multiplicity of infection</i>
NETs: <i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB: Fator nuclear Kappa B
NLRs: <i>Nod-like receptor</i>
NLRP1: <i>Nod-like receptor protein 1</i>
NLRP3: <i>Nod-like receptor protein 3</i>
NLRP6: <i>Nod-like receptor protein 6</i>
O₂: Oxigênio
Olfr8: <i>Olfactory receptor 8</i>
PA: Periodontite agressiva
PBS: Tampão fostato-salino
PHDs: Prolil-hidroxilases
Pr: Propionato
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SCFCs: <i>Short chain fatty acids</i>
TLR2: Receptor do tipo Toll 2
TLR4: Receptor do tipo Toll 4
TNF-α: Fator de necrose tumoral α
UFCs: Unidades formadoras de colônias
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular
VHL: Von Hippel Lindal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Via de ativação e inibição de HIF-1. pg.20

Figura 2: Esquema de delineamento experimental para isolamento de neutrófilos utilizando a técnica de gradiente (Percoll). pg. 28

Figura 3: Análise de Viabilidade celular de neutrófilos *in vitro* por citômetria de fluxo. pg.29

Figura 4: Esquema de delineamento experimental da inserção da câmara subcutânea e dos parâmetros avaliados.pg.36

Figura 5: Efeito dos estabilizadores sintéticos de HIF-1 sobre a viabilidade celular de neutrófilos *in vitro*.pg.38

Figura 6: Análise da eficácia de estabilizadores sintéticos de HIF-1 em neutrófilos. pg.39

Figura 7: Análise temporal da estabilização de HIF-1 por Bay85 em neutrófilos. pg. 40

Figura 8: Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 sobre a produção dos mediadores inflamatórios por neutrófilos estimulados com Aa. pg.41

Figura 9: Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 sobre a produção dos mediadores inflamatórios por neutrófilos estimulados com LPS. pg.42

Figura 10: Efeito de estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos frente à bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). pg.43

Figura 11: Gráficos representativos das taxas de fagocitose de neutrófilos pré-tratados com estabilizador sintético de HIF-1 sob estímulo de Aa. pg.44

Figura 12: Efeito de estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos frente à bactéria *Escherichia coli*. pg.44

Figura 13: Gráficos representativos das taxas de fagocitose de neutrófilos pré-tratados com estabilizador sintético de HIF-1 sob estímulo de *E.coli*. pg.45

Figura 14: Análise da capacidade de *killing* de neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1 sob estímulo de Aa. pg.46

Figura 15: Análise da capacidade de *killing* de neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1 sob estímulo de *E.coli*. pg.46

Figura 16: Exemplo mostrando o crescimento bacteriano (UFCs). pg.47

Figura 17: Análise da produção de mediadores inflamatórios em hipóxia e normóxia sob estímulo de Aa. pg.48

Figura 18: Análise da produção de mediadores inflamatórios em hipóxia e normóxia sob estímulo de LPS. pg.49

Figura 19: Análise da capacidade fagocítica de neutrófilos frente a Aa em condições de hipóxia e normóxia. pg.50

Figura 20: Análise da capacidade fagocítica de neutrófilos frente a *E.coli* em condições de hipóxia e normóxia. pg.51

Figura 21: Análise da ativação de HIF-1 por mix de AGCCs em neutrófilos. pg.52

Figura 22: Análise da ação de AGCCs na ativação de HIF-1 em neutrófilos. pg.53

Figura 23: Análise da ação de butirato na atividade de HIF-1 em neutrófilos. pg.53

Figura 24: Efeito do mix de AGCCs sobre a produção de citocinas de neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1. pg.55

Figura 25: Efeito do mix de AGCCs sobre a produção de citocinas de neutrófilos em hipóxia e normóxia. pg.57

Figura 26: Análise da capacidade fagocítica de neutrófilos tratados com mix de AGCCs em condições de normóxia ou hipóxia sob estímulo de Aa. pg.58

Figura 27: Análise da sobrevivência das bactérias Aa em modelo de câmara subcutânea *in vivo*. pg.60

Figura 28: Recrutamento leucocitário e perfil de migração de leucócitos para o interior da câmara subcutânea após a inoculação de Aa *in vivo*. pg.61

Figura 29: Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células imunes presentes no interior da câmara subcutânea *in vivo*. pg.62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	26
Objetivo Geral.....	26
Objetivos específicos:	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Animais	27
Bactérias	27
Experimentos in vitro com neutrófilos.....	28
Isolamento de Neutrófilos.	28
Tratamentos com drogas que interferem na estabilização de HIF-1	29
Viabilidade Celular.....	29
Animais HIF-1 <i>reporter</i>	30
Ensaio em Hipóxia e Normóxia.	31
Ensaio com ácidos graxos de cadeia curta	31
Parâmetros funcionais de neutrófilos avaliados.	32
Produção de Citocinas.	32
Análise de Fagocitose.....	33
Obtenção de Bactérias	33
Obtenção de Células e condições de tratamento.....	34
Sobrevivência bacteriana (killing).....	34
Experimentos <i>in vivo</i>	35
Câmara subcutânea	35
Infecção com <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> JP2	35
Coleta e análise do material	36
Análise de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatório	36

Análise qualitativa e quantitativa de leucócitos.....	36
Avaliação da capacidade de <i>killing</i> das células imunes.....	37
Análise estatística dos resultados	37
RESULTADOS	38
Análises de viabilidade celular de neutrófilos com estabilizadores sintéticos de HIF-1 α	38
Análise da eficácia de estabilizadores sintéticos de HIF-1 α em neutrófilos.	39
Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a produção de citocinas <i>in vitro</i>	41
Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade fagocítica <i>in vitro</i>	43
Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade de <i>killing in vitro</i>	46
Análise da produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios por neutrófilos em normóxia e hipóxia <i>in vitro</i>	48
Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos mantidos em normóxia e hipóxia <i>in vitro</i> ...50	
Análise do efeito de AGCCs sobre a ativação de HIF-1 em neutrófilos.	52
Avaliação do efeito de AGCCs sobre a produção de citocinas por neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1.....	55
Análise da produção de citocinas em cultura de neutrófilos <i>in vitro</i> tratados com mix de AGCCs e expostos a condição de hipóxia e normóxia.	56
Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos <i>in vitro</i> tratados com mix de AGCCs em hipóxia e normóxia.	58
Análises <i>in vivo</i> em animais com deleção de HIF-1 em células mielóides.....	59
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
Anexo I – Protocolo do comitê de ética	83
Anexo II- Declaração dos direitos autorais	84

INTRODUÇÃO

Leucócitos são células do sistema imunológico que atuam na remoção e destruição de patógenos invasores ao organismo, além de liberarem mediadores químicos, estimulando a regeneração tecidual e crescimento celular. Um dos leucócitos encontrado em maiores números na circulação sanguínea de humanos adultos e que atuam diretamente na fase inicial do processo inflamatório são os neutrófilos, foco deste estudo.

Neutrófilos possuem funções consideradas relevantes na defesa do hospedeiro, em especial na resposta e resolução de infecções. Essa célula é o tipo mais abundante de leucócitos no sangue humano constituindo em torno de 60 a 70% de todos os leucócitos presentes no sangue. São células derivadas de precursores da medula óssea que possuem grande capacidade de migração para os tecidos e apresentam uma meia vida relativamente curta (K. HUNNIGER & O. KURZAI, 2018). Foi estimado que o tempo de vida destas células no sangue de camundongos é de até doze horas, enquanto que em humanos podem sobreviver por até cinco dias, sendo que ao final deste tempo, a célula tende a morrer por mecanismos apoptóticos espontâneos. (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Quanto a sua morfologia, sabe-se que seu núcleo é condensado e multilobular, além de conter vários grânulos e vesículas intracelulares no citoplasma, o que justifica sua denominação de granulócito polimorfonuclear (FUTOSI *et al.*, 2013).

Uma característica importante dessa célula é o fato de expressar diferentes classes de receptores de reconhecimento de padrões moleculares de microrganismos incluindo receptores *toll-like* (TLR) e do tipo nod (NLRs) como *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP6*. Isso permite que essas células reconheçam e montem as respostas imunes iniciais contra patógenos (THOMAS & SCHRODER, 2013).

Atualmente, como já bem estabelecido na literatura, sabe-se que neutrófilos estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como angiogênese, cicatrização de feridas, doenças autoimunes e neoplásicas, além de condições patológicas inflamatórias (TAMASSIA *et al.*, 2018). Esse envolvimento se dá pelas mais variadas funções desta célula, dentre essas, considera-se como principais: fagocitose de patógenos; liberação de proteases, como elastase e catepsinas; liberação de peptídeos antimicrobianos como α -defensinas e catelicidinas; produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); liberação de armadilhas extracelulares (NETs);

além da secreção de citocinas e quimiocinas que induzem a atração e ativação de outras células do sistema imune (HARRIS *et al.*, 2014 ;HAJISHENGALLI *et al.*, 2015). Essa célula é capaz de sintetizar *in vitro* e *in vivo*, dependendo do estímulo, citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, além de quimiocinas como CXCL1, CXCL8, CXCL10, entre outros mediadores inflamatórios (TAMASSIA *et al.*, 2018). Sendo assim, fica-se claro que os neutrófilos e suas ações biológicas têm papel chave em processos inflamatórios.

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores (agentes biológicos) ou ação de agentes químicos ou físicos, que acarretam em lesões teciduais. Esta resposta é orquestrada por células e mediadores específicos, que colaboram de forma direta para neutralizar e eliminar os estímulos prejudiciais, visando o reestabelecimento da homeostase (COTRAN *et al.*, 1999; MEDZHITOV, 2010). A inflamação é um componente presente em várias condições patológicas, como infecções, doenças autoimunes, entre outras. Sabe-se que a inflamação possui alguns sinais característicos como calor, rubor, edema, dor e perda de função. Como forma inicial da cascata inflamatória, ocorre uma resposta vascular exacerbada e aumento da permeabilidade das paredes dos vasos. Juntamente, há vasodilatação arteriolar, acarretando em um aumento de fluxo sanguíneo para a área danificada, resultando em um quadro de hiperemia local. Nesses estágios iniciais do processo inflamatório é prontamente detectável o acúmulo de proteínas plasmáticas e líquido nos tecidos. Este processo é logo seguido pelo aumento da migração de leucócitos presentes da circulação para o tecido lesado (COTRAN *et al.*, 1999; LAWRENCE *et al.*, 2002). Esse influxo leucocitário, caracterizado predominantemente por neutrófilos, depende de sinalização de agentes quimiotáticos, citocinas e leucotrienos (RYAN & GODSON, 2010; SERHAN, 2007). Neutrófilos são usualmente os primeiros a serem recrutados para os sítios de inflamação, exercendo funções importantes no combate inicial aos agentes patológicos, como fagocitose e destruição dos mesmos (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Vários estudos mostraram ao longo dos últimos anos que as células do sistema imunológico encontram diferentes tensões de oxigênio nos tecidos (sangue, linfonodos e outros tecidos), sendo que níveis consideravelmente reduzidos de oxigênio são normalmente descritos em tecidos inflamados (HARRIS *et al.*, 2014). O aumento de leucócitos recém migrados aos locais de inflamação em conjunto com o maior consumo de oxigênio por essas células acarreta em reduções drásticas de níveis de oxigênio (O₂) aos quais as mesmas estão expostas, condição essa denominada de hipóxia.

O termo hipóxia é utilizado para definir o estado no qual há um déficit entre a quantidade de oxigênio consumido e seu aporte a determinado tecido, o que leva a uma redução da disponibilidade de O₂ em relação às condições normais. A redução da disponibilidade de O₂ pode ser o resultado de uma diminuição no seu suprimento ao tecido devido a fatores vasculares como, por exemplo, a presença de microtrombos ou rompimento de vasos, e/ou de aumento no seu consumo pelas células, podendo ocorrer tanto em condições fisiológicas como em diversos processos fisiopatológicos. Em tecidos saudáveis a tensão de oxigênio varia entre 20-90 mmHg, ou seja 2,5 a 9 % (NIZET & JOHNSON, 2009). É difícil estabelecer *in vivo* um valor exato de tensão de oxigênio que caracteriza uma condição de hipóxia, contudo considera-se que abaixo de 6% de oxigênio, para a maioria das células, são iniciadas respostas intracelulares condizentes com um estado de hipóxia (NIZET & JOHNSON, 2009). Nesse sentido, é importante ressaltar que durante a resposta imune a agentes infecciosos, é frequente a ocorrência de hipóxia tecidual, havendo relatos de tensões de oxigênio inferiores a 1% em feridas e locais infeccionados (ARNOLD *et al.*, 1987; MELICAN *et al.*, 2008). São diversos os fatores que contribuem para esse quadro de hipóxia. Além do aumento do recrutamento de leucócitos, vê-se também fatores associados ao crescimento dos microrganismos invasores, o que ocasiona um aumento da demanda de oxigênio local. Adicionalmente, pode haver diminuição do fluxo sanguíneo ao tecido, contribuindo assim para a baixa disponibilidade de oxigênio durante a infecção (PALAZON *et al.*, 2014; SCHAFFER & TAYLOR, 2015). Particularmente, em determinados tipos de infecção incluindo abscessos, infecções intestinais e periodontais, as ações das células do sistema imune recrutadas ocorrem em condições de hipóxia (BEERLAGE *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2015).

Na literatura há relatos de que células incluindo os neutrófilos conseguem se adaptar a ambientes com baixos níveis de oxigênio. Estudos anteriores comprovaram que a hipóxia pode modular positivamente a sobrevivência desta célula através da inibição de apoptose celular via NFκB (WALMSLEY *et al.*, 2005). Estudos mais recentes, como o realizado por MCGOVERN *et al* (2015) mostram que condições de hipóxia não afetam algumas funções biológicas importantes dos neutrófilos em modelos de infecção com *Staphylococcus aureus*, como motilidade, migração e liberação de conteúdo de grânulos. Entretanto, a redução de oxigênio local reduz a produção de ROS, interferindo de forma direta no *burst* oxidativo e consequente destruição da bactéria em questão. Logo, compreende-se que ações importantes destas células podem ser modificadas em

baixas tensões de oxigênio, o que pode interferir a eliminação do microrganismo invasor e a resolução do processo inflamatório.

Todas células nucleadas possuem mecanismos que as capacitam a identificar e reagir a mudanças nas concentrações de oxigênio. As células se adaptam via expressão de genes específicos que sintetizam proteínas importantes para manter a homeostase em condições de hipóxia. Uma proteína que desempenha a função de sensor celular de oxigênio nas células é o fator induzido por hipóxia (*HIF*), tendo um importante papel nas respostas celulares e sistêmicas em condições de hipóxia (SEMENZA, 2011; SUPPA, 2009). HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico, sendo composto por uma subunidade alfa (HIF-1 α) e uma subunidade beta (HIF-1 β). A expressão de HIF-1 α é regulada pela quantidade de oxigênio, havendo rápida degradação dessa proteína na presença de concentrações normais de oxigênio, enquanto que a HIF-1 β é expressa constitutivamente (KE; COSTA, 2006; SCHOFIELD; RATCLIFFE, 2004). A subunidade alfa de HIF é pós-transcricionalmente regulada pela disponibilidade de oxigênio local através de enzimas chamadas prolil-hidroxilases dependentes de ferro (PHDs). Em condições normais de oxigênio, as PHDs são ativadas, atuando na hidroxilação da subunidade alfa de HIF, marcando-a para que ocorra a degradação proteossomal, sendo este processo será mediado pela ubiquitinação dependente da proteína von Hippel-Lindau (VHL). Entretanto, se as concentrações de oxigênio caem, as enzimas PHDs se tornam inativas, o que resulta em um acúmulo no citoplasma da subunidade alfa, a qual transloca ao núcleo, se ligando a subunidade beta, e juntamente a coativadores como P300, origina um complexo transcricional efetivo, que por sua vez atuará como um fator de transcrição, modulando a expressão de vários genes alvo (SEMENZA, 2014).

Históricamente, o gene HIF-1 foi descoberto em células humanas em 1988, através da identificação de um elemento de resposta à hipóxia (*HRE*) presente no gene da eritropoietina (*EPO*). Além do fato deste gene ser considerado um regulador da eritropoietina, ele também é responsável por controlar a síntese do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), que tem ações importantes sobre a angiogênese, além de enzimas glicolíticas importantes na adaptação do metabolismo das células em condições de hipóxia e uma ampla gama de fatores envolvidos na sinalização e resposta efetora do sistema imune como citocinas pró-inflamatórias (SEMENZA, 2011; FERREIRA, 2009).

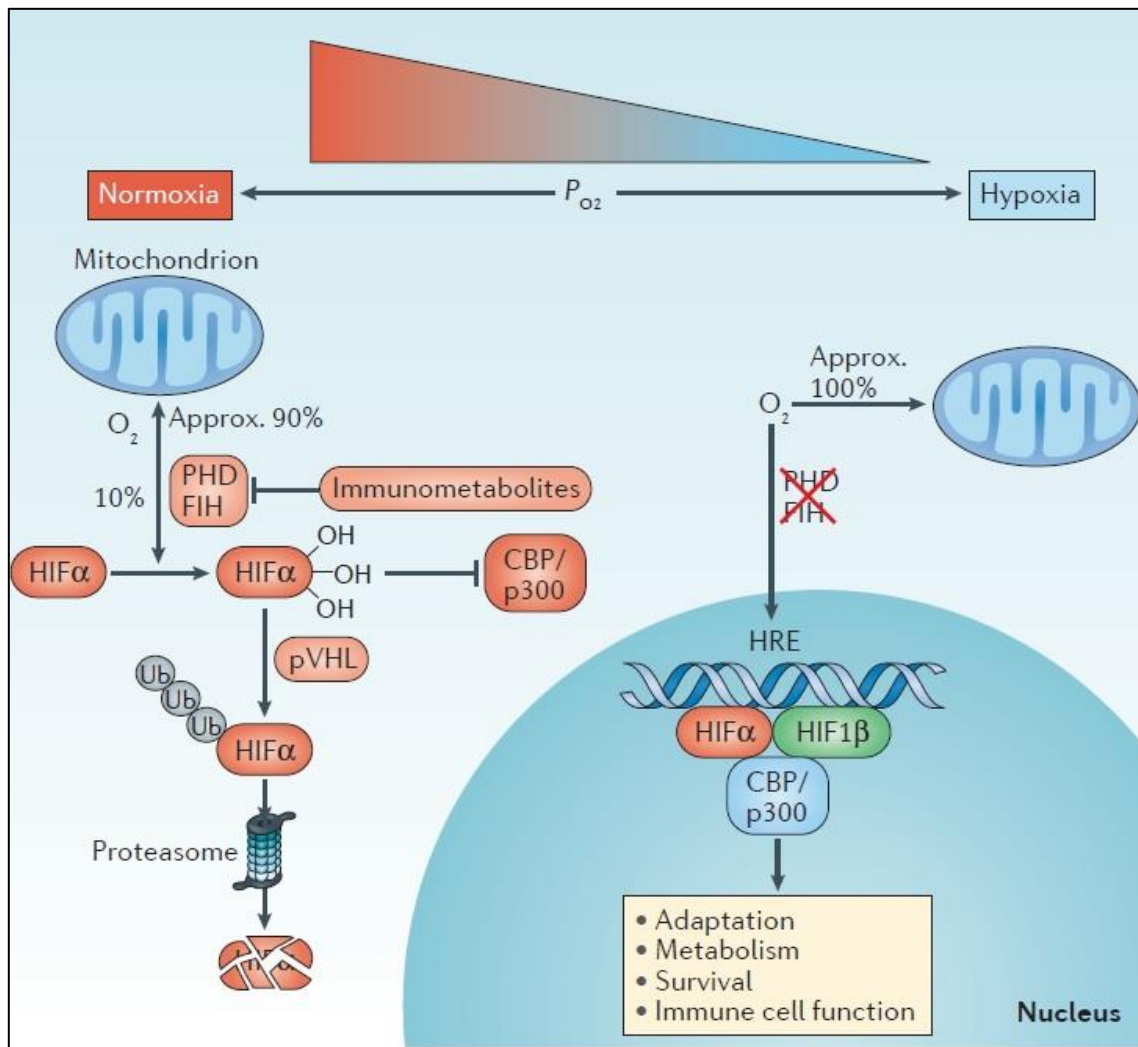


Figura 1: Imagem esquemática da via de ativação e inibição de HIF-1. Em condições de normóxia, a subunidade alfa de HIF-1 é degradada após hidroxilação pelas PHDs, mediante ação de VHL. Em condições de hipóxia, tanto PHDs quanto FIH são inibidas, o que impede a degradação desta subunidade, acarretando na translocação ao núcleo, dando origem ao complexo heterodimérico de HIF-1, que atuará transcrevendo genes alvo (Adaptado de TAYLOR & COLGAN, Nature Reviews Immunology, 2017).

Sabendo-se que as células e órgãos necessitam se adaptar às mudanças no suprimento de oxigênio, não causa estranheza o fato de uma grande variedade de genes serem regulados pela HIF-1 nos tecidos. Nesse sentido, há mais de 100 genes identificados com funções diferentes que são regulados por esta proteína (SEMENZA *et al.*, 1991). A exemplo disso, na literatura há resultados, obtidos em células endoteliais arteriais através da utilização de microarranjos de DNA, que evidenciam que mais de 2% dos genes humanos são modulados de forma direta ou indireta por HIF-1 (MANALO *et al.*, 2005). Porém, é válido ressaltar que vários estudos recentes têm mostrado

que a ativação de HIF-1 não é somente pela via de hipóxia. Foi mostrado que a presença de IL-1 e TNF- α em condições inflamatórias também são capazes de ativar este fator de transcrição, acarretando na subsequente transcrição dos genes alvos. (ARNETT 2010; OLSON & VAN DER VLIET, 2011; NG *et al.*, 2011).

Sabe-se hoje que HIF-1 é expressa em praticamente todas as células do sistema imune, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos, nas quais apresenta um importante papel, conforme discutido a seguir (MCNAMEE *et al.*, 2013; SCHOLZ & TAYLOR, 2013). Diversos estudos têm evidenciado a participação de HIF tanto na regulação da sobrevivência quanto da função efetora das células do sistema imune, sendo que a deleção desse fator de transcrição está associada, em geral, a uma condição desfavorável à atividade bactericida de células mielóides, como neutrófilos (BURKE & HOLLANDER, 2001). O grupo de PEYSSONNNAUX *et al.* (2005) demonstrou que este fator de transcrição não só é capaz de adaptar ao metabolismo glicolítico das células mielóides, como também atua coordenando diversos aspectos funcionais dessas células, resultando na modificação da capacidade microbicida das células em condições hipóxicas. Em neutrófilos, viu-se que a ativação de HIF-1 aumenta a expressão de moléculas antimicrobianas, como catelicidinas, proteases, elastases, entre outros. Logo, vê-se neste fator de transcrição um papel importante na coordenação das células mielóides em condições assépticas ou infecciosas associadas à hipóxia.

Muitos patógenos bacterianos sobrevivem e se proliferam sob condições anaeróbicas, portanto, os fagócitos devem ser adaptados para atuar na erradicação microbiana nos mesmos microambientes. Na região periodontal, em condições infecciosas, tanto as células quanto os microrganismos ali presentes consomem de forma gradativa os nutrientes e o oxigênio ali presentes, gerando uma condição hipóxica tecidual. Essa condição pode induzir a ativação de HIF-1, que como discutido anteriormente, é considerado um dos principais reguladores celulares às modificações das concentrações de oxigênio local (BRIGATI *et al.*, 2010; KOMINSKY *et al.*, 2010).

A periodontite é uma doença inflamatória de caráter crônico, que causa comprometimento na integridade do tecido que faz a sustentação do dente, incluindo a gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar, que juntos formam o que chamamos de periodonto (CEKICI *et al.*, 2014; LAMONT, 2012). Entende-se que este processo está estritamente ligado a modificações no equilíbrio da microbiota oral. De forma geral, vê-se um acúmulo de biofilme

bacteriano disbiótico, que acarreta na exacerbação de infiltrados inflamatórios, constituído principalmente por células como neutrófilos, macrófagos, linfócitos TH17, entre outros tipos celulares, localizados no interior do tecido subgingival (ROSIER, B.T. *et al*, 2014). Neste sentido, sabe-se que esta exacerbação contribui de forma direta para o acréscimo do processo inflamatório local, que será mediado através da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , e IL-17 (CEKICI *et al.*, 2014).

As doenças periodontais possuem variadas etiologias, podendo ser de caráter infeccioso, inflamatório, traumáticos ou até mesmo genéticos. Contudo, o termo doença periodontal é frequentemente usado quando se tem como objetivo se referir às desordens inflamatórias de origem infecciosa, provocadas pela presença dos microrganismos patogênicos locais no sulco gengival provenientes de uma microbiota disbiótica (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JHONSON, 2005; LINDEH *et al.*, 2010). Diversos estudos já identificaram diversas bactérias associadas à doença periodontal incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), esta última foco deste estudo (LINDHE *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2010). Essas bactérias são comumente encontradas em pacientes que possuem periodontite agressiva e crônica (MOMBELLI *et al*, 1994).

Como comentado anteriormente, muitos patógenos bacterianos são capazes de sobreviver e se proliferar em condições anaeróbicas, sendo uma delas a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Ela é um cocobacilo, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, associada a quadros de periodontite agressiva generalizada ou localizada. A periodontite agressiva (PA) é uma forma grave e de rápida progressão, onde os molares e dentes incisivos tendem a serem os dentes mais afetados (ARMITAGE, 2010). Porém, este microrganismo pode estar associado a quadros infecciosos que não se restringem apenas a região do periodonto, mas a outros locais, como: endocardite, pericardite, artrite bacteriana, osteomielite, entre outros (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1999; CUENDE, E. *et al*, 1996; ANTONY, B. *et al*, 2009). O presente estudo utilizou a cepa JP2, que é produtora de leucotoxina (LTxA), uma proteína com característica altamente citotóxica, principalmente para células imunes de primatas como os neutrófilos, sendo assim considerado como um mecanismo de evasão bacteriano (KACHLANY 2010; JOHANSSON 2011). Logo, a periodontite causada por bactérias encontradas no periodonto como a Aa resulta em alterações na produção local de moléculas importantes que conectam a microbiota e as células do hospedeiro

incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (revisado por CORRÊA, R.O. *et al*, 2016). Nesta perspectiva, vários estudos mostraram que a condição de periodontite acarreta em alterações das concentrações dos AGCCs na cavidade oral destes indivíduos. Em quadros nos quais a periodontite é generalizada e agressiva, foi mostrado que as concentrações de AGCCs eram de duas a quatro vezes superiores no fluido gengival crevicular dos pacientes quando comparados a indivíduos que não apresentam quadros de periodontite (QIQIANG *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2014).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura um grupamento carboxílico e uma curta cadeia carbonílica que normalmente varia de 1 a 3 carbonos. Os principais AGCCs são acetato, propionato e butirato e sua produção se dá através pela fermentação de carboidratos e proteínas derivados da dieta dos hospedeiros (ANDOH *et al*, 2006). Altas concentrações desses compostos estão presentes ao longo do trato gastrointestinal. Entretanto, como comentado anteriormente, estudos relatam que os mesmos podem ser encontrados em outros tecidos, como na região do periodonto, uma vez que foi constatado haver alterações significativas desses compostos durante processos inflamatórios, como a periodontite (QIQIANG *et al*, 2012; LU, R. *et al* 2014).

Esses metabólitos não atuam somente como fontes energéticas para as células, mas também podem desempenhar funções modulatórias nas células dos hospedeiros, tais funções como: apoptose, produção de ROS, citocinas, óxido nítrico, proliferação e migração (RODRIGUES *et al*, 2010; HANSEN *et al*, 2011; KEANE *et al*, 2011; TAKAHASHI *et al*, 2012). VINOLO (2009) e colaboradores mostraram que o butirato modulava de forma negativa a capacidade de fagocitose e *killing* de neutrófilos em modelo de infecção por *Candida albicans*. De forma conjunta, esses metabólitos interferem no recrutamento, função efetora e sobrevivência em diferentes tecidos (RODRIGUES *et al.*, 2015). Alguns outros estudos comprovaram que os AGCCs regulam a produção de mediadores inflamatórios por neutrófilos incluindo o TNF- α e IL-10, além de atuar no processo de quimiotaxia de neutrófilos (MASLOWSKI *et al.*, 2009; SINA *et al.*, 2009; VINOLO *et al.*, 2011).

Considerando o exposto, temos que HIF-1 é expresso em células do sistema imune e que modula diversos fatores importantes para a resposta dessas células durante processos infecciosos. Contudo, pouco se sabe a respeito do seu papel na resposta a bactérias anaeróbias e microaerófilas que estão envolvidas no desenvolvimento de periodontite como a *Aggregatibacter*

actinomycescomitans (Aa), alvo deste estudo. Além disso, o presente estudo investigou a implicação dos efeitos dos AGCCs na ação e ativação do fator de transcrição HIF-1 em neutrófilos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a relevância da ativação do fator induzido por hipóxia do tipo 1 (HIF-1) na resposta de neutrófilos frente a bactérias, bem como a implicação no efeito dos AGCCs.

Objetivos específicos:

- Analisar a resposta efetora de neutrófilos incubados *in vitro* com estabilizadores de HIF-1 α frente a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Escherichia coli* (*E.coli*) em normóxia;
- Comparar a resposta efetora de neutrófilos incubados *in vitro* com as bactérias Aa e *E.coli* em hipóxia e normóxia;
- Analisar em modelo de câmara subcutânea a resposta *in vivo* de animais com deleção em células mielóides de HIF-1 α (LysM^{Cre+}HIF-1 α ^{lox/+}) à bactéria Aa;
- Analisar a ação de AGCCs na ativação e ação de HIF-1 em neutrófilos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos com animais descritos neste projeto foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo n° 4171-1). Neste projeto foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB – UNICAMP). Com o intuito de explorar o papel do fator de transcrição HIF-1 α foram utilizados camundongos com deleção desse fator seletivamente em células mielóides (Lisozima^{Cre+}HIF-1 α ^{lox+/+}). Esses camundongos foram gerados após o cruzamento de animais Lisozima-Cre (B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J) com animais cujo gene HIF-1 α foi floxeado (B6.129-Hif1atm3Rsjo/J). Os animais gerados (Lisozima^{Cre+}HIF-1 α ^{flox+/+}) e seus controles (Lisozima^{Cre-}HIF-1 α ^{flox+/+}) foram utilizados nos experimentos. Também foram utilizados neste projeto camundongos Odd-luciferase (FVB.129S6Gt(ROSA) 26Sor^{tm2(HIF1A/luc)Kael/J}) têm a porção C-terminal do domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 α) ligado ao gene da enzima luciferase de vaga-lumes (luc). Estes animais foram adquiridos da The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME USA) e servem como *reporter* de HIF-1. Todos os animais foram mantidos no Biotério de Animais SPF e no Biotério de Nível de Biossegurança do tipo 2 do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Os mesmos foram mantidos em gaiolas autoclavadas e com filtro no topo, com livre acesso e água esterilizada.

Bactérias

A bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) foi fornecida pelo Laboratório de Anaeróbios coordenado pelo Prof. Mário Júlio Ávila Campos (ICB/USP) e cultivadas em anaerobiose em meio ágar chocolate (Aa) BHI (Kasvi) suplementado com hemina (5 μ g/mL, Sigma Aldrich, Germany) e menadiona (1 μ g/mL, Sigma Aldrich, Germany) a 37° C. Dois dias anteriores aos experimentos realizados, as bactérias presentes na placa foram transferidas para caldo BHI (Kasvi) e parte da suspensão de bactérias (100 μ L) foi então plaqueada em meio ágar chocolate, por meio da técnica de esgotamento, visando garantir que a bactéria cultivada era a de nosso interesse, eliminando a possibilidade de contaminação. Já a *Escherichia coli*

expressando GFP foi fornecida pelo Prof. Marcelo Lancellotii (FCF/UNICAMP) e cultivada em aerobiose em meio ágar L.A com ampicilina, em placa de pétri, a 37°C.

Nos dias dos experimentos, as bactérias foram retiradas das placas, centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS estéril (pH=7,3). Posteriormente as lavagens, as mesmas foram ressuspensas na concentração de 12×10^8 CFUs/mL em PBS utilizando-se para tanto a escala de MacFarland.

Experimentos in vitro com neutrófilos

Isolamento de Neutrófilos.

Neutrófilos foram isolados da medula óssea obtida das tíbias e o fêmures de camundongos (Figura 2). A separação dos neutrófilos das demais células que compõem a medula óssea foi realizada através da técnica de gradiente, utilizando o reagente Percoll (Ge Healthcare Bio-Sciences AB). Com este protocolo, a pureza dos neutrófilos obtida foi superior a 70%. Inicialmente, as células foram coletadas através da lavagem da medula, utilizando 5 mL de HBSS (Thermo Fisher) em tubos cônicos, e posteriormente centrifugados a 1.200 rpm em 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, as células foram ressuspensas em 3 mL de HBSS. Para o processo de separação foram preparados dois gradientes de Percoll (65% e 55%), os quais foram unidos em um tubo cônico, sendo o gradiente de 65% colocado por baixo do gradiente de 55%, e as células então depositadas por cima dos gradientes. A amostra foi então centrifugada a 2.400 rpm, por 30 minutos, a 4°C, sem aceleração e a desaceleração. Após o término desse intervalo de tempo, houve a formação de duas bandas bem visíveis, sendo que a primeira banda composta por células mononucleadas, enquanto que a segunda banda era composta por células polimorfonucleadas. Utilizando a pipeta Pasteur, a primeira banda foi retirada cuidadosamente, juntamente com o gradiente de percoll a 55%. Logo em seguida, a segunda banda contendo neutrófilos foi retirada cuidadosamente e transferida para um tubo cônico contendo 30 mL de PBS para lavagem das células. As células foram então centrifugadas a 2000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Posterior a centrifugação, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI (Vitrocell, Campinas/SP) contendo soro bovino fetal a 10% (Vitrocell, Campinas/SP). As células foram então contadas em câmara de *Neubauer*, e posteriormente ajustadas para a concentração necessária de acordo com o tipo de experimento realizado. Lâminas de citocentrifugado foram confeccionadas e coradas com Panótico, para posterior análise da pureza do experimento. Esta técnica de coloração possibilitou

visualizar os lobos nucleares das células, o que permitiu distinguirmos os diferentes tipos celulares ali presentes.

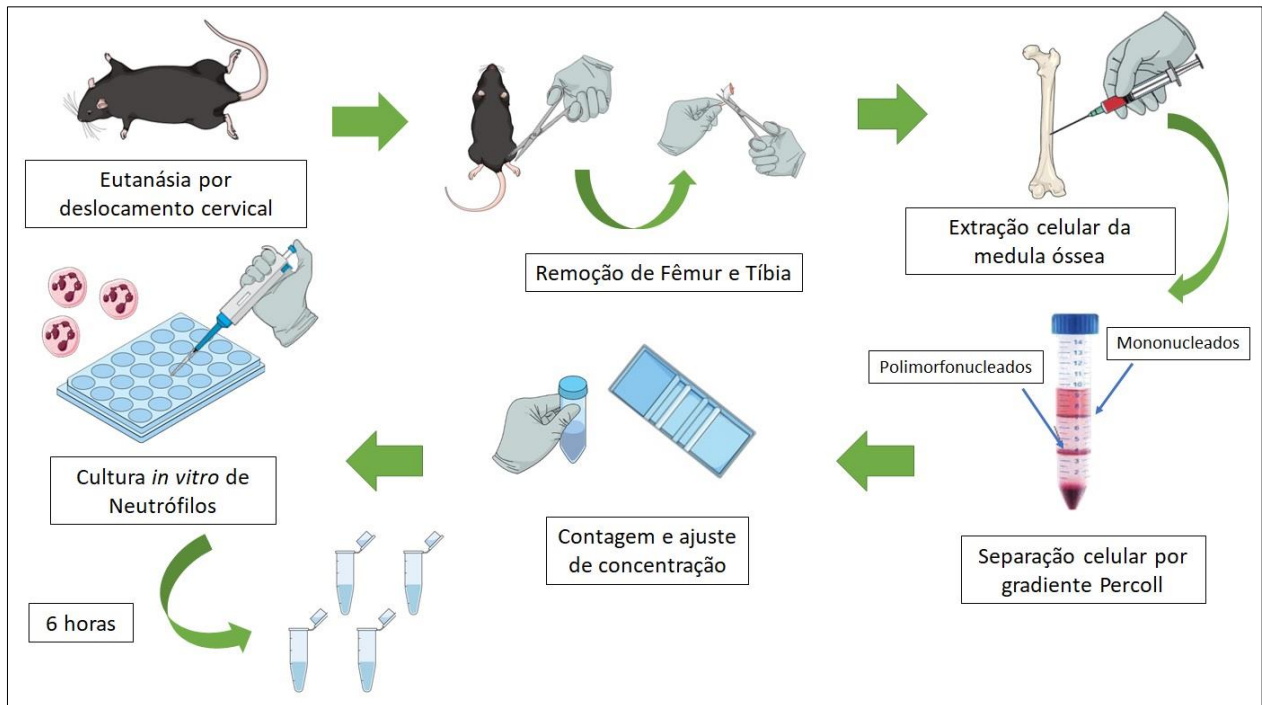


Figura 2: Esquema de delineamento experimental para isolamento de neutrófilos utilizando a técnica de gradiente Percoll.

Tratamentos com drogas que interferem na estabilização de HIF-1

Para que fosse possível analisar a relevância de HIF-1 em normóxia, neutrófilos isolados da medula óssea foram incubados com estabilizadores sintéticos, compostos que atuam na estabilização de HIF-1 na presença de oxigênio. Para tal, foram utilizados inibidores de PHDs (enzimas que hidroxilam HIF-1 α e, com isso induzem sua degradação): Iox-2 e Bay85-3934 (FLAMME *et al.*, 2014; MURRAY *et al.*, 2010). Juntamente foi utilizado o composto cloreto de cobalto (CoCl₂), composto esse que possui a capacidade de mimetizar condições hipóxicas, por atuar como inibidor competitivo de ferro, fator essencial a atividade da enzima PHD (FAN *et al.*, 2014). As concentrações dos inibidores foram inicialmente padronizadas.

Viabilidade Celular

Para a análise de viabilidade celular empregamos a anexina marcada com FITC, a qual faz a detecção de fosfatidilserina (PS) externalizada, e o 7-AAD, marcador de DNA não permeável a membrana. Neutrófilos isolados da medula óssea foram plaqueados na concentração de 4×10^6

células/mL a 37°C e mantidos em meio RPMI 1640 contendo soro bovino fetal (SBF 10%) sem antibiótico, e tratados com inibidores da enzima prolil-hidroxilase (Iox-2, Bay-85 e CoCl₂) em três concentrações distintas, e então incubados por um intervalo de 6 horas. Após o tempo de incubação, as células das placas foram coletadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS para lavagem. Em seguida, as células foram centrifugadas, o PBS foi descartado e então se iniciou o procedimento de marcação dos neutrófilos. Inicialmente as células foram ressuspensas em tampão de ligação da Anexina V. Em seguida, utilizamos 2 uL de Anexina V FITC (BioLegend). A marcação prosseguiu então com a adição de 1 uL de 7-AAD (Sigma), na concentração de 1 mg/mL, e finalizando o processo de marcação, foi utilizado o anti-Ly6G PE (PE anti-mouse Ly6G PE, clone 1A8, Biolegend, EUA). As células foram analisadas por citometria de fluxo. De acordo com a marcação das células, nós identificamos quatro populações: células viáveis, apoptose, apoptose tardia, e necrose, conforme mostrado na figura abaixo.

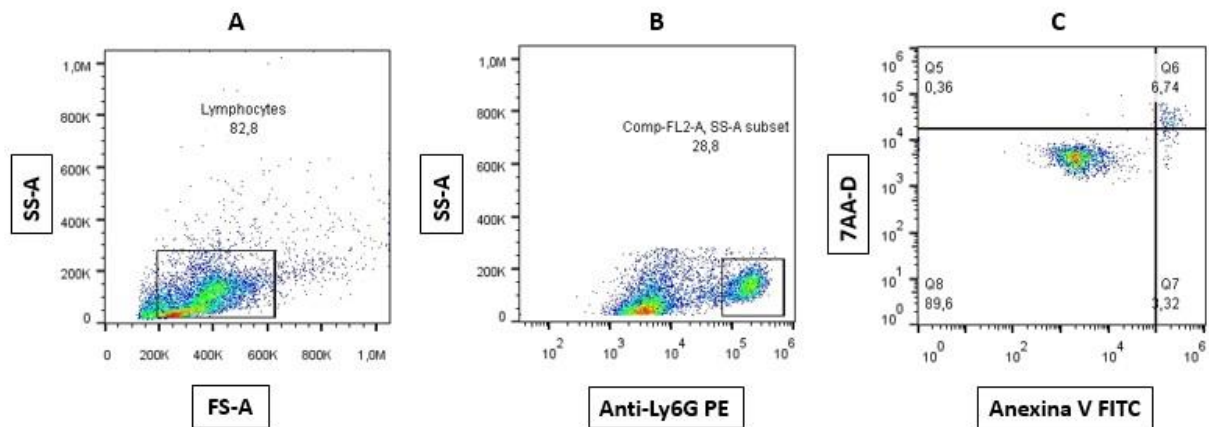


Figura 3: Análise de Viabilidade celular de neutrófilos *in vitro* por citometria de fluxo. Figura 3(A) refere-se a população de células totais em tamanho (FS-A) por granulosidade (SS-A). A figura 3(B) mostra a granulosidade (SS-A) por seleção da população celular positiva para neutrófilos (Anti-Ly6G PE), e a figura 3(C) apresenta quatro parâmetros de análise dos neutrófilos, sendo: Q5 (Necrose), Q6 (Apoptose Tardia), Q7 (Apoptose) e Q8 (Células Viáveis).

Animais HIF-1 reporter

Neste modelo repórter, os animais expressam o domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) do gene de HIF-1 fundido com um gene repórter bioluminescente luciferase. Desta forma, visando expressar universalmente o gene da ODD-luciferase em camundongos, neste modelo a luciferase é continuamente transcrita e traduzida em todas as células. Em condições de

normóxia, a luciferase é rapidamente degradada. Entretanto somente sob condições de hipóxia, a luciferase se acumula, onde ao fornecer o substrato luciferina, regiões em hipóxia nestes animais podem ser visualizadas e quantificadas (SAFRAN *et al.*, 2006).

Para as análises, foram realizadas culturas de neutrófilos utilizando a concentração de 4×10^6 células/mL. As células foram tratadas com drogas que interferem na ativação do fator de transcrição HIF-1, como Iox-2, Bay85-3934 e Cloreto de cobalto (CoCl_2) em diferentes concentrações. Adicionalmente, foram realizadas análises utilizando um mix de AGCCs (Acetato, Propionato e Butirato) em diferentes concentrações. As células e seus respectivos tratamentos foram incubados em estufa a 37°C por 2 horas, e posteriormente coletadas e transferidas para microtubos. Em seguida, as células foram lisadas, o que permitiu que a análise da atividade enzimática da luciferase fosse quantificada, por meio do kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para que realizássemos a quantificação de emissão de luminescência das amostras, foi utilizado o leitor de placas Biotek Synergy HT™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram normalizados através da quantificação de proteínas totais do lisado das células através do método de Bradford, sendo então calculada a razão da luminescência pela quantidade de proteínas presentes em cada amostra avaliada. As análises foram realizadas em duplicatas.

Ensaio em Hipóxia e Normóxia.

Tendo como objetivo realizar análises comparativas da resposta efetora *in vitro* de neutrófilos frente às bactérias *Aa* e *E.coli* nas condições de hipóxia e normóxia, foram realizadas culturas de neutrófilos utilizando uma concentração de 4×10^6 células/mL. As células foram incubadas em hipóxia (1% de O_2 e 5% de CO_2) e normóxia (21% O_2 e 5% de CO_2) a 37°C . Para que fosse possível a realização da cultura em hipóxia, foi utilizado o leitor de microplacas Cytation-5 (BioTeK), o qual permitiu a mimetização de ambientes hipóxicos através da regulação dos níveis de nitrogênio e dióxido de carbono. Quanto às culturas em normóxia, as placas foram incubadas em estufas de cultura celular a 37°C .

Ensaio com ácidos graxos de cadeia curta

Tendo como objetivo analisar o possível papel dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) na atividade de HIF-1 α em neutrófilos foram realizadas culturas de neutrófilos com esses

metabólicos bacterianos. Nesses experimentos utilizou-se três concentrações de uma mistura de AGCCs (acetato, propionato e butirato) onde acetato encontrava-se a 26 mM, butirato a 10 mM, e propionato a 2,5 mM como concentrações iniciais. Foram realizadas três diluições nas proporções de 1/2 (Ac 13 mM, Bt 5 mM e Pr 1.25 mM), 1/5 (Ac 5,2mM, Bt 2mM e Pr 0,5mM) e 1/10 (Ac 2,6mM, Bt 1mM e Pr 0,25mM). Essas concentrações foram escolhidas baseando-se no artigo de LU *et al.* (2014), que descreve as concentrações de AGCCs que encontradas no fluido gengival crevicular de indivíduos que apresentam quadros de periodontite agressiva generalizada, condição infecciosa na qual há envolvimento da bactéria Aa.

Parâmetros funcionais de neutrófilos avaliados.

Neutrófilos foram analisados quanto a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias, capacidade de fagocitose e *killing* de bactérias.

Produção de Citocinas.

Sobrenadantes de culturas celulares foram quantificadas para mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β) e anti-inflamatório (IL-10) através da técnica de ELISA (imunoensaio enzimático) utilizando o Kit Duo Set (R&D System, Mineapolis, MN, USA).

Os neutrófilos foram plaqueados na concentração de 4×10^6 células/mL a 37°C e mantidos em meio RPMI 1640 contendo soro bovino fetal (SBF 10%) sem antibiótico. Para os ensaios com estabilizador sintético de HIF-1 α , Bay85-3934 (5,0 uM e 10 uM), as células foram pré-tratadas inicialmente por 2 horas, e posteriormente estimuladas com a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) ou LPS (1 ug/mL, *E.coli* 0111:B4) por mais 4 horas. Com relação aos ensaios em hipóxia e normóxia, as células foram estimuladas com a bactéria Aa e *E.coli* por 6 horas. A condição de hipóxia foi realizada por meio do leitor Cytation-5 (mimetiza ambientes de hipóxia), enquanto que para a condição de normóxia, as células foram mantidas em estufa de cultura celular. Sobre os ensaios com AGCCs, as células foram tratadas com o mix de AGCCs em diferentes concentrações e incubadas com Bay-85 ou em hipóxia/normóxia, e então estimuladas com a bactéria Aa. Após o tempo total de incubação, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos e congelados (-80°C).

As quantificações seguiram procedimentos padrões estabelecidos pelo Kit. Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura *overnight*. No dia

seguinte, foi realizado o bloqueio das placas com solução contendo 0,1% de albumina pelo intervalo de 1 hora. Posterior ao tempo de bloqueio, realizou-se a adição das amostras e padrões internos. A placa foi mantida ao abrigo da luz por 1 hora, em temperatura ambiente. Após três lavagens (PBS 0,05%-*Tween 20*) foi adicionado anticorpo de detecção. Após passadas 2 horas de incubação, foram feitas três lavagens e em seguida adicionada solução contendo estreptavidina (1:200), a qual foi mantida ao abrigo da luz por 20 minutos. Após novas lavagens, foi adicionado o substrato (Solução A e B) e as placas foram mantidas ao abrigo da luz por mais 20 minutos. Por fim, adicionou-se solução de HCl 2 M para encerrar a reação e então foi realizada a leitura da placa no espectrofotômetro em 450 nm.

Análise de Fagocitose

Os ensaios de fagocitose foram realizados utilizando 5×10^5 neutrófilos e $2,5 \times 10^7$ bactérias (proporção de 1:50 células por bactérias). As células de interesse foram tratadas com inibidor de PHD Bay85-3934 a 5,0 uM ou 10,0 uM ou então mantidas em hipóxia (1% de O₂ e 5% de CO₂) ou normóxia (21% O₂ e 5% de CO₂).

Obtenção de Bactérias

As bactérias de interesse foram retiradas do meio ágar BHI (Aa) ou ágar L.A (*E.coli*) e transferidas para microtubos com 1 mL de PBS. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 12.000 RPM por 5 minutos, e as bactérias foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Após efetuadas as duas lavagens em PBS, o material foi ressuspensado em 1 mL de PBS e foi realizada a quantificação seguindo os parâmetros da escala de McFarland. A quantidade de bactéria que seria necessária para a análise foi então transferida para um microtubo, centrifugada a 12.000 RPM por 5 minutos a 4°C.

A opsonização das bactérias foi realizada com soro murino (100 uL no total) previamente coletado e armazenado no freezer. As bactérias foram ressuspensas no soro murino e mantidas sob agitação por um intervalo de 30 minutos, a 400 RPM, a 37°C. Em específico para a bactéria Aa, finalizado o processo de opsonização, as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 200 uL de PBS com pH: 9,0 e juntamente adicionado 1 uL de sonda pHRedo (Invitrogen). Não foi utilizado sonda pHRedo na bactéria *E.coli*, pois as mesmas expressam a proteína GFP.

As bactérias então foram mantidas sob agitação por 400 RPM, a 37°C por um intervalo de 30 minutos. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 5 minutos a 4°C, e logo em seguida lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas novamente seguindo o mesmo padrão de centrifugação anterior. Ao final as bactérias foram ressuspensas em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal (SBF), sem antibiótico, em volume ajustado de acordo com a concentração desejada.

Obtenção de Células e condições de tratamento.

Após ajuste do volume e concentração das células, as mesmas foram incubadas em normóxia com o inibidor de PHD ou então incubadas em hipóxia (1% de O₂ e 5% CO₂) ou normóxia (21% de O₂ e 5% CO₂) em conjunto das bactérias (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 e *Escherichia coli*), por um intervalo de 2 horas. Também foram realizados ensaios utilizando mix de AGCCs nas condições de 1/2 (Ac 13mM, Bt 5mM e Pr 1.25mM) e 1/5 (Ac 5,2mM, Bt 2mM e Pr 0,5mM).

Após a incubação, as células foram coletadas, transferidas para microtubos e centrifugadas por 2.000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 500 uL de PBS e centrifugado mais duas vezes com PBS para lavagem. Posterior à lavagem, as amostras foram marcadas com anticorpos anti-Ly6G-APC (APC anti-mouse Ly-6G, clone 1A8, Biolegend, EUA). Para este procedimento, as células foram ressuspensas em 100 uL de PBS, e foi adicionando 1 uL do anticorpo. As células foram incubadas ao abrigo de luz por um intervalo de 15 minutos. Passado esse intervalo, foram adicionados 200 uL de PBS e o material foi então transferido para tubos específicos de citometria. Em seguida, foi adicionado Azul de Tripan diluído a 0,5% e então feita a leitura no Citômetro de Fluxo FACS Calibur (BD).

Sobrevivência bacteriana (killing)

Neutrófilos foram plaqueados na concentração de 4×10^6 células/mL a 37°C e mantidos em meio RPMI 1640 contendo soro bovino fetal (SBF 10%) sem antibiótico por duas horas sob tratamento de Bay-85. Posterior a este intervalo, foram adicionadas as bactérias Aa ou *E.coli* (MOI 1:10) previamente opsonizadas com soro murino. Após duas horas de incubação, as bactérias foram coletadas, diluídas serialmente em PBS estéril (pH 7,4) e então plaqueadas. Para Aa, as bactérias foram então plaqueadas em ágar BHI chocolate suplementado com hemina e menadiona e as placas

foram mantidas em anaerobiose, por 3-5 dias à 37°C. Enquanto que para a bactéria *E.coli*, as bactérias foram plaqueadas e cultivadas em aerobiose em meio ágar L.A, a 37°C e mantidas por 2-3 dias. Para ambas as bactérias, após os dias de crescimento, foi possível determinar o número de CFUs em cada placa. Estes números representam a quantidade de bactérias que sobreviveram junto aos neutrófilos após as 2 horas de incubação.

Experimentos *in vivo*

Câmara subcutânea

A implantação da câmara foi realizada de acordo com protocolo proposto por Genco et al. (1991). As câmaras foram feitas utilizando-se de fio de aço inoxidável e tinham 0,5 cm de diâmetro e 1 cm de comprimento. Posterior a confecção da câmara, os materiais utilizados nos procedimentos foram esterilizados em autoclave.

Os camundongos foram inicialmente anestesiados i.p. (intra-peritonealmente) com xilazina (Anasedan, Ceva) e quetamina (Dopalen, Ceva) nas concentrações respectivas de 10 mg/Kg e 100 mg/Kg de peso corpóreo. Em seguida, realizamos a tricotomia do quadrante inferior do dorso do animal utilizando lâminas, e então foi feita à assepsia da região com álcool 70%. No procedimento cirúrgico, realizou-se uma incisão de 1,5 cm no dorso do animal, permitindo assim a inserção da câmara subcutaneamente. Finalizada a inserção, o local onde foi realizado a incisão foi fechada com cola instantânea (Super Bonder, Henkel), e aplicado degermante de iodopolividona (Riodeine, Rioquímica, 1% de iodo). Os animais foram mantidos em recuperação por um intervalo de 10 dias, sendo que no primeiro dia os mesmos receberam analgésico aplicado i.p. (cetoprofeno). Posterior aos dias de recuperação, a câmara de aço foi totalmente recoberta por tecido epitelial, sendo que seu interior permaneceu livre, local onde foi feito posteriormente a inoculação da bactéria (Figura 4).

Infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2

Posterior ao período de recuperação, os animais foram anestesiados com isoflurano a 2% (BioChimico) por via inalatória. A região onde a câmara foi implantada foi desinfetada com álcool 70% e então foi inoculado 1×10^8 UFCs/100 uL da bactéria Aa diretamente no interior da câmara, utilizando seringas hipodérmicas e agulhas de 25G estéril (BD - São Paulo, SP). Após o procedimento de inoculação da Aa, parte da suspensão inicial de bactérias inicial foi plaqueada em

meio BHI chocolate suplementado para contagem de UFCs, visando à determinação do número inicial de bactérias, além de possibilitar análises para possíveis contaminações.

Coleta e análise do material

Após 24 horas da inoculação da bactéria na câmara, os animais foram eutanasiados com uso de Isoflurano a 2% (BioChimico) e posterior deslocamento cervical. O exsudato formado no interior da câmara foi então coletado de forma conjunta a 40 uL de EDTA 0,5M estéril em seringas hipodérmicas (BD – São Paulo, SP). O material foi então dividido de forma que fosse possível avaliar posteriormente alguns parâmetros como produção de citocinas, migração de leucócitos e *killing* (sobrevivência bacteriana) (Figura 4).

Análise de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatório

Para a avaliação dos mediadores de interesse (TNF- α , IL-1 β , IL-10) foi utilizado cerca de 50 uL do material obtido no interior da câmara. As análises foram realizadas por meio da técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do Kit Duo Set (R&D System, Mineapolis, MN, USA).

Análise qualitativa e quantitativa de leucócitos

As análises para avaliação do total de células presentes no interior da câmara foram realizadas utilizando câmara de Neubauer. Para tal, foi adicionado solução para lise de hemácias em 10 uL do exsudato e centrifugadas por 10 minutos a 2.000 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e então o pellet celular foi ressuspensionado em PBS estéril. Em seguida, as células foram então contadas utilizando a câmara de Neubauer.

Para que pudesse ser feita a diferenciação morfológica das células (neutrófilos e células mononucleadas) presentes no exsudato coletado, foi utilizado 20 uL do exsudato coletado. Foram realizadas lâminas de citocentrifugado (Citospin/INCIBRÁS), e as mesmas coradas com o Kit Panótipo Rápido (LABORCLIN). As lâminas foram posteriormente analisadas em microscópio óptico e cerca de 100 a 200 células foram contadas e diferenciadas em neutrófilos e mononucleares.

Avaliação da capacidade de *killing* das células imunes

Para realização deste parâmetro, 20 uL do exsudato obtido no interior da câmara foram diluídos serialmente em PBS estéril (pH=7,4) e então plaqueados em ágar BHI chocolate suplementado com hemina e menadiona. As placas foram mantidas em anaeróbiose, por 3-5 dias à 37°C, seguido pela determinação do número de UFCs. Estes números representam a quantidade de bactérias que sobreviveram no interior da câmara após 24 horas de incubação.

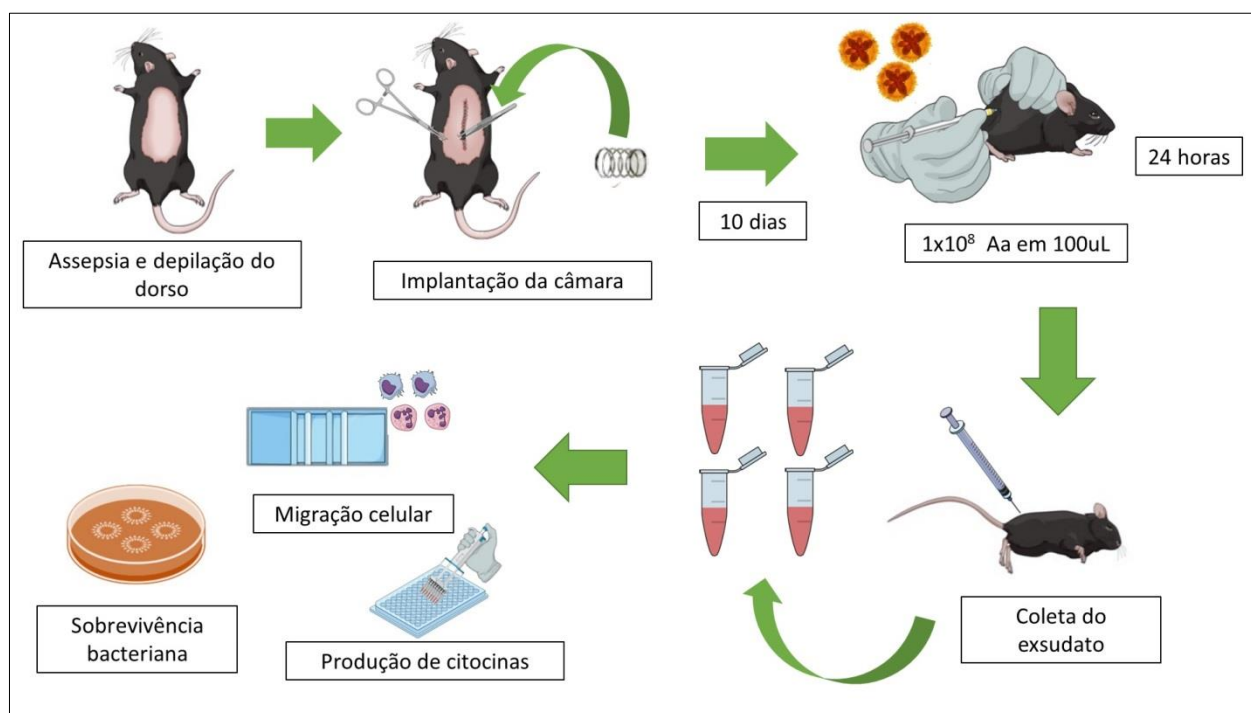


Figura 4: Esquema de delineamento experimental da inserção da câmara subcutânea e dos parâmetros avaliados.

Análise estatística dos resultados

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Todos os resultados foram inicialmente analisados quanto à normalidade usando os testes de D'Agostino/Shapiro-Wilk. Comparações entre dois diferentes grupos experimentais foram realizadas por teste t ou teste de Mann Whitney. Para mais de dois grupos, os dados foram comparados por ANOVA com pós-teste de Tukey. Análises foram realizadas utilizando o programa Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análises de viabilidade celular de neutrófilos com estabilizadores sintéticos de HIF-1 α .

Sabe-se que HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico, composto por subunidades alfa (HIF-1 α) e beta (HIF-1 β). Enquanto a HIF-1 β é expressa de forma constitutiva, a HIF-1 α é regulada pela presença ou ausência de oxigênio local. Na presença de oxigênio, enzimas prolil-hidroxilases atuam de forma direta para que ocorra a degradação proteossômica de HIF-1 α , sendo este mecanismo mediado pelo Fator de Von Hippel Lindau (VHL). Desta maneira, visamos inicialmente avaliar se estabilizadores sintéticos de HIF-1 (Iox-2, Bay85-3934 e CoCl₂) em concentrações pré-estabelecidas, poderiam apresentar alguma citotoxicidade para neutrófilos em culturas *in vitro*.

Para a realização desta análise, neutrófilos extraídos da medula óssea foram mantidos em cultura celular sob condição de normóxia por 6 horas na presença de Iox-2 (10 e 20 μ M), Bay85-3934 (5 μ M e 10 μ M) ou CoCl₂ (100 μ M e 250 μ M). Passado o tempo de incubação, as células foram marcadas com Anexina V, anti-Ly6G PE, e 7-AAD e posteriormente analisadas via citometria de fluxo.

Conforme apresentado na Figura 5, conclui-se que as células mantidas com os estabilizadores nas diferentes concentrações, não apresentaram qualquer sinal de citotoxicidade quando comparados ao grupo controle, principalmente quanto a viabilidade dos neutrófilos. Sendo assim, esses resultados viabilizaram a utilização dos estabilizadores de HIF-1 nas concentrações testadas em análises posteriores.

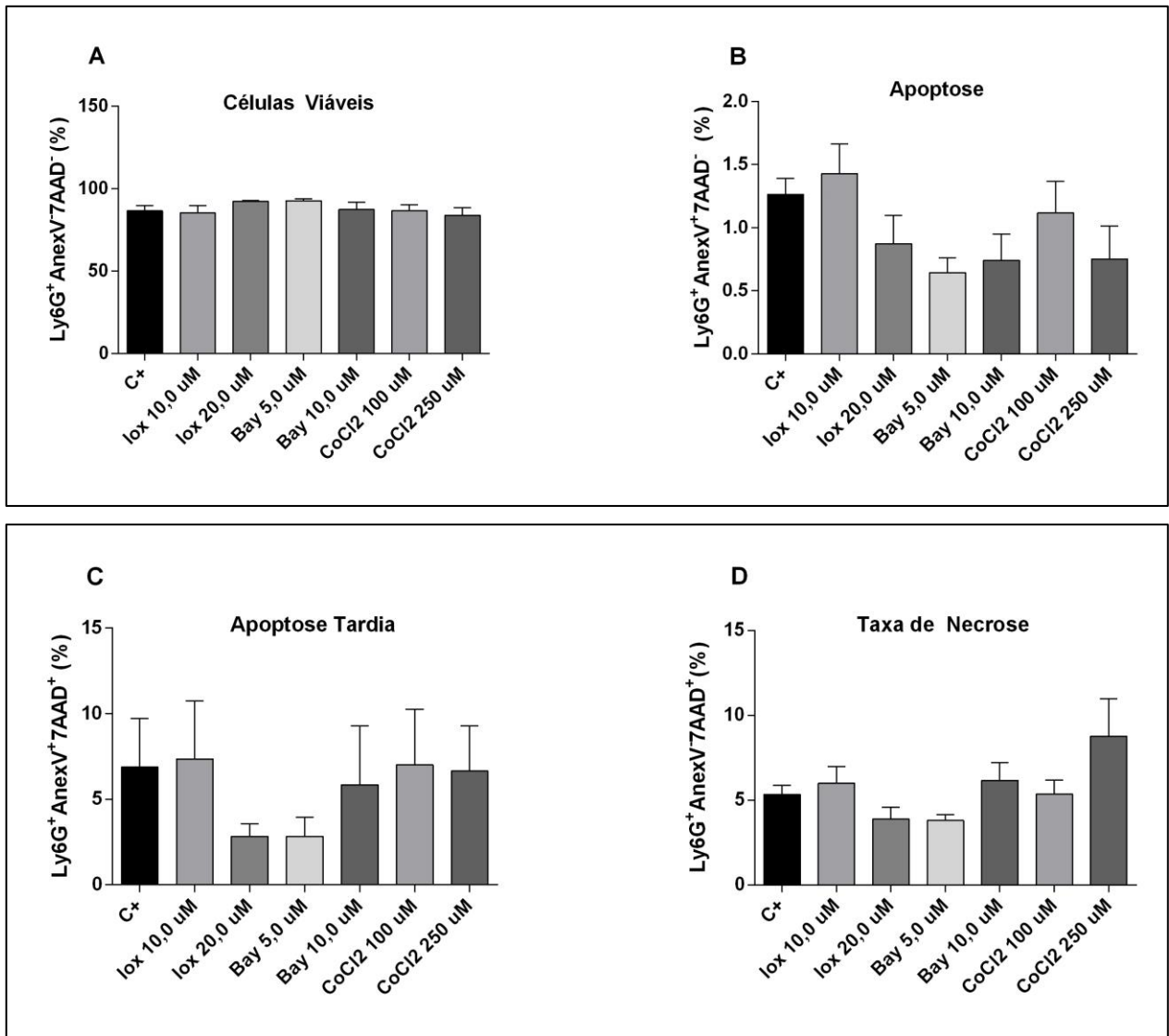


Figura 5: Efeito dos estabilizadores sintéticos de HIF-1 sobre a células viáveis (A), apoptose (B), apoptose tardia (C) e taxa de necrose (D) de neutrófilos in vitro em cultura com 6 horas de incubação. O grupo controle (C+) foi utilizado como referência. Resultados apresentados como média e erro da média em dois experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Análise da eficácia de estabilizadores sintéticos de HIF-1 α em neutrófilos.

Após os testes de citotoxicidade, nos quais pudemos ver que as concentrações de escolha dos estabilizadores de HIF-1 α não apresentavam efeitos citotóxicos para os neutrófilos, o próximo passo foi descobrir quais dos estabilizadores sintéticos apresentavam maior eficácia em estabilizar HIF-1 em neutrófilos. Utilizando animais Odd-luciferase, neutrófilos foram isolados da medula óssea, tratados com três estabilizadores sintéticos distintos em diferentes concentrações e

incubados por duas horas. Nossos resultados indicam que o estabilizador sintético Bay-85-3934 nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M foi capaz de estabilizar HIF-1 nestas células (**Figura 6**). A partir deste resultado, dentre todos estabilizadores avaliados, apenas Bay-85-3934 (5 μ M e 10 μ M) foi utilizado nas análises posteriores.

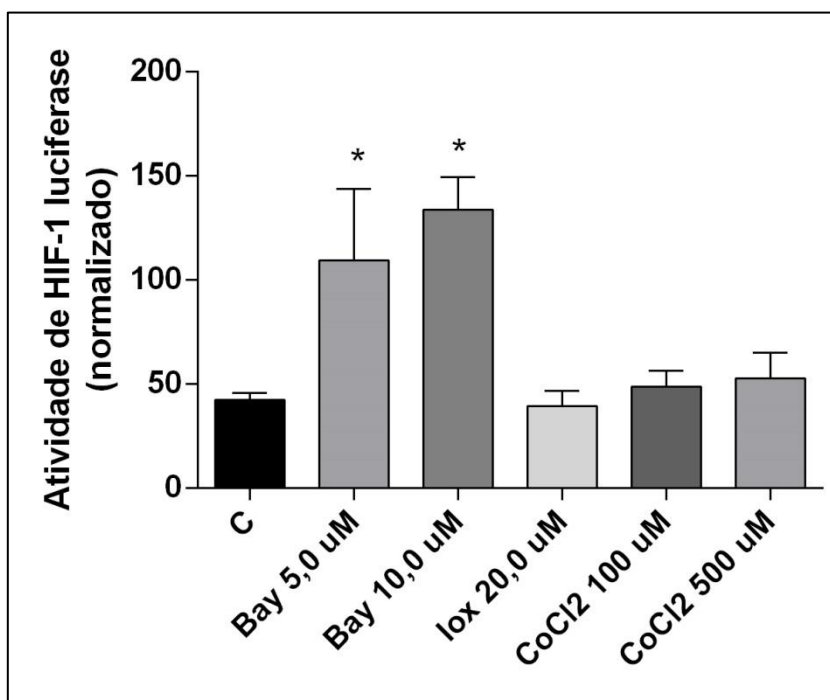


Figura 6: Análise da eficácia de estabilizadores sintéticos de HIF-1 em neutrófilos. Os neutrófilos foram tratados *in vitro* com os estabilizadores durante 2 horas. O grupo controle (C) foi utilizado como referência. Dados de luminescência foram normalizados por proteína total das amostras. Resultados apresentados como média e erro da média em 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Considerando os resultados obtidos, realizamos uma análise temporal do efeito do Bay-85-3934. Para tal, os neutrófilos foram isolados da medula óssea de animais Odd-luciferase, e em seguida tratados com Bay a 10 μ M por diferentes intervalos de tempo. Nesses experimentos vimos que somente a partir de 60 minutos de incubação há estabilização significativa de HIF-1 nessas células (Figura 7). A partir deste resultado ficou estabelecido que todos ensaios posteriores com esse composto seriam realizados com de 1 a 2 horas de incubação das células.

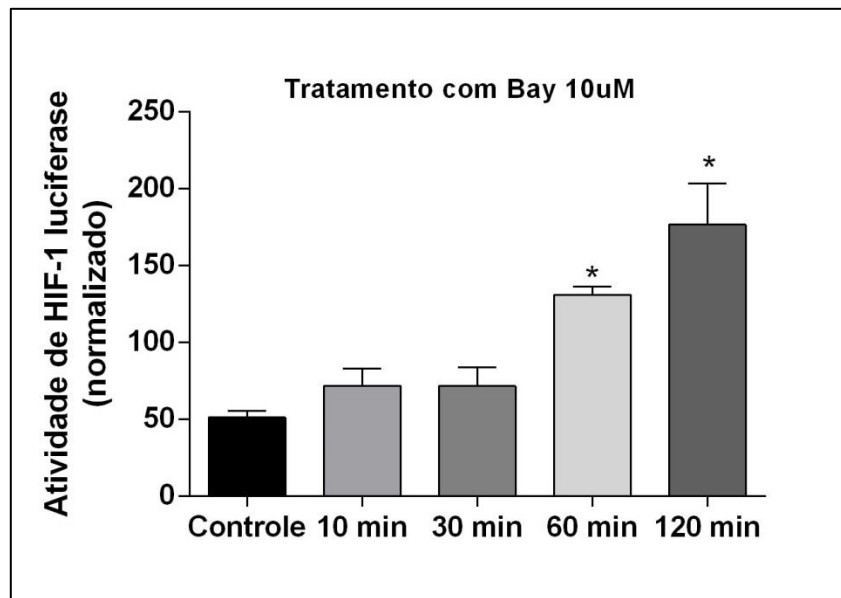


Figura 7: Análise temporal da estabilização de HIF-1 por Bay85-3934 em neutrófilos. Os neutrófilos foram tratados *in vitro* com Bay-85-3934 por intervalos de tempo distintos. O grupo controle foi utilizado como referência. Resultados apresentados como média e erro da média em 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a produção de citocinas *in vitro*.

Com o intuito de analisarmos o efeito do estabilizador sintético de HIF-1 (Bay-85-3934) sobre a produção de citocinas por neutrófilos *in vitro*, células isoladas da medula óssea foram tratadas previamente por 2 horas com o estabilizador e posteriormente estimuladas com Aa ou LPS (células incubadas a 37°C em estufa por mais 4 horas). Finalizado o período de incubação foram coletados os sobrenadantes das amostras, os quais foram posteriormente utilizados na quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 pelo método de ELISA.

Vale ressaltar que em todos os experimentos foi realizado controle negativo (células não estimuladas com Aa ou LPS, não apresentado nos gráficos) e que as células responderam conforme esperado a estimulação. Como mostrado na **Figura 8**, as células tratadas com o estabilizador sintético Bay-85 sob estímulo de Aa aumentaram a produção da citocina IL-1 β quando comparadas ao grupo controle (**Figura 8B**). Contudo, não foi visto o mesmo perfil de resposta quanto às citocinas IL-10 e TNF- α (**Figura 8C e A**).

Quanto aos neutrófilos estimulados com LPS, não houve diferenças significativas quanto a produção de IL-10 e IL-1 β (**Figura 9B e C**). Entretanto, nossos resultados mostraram

redução na produção de TNF- α (**Figura 9A**) por células mantidas na presença de estabilizador de HIF-1 quando comparadas ao grupo controle.

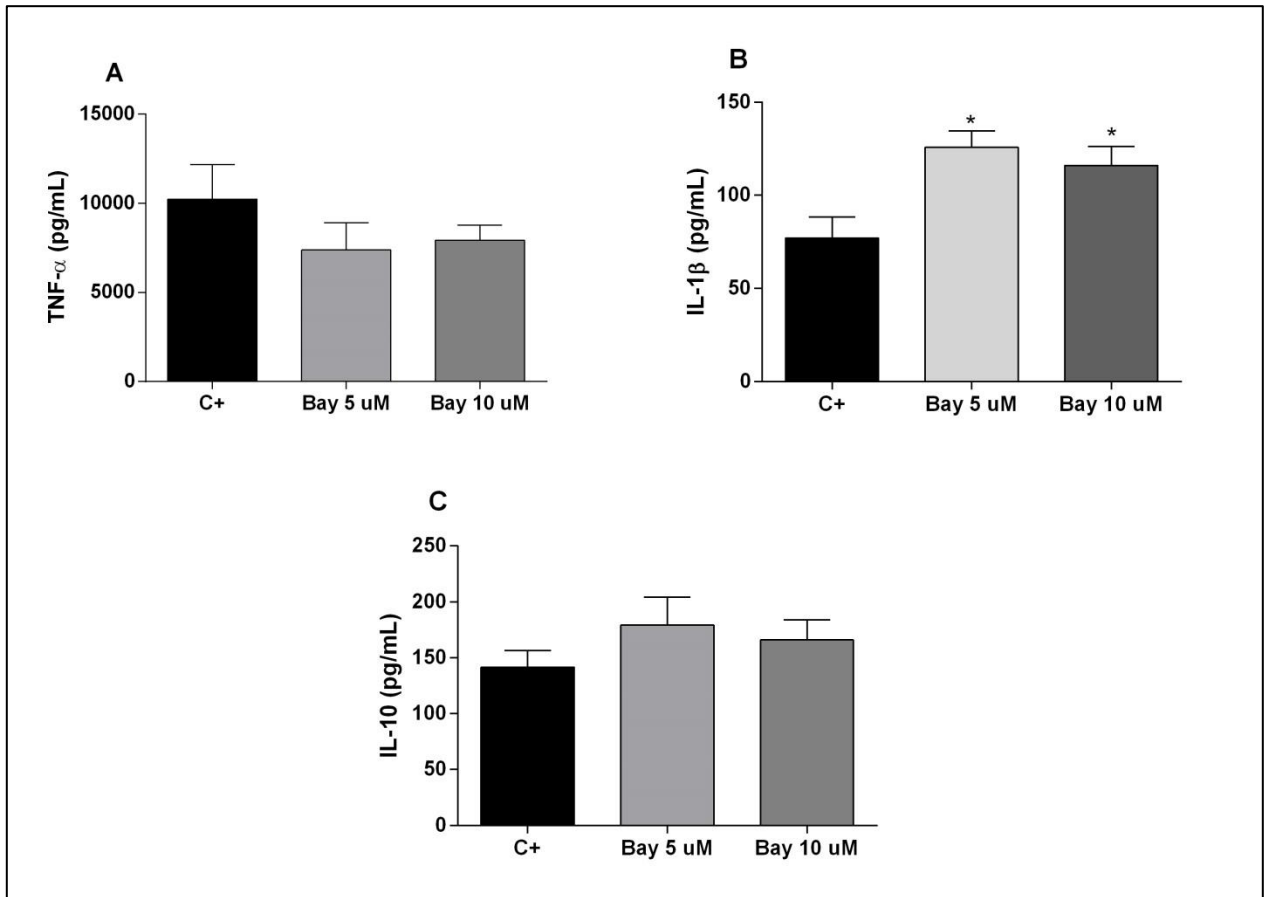


Figura 8: Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 sobre a produção dos mediadores inflamatórios por neutrófilos. As células foram pré-tratadas com Bay-85 por 2 horas e, posteriormente, incubadas por 4 horas sob estímulo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (MOI: 1:10). O grupo controle foi utilizado como referência. Resultados apresentados como média e erro da média em 3 experimentos independentes (N=6). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

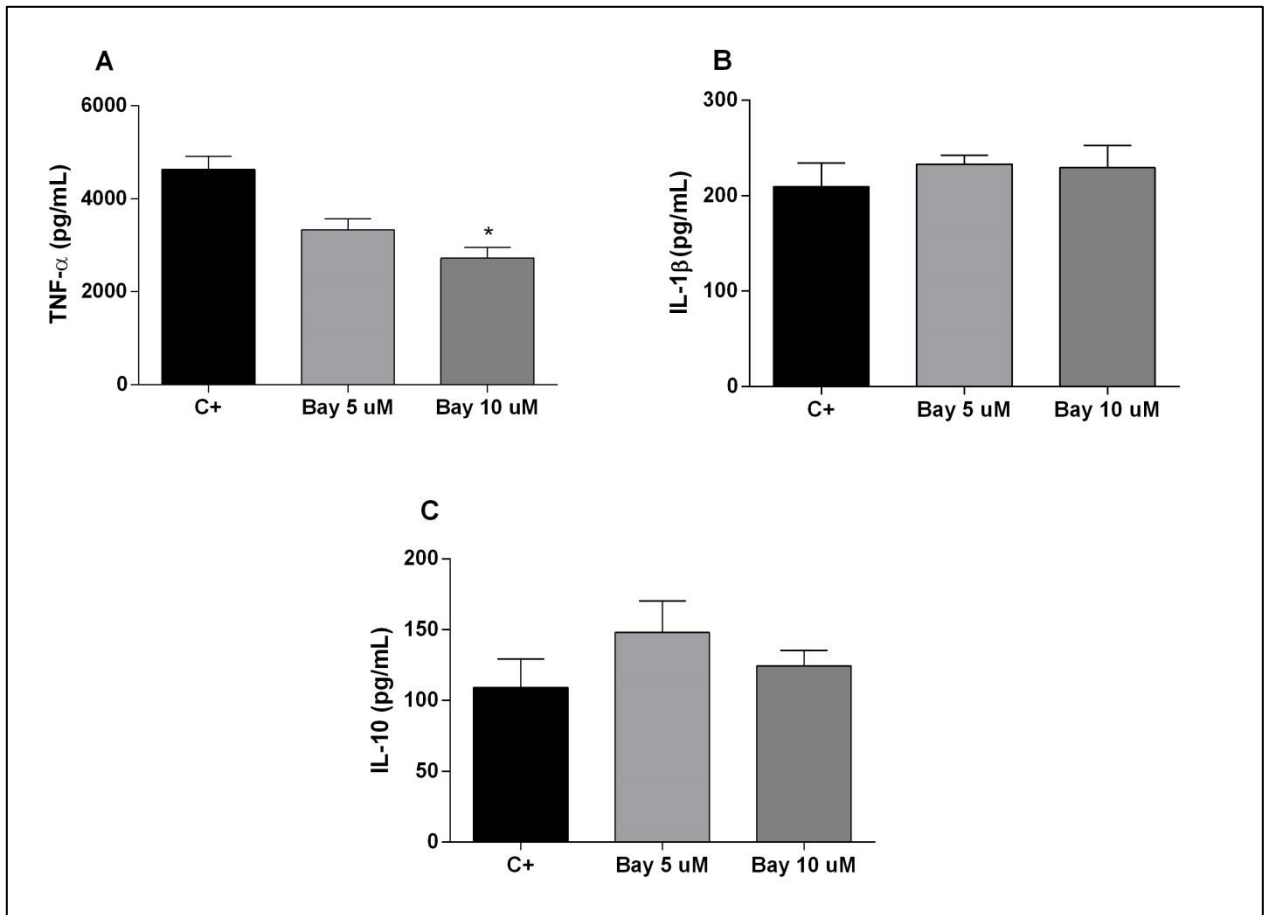


Figura 9: Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 sobre a produção dos mediadores inflamatórios por neutrófilos. As células foram pré-tratadas com Bay-85 por 2 horas e posteriormente incubadas por 6 horas sob estímulo de LPS. O grupo controle (C+) foi utilizado como referência. Resultados apresentados como média e erro da média em 3 experimentos independentes (N=6). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade fagocítica *in vitro*

Neutrófilos isolados da medula óssea, foram pré-tratados com Bay-85-3934 por duas horas. Posteriormente, foram adicionadas as bactéria Aa ou *E.coli*, previamente opsonizadas. No caso da bactéria Aa, a mesma foi previamente marcada com sonda pHrodo (sonda fluorescente sensível às mudanças de pH e que serve como indicador de fagocitose dessas células (SIMONS, 2010)). Passadas duas horas, após as bactérias terem sido adicionadas as culturas, as células foram coletadas e então marcadas com anti-Ly6G e analisadas via citometria de fluxo.

Nestes ensaios analisamos a porcentagem de neutrófilos com bactérias internalizadas (Aa ou *E. coli*). Além disso, avaliamos a média de fluorescência nas células que fagocitaram

bactérias, parâmetro esse que nos dá uma idéia do número de bactérias fagocitadas por célula. A capacidade fagocítica e a média de fluorescência dos neutrófilos tratados com Bay-85-3934 e incubados com Aa não foi modificada (**Figura 10 A e B**). O mesmo perfil de resposta foi verificado para as células incubadas com *E.coli* (**Figura 12 A e B**). Esses resultados nos indicam que a ativação de HIF-1 em neutrófilos *in vitro* mediante a Bay-85-3934 não exerce ação modulatória sobre este parâmetro.

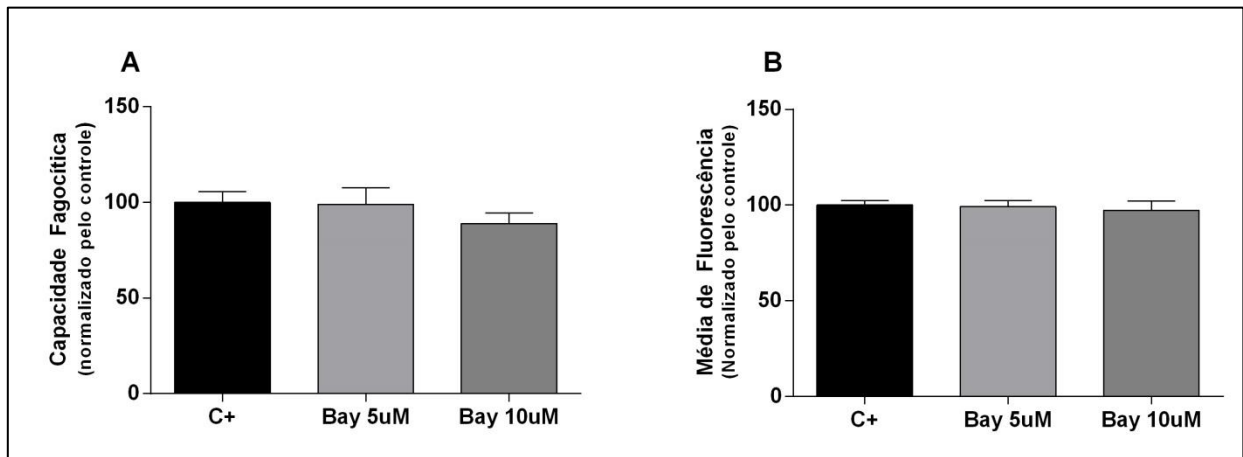


Figura 10: Efeito de estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos frente a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). As células foram pré-tratadas com Bay-85-3934 por 2 horas e posteriormente incubadas por mais 2 horas com Aa (MOI: 1:50). As células foram marcadas com anticorpos anti-Ly6G-APC, e depois lidas no citometro de fluxo. Os resultados obtidos referentes a percentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias (A) e média de fluorescência por neutrófilos que fagocitou bacteria (B) foram normalizados pela condição controle (C+ = 100%). Resultados apresentados como média e erro da média de 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

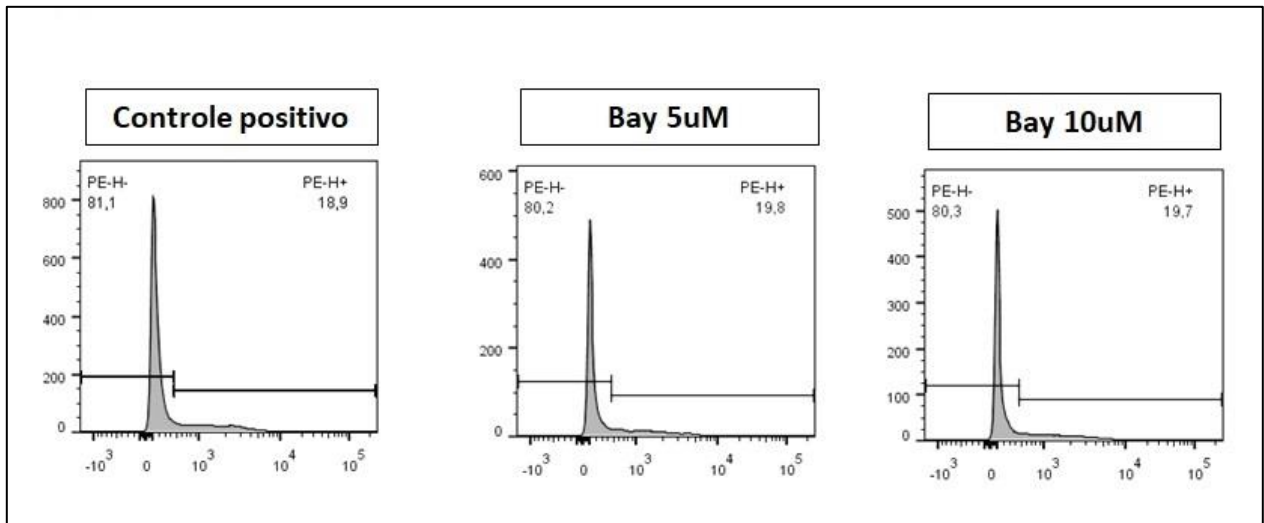


Figura 11: Gráficos representativos das taxas de fagocitose de neutrófilos pré-tratados com estabilizador sintético de HIF-1 por 2 horas e posterior estimulado com Aa por mais 2 horas. Os gráficos foram gerados pelo programa *FlowJo v.X.0.7*

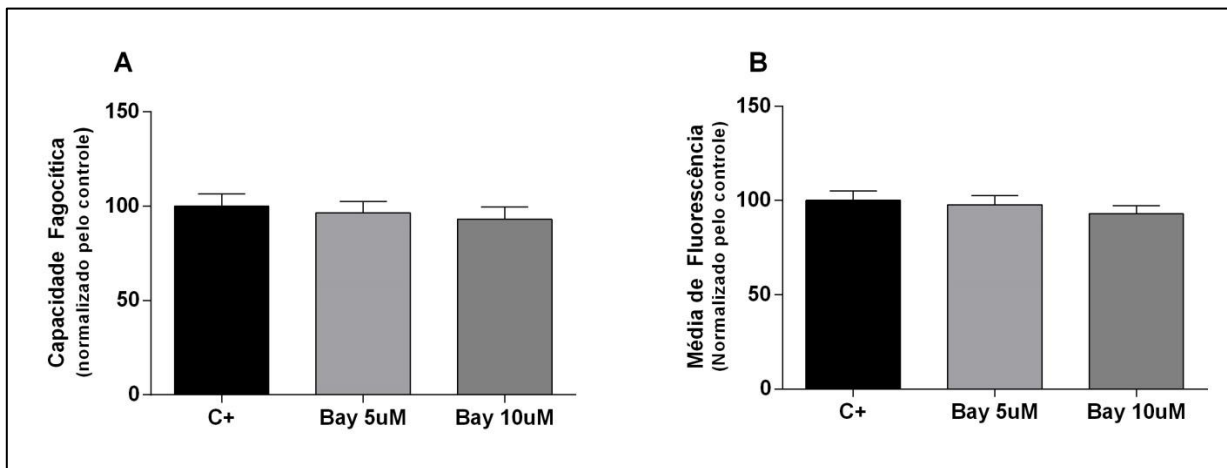


Figura 12: Efeito de estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos frente a bactéria *Escherichia coli*. As células foram pré-tratadas com Bay-85-3934 por 2 horas e posteriormente incubadas por mais 2 horas na presença da bactéria *E.coli* (MOI: 1:50). As células foram marcadas com anticorpos anti-Ly6G APC, e depois analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos referentes a percentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias (A) e média de fluorescência por neutrófilos que fagocitou bactéria (B) foram normalizados pela condição controle (C+ = 100%). Resultados apresentados como média e erro da media em 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

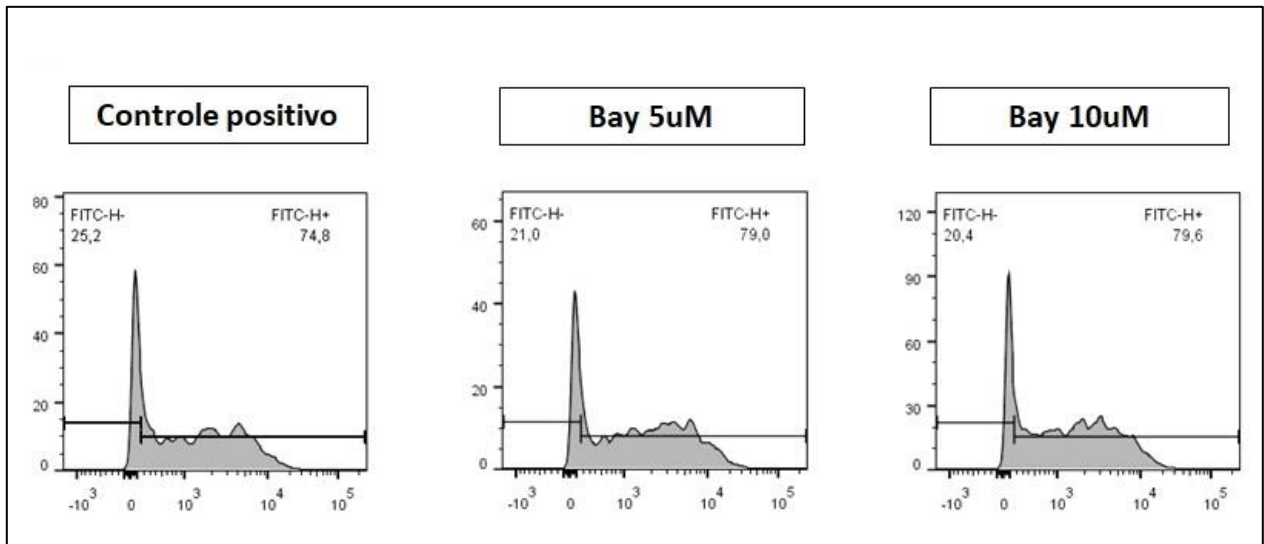


Figura 13: Gráfico representativos das taxas de fagocitose de neutrófilos pré-tratados com estabilizador sintético de HIF-1 por 2 horas e posterior estimulado com *E.coli* por mais 2 horas. Os gráficos foram gerados pelo programa *FlowJo v.X.0.7*.

Efeito do estabilizador sintético de HIF-1 α sobre a capacidade de killing *in vitro*.

As células foram inicialmente pré-tratadas com Bay85-3934 em duas concentrações e, posteriormente, incubadas com bactérias por mais duas horas. Passado este período de tempo, de forma resumida, as bactérias não internalizadas foram diluídas serialmente, plaqueadas e mantidas em anaerobiose para *Aa*, ou em aerobiose para *E.coli*, a 37°C. Após os dias de crescimento em estufa, pôde-se determinar o número de UFCs presentes em cada placa. Um exemplo de crescimento bacteriano pode ser visto na placa de BHI chocolate (**Figura 16**). Este crescimento de colônias está estritamente associado à capacidade dos neutrófilos de destruírem as bactérias.

Nossos resultados mostram que a estabilização de HIF-1 α em neutrófilos nas presentes condições resulta em uma redução significativa de bactérias viáveis na concentração de Bay 5uM nos ensaios com *Aa* (**Figura 14**). Entretanto, o mesmo não foi visto, quando os neutrófilos foram estimulados por *E.coli*. (**Figura 15**).

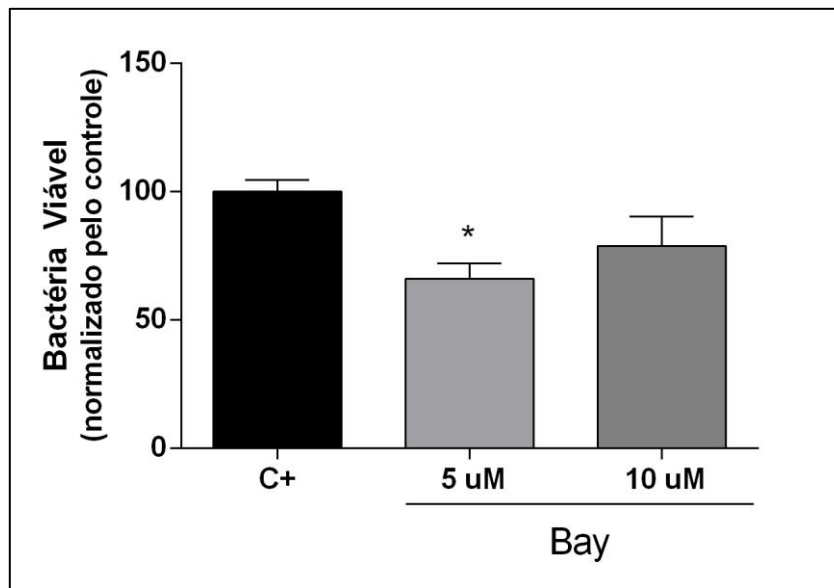


Figura 14: Análise da capacidade de *killing* de neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1. As células foram pré-tratadas com Bay-85 por 2 horas e posteriormente incubadas por mais 2 horas sob estímulo da bactéria Aa. Posterior ao tempo de incubação, as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar BHI chocolate suplementado com hemina e menadiona, onde as placas foram mantidas em anaerobiose, por 3-5 dias à 37°C. Após os dias de crescimento, foi possível determinar o número de UFCs em cada placa. Os grupos foram normalizados pela condição controle (C+ = 100%). Resultados apresentados como média e erro da média em 3 experimentos independentes (N=6). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

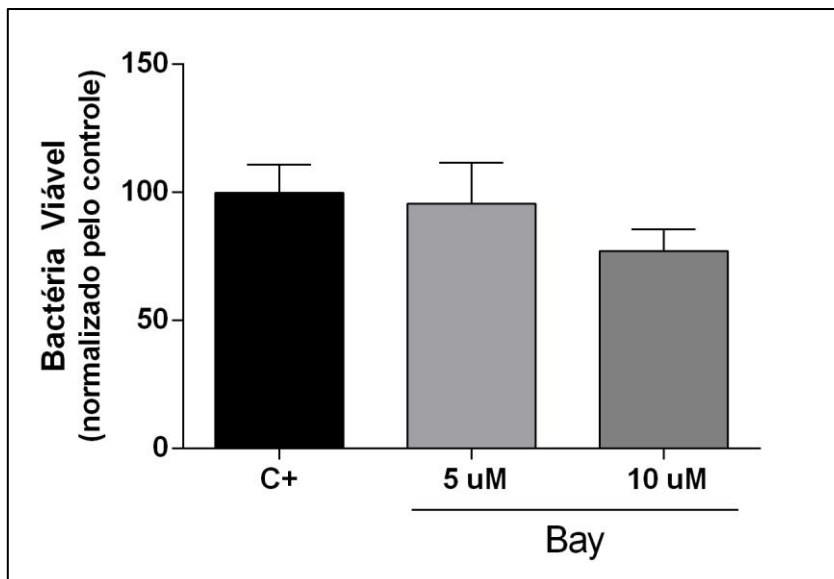


Figura 15: Análise da capacidade de *killing* de neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1. As células foram pré-tratadas com Bay-85 por 2 horas e posteriormente incubadas por mais 2 horas sob estímulo da bactéria

E.coli. Posterior ao tempo de incubação, as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas e cultivadas em aerobiose em meio ágar L.A a 37°C e mantidas por 2-3 dias. Após os dias de crescimento, foi possível determinar o número de UFCs em cada placa. Os grupos foram normalizados pela condição controle (C+ = 100%). Resultados apresentados como média e erro da media em 3 experimentos independentes (N=6). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.



Figura 16: Exemplo de placa ágar BHI chocolate com bactérias plaqueada em três diferentes diluições, mostrando o crescimento bacteriano (UFCs) após 3-5 dias em estufa à 37 °C. Cada gota representa uma replicata, sendo cinco replicatas por diluição. Diluições: (1) 1:1000; (2) 1:10.000; (3) 1:100.000. Cada placa consistia em um animal diferente.

Análise da produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios por neutrófilos em normóxia e hipóxia *in vitro*.

Com o intuito de avaliar se ambientes hipóxicos seriam capazes de interferir na produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, neutrófilos foram estimulados com bactérias Aa ou LPS durante um intervalo de 6 horas em duas condições distintas. Para as culturas em hipóxia foi padronizado os níveis de oxigênio em 1% e de CO₂ em 5%. Já as culturas em normóxia, foram mantidas em condições normais de oxigênio (em torno de 21%) e CO₂ em 5%. Após o tempo de incubação foram realizadas as quantificações dos mediadores TNF- α , IL-1 β e IL-10 no sobrenadante das culturas pelo método de ELISA.

Conforme mostrado na figura 17, em cultura de neutrófilos sob estímulo de Aa, em hipóxia houve aumento da produção de IL-1 β , importante mediador pró-inflamatório (**Figura 17B**), quando comparados aos neutrófilos mantidos em normóxia. Entretanto, não houve diferenças significativas na produção de TNF- α , e IL-10 (**Figura 17 A e C**). Quanto aos neutrófilos estimulados com LPS (**Figura 18**) foi visto aumento na produção de IL-1 β e IL-10 por parte dos neutrófilos em hipóxia (**Figura 18 B e C**). O mesmo não foi visto quanto ao mediador TNF- α .

(Figura 18A). Sendo assim, estes resultados sugerem que neutrófilos expostos a baixas tensões de oxigênio, a capacidade de produção de citocinas por neutrófilos é aumentada.

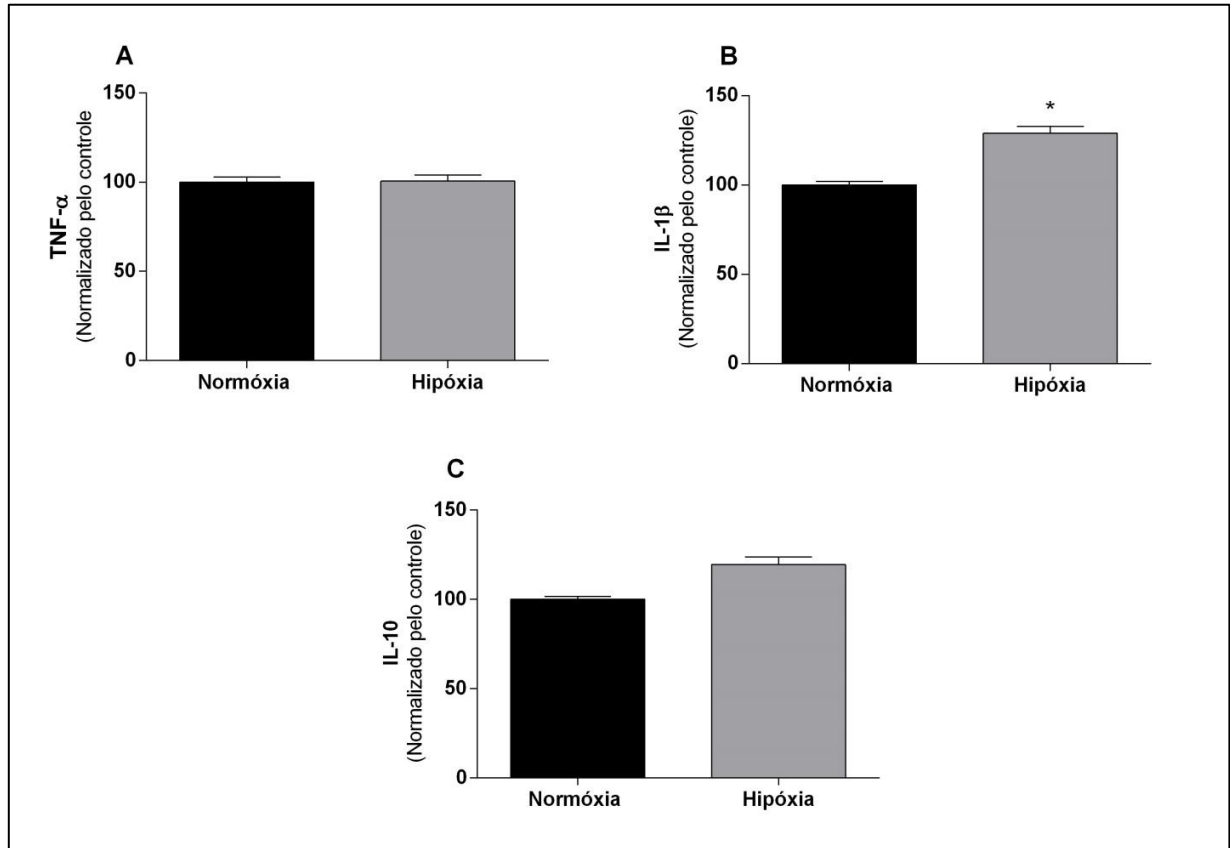


Figura 17: Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β (Figura A e B) e anti-inflamatório IL-10 (Figura C) em cultura de neutrófilos incubados por 6 horas em normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) ou hipóxia (1% O₂ e 5% CO₂) e estimulados com Aa (MOI:1:10). Resultados apresentados como média e erro da média de três experimentos independentes (N=6). Os resultados foram normalizados pela condição controle (normóxia = 100%). Análise estatística por teste T não pareado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

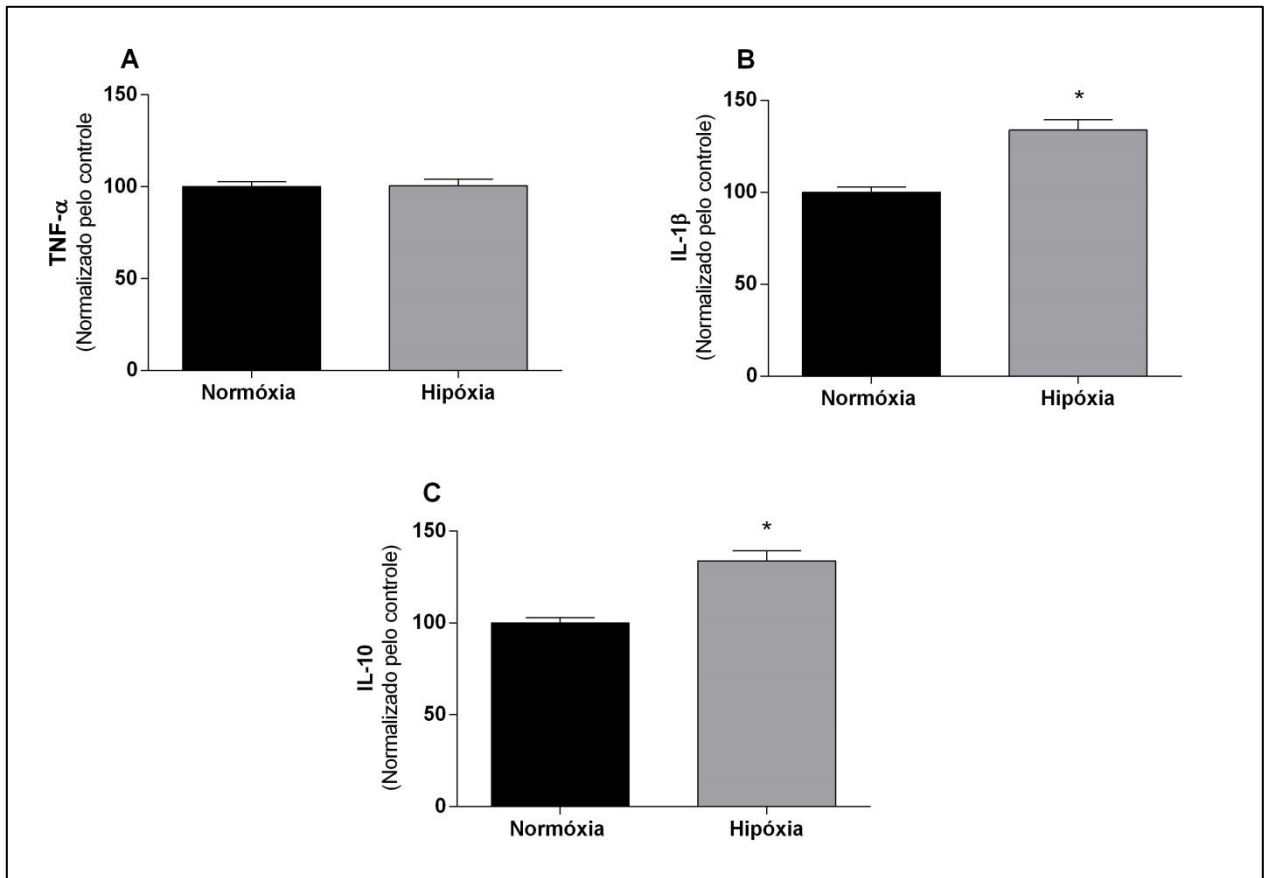


Figura 18: Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β (Figura A e B) e anti-inflamatório IL-10 (Figura C) em cultura de neutrófilos incubados por 6 horas em normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) ou hipóxia (1% O₂ and 5% CO₂) e estimulados com LPS. Resultados apresentados como média e erro da media em três experimentos independentes (N=6). Os resultados foram normalizados pela condição controle (normóxia = 100%). Análise estatística por teste T não pareado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos mantidos em normóxia e hipóxia *in vitro*.

Prosseguindo com as análises em hipóxia e normóxia avaliamos a capacidade fagocítica de neutrófilos *in vitro* expostos as bactérias Aa e *E.coli*. Conforme explicado anteriormente, as culturas de hipóxia foram mantidas em atmosfera de 1% de O₂ e 5% de CO₂, enquanto que as culturas em normóxia permaneceram em ambiente com 21% de O₂ e 5% de CO₂. Para este ensaio, a bactéria Aa foi marcada com sonda pHrodo, enquanto que a *E.coli* utilizada apresentava GFP. As bactérias foram opsonizadas com soro murino e adicionadas as culturas de neutrófilos (MOI: 1:50), e então incubadas por 2 horas. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos anti-Ly6G e lidas no citometro de fluxo Calibur FACS (BD).

Para os ensaios com Aa (**Figura 19**), o ambiente hipóxico diminuiu a capacidade fagocítica dos neutrófilos (**Figura 19A**). O mesmo padrão foi visto para a média de fluorescência destas células (**Figura 19B**). Esse mesmo efeito foi em parte observado frente a *E.coli*. Em hipóxia houve redução significativa das células que fagocitaram bactérias quando comparada ao grupo normóxia. Entretanto, a média de fluorescência não foi diferente entre os dois grupos (**Figura 20 A e B**).

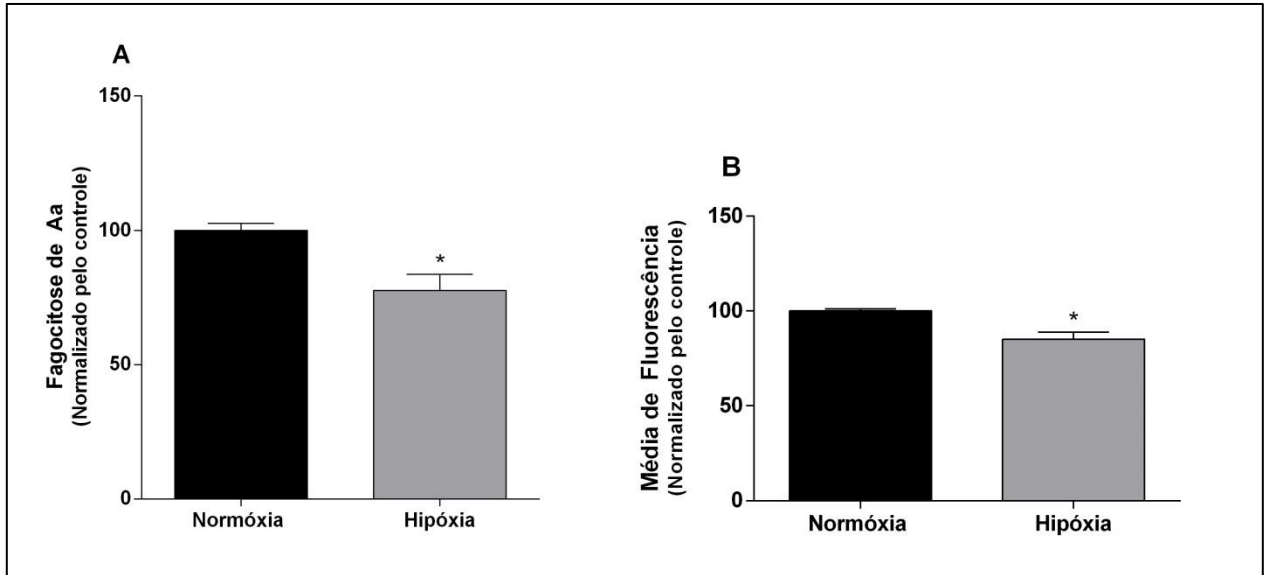


Figura 19: Análise da capacidade fagocítica de neutrófilos frente a Aa em condições de normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) ou hipóxia (1% O₂ and 5% CO₂). Os resultados obtidos (percentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias e média de fluorescência por neutrófilos que fagocitou bactéria) foram normalizados pela condição controle (normóxia = 100%). Resultados apresentados como média e erro da media em três experimentos distintos (N=6). Análise estatística por teste T não pareado. As diferenças foram consideradas significativas para p<0,05

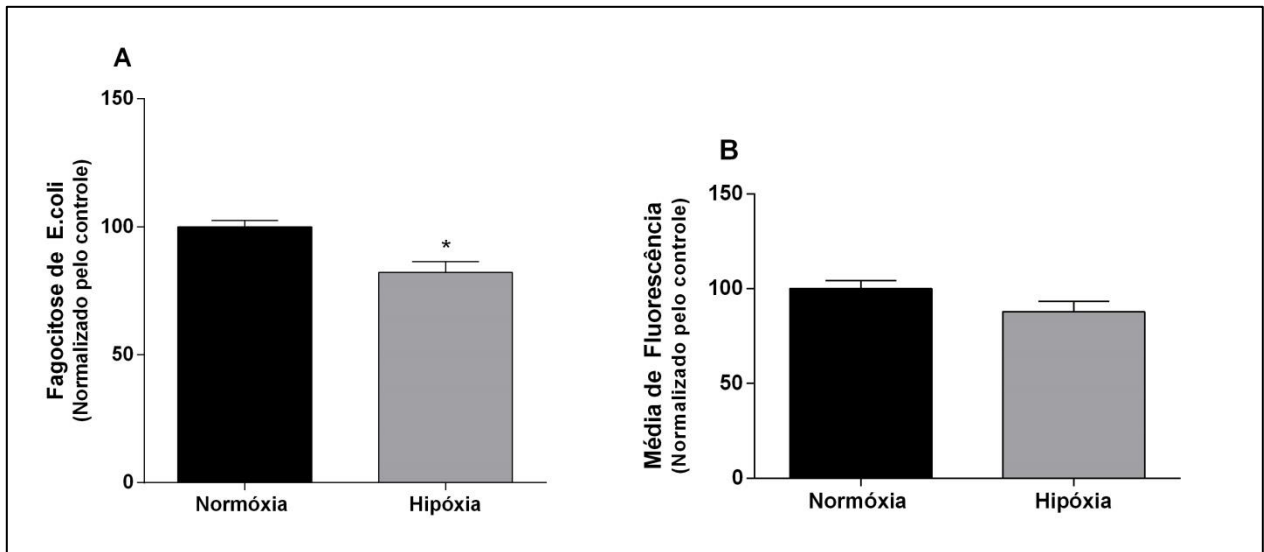


Figura 20: Análise da capacidade fagocítica de neutrófilos frente a *E.coli* em condições de normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) ou hipóxia (1% O₂ and 5% CO₂). Os resultados obtidos referem-se a percentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias (A) e média de fluorescência por neutrófilos que fagocitou bactéria (B). As análises foram normalizadas pela condição controle (normóxia = 100%). Resultados apresentados como média e erro da media em três experimentos distintos (N=6). Análise estatística por teste T não pareado. As diferenças foram consideradas significativas para p<0,05

Análise do efeito de AGCCs sobre a ativação de HIF-1 em neutrófilos.

Sabe-se que os ácidos graxos de cadeia curta são produtos da fermentação bacteriana que atuam de várias formas modulando as ações biológicas de neutrófilos, como migração, sobrevivência, produção de citocinas, entre outras funções (revisado em RODRIGUES et al., 2015). Recentemente foi mostrado em células epiteliais intestinais que um dos mecanismos pelos quais os AGCCs atuam sobre essas células é via estabilização de HIF-1 α . Considerando isso e o fato de que, conforme mostrado até o momento, condições de estabilização química ou por hipóxia desse fator modificam as respostas dessas células a bactérias, avaliamos se os AGCCs poderiam apresentar algum papel na estabilização de HIF-1 em neutrófilos *in vitro*. Para isso, neutrófilos isolados da medula óssea de animais Odd luciferase foram tratados com Bay-85-3834 ou com AGCCs em duas concentrações diferentes pelo intervalo de duas horas. Conforme mostrado na **figura 21**, somente os AGCCs não exerceram nenhuma ação na estabilização de HIF-1 em neutrófilos *in vitro*.

A partir deste resultado, resolvemos avaliar de forma mais específica o papel destes AGCCs na ativação de HIF-1 em neutrófilos. Para tal, tratamos estas células com mix de AGCCs

em duas concentrações distintas, e juntamente adicionamos Bay-85-3934, que, conforme já mostrado neste trabalho, atua estabilizando HIF-1 nestas células. Nossos resultados mostraram que a ativação de HIF-1 em neutrófilos cai drasticamente quando da presença dos AGCCs em comparação à condição controle (só estabilizador de HIF-1) (**Figura 22**).

Como vimos, utilizando um mix de AGCCs em neutrófilos *in vitro*, temos como consequência uma menor ativação de um importante fator de transcrição para essas células (HIF-1). Portanto, como próximo passo, decidimos avaliar se era o butirato que exercia esse efeito inibitório sobre HIF-1. Esta escolha é justificada pelo fato de em células epiteliais intestinais o butirato ser o AGCC com efeito mais evidente sobre a estabilização de HIF-1 (KELLY *et al.*, 2015). Para esta análise, utilizamos duas concentrações distintas de butirato, e tratamos os neutrófilos juntamente com Bay-85 por duas horas. Os resultados obtidos demonstram que o butirato exerce uma atividade inibidora sobre a estabilização de HIF-1 nessas células, quando comparados com a condição controle (**Figura 23**).

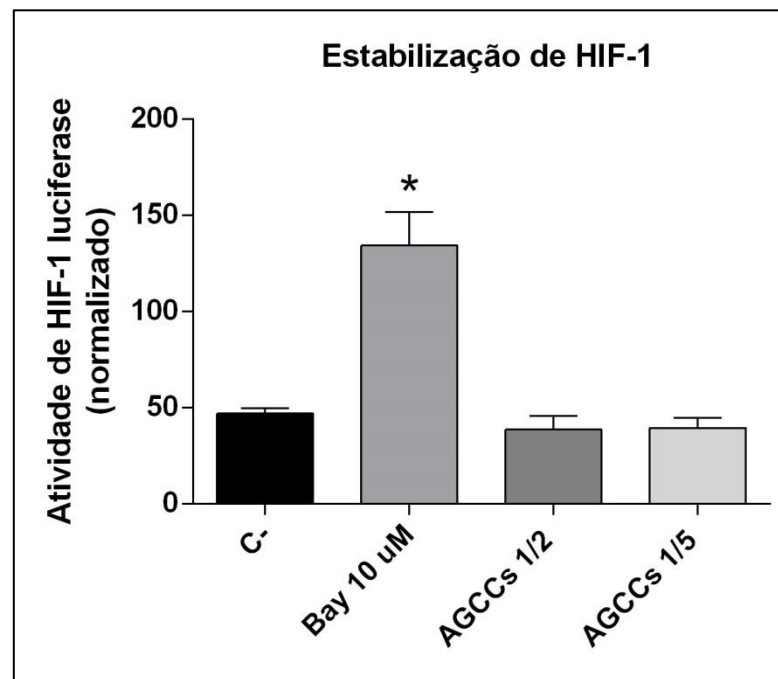


Figura 21: Análise da ativação de HIF-1 por mix de AGCCs em neutrófilos. Neutrófilos de animais Odd-luciferase foram incubados *in vitro* com estabilizador sintético de HIF-1 ou com mix de AGCCs 1/2 (Ac 13mM, Bt 5mM, Pr 1.25mM) e 1/5 (Ac 5,2mM, Bt 2mM e Pr 0,5mM) no intervalo de 2 horas. Ao final desse tempo, as células foram lisadas e mensurou-se a atividade de luciferase em cada condição, resultado esse que foi normalizado pela quantidade de proteína. Resultados apresentados como média e erro da media em 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

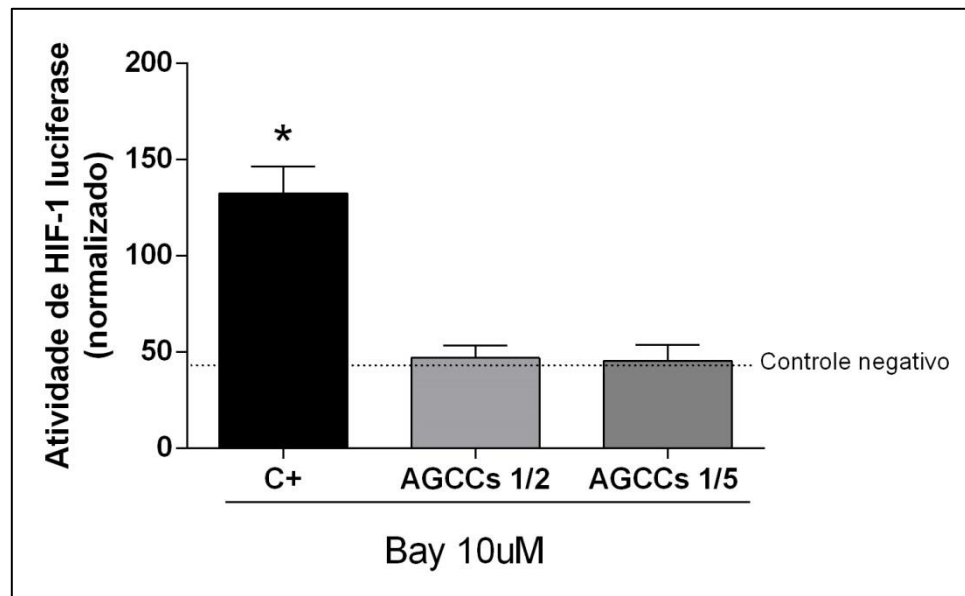


Figura 22: Análise da ação de AGCCs na ativação de HIF-1 em neutrófilos. Neutrófilos de animais Odd-luciferase foram incubados *in vitro* com estabilizador sintético de HIF-1 e mix de AGCCs 1/2 (Ac 13mM, Bt 5mM, Pr 1.25mM) e 1/5 (Ac 5,2mM, Bt 2mM e Pr 0,5mM) por 2 horas. Ao final desse tempo, as células foram lisadas e mensurou-se a atividade de luciferase em cada condição, resultado esse que foi normalizado pela quantidade de proteína. A condição (C+) refere-se ao grupo tratado apenas com estabilizador sintético (Bay-85). Resultados apresentados como média e erro da media em 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

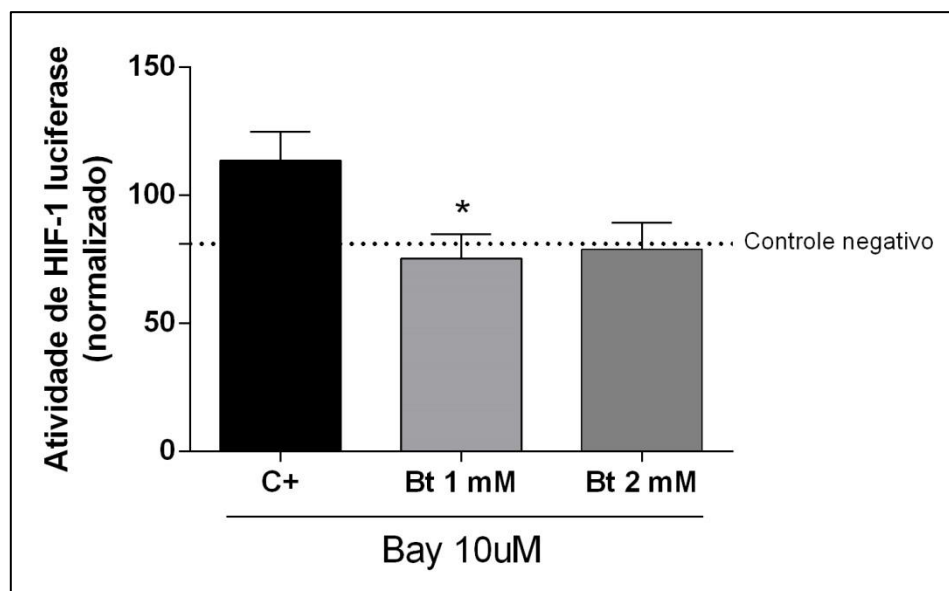


Figura 23: Análise da ação de butirato na atividade de HIF-1 em neutrófilos de animais Odd-luciferase. Neutrófilos de animais Odd-luciferase foram incubados *in vitro* com estabilizador sintético de HIF-1 e butirato em duas diferentes concentrações por 2 horas. Ao final desse tempo, as células foram lisadas e mensurou-se a atividade de luciferase em

cada condição, resultado esse que foi normalizado pela quantidade de proteína. Resultados apresentados como média e erro da média em 2 experimentos independentes (N=2). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Avaliação do efeito de AGCCs sobre a produção de citocinas por neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1.

Estudos anteriores já mostraram a capacidade dos AGCCs modificarem em neutrófilos a produção de importantes citocinas presentes em condições inflamatórias e infecciosas (VINOLO et al., 2010; CORREA et al., 2017). Entretanto, pouco se sabe a respeito das ações modulatórias destes compostos em condições nas quais HIF-1 esteja ativo nestas células. Logo, foram realizadas culturas de neutrófilos isolados da medula óssea, as quais foram tratadas com Bay-85-3934 e/ou mix de AGCCs em duas concentrações distintas, e estimuladas com a bactéria Aa.

Nossos resultados mostraram que os AGCCs diminuem drasticamente a produção do mediador TNF- α em neutrófilos, em ambos grupos analisados, sendo esta redução mais acentuada na condição de mix de AGCCs 1/2. Na condição de mix 1/5 observamos que o grupo com Bay-85 aumentou a produção deste mediador quando comparado ao grupo sem Bay-85 (**Figura 24A**). Para IL-1 β , foi observado que na condição de AGCCs 1/5 houve aumento no grupo tratado com Bay-85 quando comparado ao grupo sem Bay-85. Além disso, observa-se um aumento quando as células foram incubadas com mix 1/5 de AGCCs na presença de Bay-85-3934 (**Figura 24B**). Para o mediador IL-10, não houve diferenças significativas entre os grupos analisados (**Figura 24C**).

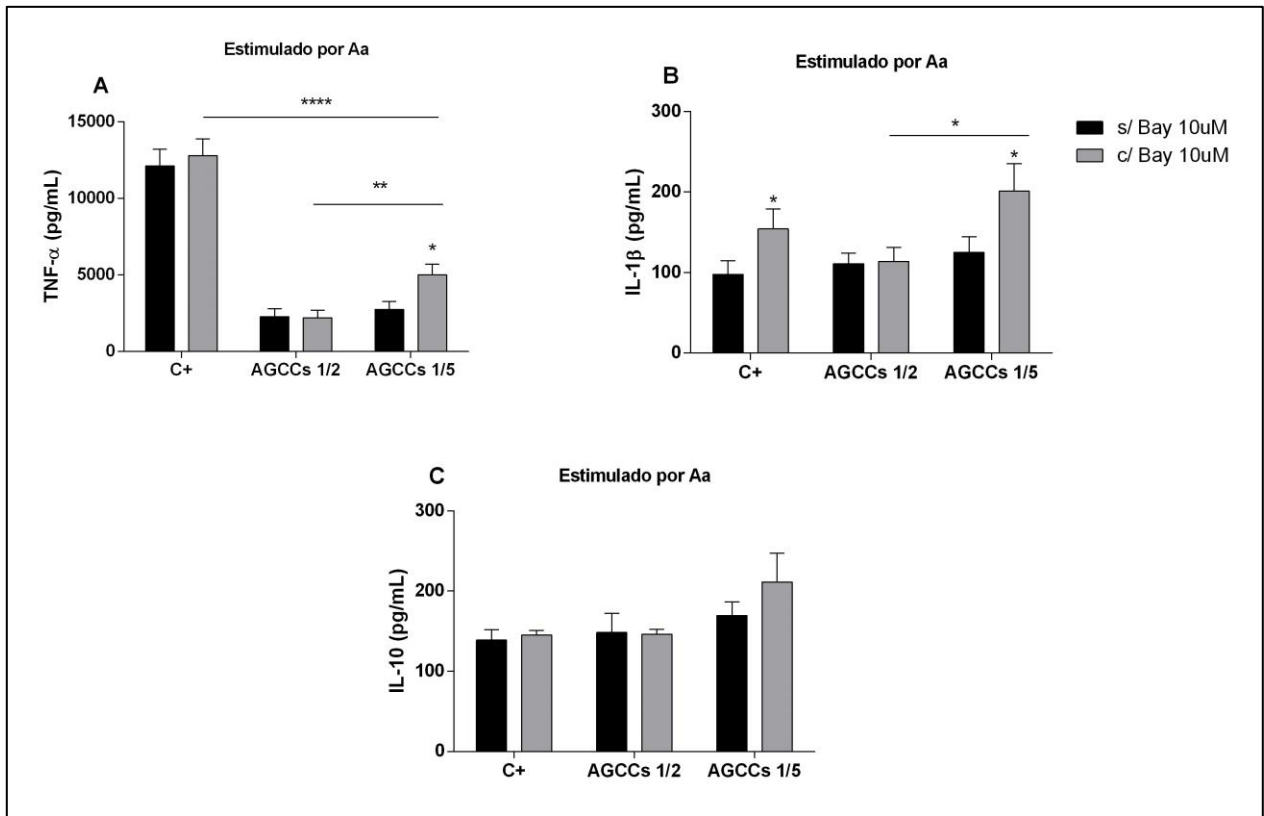


Figura 24: Efeito do mix de AGCCs sobre a produção de citocinas de neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1. As células foram previamente tratadas com estabilizador sintético de HIF-1e/ou mix de AGCCs por 2 horas e posteriormente incubadas por 6 horas sob estímulo de Aa. Resultados apresentados como média e erro da media em 2 experimentos independentes (N=4). Análise estatística por ANOVA e *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Análise da produção de citocinas em cultura de neutrófilos *in vitro* tratados com mix de AGCCs e expostos a condição de hipóxia e normóxia.

A seguir avaliamos os efeitos dos AGCCs em células incubadas em condições de hipóxia e normóxia. Para isso, as células foram isoladas da medula óssea dos animais, incubadas com mix de AGCCs e estimuladas com Aa em condições de hipóxia (1% O₂ e 5% CO₂) ou normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) por um intervalo de 6 horas. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante das culturas os quais foram usados na quantificação das citocinas pela técnica de ELISA.

Conforme já mostrado em resultados anteriores, a condição de hipóxia não altera a produção de TNF-α quando comparada a normóxia. A produção desse mediador foi reduzida em

células mantidas na presença de AGCCs tanto em hipóxia quanto em normóxia, o que sugere que esse efeito independe desse fator (**Figura 25A**).

Quanto às análises de IL-1 β , assim como já mostrado anteriormente, a condição de hipóxia aumentou a produção deste mediador, quando comparado a normóxia. Observou-se que nas três condições em que o mix de AGCCs foi adicionado em hipóxia houve aumento da produção deste mediador quando comparado à condição de normóxia. Quando comparado à condição controle em relação aos grupos tratados com mix de AGCCs em hipóxia, notou-se um aumento significativo de produção de IL-1 β nas condições com mix de AGCCs 1/2 e 1/5, ou seja, os AGCCs tiveram um efeito aditivo sobre a produção de IL-1 β na condição de hipóxia (**Figura 25B**).

Para as análises de IL-10, o grupo mix de AGCCs 1/2 e 1/10 na condição de hipóxia reduziram a produção deste mediador quando comparado à condição de normóxia. Juntamente, vimos que o grupo mix de AGCCs 1/2 em hipóxia reduziu drasticamente a produção quando comparado com a condição controle em hipóxia (**Figura 25C**).

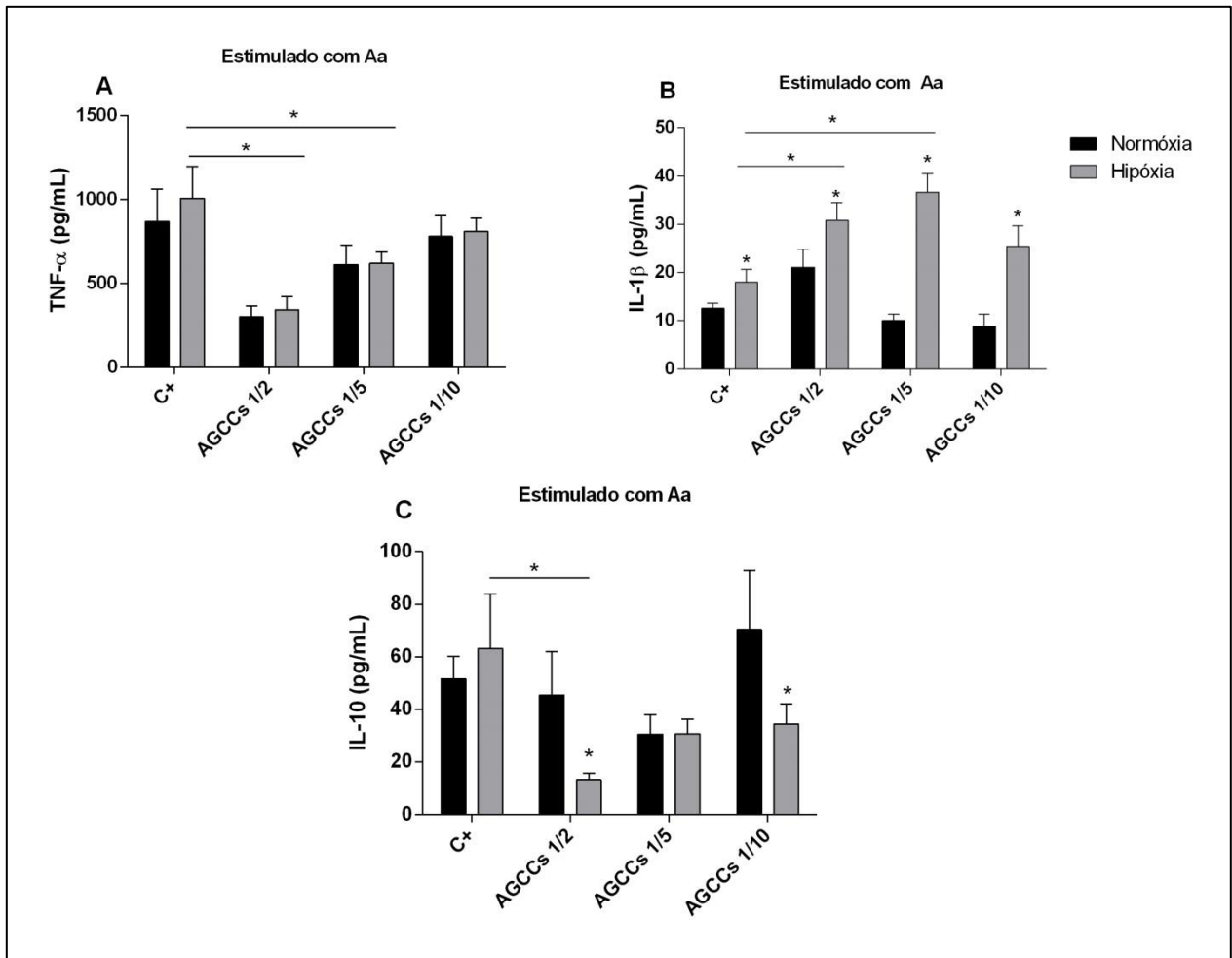


Figura 25: Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β (Figura A e B) e anti-inflamatório IL-10 (Figura C) em cultura de neutrófilos tratados com mix de AGCCs e incubados por 6 horas em normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) ou hipóxia (1% O₂ e 5% CO₂) e estimulados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (MOI:1:10). Resultados apresentados como média e erro da média em dois experimentos independentes (N=4). Análise estatística por teste T não pareado. As diferenças foram consideradas significativas para p<0,05.

Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos in vitro tratados com mix de AGCCs em hipóxia e normóxia.

A seguir avaliamos se condição de hipóxia afetaria a capacidade fagocítica de neutrófilos tratados com mix de AGCCs. Para isso, neutrófilos foram isolados da medula óssea, tratados com mix de AGCCs em diferentes concentrações e incubados com a bactéria Aa por um intervalo de duas horas. Posterior ao tempo de incubação, as células foram marcadas e então realizadas as leituras via citometria de fluxo. Nossos resultados evidenciam que, como já mostrado anteriormente, a capacidade fagocítica dos neutrófilos é prejudicada em condições de hipóxia

quando comparada a de normóxia. Entretanto, o tratamento com mix de AGCCs, não teve qualquer efeito sobre esse parâmetro (**Figura 26A**). Para a média de fluorescência, a exceção da condição controle, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados (**Figura 26B**).

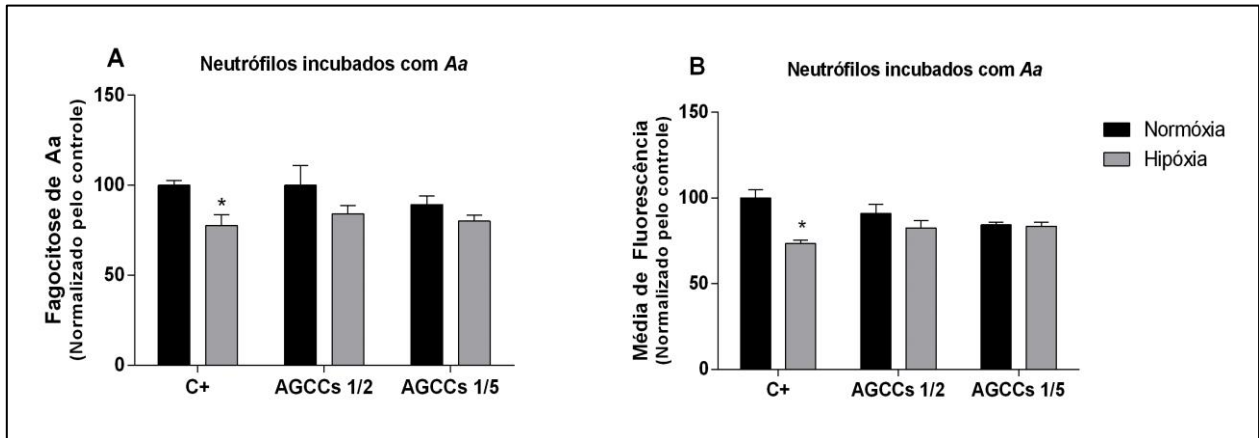


Figura 26: Análise da capacidade fagocítica de neutrófilos tratados com mix de AGCCs em condições de normóxia (21% O₂ e 5% CO₂) ou hipóxia (1% O₂ e 5% CO₂). As células foram tratadas e incubadas por 2 horas e posteriormente, realizada a leitura em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos referem-se a percentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias (A) e média de fluorescência por neutrófilos que fagocitou bactéria (B). As análises foram normalizadas pela condição controle (normóxia = 100%). Resultados apresentados como média e erro da média em três experimentos distintos (N=8). Análise estatística por teste T não pareado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$

Análises *in vivo* em animais com deleção de HIF-1 em células mielóides.

Com o intuito de analisar *in vivo* a relevância de HIF-1 para células de origem mielóide frente a uma condição infecciosa causada pela bactéria anaeróbia *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 utilizamos do modelo de câmara subcutânea (GENCO et al., 1991). Esse modelo nos permitiu induzir uma monoinfecção por Aa em camundongos com deleção mielóide de HIF-1a.

Primeiramente, analisamos a capacidade de eliminação das bactérias inoculadas na câmara. Para tal, uma parte do exsudato inflamatório que foi formado no interior da câmara foi diluído de forma seriada em PBS estéril e plaqueado em ágar chocolate suplementado com menadiona e hemina. Por se tratar de uma bactéria anaeróbia, as placas foram mantidas em anaeróbiose em estufa por 37°C, por 3-5 dias. Ao fim deste período, foi possível determinar o número de UFCs em cada placa, número este que nos mostra a capacidade das células que

migraram para o local infectado em matar as bactérias. Conforme mostrado na **figura 27**, a ausência de HIF-1 em células mielóides não modificou a resposta quanto à capacidade de destruição de Aa. Nota-se que a capacidade de *killing* de animais KO para HIF-1 é semelhante aos animais WT que possuem este fator de transcrição presente em suas células, evidenciando que a ação de HIF-1 nessas células não modula o parâmetro em questão.

Seguidamente, foi avaliado o recrutamento celular para o interior da câmara subcutânea após 24 horas da inoculação da bactéria Aa. De acordo com a figura 29, os resultados obtidos nos mostraram que HIF-1 não tem ação direta no recrutamento celular das células no nosso modelo de infecção: tanto o total de células quanto de polimorfonucleares neutrófilos (**Figura 28B**) e células mononucleadas (**Figura 28C**) não diferiu entre os grupos experimentais.

A seguir, foi analisado e quantificado a produção de citocinas, onde sabe-se que as mesmas são importantes em processos inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , e IL-10. Para que fosse possível esta análise, parte do exsudato formado no interior da câmara subcutânea após 24 horas da infecção por Aa foi coletado e quantificado. Inicialmente, avaliamos TNF- α , citocina que possui uma vasta gama de ações pró-inflamatórias e que geralmente é encontrada em altas concentrações em condições infecciosas. Como mostrado na (**Figura 29A**), a produção deste mediador inflamatório foi reduzida significativamente no grupo que apresenta deleção de HIF-1, quando comparado ao grupo WT. Perfil distinto de resposta foi visto para outro importante mediador inflamatório, a IL-1 β (**Figura 29B**). As concentrações desta citocina foram semelhantes entre os dois grupos, mostrando que a ausência de HIF-1 em células mielóides em 24 horas não tem influência quanto à produção da mesma por parte dessas células em processos infecciosos por Aa. Contudo, a produção de IL-10 (**Figura 29C**), importante citocina anti-inflamatória, se elevou no grupo KO para HIF-1 quando comparado ao grupo WT. Com isso temos que na ausência de HIF-1 em células mielóides há uma redução de TNF- α e aumento de IL-10, mostrando que a ausência deste fator de transcrição reduz a resposta inflamatória.

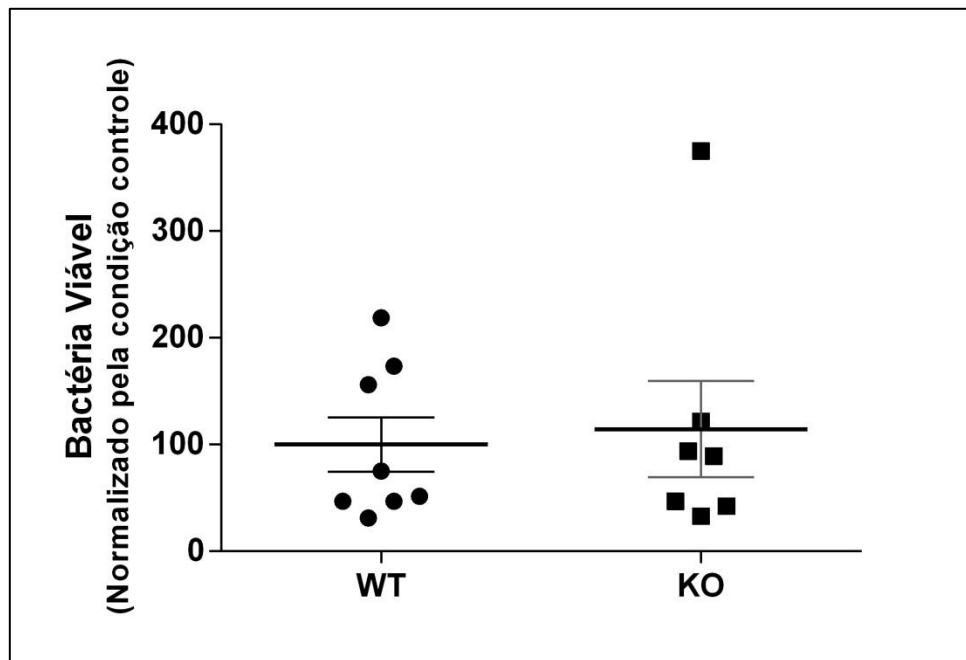


Figura 27: Análise da sobrevivência das bactérias Aa na câmara subcutânea. O exsudato inflamatório foi diluído, plaqueado em ágar BHI chocolate, mantido em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias, para determinação do número de UFCs. Os valores foram posteriormente normalizados pelos valores obtidos nos animais WT. Nos gráficos, cada círculo ou quadrado representa um animal. São apresentados resultados referentes a 2 experimentos independentes. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 7-8 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*, com significância considerada para $p < 0,05$.

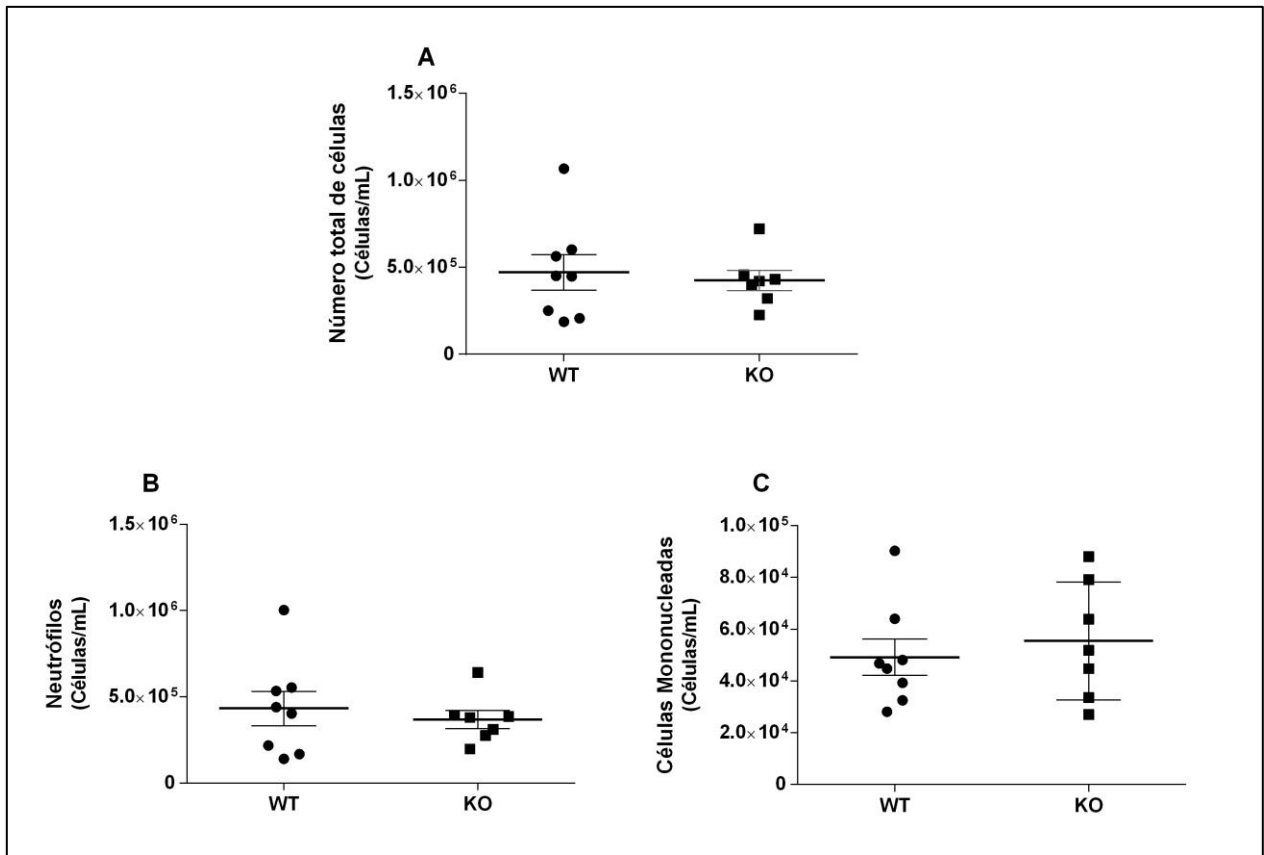


Figura 28: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara 24 horas após a inoculação de Aa. Número total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e células mononucleadas (C) presentes na câmara subcutânea. Nos gráficos, cada quadrado ou círculo representa um animal. São apresentados resultados referentes a 2 experimentos independentes. (N = 7-8 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*, com significância considerada para $p < 0,05$.

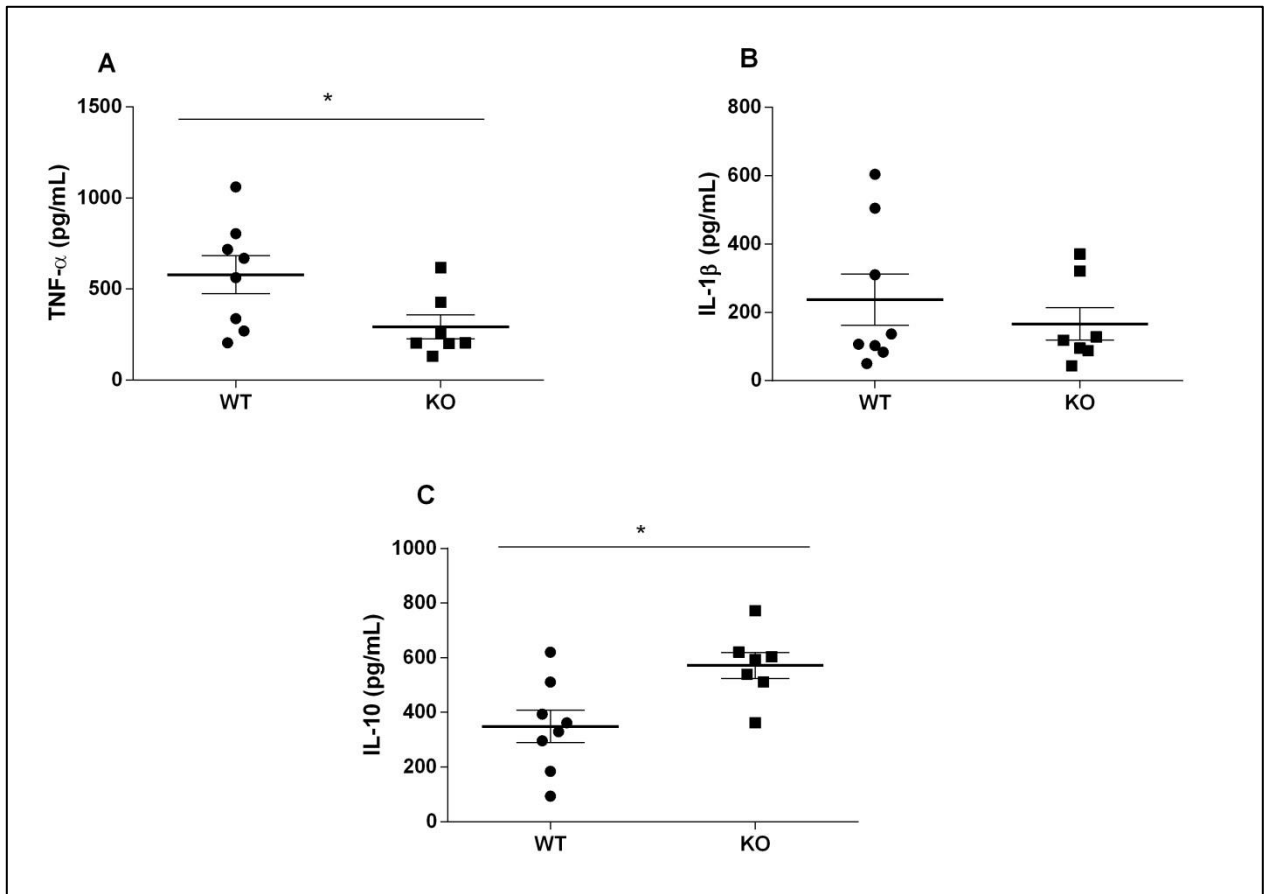


Figura 29: Análise da produção de mediadores inflamatórios no interior da câmara subcutânea após infecção com Aa. As concentrações das citocinas no exsudato inflamatório da câmara subcutânea foram medidas pelo método de ELISA, 24 horas após inoculação da bactéria Aa (N = 8 animais para WT e 7 animais para KO). Nos gráficos, cada quadrado ou círculo representa um animal. São apresentados resultados referentes a 2 experimentos independentes. Resultados apresentados como média $\pm$ SEM e analisados pelo teste de *Mann-Whitney*, com significância considerada para $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a relevância do fator induzido por hipóxia (HIF)-1 na função efetora de neutrófilos frente à bactéria Aa, e juntamente analisar a ação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) na ativação deste fator de transcrição. Para tal, utilizamos compostos que modificam a estabilidade de HIF-1 na presença de oxigênio, assim como à incubação das células em condição de hipóxia. Além disso, foram realizadas análises utilizando animais com deleção tecido específico de HIF-1 em células mielóides.

Inicialmente, vimos pelo teste de viabilidade celular que os estabilizadores sintéticos nas concentrações utilizadas não apresentaram danos citotóxicos em neutrófilos, mostrando que nossas condições de tratamento eram viáveis. Entretanto, era importante descobrirmos quais destes compostos seriam eficazes na estabilização de HIF-1 nessas células. Dentre os inibidores usados, o único que apresentou efeito significativo foi o inibidor de PHDs Bay-85-3934. Acreditamos que este resultado se deu pela capacidade deste composto em atuar sobre as três isoformas das PHDs (1-3) acarretando em um efeito mais eficaz do que IOX-2, que atua apenas em uma das isoformas desta enzima (PHD2) ou cloreto de cobalto, o qual atua como competidor endógeno de ferro (FLAMME *et al.*, 2014; MURRAY *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2014).

Estudos *in vitro* mostraram que em células de carcinoma, como HeLa e A549, o tratamento com Bay-85-3934 por 20 minutos foi suficiente para induzir concentrações proteicas detectáveis de HIF-1 α (FLAME *et al.*, 2014). Em neutrófilos, observamos que a estabilização ocorreu apenas a partir de 1 hora de tratamento com o estabilizador, sendo que esta foi mais evidente no intervalo de 2 horas. Assim, foi possível definir no nosso modelo uma condição de estabilização de HIF-1 α (pré-tratamento de 2 horas) em neutrófilos antes de realizarmos as outras análises.

Sabe-se que células como neutrófilos tendem a produzir quantidades inferiores de citocinas quando comparadas a outros tipos de células mielóides, como os macrófagos. Entretanto, no início do processo inflamatório, o tipo celular mais abundante encontrado são os neutrófilos, tornando-os importantes não somente para destruição e contenção de patógenos invasores, mas também ao que diz respeito quanto à produção de mediadores inflamatórios (MANTOVANI *et al.*, 2011). Na inflamação, os níveis de oxigênio local normalmente são reduzidos, expondo células como neutrófilos à condição de hipóxia. Os efeitos da hipóxia na função dos neutrófilos ainda não

são totalmente conhecidos, porém, a literatura evidencia que HIF-1 atua de forma direta na regulação das funções inflamatórias destas células. Neste contexto, HIF-1 age principalmente na sobrevivência e migração de células mielóides, destruição bacteriana via ROS, regulando a capacidade fagocítica, além de modular a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-6, o que o torna um importante regulador das funções efetoras destas células (PALAZON *et al.*, 2014; AMULIC *et al.*, 2012). Entretanto, ainda não é claro qual o papel de HIF-1 na resposta de neutrófilos frente a bactérias envolvidas em quadros de periodontite como a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), alvo deste estudo. Vale ressaltar que já há relatos na literatura indicando que a tensão de oxigênio tecidual em indivíduos com periodontite tende a diminuir de acordo com a intensidade da doença (PRADEEP *et al.*, 2011).

Tanto em neutrófilos tratados com estabilizador sintético de HIF-1 quanto expostos a condições de hipóxia e então estimulados com Aa ou LPS, observou-se aumento significativo na produção do mediador pró-inflamatório IL-1 β , enquanto que para outras citocinas (IL-10 e TNF- α) houve alteração apenas em determinadas condições de estimulação (apenas com LPS). A IL-1 β é um mediador importante na resposta a infecções bacterianas, sendo essencial para o processo inflamatório. Essa citocina é sintetizada como um polipeptídeo biologicamente inativo, se tornando ativo por meio da ação de caspase-1 (ou outras proteases), que atua clivando e liberando a forma madura deste mediador, que atuará nas respostas imunes (FOLCO *et al.*, 2014). A literatura mostra que macrófagos produzem grandes quantidades deste mediador após estimulação. Nestas células há descrição de que a ativação de HIF-1, potencializa essa ação. Em nosso trabalho, nas condições estudadas, pudemos ver que neutrófilos, assim como macrófagos, produzem quantidades aumentadas de IL-1 β em condição de hipóxia ou ativação de HIF-1 (FOLCO *et al.*, 2014; TANNAHILL *et al.*, 2013; SNODGRASS *et al.*, 2016). Logo, vê-se que HIF-1 possui um papel importante no contexto inflamatório em células mielóides.

A fagocitose é o processo pelo qual microrganismos são internalizados e subsequentemente degradados por células do sistema imune inato, como os fagócitos, representando assim, uma das primeiras linhas de defesa contra infecções. A ativação deste mecanismo depende de reconhecimento de moléculas produzidas pelo hospedeiro, as quais se ligam a superfície dos microrganismos (opsoninas incluindo constituintes do sistema complemento, proteínas de fase aguda e imunoglobulinas) e do reconhecimento via receptores de de padrões moleculares associados à microrganismo como receptores do tipo Toll (STEINBERG

et al., 2007; NORDENFELT & TAPPER, 2011; ROGER *et al.*, 2011). Diferentemente do que foi observado para a produção de IL-1 β , o tratamento dos neutrófilos com Bay-85-3934 não apresentou nenhum efeito sobre a capacidade de fagocitose destas células frente a Aa ou *E. coli*. Estes resultados indicam que o processo de fagocitose, ao menos nas condições por nós estudadas, não é regulado pela ativação de HIF-1. Já em neutrófilos expostos a condição de hipóxia, nossos achados mostraram que a porcentagem destas células com bactérias internalizadas (Aa e *E.coli*) foi significativamente menor quando comparada as células mantidas em condição de normóxia. Além disso, houve redução na quantidade de bactérias internalizadas (ao menos para Aa) por neutrófilo na condição de hipóxia em comparação a condição controle. Logo, se levarmos em conta que a redução foi vista apenas na condição hipóxia e não com o estabilizador de HIF-1, podemos sugerir que mecanismos independentes de HIF-1 estejam atuando na regulação desse parâmetro em neutrófilos. Nesse sentido, vale ressaltar que vários outros mecanismos (independentes de HIF-1) são reponsivos a hipóxia e podem estar envolvidos na resposta ora observada (SHIRATSUCHI, 2005; HOENDERDOS *et al.*, 2016). Além disso, considerando os relatos na literatura de que a hipóxia e/ou ativação de HIF-1 aumentam a capacidade fagocítica de macrófagos (PEYSSONNAUX *et al.*, 2005), podemos especular que mecanismos diferentes atuem na regulação do processo de fagocitose em neutrófilos, macrófagos e outras células em hipóxia.

No presente estudo também avaliamos a capacidade microbida de neutrófilos incubados com Bay-85-3934 frente às bactérias Aa e *E. coli*. Diferente do que foi visto na fagocitose, nossos resultados indicam que a ativação de HIF-1 em neutrófilos incubados com Aa, mas não com *E.coli*, aumenta a capacidade microbida destas células. Nesse sentido, Okumura e colaboradores (2012) evidenciaram que a estabilização farmacológica de HIF-1 em neutrófilos aumentou significativamente a atividade antibacteriana dessas células frente a *Staphylococcus aureus* (OKUMURA *et al.*, 2012). De forma associada, BERGER e colaboradores (2013) evidenciaram que a inibição de HIF-1 em neutrófilos reduz a atividade bactericida tanto *in vivo* quanto *in vitro* destas células.

Os AGCCs, principalmente acetato, propionato e butirato, são produtos finais da fermentação de fibras por bactérias. Tais compostos são comumente encontrados em altas concentrações no cólon, contudo, estudos já revelaram que estes metabólitos bacterianos também podem ser encontrados em altas concentrações em tecidos periodontais, principalmente em condições infecciosas, como em quadros de infecções por Aa, alvo do presente estudo (TAN *et al.*,

2014; LU *et al.*, 2014). Os AGCCs sabidamente têm ações metabólicas importantes, incluindo sua função de substrato energético para células epiteliais, mas também, conforme mostrado em trabalhos mais recentes, alteraram diferentes aspectos fisiológicos de leucócitos, como a sua diferenciação, quimiotaxia e outras funções efetoras. Em neutrófilos, sabe-se que estes compostos modulam funções como produção de espécies reativas de oxigênio, degranulação, atividade microbida, além de processos fagocíticos (CORRÊA *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2015). Contudo, ainda não é bem esclarecido até o momento, o papel e possíveis ações modulatórias dos AGCCs na ativação e ação do fator de transcrição HIF-1 em neutrófilos.

Estudos constataram que os AGCCs são capazes de estabilizar HIF-1 em células epiteliais intestinais, o que decorre ao menos em parte da capacidade dos AGCCs em aumentar o metabolismo oxidativo dessas células e consequentemente o consumo de oxigênio (KELLY *et al.*, 2015). Neste sentido, analisamos inicialmente se os AGCCs poderiam apresentar algum papel na estabilização de HIF-1 em neutrófilos *in vitro*. Para tal, utilizamos neutrófilos isolados da medula óssea de animais HIF *reporter* e então tratados com Bay 85-3934, ou AGCCs. De forma distinta ao que foi visto em células epiteliais intestinais, em nosso estudo, os AGCCs não exerceram ação na estabilização de HIF-1, mostrando que estes compostos não são capazes de estabilizar HIF-1 em neutrófilos. Mais do que isso, em experimentos subsequentes, observamos que a ativação de HIF-1 por Bay 85-3934 cai drasticamente quando as mesmas são tratadas com AGCCs. Portanto, os resultados sugerem que além dos AGCCs não estabilizarem HIF-1, eles ainda interferem de forma negativa na estabilização deste importante fator de transcrição em neutrófilos.

A seguir avaliamos se o butirato poderia estar exercendo esta ação negativa na estabilização de HIF-1 em neutrófilos. Optamos pelo butirato devido ao fato de que esse é o AGCC normalmente mais ativo nestas células (VINOLO *et al.*, 2010; SINA *et al.*, 2009) e na estabilização de HIF-1 em células epiteliais intestinais (KELLY *et al.*, 2015). Os resultados obtidos mostraram que o butirato exerce atividade inibitória sobre a ativação de HIF-1 em neutrófilos. Esse efeito, conforme já comentado, é oposto ao observado em células epiteliais, o que pode ser em parte explicado pelas diferenças de metabolismo entre essas células. Vale ressaltar que os neutrófilos são altamente dependentes do processo de glicólise anaeróbica, enquanto que as células epiteliais obtêm parte de sua energia pelo processo de oxidação fosforilativa. Conforme descrito anteriormente, o mecanismo associado a ativação de HIF-1 envolve aumento de consumo de

oxigênio pelas células epiteliais (utilizado na metabolização aeróbia de butirato), o que não deve ocorrer em neutrófilos devido ao fato de estas últimas serem células que tem pouca capacidade de metabolização aeróbia.

Considerando os resultados dos AGCCs sobre a ativação de HIF-1 em neutrófilos, a seguir avaliamos o efeito dos AGCCs sobre parâmetros funcionais destas células na presença de estabilizador deste fator de transcrição ou hipóxia. Os ácidos graxos de cadeia curta diminuem drasticamente a produção do mediador TNF- α em neutrófilos incubados com Aa, efeito esse que foi mantido tanto na presença de Bay 85-3934 quanto em condições de hipóxia. Para IL-10, o estabilizador de HIF-1 não teve qualquer ação, porém em hipóxia a produção desta citocina foi inibida na presença de AGCCs, efeito não observado em normóxia. Por fim, para IL-1 β observou-se que em condições de hipóxia a presença de AGCCs aumentou ainda mais a produção desse mediador. Esses resultados, apesar de preliminares, nos indicam que em hipóxia são ativados mecanismos (independentes de HIF-1) os quais modificam a resposta de neutrófilos aos AGCCs, sendo que, de modo geral, quando em hipóxia os neutrófilos incubados com AGCCs se tornam mais pró-inflamatórios (maior produção de IL-1 β e menor de IL-10). Por outro lado, para a fagocitose, não observamos qualquer ação da condição de hipóxia sobre os efeitos dos AGCCs. Em conjunto, esses dados nos indicam que em hipóxia os AGCCs atuam em neutrófilos aumentando sua capacidade inflamatória, mas sem alterar sua capacidade fagocítica, o que pode ter grande relevância durante condições infecciosas em que há redução dos níveis de oxigênio.

No presente estudo, além dos ensaios *in vitro*, avaliamos *in vivo* a relevância de HIF-1 na ação de células mielóides em condição infecciosa causadas pela Aa. Para tanto, utilizamos o modelo de câmara subcutânea (GENCO *et al.*, 1991), modelo que nos permitiu induzir uma monoinfecção por Aa em camundongos *knockout* tecido específico (KO) para HIF-1. Vale ressaltar que o modelo animal (LysMCre) utilizado envolve deleção de HIF-1a em células mielóides e de forma mais evidente em macrófagos do que em neutrófilos (CRAMER *et al.*, 2003). Em geral, nesses experimentos não houve alteração no recrutamento de células e sua capacidade de destruição de bactérias (Aa). Por outro lado, observamos alterações relevantes na produção de mediadores inflamatórios incluindo TNF- α e IL-10, o qual estavam em menores e maiores concentrações respectivamente nos animais KO para HIF-1, importante mediador anti-inflamatório cujas concentrações estavam mais altas nos animais do grupo KO para HIF-1 quando comparados ao grupo WT. Em conjunto estes dados nos indicam que na ausência de HIF-1, apesar de não haver

prejuízo da função microbicida frente a Aa, a resposta inflamatória tende a ser menos intensa devido as menores concentrações de TNF- α e aumento de IL-10. A cerca dos efeitos de HIF-1 na produção de mediadores inflamatórios por células mielóides, nossos resultados vão de encontro a estudos já publicados, que mostram que animais deficientes de HIF-1 produzem menores quantidades de mediadores pro-inflamatórios como TNF- α e IL-6 (PEYSSONNAUX *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2015; ZAMPELL *et al.*, 2012). Adicionalmente, trabalho realizado em modelo de infecção por *H. capsulatum*, demonstrou que animais com ausência de HIF-1 na linhagem mielóide produzem quantidades aumentadas de IL-10 (FECHER *et al.*, 2016). Estes resultados sugerem que a ausência deste fator de transcrição nas células estudadas contribui para uma resposta menos inflamatória, afetando assim de forma direta na resolução do processo infeccioso.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a hipóxia e ativação de HIF-1 em células mielóides (neutrófilos) é relevante na resposta efetora frente a bactérias envolvidas no desenvolvimento de periodontite como a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), e os AGCCs, principalmente o butirato, interferem negativamente nesta ativação de HIF-1, podendo assim modular a resposta durante quadro infeccioso, uma vez que:

1) Neutrófilos mantidos em hipóxia ou incubados com estabilizador de HIF-1 apresentam alteração das suas respostas efetoras (produção de IL-1 β e atividade microbicida) frente a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

2) Os AGCCs inibem a estabilização de HIF-1 em neutrófilos.

3) Os efeitos dos AGCCs sobre a produção de mediadores inflamatórios por neutrófilos em hipóxia são, em parte, distintos daqueles observados em normóxia.

4) A deleção específica de HIF-1 em células mielóides não altera o recrutamento de células ou sua ação microbicida frente a Aa em modelo de monoinfecção. Contudo, a ausência desse fator modifica a produção de mediadores inflamatórios pelas células, o que pode ter consequências diretas na resolução do processo inflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, G. O.; Seita, J.; Hong, B. J.; Kim, Y. E.; Bok, S. *et al.* Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in myeloid cells promotes angiogenesis through VEGF and S100A8. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 7, p. 2698-2703, 2014.
- Anand, R. J.; Gribar, S. C.; Li, J.; Kohler, J. W.; Branca, M. F. *et al.* Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 α -dependent manner. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n.5, p. 1257-1265, 2007.
- Beerlage, C.; Devraj, G.; Brüne, B.; & Kempf, V. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1-regulated lysyl oxidase is involved in Staphylococcus aureus abscess formation. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2562-2573, 2013.
- Berger, E. A.; McClellan, S. A.; Vistisen, K. S.; & Hazlett, L. D. HIF-1 α is essential for effective PMN bacterial killing, antimicrobial peptide production and apoptosis in Pseudomonas aeruginosa keratitis. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 7, p. e1003457, 2013.
- Bhandari, T.; & Nizet, V. Hypoxia-inducible factor (HIF) as a pharmacological target for prevention and treatment of infectious diseases. **Infectious diseases and therapy**, v. 3, n. 2, p. 159-174, 2014.
- Bindels, L. B.; Dewulf, E. M.; & Delzenne, N. M. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 4, p. 226-232, 2013.
- Borregaard, N. What Doesn't Kill You Makes You Stronger: The Anti-inflammatory Effect of Neutrophil Respiratory Burst. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 1-2, 2014.

- Branitzki-Heinemann, K.; Okumura, C. Y.; Völlger, L.; Kawakami, Y.; Kawakami, T. *et al.* A novel role for the transcription factor HIF-1 α in the formation of mast cell extracellular traps. **Biochemical Journal**, v. 446, n. 1, p. 159-163, 2012.
- Campbell, E. L.; Bruyninckx, W. J.; Kelly, C. J.; Glover, L. E.; McNamee, E. N. *et al.* Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 66-77, 2014.
- Campbell, E. L.; & Colgan, S. P. Neutrophils and inflammatory metabolism in antimicrobial functions of the mucosa. **Journal of leukocyte biology**, v. 98, n. 4, p. 517-522, 2015.
- Charpentier, T.; Hammami, A.; & Stäger, S. Hypoxia inducible factor 1 α : A critical factor for the immune response to pathogens and Leishmania. **Cellular immunology**, v. 309, p. 42-49, 2016.
- Chen, S.; Okahara, F.; Osaki, N.; & Shimotoyodome, A. Increased GIP signaling induces adipose inflammation via a HIF-1 α -dependent pathway and impairs insulin sensitivity in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 5, p. E414-E425, 2014.
- Cho, S. H.; Raybuck, A. L.; Stengel, K.; Wei, M.; Beck, T. C.; Volanakis, E. *et al.* Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 234, 2016.
- Corcoran, S. E.; & O'Neill, L. A. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 10, p. 3699-3707, 2016.
- Corrêa-Oliveira, R.; Fachi, J. L.; Vieira, A.; Sato, F. T.; & Vinolo, M. A. R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & translational immunology**, v. 5, n. 4, 2016.

- Cramer, T.; Yamanishi, Y.; Clausen, B. E.; Förster, I.; Pawlinski, R. *et al.* HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 645-657, 2003.
- Cummins, E. P.; Keogh, C. E.; Crean, D.; & Taylor, C. T. The role of HIF in immunity and inflammation. **Molecular aspects of medicine**, v. 47, p. 24-34, 2016.
- Dehne, N.; & Brüne, B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. **Experimental cell research**, v. 315, n. 11, p. 1791-1797, 2009.
- Déry, M. A. C.; Michaud, M. D.; & Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 3, p. 535-540, 2005.
- D'ignazio, L.; Bandarra, D.; & Rocha, S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. **The FEBS journal**, v. 283, n. 3, p. 413-424, 2016.
- D'Ignazio, L.; Batie, M.; & Rocha, S. Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF- κ B. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, p. 21, 2017.
- Eftimiadi, C., Buzzi, E., Tonetti, M., Buffa, P., Buffa, D. *et al.* Short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria alter the physiological responses of human neutrophils to chemotactic peptide. **Journal of Infection**, v. 14, n. 1, p. 43-48, 1987.
- Fecher, R. A.; Horwath, M. C.; Friedrich, D.; Rupp, J.; & Deepe, G. S. Inverse correlation between IL-10 and HIF-1 α in macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. **The Journal of Immunology**, p. 1600342, 2016.
- Flamme, I.; Oehme, F.; Ellinghaus, P.; Jeske, M.; Keldenich, J.; & Thuss, U. Mimicking hypoxia to treat anemia: HIF-stabilizer BAY 85-3934 (Molidustat) stimulates erythropoietin production without hypertensive effects. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e111838, 2014.

- Fine, D. H.; Markowitz, K.; Furgang, D.; Fairlie, K.; Ferrandiz, J. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3859-3869, 2007.
- Folco, E. J.; Sukhova, G. K.; Quillard, T.; & Libby, P. Moderate hypoxia potentiates interleukin-1 β production in activated human macrophages. **Circulation research**, v. 115, n. 10, p. 875, 2014.
- Fujita, T.; Yoshimoto, T.; Kajiya, M.; Ouhara, K.; Matsuda, S. *et al.* Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. **Japanese Dental Science Review**, 2017.
- Futosi, K.; Fodor, S.; & Mócsai, A. Reprint of neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways. **International Immunopharmacology** 17.3 (2013): 638–650. *PMC*. Web. 25 June 2018.
- Gale, D. P.; & Maxwell, P. H. The role of HIF in immunity. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 4, p. 486-494, 2010.
- Gómez-Moreno, D.; Adrover, J. M.; & Hidalgo, A. Neutrophils as effectors of vascular inflammation. **European journal of clinical investigation**, p. e12940, 2018.
- Haddad, J. J.; & Harb, H. L. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . **International immunopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 461-483, 2005.
- Harris, A. J.; Thompson, A. R.; Whyte, M. K.; & Walmsley, S. R. HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. **Hypoxia**, v. 2, p. 47, 2014.
- Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. **Trends in immunology**, v. 35, n. 1, p. 3-11, 2014.

- Hajishengallis, G.; Chavakis, T.; Hajishengallis, E.; & Lambris, J. D. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. **Journal of leukocyte biology**, v. 98, n. 4, p. 539-548, 2015.
- Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30, 2015.
- Hellebrekers, P.; Vrisekoop, N.; & Koenderman, L. Neutrophil phenotypes in health and disease. **European journal of clinical investigation**, p. e12943, 2018.
- Hoenderdos, K.; Lodge, K. M.; Hirst, R. A.; Chen, C.; Palazzo, S. G. *et al.* Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. **Thorax**, v. 71, n. 11, p. 1030-1038, 2016.
- Hollander, A. P.; Corke, K. P.; Freemont, A. J.; & Lewis, C. E. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α by macrophages in the rheumatoid synovium: Implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 7, p. 1540-1544, 2001.
- Iglesias, D. P. P. Expressão Imuno-histoquímica de COX-2, EMMPRIN, HIF-1 α e GLUT-1 no tecido gengival normal e inflamado. 2012.
- Imtiyaz, H. Z.; & Simon, M. C. Celeste. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. **Diverse Effects of Hypoxia on Tumor Progression**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 105-120, 2010.
- Kelly, C. J.; Zheng, L.; Campbell, E. L.; Saeedi, B.; Scholz, C. C. *et al.* Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 5, p. 662-671, 2015.

- Kolaczowska, E.; & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159, 2013.
- Kong, T.; Eltzschig, H. K.; Karhausen, J.; Colgan, S. P.; & Shelley, C. S. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of $\beta 2$ integrin gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 28, p. 10440-10445, 2004.
- Konisti, S.; Kiriakidis, S.; & Paleolog, E. M. Hypoxia a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 153, 2012.
- Krzywinska, E.; & Stockmann, C. Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, p. 56, 2018.
- Langlois, C.; Del Gatto, A.; Arseneault, G.; Lafrance-Vanasse, J.; De Simone, M. *et al.* Structure-based design of a potent artificial transactivation domain based on p53. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1715-1723, 2012.
- Lee, J. W.; Bae, S. H.; Jeong, J. W.; Kim, S. H.; & Kim, K. W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1-12, 2004.
- Lihong, F.; Li, J.; Yu, Z.; Dang, X.; & Wang, K. The Hypoxia-Inducible Factor Pathway, Prolyl Hydroxylase Domain Protein Inhibitors, and Their Roles in Bone Repair and Regeneration. **BioMed Research International**, vol. 2014, 2014.
- Lin, A. E.; Beasley, F. C.; Olson, J.; Keller, N.; Shalwitz, R. A. *et al.* Role of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in innate defense against uropathogenic *Escherichia coli* infection. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 4, p. e1004818, 2015.

- Lin, N.; & Simon, M. C. Celeste. Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 10, p. 3661-3671, 2016.
- Lodge, K. M.; Thompson, A. R.; Chilvers, E. R.; & Condliffe, A. M. Hypoxic regulation of neutrophil function and consequences for *Staphylococcus aureus* infection. **Microbes and infection**, v. 19, n. 3, p. 166-176, 2017.
- Mantovani, A.; Cassatella, M. A.; Costantini, C.; & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519, 2011.
- Matak, P.; Heinis, M.; Mathieu, J. R.; Corriden, R.; Cuvellier, S. *et al.* Myeloid HIF-1 is protective in *Helicobacter pylori* mediated gastritis. **Journal of Immunology**, April 1, 2015.
- McGovern, N. N.; Cowburn, A. S.; Porter, L.; Walmsley, S. R.; Summers, C. *et al.* Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. **The Journal of Immunology**, p. 1002213, 2010.
- Meijer, K.; de Vos, P.; & Priebe, M. G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, n. 6, p. 715-721, 2010.
- Murray, J. K.; Balan, C.; Allgeier, A. M.; Kasparian, A.; Viswanadhan, V. *et al.* Dipeptidyl-quinolone derivatives inhibit hypoxia inducible factor-1 α prolyl hydroxylases-1,-2, and-3 with altered selectivity. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 12, n. 5, p. 676-686, 2010.
- Nauseef, W. M.; & Borregaard, N. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602, 2014.

- Narita, T., Yin, S.; Gelin, C. F.; Moreno, C. S.; Yepes, M. *et al.* Identification of a novel small molecule HIF-1 α translation inhibitor. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6128-6136, 2009.
- Nathan, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846, 2002.
- Niederman, R.; Zhang, J.; & Kashket, S. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 3, p. 269-290, 1997.
- Nizet, V.; & Johnson, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 9, p. 609-617, 2009.
- Nordenfelt, P.; & Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 2, p. 271-284, 2011.
- Okumura, C. Y.; Hollands, A.; Tran, D. N.; Olson, J.; Dahesh, S. *et al.* A new pharmacological agent (AKB-4924) stabilizes hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and increases skin innate defenses against bacterial infection. **Journal of molecular medicine**, v. 90, n. 9, p. 1079-1089, 2012.
- Oliveira, V. D. A. **Ácidos graxos de cadeia curta, produtos do metabolismo da microbiota intestinal, protegem da lesão renal aguda.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Palazon, A.; Goldrath, A. W.; Nizet, V.; & Johnson, R. S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. **Immunity**, v. 41, n. 4, p. 518-528, 2014.
- Pradeep, A. R.; Prapulla, D. V.; Sharma, A.; & Sujatha, P. B. Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 200-204, 2011.

- Peyssonnaud, C.; Datta, V.; Cramer, T.; Doedens, A.; Theodorakis, E. A. *et al.* HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 7, p. 1806-1815, 2005.
- Rodrigues, H. G.; Sato, F. T.; Curi, R.; & Vinolo, M. A. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 50-58, 2016.
- Roy, C. C.; Kien, C. L.; Bouthillier, L.; & Levy, E. Short-chain fatty acids: ready for prime time. **Nutrition in clinical practice**, v. 21, n. 4, p. 351-366, 2006.
- Semenza, G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 47-71, 2014.
- Semenza, G. L. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. **American Physiological Society**, 2004.
- Schaible, B.; McClean, S.; Selfridge, A.; Broquet, A.; Asehnoune, K. *et al.* Hypoxia modulates infection of epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56491, 2013.
- Scholz, C. C.; & Taylor, C. T. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. **Current opinion in pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 646-653, 2013.
- Shi, Q. Y.; Huang, S. G.; Zeng, J. H.; & Fang, X. G. Expression of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor-C in human chronic periodontitis. **Journal of Dental Sciences**, v. 10, n. 3, p. 323-333, 2015.
- Silva, Í. C. NEUTRÓFILOS: ASPECTOS CLÁSSICOS, PLASTICIDADE E NOVAS FUNÇÕES IMUNORREGULATÓRIAS. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-**

Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies, v. 7, n. 1, 2016.

Simons, E. R. Measurement of phagocytosis and of the phagosomal environment in polymorphonuclear phagocytes by flow cytometry. **Current protocols in cytometry**, p. 9.31. 1-9.31. 10, 2010.

Sims, J. E.; & Smith, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89, 2010.

Sina, C.; Gavrilova, O.; Förster, M.; Till, A.; Derer, S.; Hildebrand, F. *et al.* G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7514-7522, 2009.51-60, 2007.

Siqueira, D. M. D. **Estudo da correlação entre a expressão de genes reguladores do estado de hipóxia e a intensidade da resposta inflamatória aguda**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Snodgrass, R. G.; Bob, M.; Zezina, E.; Weigert, A.; Dehne, N.; Fleming, I. *et al.* Hypoxia potentiates palmitate-induced pro-inflammatory activation of primary human macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M115. 686709, 2015.

Soto-Barreras, U.; Cortés-Sandoval, G.; Dominguez-Perez, R.; Loyola-Leyva, A.; Martinez-Rodriguez, P. R. *et al.* Stimulatory effect of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DNA on proinflammatory cytokine expression by human gingival fibroblasts. **Archives of oral biology**, v. 82, p. 127-133, 2017.

Suppa, A. P. **Estudo da expressão dos genes regulatórios de hipóxia durante a inflamação pulmonar produzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos AIRmax e AIRmin**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- Steinberg, B. E.; Scott, C. C.; & Grinstein, S. High-throughput assays of phagocytosis, phagosome maturation, and bacterial invasion. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 292,C945-C952, 2007.
- Tamassia, N.; Bianchetto-Aguilera, F.; Arruda-Silva, F.; Gardiman, E.; Gasperini, S. *et al.* Cytokine production by human neutrophils: revisiting the dark side of the moon. **European journal of clinical investigation**, p. e12952, 2018.
- Tan, J.; McKenzie, C.; Potamitis, M.; Thorburn, A. N.; Mackay, C. R. *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease. In: **Advances in immunology**. Academic Press, 2014. p. 91-119.
- Tannahill, G. M.; Curtis, A. M.; Adamik, J.; Palsson-McDermott, E. M.; McGettrick, A. F. *et al.* Succinate Is a Danger Signal That Induces IL-1 β via HIF-1 α . **Nature** 496.7444 (2013): 238–242. *PMC*. Web. 31 July 2018.
- Taylor, C. T.; Doherty, G.; Fallon, P. G.; & Cummins, E. P. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 10, p. 3716-3724, 2016.
- Taylor, C. T.; & Colgan, S. P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 12, p. 774, 2017.
- Thompson, A. R.; Binham, J.; Plant, T.; Whyte, M. K.; & Walmsley, S. R. Hypoxia, the HIF pathway and neutrophilic inflammatory responses. **Biological chemistry**, v. 394, n. 4, p. 471-477, 2013.
- Vasconcelos, R. C. **Análise Imuno-Histoquímica das Proteínas VEGF e HIF-1 α Na Doença Periodontal**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Patologia Oral, Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

- Vermeren, S.; Karmakar, U.; & Rossi, A. G. Immune complex-induced neutrophil functions: A focus on cell death. **European journal of clinical investigation**, p. e12948, 2018.
- Vinolo, M. A.; Hatanaka, E.; Lambertucci, R. H.; Newsholme, P., & Curi, R. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. **Cell biochemistry and function**, v. 27, n. 1, p. 48-55, 2009.
- Vinolo, M. A.; Rodrigues, H. G.; Hatanaka, E.; Hebeda, C. B.; Farsky, S. H.; & Curi, R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clinical Science**, v. 117, n. 9, p. 331-338, 2009.
- Vinolo, M. A.; Ferguson, G. J.; Kulkarni, S.; Damoulakis, G.; Anderson, K. *et al.* SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21205, 2011.
- Vinolo, M. A.; Rodrigues, H. G.; Hatanaka, E.; Sato, F. T.; Sampaio, S. C. *et al.* Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 9, p. 849-855, 2011.
- Vinolo, M. A.; Rodrigues, H. G.; Nachbar, R. T.; & Curi, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858-876, 2011.
- Walmsley, S. R.; Farahi, N.; Peyssonnaud, C.; Johnson, R. S.; Cramer, T. *et al.* Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 1, p. 105-115, 2005.
- Walmsley, S. R.; McGovern, N. N.; Whyte, M. K.; & Chilvers, E. R. The HIF/VHL pathway: from oxygen sensing to innate immunity. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 38, n. 3, p. 251-255, 2008.

- Walmsley, S. R.; Chilvers, E. R.; Thompson, A. A.; Vaughan, K.; Marriott, H. M. *et al.* Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 3, p. 1053-1063, 2011.
- Yang, F.; Feng, C.; Zhang, X.; Lu, J.; & Zhao, Y. The diverse biological functions of neutrophils, beyond the defense against infections. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 311-323, 2017.
- Zampell, J. C.; Yan, A.; Avraham, T.; Daluvoy, S.; Weitman, E. S. *et al.* HIF-1 α coordinates lymphangiogenesis during wound healing and in response to inflammation. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 3, p. 1027-1039, 2012.
- Zarembek, K. A.; & Malech, H. L. HIF-1 α : a master regulator of innate host defenses?. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 7, p. 1702-1704, 2005.
- Ziello, J. E.; Jovin, I. S.; & Huang, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **Yale J Biol Med**, v. 80, n. 2, p.
- Zinkernagel, A. S.; Johnson, R. S.; & Nizet, V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. **Journal of molecular medicine**, v. 85, n. 12, p. 1339-1346, 2007.

Anexo I – Protocolo do comitê de ética



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Relevância da ativação do fator induzido por hipóxia (HIF) na resposta de fagócitos a bactérias anaeróbias", protocolo nº 4171-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo / Felipe Cezar Pinheiro de Mato / José Luis Fachi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 07 de março de 2016.

Vigência do projeto: 04/2016-12/2017

Início do experimento envolvendo manipulação animal: ABRIL/2016

- Espécie/Linhagem: Camundongo transgênico / B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J

No. de animais: 10 - Idade/Peso: 02 meses / 25g - Sexo: machos

- Espécie/Linhagem: Camundongo transgênico / B6.129S4(C)-Vhltm1Jae/J

No. de animais: 10 - Idade/Peso: 02 meses / 25g - Sexo: machos

- Espécie/Linhagem: B6.129-Hif1atm3Rsjo/J

No. de animais: 10 - Idade/Peso: 02 meses / 25g - Sexo: machos

- Espécie/Linhagem: Camundongo Knockout / LisozimaCre+Vhlflx+/+

No. de animais: 168 - Idade/Peso: 02 meses / 25g - Sexo: machos

Origem: Biotério de Animais Transgênicos, DGEB/IB/UNICAMP

- Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib

No. de animais: 84 - Idade/Peso: 02 meses / 25g - Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 07 de março de 2016.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

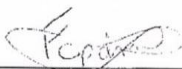
Anexo II – Declaração dos direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam na minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada " **Relevância da ativação do fator induzido por hipóxia (HIF) na resposta de neutrófilos a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: possível implicação no efeito dos AGCCs**", não infringem os dispositivos da Lei nº. 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 21 de agosto de 2018.

Assinatura: _____



Nome do(a) autor(a): **Felipe Cezar Pinheiro de Mato**

RG nº. 10.052.672.-7

Assinatura: _____



Nome do(a) orientador(a): **Marco Aurélio Ramirez Vinolo**

RG nº. 33.269.470-7