

EFEITOS DA ESTABILIZAÇÃO DE HIF-1 α , MEDIADA PELA DELEÇÃO DE VHL, SOBRE A FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

GUILHERME RIBEIRO DA SILVA¹, GUSTAVO GASTÃO DAVANZO¹; JOÃO VICTOR VIRGILIO DA SILVA¹; CRISTHIANE FAVERO DE AGUIAR¹; PEDRO MANOEL MENDES MORAES-VIEIRA¹.

1. Laboratório de Imunometabolismo, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes. Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: HIF-1 α ; imunometabolismo; macrófagos.

Agências financiadoras: FAPESP, CNPq, CAPES.

Macrófagos são células plásticas do sistema imunológico envolvidas na defesa do hospedeiro e homeostase tecidual. Essas células assumem um perfil pró-inflamatório quando ativadas com lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular de bactérias gram-negativas, e IFN- γ , produzido por linfócitos TCD4 em respostas Th1¹. Esse perfil é caracterizado pela indução do fator nuclear- κ B (NF- κ B), fator de transcrição que pode ser formado pelo dímero p50-p65 e, após fosforilação da subunidade p65, induz a expressão de genes alvo associados à inflamação. Além disso, macrófagos passam a produzir citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) e expressar a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), enzima responsável pela produção óxido nítrico (NO)¹. Para assumir esse perfil, macrófagos assumem um metabolismo altamente glicolítico, com indução de enzimas como piruvato quinase M2 (Pkm2), lactato desidrogenase subunidade a (Ldha) e frutose-2,6-bifosfatase 3 (Pfkfb3)². Além disso, a fosforilação oxidativa é reduzida². Uma molécula-chave envolvida nessa mudança metabólica é o fator de transcrição induzido por hipóxia-1 α (HIF-1 α). HIF-1 α é expresso e degradado constitutivamente em condições de normóxia, em um mecanismo dependente de ubiquitinação pela proteína VHL³. Durante a ativação com LPS e IFN- γ , HIF-1 α é ativado em macrófagos e induz genes envolvidos na via glicolítica e citocinas pró-inflamatórias³. Portanto, nossa hipótese é que a deleção de VHL em células da linhagem mieloide (VHL^{-/-}) induz maior estabilização de HIF-1 α , aumentando a glicólise e o perfil pró-inflamatório de macrófagos.

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) têm HIF-1 α estabilizado após ativação com LPS e IFN- γ (Figura 1A), enquanto macrófagos VHL^{-/-} apresentam HIF-1 α estabilizado mesmo sem estímulo, em níveis maiores após ativação comparados com macrófagos VHL^{+/+} (Figura 1A). Apesar de não haver diferença entre os grupos na quantidade de HIF-1 α no núcleo, macrófagos VHL^{-/-} têm maiores níveis totais de HIF-1 α em relação ao grupo VHL^{+/+} (Figura 1B e C). Esses dados indicam que a deleção de VHL em células da linhagem mieloide induz aumento na estabilização de HIF-1 α em macrófagos.

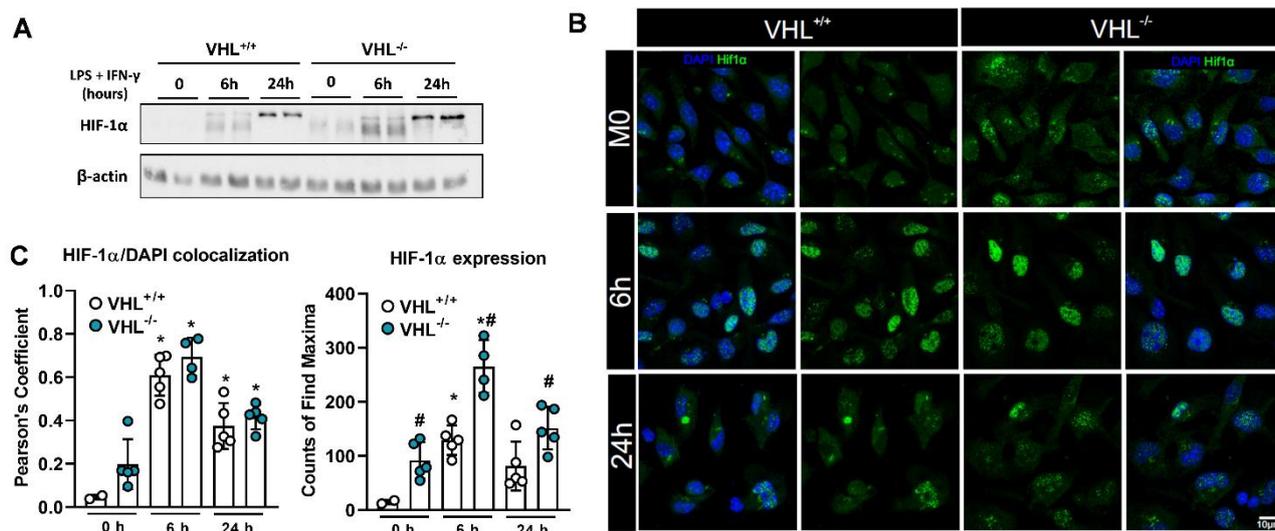


Figura 1. A deleção de VHL aumenta os níveis de HIF-1 α em macrófagos. BMDMs de animais VHL^{+/+} e VHL^{-/-} foram estimulados com LPS (100ng/ml) e IFN- γ (20ng/ml) por 6 e 24 horas. (A) Níveis proteicos de HIF-1 α determinados por Western Blotting. (B) Microscopia de imunofluorescência de HIF-1 α e núcleo (DAPI). (C) Quantificação da expressão de HIF-1 α e da colocalização de HIF-1 α /DAPI. * vs 0h; # VHL^{+/+} vs VHL^{-/-}. Resultados significativos foram considerados para p<0,05.

Para compreender como o aumento da estabilização de HIF-1 α afeta o metabolismo e a função de macrófagos, BMDMs foram estimulados com LPS e IFN- γ por 6 e 24 horas e o perfil metabólico e inflamatório dessas células foi avaliado (Figura 2). Após ativação, a expressão de enzimas da via glicolítica (Pkm2, Pfkfb3 e Ldha) é induzida em macrófagos, sendo maior em macrófagos VHL^{-/-} (Figura 2A). A expressão do transportador de glicose 1 (Glut1) também é maior em macrófagos VHL^{-/-} (Figura 2B). A captação de glicose desse macrófagos também é maior, como indicado pela captação de glicose marcada (Figura 2C). Em condições basais, macrófagos utilizam a respiração mitocondrial para produção de ATP, em níveis menores no grupo VHL^{-/-} (Figura 2D). Após ativação com LPS e IFN- γ as respirações basal e máxima, bem como a produção de ATP mitocondrial, são reduzidas em ambos os grupos, sendo ainda menor em macrófagos VHL^{-/-} (Figura 2D).

Em relação ao perfil pró-inflamatório de macrófagos, a fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B (p-p65) ocorre nos primeiros minutos após ativação com LPS e IFN- γ , juntamente com a redução de I κ B α , inibidor de NF- κ B (Figura 2E). Quando HIF-1 α é estabilizado (VHL^{-/-}), há aumento de p-p65 (Figura 2E). Já o pico de expressão das citocinas Tnf- α , Il-6, Il-1 β ocorre 6 horas após estímulo, sendo reduzido após 24 horas (Figura 2F). Entretanto, em 24 horas a expressão permanece elevada no grupo VHL^{-/-} em relação ao VHL^{+/+} (Figura 2F). A expressão de Nos2 é induzida após ativação, sendo maior no grupo VHL^{-/-} (Figura 2F) e o produto de iNOS, óxido nítrico, é formado após 24 horas, em maiores quantidades no grupo VHL^{-/-} (Figura 2G). Além disso, macrófagos VHL^{-/-} apresentam maior capacidade de *killing* quando incubados com *E. coli* (Figura 2H). Esses dados indicam que o aumento da estabilização de HIF-1 α aumenta o perfil glicolítico de macrófagos, ao mesmo tempo que reduz a respiração mitocondrial. Além disso, o perfil inflamatório de macrófagos VHL^{-/-} é exacerbado.

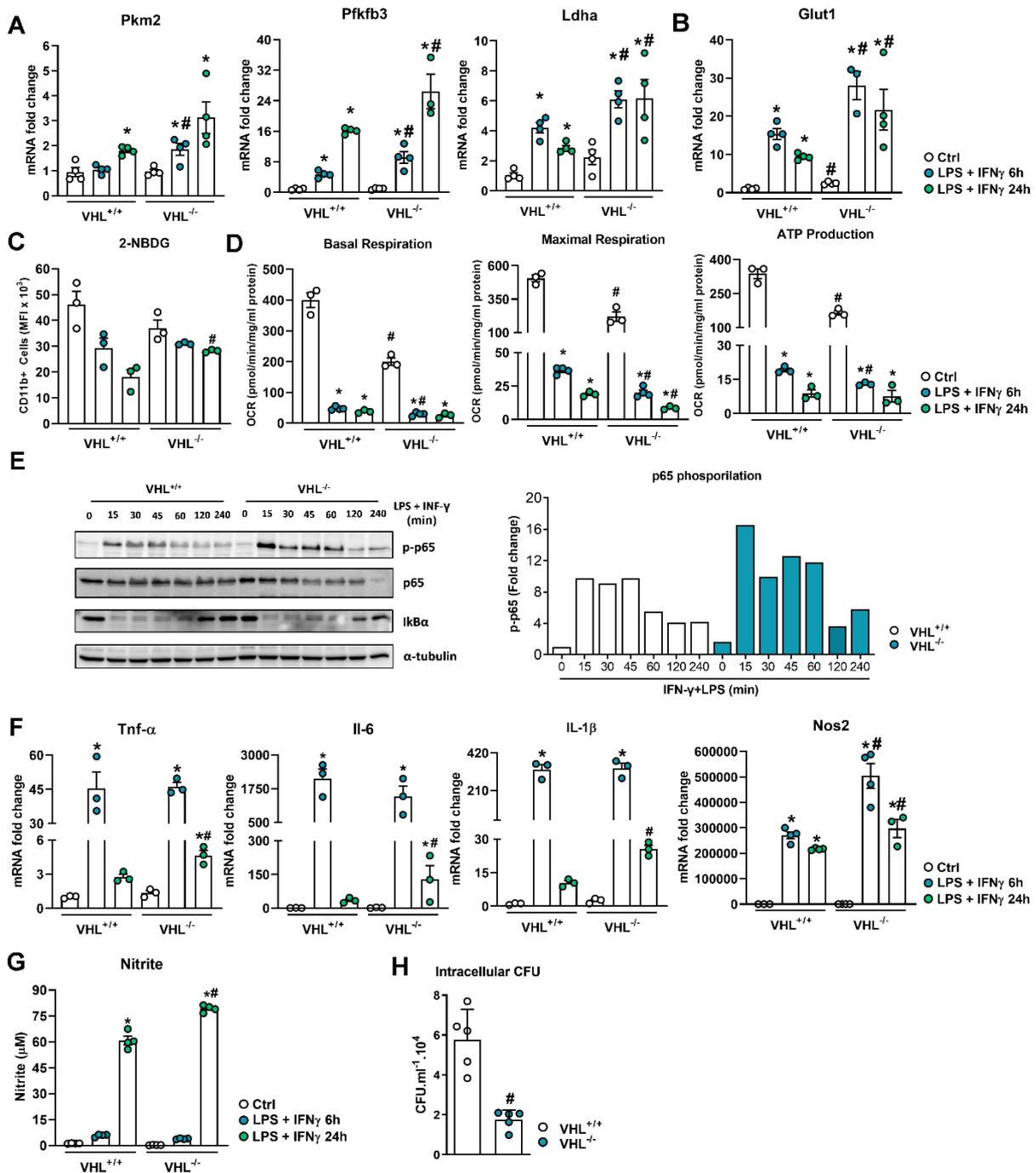


Figura 2. O aumento dos níveis de HIF-1 α afeta o metabolismo e a função de macrófagos. BMDMs de animais VHL $^{+/+}$ e VHL $^{-/-}$ foram estimulados com LPS (100ng/ml) e IFN- γ (20ng/ml) por 6 e 24 horas. (A,B) Expressão gênica Pkm2, Pfkfb3, Ldha e Glut1 determinados por RT-PCR. (C) Macrófagos foram incubados com glicose marcada (2-NBDG) e a captação de glicose foi determinada por citometria de fluxo. (C,D) Respiração celular e produção de ATP determinados por *Seahorse Mito Stress*. (E) BMDMs de animais VHL $^{+/+}$ e VHL $^{-/-}$ foram estimulados com LPS (100ng/ml) e IFN- γ (20ng/ml) por 15, 30, 45, 60, 120 e 240 minutos. Níveis da subunidade p65 de NF- κ B (total e fosforilada) e I κ B α determinados por Western Blotting. (F) Expressão gênica de Tnf- α , Il-6, Il-1 β e Nos2 determinados por RT-PCR. (G) Quantificação de nitrito por reação de Griess. (H) BMDMs de animais VHL $^{+/+}$ e VHL $^{-/-}$ foram incubados com *E. coli* por 1,5h e permaneceram em RPMI por 4h. Células foram lisadas, adicionadas em placa de ágar e deixadas *overnight* a 37°C. * vs 0h; # VHL $^{+/+}$ vs VHL $^{-/-}$. Resultados significativos foram considerados para p<0,05.

Dado o fenótipo de macrófagos VHL^{-/-}, decidimos verificar como o aumento na estabilização de HIF-1 α afeta a resposta a infecções bacterianas *in vivo*. *Klebsiella pneumoniae* (KP) é uma bactéria gram-negativa associada a infecções nos tratos urinários e respiratórios, principalmente em indivíduos imunossuprimidos e no ambiente hospitalar. Codo *et al*⁴ demonstraram que a produção de IL-1 β , num mecanismo dependente de caspase-1/11, é importante para a resolução da infecção por KP, *in vivo* e *in vitro*. Como IL-1 β é um gene alvo de HIF-1 α ⁵, decidimos avaliar a resposta desses de animais VHL^{-/-} à infecção pulmonar por KP por 4 dias, com uma dose não-letal (Figura 3).

Ao longo dos 4 dias de infecção, animais VHL^{+/+} e VHL^{-/-} perderam peso (Figura 3A). Ao final do período, o grupo VHL^{+/+} apresentava menor variação de peso que o grupo VHL^{-/-} (Figura 3A). O aumento de proteínas no lavado bronco-alveolar (BAL), que indica perda da integridade do tecido em decorrência da infecção, foi maior apenas no grupo VHL^{+/+} (Figura 3B). Já o infiltrado celular no pulmão aumenta em ambos os grupos, sem diferenças entre eles (Figura 3C e D). Em conformidade com nossos dados prévios (Figura 1), monócitos, macrófagos alveolares e macrófagos infiltrantes apresentam HIF-1 α estabilizado mesmo sem ativação (Figura 3E). No contexto da infecção, há aumento do infiltrado de neutrófilos tanto no tecido quanto no BAL, sem diferenças entre os grupos VHL^{+/+} e VHL^{-/-} (Figura 3F). A população de macrófagos infiltrantes aumenta da mesma maneira no tecido pulmonar em ambos os grupos, enquanto há redução dos macrófagos alveolares (Figura 3G). No BAL, a população de monócitos aumenta após infecção, mas, ao final do período analisado, é menor no grupo VHL^{-/-} (Figura 3H). Além disso, no grupo VHL^{+/+} há mais macrófagos infiltrantes no BAL após infecção, mas não no grupo VHL^{-/-} (Figura 3H). A população de macrófagos alveolares no BAL é reduzida no grupo VHL^{+/+}, mas recuperada no grupo VHL^{-/-} (Figura 3H). No tecido pulmonar e no BAL, a infecção induz a expressão de IL-1 β em monócitos e macrófagos infiltrantes (Figura 3I), mas no BAL essa expressão é reduzida no grupo VHL^{-/-} em relação ao VHL^{+/+} (Figura 3J). A indução de IL-1 β não ocorre em macrófagos alveolares do BAL (Figura 3K). Em relação às citocinas no BAL, IL-6 e TNF- α são induzidas após infecção, mas estão em menor quantidade no grupo VHL^{-/-}, enquanto os níveis de IL-1 β são maiores apenas no grupo VHL^{+/+} (Figura 3L). Esses dados indicam que a infecção por *Klebsiella pneumoniae* induz dano pulmonar em ambos os animais VHL^{+/+} e VHL^{-/-}. Em decorrência da recuperação de peso ser mais rápida no grupo VHL^{-/-}, bem como pela menor quantidade de proteínas, citocinas pró-inflamatórias e células infiltrantes no BAL, nossos dados indicam que o aumento da estabilização de HIF-1 α na linhagem mieloide contribui para a resolução mais rápida da infecção nesse contexto.

REFERÊNCIAS

1. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 541–566 (2017).
2. Kelly, B. & O'Neill, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* **25**, 771–784 (2015).
3. McGettrick, A. F. & O'Neill, L. A. J. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab.* **32**, 524–536 (2020).
4. Codo, A. C. *et al.* Inhibition of inflammasome activation by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae* impairs efferocytosis and leads to bacterial dissemination. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
5. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature.* **496**, 238–242 (2013).

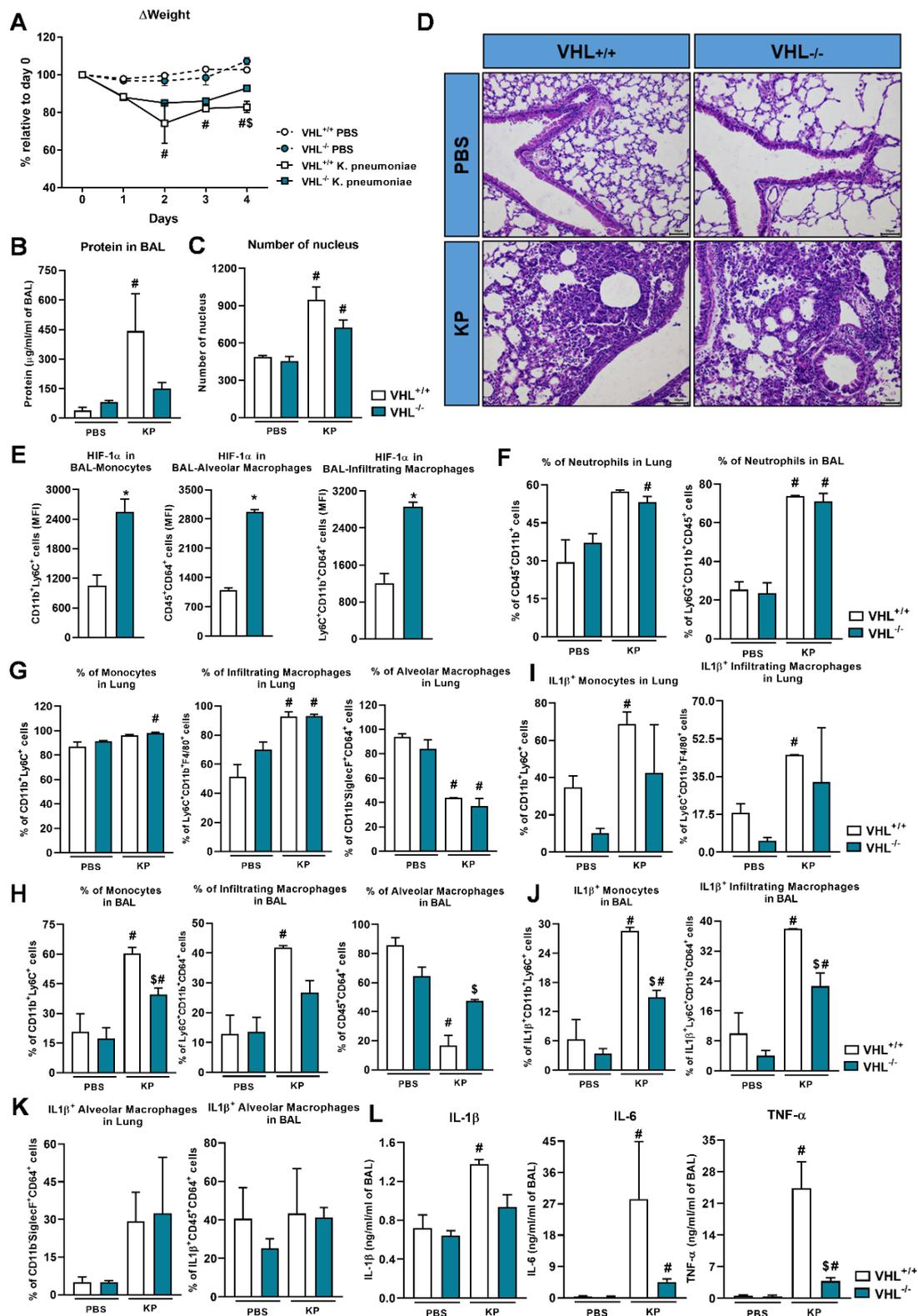


Figura 3. Animais VHL^{+/+} e VHL^{-/-} foram tratados por via nasal com 10⁸ CFU de *Klebsiella pneumoniae* (KP) ou PBS e o lavado bronco-alveolar (BAL) e o pulmão foram coletados após 4 dias. (A) Variação de peso ao longo da infecção. (B) Quantidade total de proteína no BAL. (C,D) Quantificação de células por número de núcleos e histologia do pulmão (hematoxilina-eosina). (E) Quantidade de HIF-1 α em macrófagos do pulmão sem infecção. (F) Porcentagem de neutrófilos no pulmão e no BAL. (G,H) Porcentagem de monócitos e macrófagos no pulmão e no BAL. (I,J,K) Porcentagem de monócitos e macrófagos expressando IL-1 β . (L) Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no BAL por ELISA. Estratégia de gate a partir de células vivas CD45⁺. * PBS vs PBS; # KP vs PBS; \$ KP vs KP. Resultados significativos foram considerados para p<0,05.