

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alterações epigenéticas induzidas pelo IFN- γ e envolvidas na
diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos
(Mo-DCs) durante a malária.

ORIENTADA: Fernanda Chacon Cavalcante

ORIENTADOR: Ricardo Tostes Gazzinelli

CO- ORIENTADORA: Patricia Aparecida Assis

BELO HORIZONTE
MAIO 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Alterações epigenéticas induzidas pelo IFN- γ e envolvidas na
diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos
(Mo-DCs) durante a malária.

Fernanda Chacon Cavalcante

Dissertação submetida ao programa de
Pósgraduação em Genética (Área de
Concentração em Genética Molecular, de
Microorganismos e Biotecnologia) da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Genética.

043

Cavalcante, Fernanda Chacon.

Alterações epigenéticas induzidas pelo IFN- γ e envolvidas na diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) durante a malária [manuscrito] / Fernanda Chacon Cavalcante. – 2018.

56 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Tostes Gazzinelli. Co-orientadora: Patrícia Aparecida Assis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. Epigenômica. 3. Plasmodium. 4. Monócitos. 5. Células dendríticas. 6. Interferons. 7. Malária. I. Gazzinelli, Ricardo Tostes. II. Assis, Patrícia Aparecida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
Fernanda Chacon Cavalcante

269/2018
entrada
1º/2016
CPF:
981.847.092-34

Às nove horas do dia **25 de maio de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Alterações epigenéticas induzidas pelo IFN- γ e envolvidas na diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) durante a malária**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Ricardo Gazzinelli**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Ricardo Gazzinelli	UFMG	355.766.506-20	APROVADO
Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo	UFMG	917650806-49	APROVADA
Taís Nobrega de Sousa	Fiocruz - René Rachou	046 090 796-40	Aprovada
Patrícia Aparecida de Assis	UMASS Medical School	298-499.438-41	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 25 de maio de 2018.

Ricardo Gazzinelli

Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo

Taís Nobrega de Sousa

Patrícia Aparecida de Assis

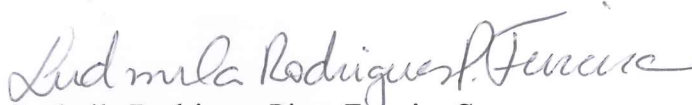


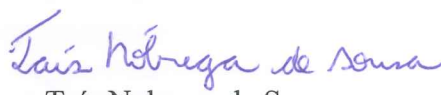
**"Alterações epigenéticas induzidas pelo IFN- γ e envolvidas na
diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs)
durante a malária."**

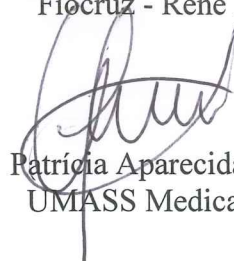
Fernanda Chacon Cavalcante

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Ricardo Gazzinelli
UFMG


Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo
UFMG


Taís Nobrega de Sousa
Fiocruz - René Rachou


Patrícia Aparecida de Assis
UMASS Medical School

Belo Horizonte, 25 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr., Ricardo Gazzinelli por me receber em seu laboratório, por todas as oportunidades nesse período, pelos desafios propostos e pelo exemplo de amor a ciência.

À Dra. Patricia Aparecida Assis pelo direcionamento, ensinamento e ajuda minuciosa na execução de todos os experimentos, sem dúvida contribuíram muito para o meu crescimento científico.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia pela amizade e apoio durante esses dois anos.

À Clécia, por ser nossa mãe no laboratório, Lídia e Marina por toda eficiência.

As minhas amigas e companheiras de laboratório Camila, Isabella, Júlia e Larissa por dividirem as angústias do dia-a-dia e por proporcionarem os melhores momentos nesses dois anos em Belo Horizonte, vocês foram a minha família aqui e com certeza foram responsáveis por muito que aprendi, obrigada por torcerem sempre por mim.

Em especial a Natália, pela linda amizade construída nesses 2 anos, que com certeza levarei pra vida. Obrigada pela disponibilidade para me ouvir, pelas inúmeras ajudas com experimentos e pela companhia em todos os momentos.

Aos meus pais, Delmiro e Angélica por sempre acreditarem em mim e pelo apoio em todos os momentos. Amo vocês.

Ao meu marido Rodrigo, meu maior incentivador. Obrigada pelo amor, compreensão, por ser meu porto seguro e principalmente por acreditar nos meus sonhos junto comigo. Estamos juntos sempre!

Ao meu João, que mesmo ainda na barriga já me faz sentir a pessoa mais feliz do mundo.

À CAPES, pela concessão da bolsa ao longo deste período.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA QUADROS	4
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.2 Imunopatologia da malária	9
1.3. Epigenética	11
1.3.1 Metilação do DNA	12
1.3.2 Modificações de histonas.....	13
2 OBJETIVO GERAL	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 Modelo experimental de malária cerebral.....	17
3.1.1 Animais	17
3.1.2 Infecção.....	17
3.2 Obtenção de células do baço e medula óssea.....	17
3.3 Citometria de fluxo	18
3.4 Análise da expressão de enzimas modificadoras de histonas e de DNA.....	19
3.4.1 Purificação por citometria (<i>Cell Sorting</i>).....	19
3.4.2 Extração de RNA e conversão em cDNA	19
3.4.3 PCR- Real Time	20
3.4.4 Análise da expressão gênica por qPCR	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Análise fenotípica de Mo-DCs presentes no baço e medula óssea de camundongos infectados com <i>P.b.</i> ANKA.....	23
4.2 Cinética de diferenciação de Mo-DCs no baço e na medula de camundongos infectados com <i>Pb</i> ANKA.	25
4.3 Identificação de citocinas com potencial papel regulador na diferenciação de Mo-DCs durante a infecção por <i>P.b.</i> ANKA.....	27
4.4 Purificação de células isoladas de camundongos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com <i>P.b.</i> ANKA e naive.....	29
4.5 Avaliação da expressão de enzimas modificadoras de histonas e de DNA em células isoladas de camundongos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com <i>P.b</i> ANKA.....	33
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs) na malária	10
Figura 2. Representação da estrutura da cromatina	11
Figura 3. Análise da diferenciação de Mo-DCs no baço e medula óssea de camundongos infectados por <i>P.b.</i> ANKA	24
Figura 4. Cinética de diferenciação de Mo-DCs em animais infectados com <i>P.b.</i> ANKA	26
Figura 5. DCs presentes no baço de camundongos infectados por <i>P.b.</i> ANKA	28
Figura 6. Mo-DCs, monócitos inflamatórios e monócitos de animais WT infectados e naive separados por cell sorting.	30
Figura 7. Mo-DCs, monócitos inflamatórios e monócitos de animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados e naive separados por cell sorting.	31
Figura 8. Análise de componentes principais (ACP) da expressão gênica de enzimas modificadoras de DNA e histona em animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados por <i>P.b.</i> ANKA	34
Figura 9. . Expressão gênica de enzimas DNA metiltransferase.	36
Figura 10. Expressão gênica de enzimas Histona Demetilase e Histona Desacetilase.	37
Figura 11. Expressão gênica de enzimas Histona Acetiltransferase e Histonas Metiltransferase.	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Pannel de anticorpos para citometria de fluxo.....	18
Quadro 2. Reagente utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
Quadro 3. Lista de genes alvo avaliados por PCR em tempo real.....	22
Quadro 4. Pureza e número de células após purificação.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APC** – células apresentadoras de antígenos (*Antigens presenting cells*)
- COMPASS**- Complexo de proteínas associados a SET1 (*Complex Proteins Associated with Set1*)
- DCs**- Células dendríticas (*Dendritic cells*)
- DNMT**- DNA metiltransferase
- GAPDH**- gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
- GPI**- glicosil fosfatidilinositol
- GUSB**- beta-glucuronidases
- HATS**- Histonas acetiltransferase
- HDACs**- Histonas desacetilases
- HMTs**- Histonas metiltransferase
- HDMTs**- Histonas demetilases
- HPRT**- hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
- ICAM**- Molécula de adesão intercellular 1 (*Intercellular adhesion molecule1*)
- FN-γ**- interferon
- IL**- interleucina
- LES**- Lúpus eritematoso sistêmico
- miRNA**- micro RNA
- MBPs**- proteínas ligantes de metil CpG
- MCE**- malária cerebral experimental
- Mo-DCs** – células dendríticas derivadas de monócitos
- mRNA**- RNA mensageiro
- NK**- Exterminadoras naturais
- PRC2**- complexo repressivo Polycomb 2 (*polycomb repressive complex 2*)
- PBS**- salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCR**- Reação em cadeia polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PfEMP1**- Proteína de membrane do eritrócito 1 de *Plasmodium falciparum*
- ROS**- espécie reativo de oxigênio
- RNS**- espécie reativo de nitrogênio
- SNC**- sistema nervoso central
- TNF**- fator de necrose tumoral
- TLR**- receptores do tipo *toll* (*Toll Like Receptors*)
- WT**- animal selvagem (*Wild type*)

RESUMO

Em doenças infecciosas como a malária, monócitos, macrófagos e células dendríticas são populações celulares que têm papel crucial no reparo de tecidos, detecção de presença de microrganismos invasores, iniciando respostas imunitárias protetoras. Estímulos inflamatórios e microbianos podem levar à diferenciação de monócitos em células dendríticas (Mo-DCs) no sítio inflamatório. Durante a malária cerebral experimental (MCE), Mo-DCs são diferenciadas em resposta a mediadores inflamatórios, como o IFN- γ , e tem papel chave no desenvolvimento dos sintomas neurológico observados na malária cerebral experimental. Pouco se sabe sobre fatores epigenéticos induzidos por doenças infecciosas, especialmente na malária. Dada a importância das Mo-DCs na imunopatogênese da malária cerebral e outras doenças infecciosas no presente trabalho foi avaliado os possíveis mecanismos epigenéticos envolvidos na diferenciação de Mo-DCs. Além disso, sendo IFN- γ uma citocina chave para a diferenciação destas células, também avaliamos o seu papel como regulador epigenético deste processo. Para isto, Mo-DCs e monócitos foram purificadas a partir do baço e da medula óssea de animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ para a análise da expressão gênica de enzimas envolvidas na regulação epigenética. Foi então demonstrado que a enzima metiltransferase Kmt2c (MLL3) foi altamente expressa em Mo-DCs do baço de forma dependente de IFN- γ . Por outro lado, a enzima metiltransferase Ezh2, responsável pela repressão da transcrição, foi altamente expressa na ausência de IFN- γ . Esses achados sugerem que estas enzimas podem estar envolvidas na regulação da transcrição de genes essenciais para a diferenciação de Mo-DCs no baço durante a infecção por *P.b. ANKA*. Mais estudos são necessários para identificar os genes alvos envolvidos com esses mecanismos epigenéticos e quais os efeitos da inibição dessas enzimas na malária. Por fim, Kmt2c e Ezh2 podem representar importantes alvos para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da malária a cerebral.

Palavras chaves: Plasmodium, IFN- γ , Monócitos, Mo-DCs, Epigenética

ABSTRACT

In infectious diseases such as malaria, monocytes, macrophages and dendritic cells are cellular populations that have crucial role in tissue repair, detection of presence of invading micro-organisms, initiating protective immune responses. Inflammatory and microbial stimuli can lead to the differentiation of monocytes in dendritic cells (Mo-DCs) in the inflammatory site. During experimental cerebral malaria (ECM), Mo-DCs are differentiated in response to inflammatory mediators, such as IFN- γ , and have key role in developing neurological symptoms observed in experimental brain malaria. Is not well known about epigenetic factors induced by infectious diseases, especially in malaria. Given the importance of the Mo-DCs in the immunopathogenesis of cerebral malaria and other infectious diseases in this work, the possible mechanisms epigenetic involved in the differentiation of MO-DCs were evaluated. Moreover, being IFN- γ a key cytokine for the differentiation of these cells, we also evaluate their role as epigenetic regulator of this process. For this, Mo-DCs and monocytes were purified from the spleen and bone marrow of animals WT and IFN- $\gamma^{-/-}$ for the analysis of the gene expression of enzymes involved in the epigenetic regulation. On one hand, studied demonstrated that the enzyme methyltransferase Kmt2c (MLL3) was highly expressed in Mo-DCs of the spleen in a dependent manner on IFN- γ . On the other hand, the enzyme methyltransferase Ezh2, responsible for the repression of the transcription, was highly expressed in the absence of IFN- γ . These findings suggest that these enzymes may be involved in regulating the transcription of essential genes for the differentiation of Mo-DCs in the spleen during the infection by *P.b. ANKA*. More studies are needed to identify the target genes involved with these epigenetic mechanisms and what the effects of inhibition of these enzymes in malaria. Finally, Kmt2c and Ezh2 may represent important targets for the development of new therapies for the treatment of brain malaria.

Keywords: Plasmodium, IFN- γ , Monocytes, Mo-DCs, Epigenetics

1 INTRODUÇÃO

1.1. Malária

A malária é uma doença infecciosa de grande importância no mundo. Está classificada como uma das maiores endemias, sendo um grande obstáculo para o avanço de comunidades e nações menos desenvolvidas. Atualmente, o impacto global referente aos danos sociais e econômicos causados pela malária é extenso e representa um dos maiores problemas de saúde pública nas áreas tropicais e subtropicais do mundo [1,2]. Em 2016, ocorreram mais de 200 milhões de casos da doença no mundo, sendo cerca de 445 mil casos fatais [1]. A maioria dos casos e mortes encontram-se na África Subsaariana, seguida pela Ásia, América Latina e Oriente Médio. No Brasil, em 2016 foram registrados aproximadamente 81.000 casos de malária, sendo que mais de 99% dos casos ocorreram na Região Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo 807 municípios [2]

A infecção é causada pelo parasito *Plasmodium* spp., que é transmitido para seres humanos durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* spp. infectados [3]. Atualmente, são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, principalmente quatro espécies parasitam o homem: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. Ovale* e *P. falciparum* [1].

A principal característica da malária é o padrão cíclico de febre e calafrios, o que está relacionado com a fase intraeritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*. Os demais sintomas, como mal estar generalizado, cefaléia, cansaço e mialgia são uma consequência da inflamação sistêmica gerada pelo parasitismo eritrocítico, caracterizando a imunopatologia da doença. Se prosseguir sem tratamento, esse quadro inflamatório da malária pode contribuir para o desenvolvimento de formas graves da doença, como na infecção por *P. falciparum*. As formas de malária grave podem se manifestar por hiperparasitemia, hipoglicemia, anemia grave, lesão renal, estresse respiratório, edema pulmonar, choque endotóxico e coma (malária cerebral) [3]. Em modelos experimentais, a cepa *Plasmodium berghei* ANKA (*P.b.ANKA*) tem sido bastante utilizada no estudo da malária cerebral experimental (MCE) murina. A MCE é caracterizada pela produção descontrolada de mediadores inflamatórios, seguida de síndrome neurológica, que ocorre de 6 a 12 dias após a infecção, com mortalidade de 90% dos animais. Entre os sintomas da síndrome neurológica estão: pêlo arrepiado, postura arqueada, desequilíbrio, paralisia dos membros, convulsões e coma. A parasitemia no momento da morte é relativamente baixa (~5%), entretanto, os animais que sobrevivem a MCE, morrem em decorrência de anemia grave e parasitemia elevada [4].

1.2 Imunopatologia da malária

A imunidade inata é uma das primeiras barreiras que o organismo possui para detectar a presença de patógenos invasores e rapidamente eliminá-los ou iniciar uma resposta imune adaptativa protetora. Na malária a resposta imune tem início com o reconhecimento do parasito por receptores de reconhecimento padrão do tipo *toll* (TLRs) presentes em monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs). Os receptores TLR2 e TLR4 reconhecem a proteína glicosil fosfatidilinositol (GPI) proveniente do parasito, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 [5,6]. A hemozoína, um metabólito da hemoglobina presente nos eritrócitos que é consumida pelo parasito como fonte de aminoácidos, é um indutor de citocinas pró-inflamatórias, via sinalização por TLR9 [7].

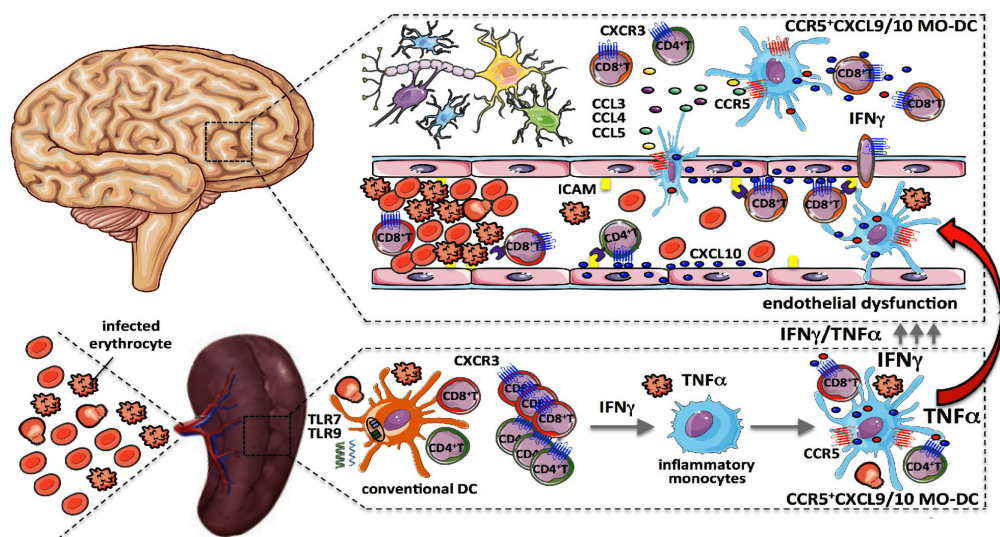
A ativação de monócitos/macrófagos e células dendríticas resulta na secreção de IL-12 por estas células, induzindo assim a produção de TNF- α e IFN- γ por células NK e células T [8,9]. O IFN- γ , por sua vez, promove as respostas pró-inflamatórias e a ativação das funções efectoras dos macrófagos que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), mediando a resistência do hospedeiro à infecção [10]. Em contrapartida, o aumento na expressão de citocinas como TNF- α e IFN- γ também induz a expressão de moléculas de adesão no endotélio, como ICAM-1. Estas se ligam à molécula PfEMP1, expressa na superfície dos eritrócitos infectados [11], o que contribui para o sequestro de hemácias infectadas para o cérebro, podendo romper a barreira hematoencefálica. Como consequência, ocorre o extravasamento (derrame) de sangue para o tecido cerebral causando hipóxia, convulsões, coma e até a morte [12]. Ainda, o IFN- γ está diretamente envolvido no recrutamento de células T CD8⁺ para o cérebro via produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 [13], provocando danos a barreira hematoencefálica através da perforina [14] e granzima B [15,16].

Em camundongos, macrófagos e monócitos inflamatórios (Ly6C^{high}), bem como as células dendríticas são importantes fontes de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Uma característica importante que vêm sendo amplamente descrita em monócitos inflamatórios é o seu potencial para se diferenciar em células dendríticas *in vivo*. Estas células denominadas Células Dendríticas Derivadas de Monócitos (Mo-DCs) se diferenciam nos focos inflamatórios e podem desempenhar um importante papel na indução e regulação da resposta imune contra patógenos, além do desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes [17,18]. A diferenciação de monócitos em Mo-DCs foi inicialmente demonstrada utilizando o modelo de infecção por *Leishmania major*. Nesse estudo, monócitos Ly6C^{high} foram recrutados para a derme e

linfonodos e se diferenciaram em Mo-DCs em ambos locais [19]. Estes achados foram posteriormente confirmados por uma série de trabalhos descrevendo a diferenciação de monócitos em Mo-DCs em diferentes modelos de infecções virais e bacterianas [20,21,22,23]. Na infecção intraperitoneal com *Toxoplasma gondii*, IFN- γ produzido por células NK foi essencial para o recrutamento de monócitos inflamatórios e sua diferenciação em Mo-DCs [24]. Na hematopoiese extramedular observada na malária murina, IFN- γ foi essencial para induzir quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células progenitoras para o baço [25].

Em estudo publicado pelo nosso laboratório, foi demonstrado que a infecção com *P.b. ANKA* induz uma diferenciação massiva de Mo-DCs no baço, a qual posteriormente emerge no sistema nervoso central (SNC) mediando a MCE. A diferenciação e a ativação de Mo-DCs no baço é mediada por receptores de ácidos nucleicos, como TLR7 e TLR9, e dependente de IFN- γ . Do baço, essas Mo-DCs migram para o cérebro, de uma forma dependente da expressão de CCR5, levando ao recrutamento de linfócitos T CD8⁺ via produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 [26].

Figura 1: Células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs) na malária



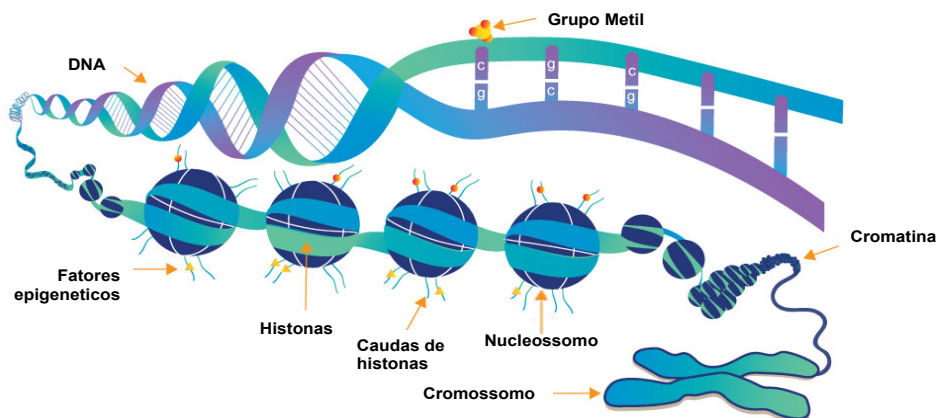
A infecção com *Pb ANKA* leva a ativação de células dendríticas convencionais, que ativam células T. Na presença de IFN- γ , monócitos inflamatórios (iMOS) se diferenciam em Mo-DCs no baço e passam a expressar altos níveis de CCR5, CXCL9 e CXCL10. Após a diferenciação, MO-DCs CCR5⁺ CXCL9⁺ CXCL10⁺ migram para o sistema nervoso central em resposta aos ligantes de CCR5 (CCL3, CCL4 e CCL5) e amplificam o recrutamento de linfócitos T CD8⁺, iniciado por células endoteliais expressando CXCL10 e promovendo o desenvolvimento de MCE[26].

1.3. Epigenética

Em 1942 o termo "epigenética" foi inserido por Conrad Waddington que relacionando-o com o conceito de "epigênese" do século XVII, definiu como um complexo de processos de desenvolvimento entre genótipo e fenótipo [27]. Hoje em dia, o termo epigenética é definido como "os processos que regulam a expressão gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares " [28].

A regulação da expressão gênica é um processo complexo que envolve diferentes mecanismos tais como: acessibilidade, reconhecimento e recrutamento de fatores transcricionais e da RNA polimerase para regiões promotoras. A regulação epigenética envolve mecanismos responsáveis por controlar a acessibilidade física da região promotora à maquinaria de transcrição através da metilação do DNA, das modificações de histonas, expressão do microRNA (miRNA) e o reposicionamento dos nucleossomos (figura 2) [29]. Em 1975 Arthur Riggs propôs um modelo baseado na metilação do DNA para explicar a iniciação e manutenção da inativação do cromossomo X [30]. A partir de então, evidências foram obtidas para apoiar este conceito, e a metilação do DNA ficou conhecida como um fator fundamental para a estabilidade dos estados de expressão gênica, pois estabelece um estado de cromatina inativo ao interagir com proteínas que modificam os nucleossomos [31].

Figura 2: Representação da estrutura da cromatina



As modificações epigenéticas podem ocorrer tanto diretamente no DNA quanto nas caudas de proteínas histonas, facilitando a ativação ou repressão gênica [11].

1.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é o processo no qual um radical metil (-CH₃) é adicionado ao carbono 5 da citosina (5 metilcitosina ou 5mC) e ocorre predominantemente em regiões denominadas “ilhas CpG” [32], regiões do DNA ricas em dinucleotídeos C-Gs [33]. Aproximadamente 60% das regiões promotoras de genes humanos são ricas em ilhas CpG e quando não metiladas encontram-se em estado ativo para a transcrição; e quando são metiladas a transcrição gênica fica impedida, ou seja, o gene alvo é reprimido, sugerindo que estes *clusters* são importantes elementos de regulação gênica [34].

A repressão da transcrição gênica por meio da metilação pode ocorrer por dois mecanismos: 1) diretamente, pelo impedimento físico da ligação de fatores de transcrição e/ou co-ativadores a sítios regulatórios (promotores e potenciadores); 2) indiretamente, pelo recrutamento de proteínas ligantes de metil-CpG (MBPs), que criam um impedimento estérico para o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios regulatórios [35]. As enzimas responsáveis pela regulação deste processo pertencem à família das DNA-metiltransferases, como DNMT1, DNMT3a e DNMT3b [34]. A desmetilação do DNA, por sua vez, pode ocorrer através de dois mecanismos diferentes: 1) desmetilação passiva durante a replicação do DNA, devido ao nível mais baixo de DNMT1; 2) por desmetilação ativa, na qual atuam as enzimas da família TET (*ten-eleven translocation*) TET1, TET2 e TET3 [36]. Tendo em vista que a desmetilação está correlacionada com transcrição e a hipermetilação, com repressão, a análise de padrões de metilação do DNA pode ser usada para prever a probabilidade de expressão gênica/comprometimento de linhagem de células [35].

A metilação do DNA tem sido demonstrada como um contribuinte vital para uma ampla gama de processos celulares, podendo interferir na diferenciação de células-tronco e o *imprinting* gênico [37]. Já foi demonstrado que células T CD4⁺ não produtoras de IL-17A apresentavam hipermetilação na região promotora do gene *IL17A*, porém quando tratadas com o agente desmetilante 5-aza apresentaram aumento na produção desta citocina, demonstrando que o gene *IL17A* é regulado pelo nível de metilação na sua região promotora [38]. A diferenciação de monócitos em células dendríticas (Mo-DCs) foi associada a expressão significativamente aumentada de DNMT1 e DNMT3A após o início da diferenciação de monócitos para células dendríticas imaturas, após a maturação dessas células ocorreu a diminuição da enzimas DNMT1, seguido por aumento de DNMT3b durante a maturação células dendríticas imaturas para maduras [39]. Além disso, padrões aberrantes de metilação tem sido associados a algumas doenças humanas auto-imunes, como: lúpus eritematoso sistêmico, no qual vários mecanismos epigenéticos

interagem entre si, aumentando a expressão ou silenciamento de genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e ativação de linfócitos B autorreativos. Entre os mecanismo epigenéticos envolvidos estão a hipometilação global sobre as células T CD4+, hipoacetilação das histonas, metilação da histona H3 e reativação do cromossomo X [40]. Na artrite reumatoide a família Jumonji C de histonas demetilases (JMJD3) regula a proliferação e ativação de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, que estão envolvidos na destruição da articulação na artrite reumatoide e no processo patológico. Assim como em diversos tipos de neoplasias, entre elas, câncer de colón, endométrio, hepáticos, do sistema nervoso, de mama, esôfago, bexiga, de pele, leucemias, etc. [41].

1.3.2 Modificações de histonas

Histonas são proteínas que participam do empacotamento do DNA e estabilização da cromatina. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 formam octâmeros nos quais o DNA é enovelado (aproximadamente 146 pares de bases), formando estruturas denominadas nucleossomos. No seu estado condensado, a cromatina permanece em uma configuração dobrada de modo que os nucleossomos estão empacotados e, portanto, não estão facilmente acessíveis à maquinaria de transcrição gênica [42]. Em contraste, sua estrutura aberta (eucromatina) permite a expressão gênica, em parte, devido ao aumento da acessibilidade dos promotores gênicos a maquinaria transcricional [43]. As caudas N-terminais das histonas contêm numerosos sítios que podem sofrer modificações pós-traducionais como, ubiquitinação, acetilação, metilação e fosforilação. Essas modificações alteram o estado de enovelamento da cromatina, tornando o DNA mais ou menos acessível para a transcrição gênica.

A combinação destas modificações de histonas podem assim gerar um “código de histona”, responsável pela regulação da expressão de diversos genes [44]. A acetilação de histonas ocorre em resíduos específicos de lisina por meio da atividade de histonas acetiltransferases (HATs), elas removem a carga positiva nas histonas, diminuindo assim a interação da cauda N-terminal das histonas com os grupos de fosfato carregados negativamente do DNA. Como consequência, há um aumento da acessibilidade à cromatina o que está associado com ativação da transcrição gênica. Este processo pode ser revertido pela atividade de histona desacetilases (HDACs) que clivam essas modificações [44].

Na metilação grupos metil são transferidos por enzimas histona metiltransferases (HMTs) para resíduos de lisina ou arginina. A metilação pode aumentar ou diminuir a transcrição de genes, dependendo de quais aminoácidos são metilados e quantos grupos metil são adicionados. Os reguladores epigenéticos antagonistas mais bem estudados são a trimetilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4me3) ou da lisina 27 na histona 3 (H3K27me3), que estão associados com ativação e repressão da transcrição, respectivamente [46]. Essas marcas podem ser adicionadas por complexos de proteínas amplamente conhecidos por regular genes agindo de forma antagônicas, como exemplo, H3K27me3 adicionada pelas proteínas do grupo Polycomb, e a H3K4me3 adicionado pelo grupo Tritorax [47].

Embora vários mecanismos possam estar envolvidos na regulação da expressão gênica em diferentes tipos de celulares, a modificação nas caudas de histonas é um dos mecanismo mais relevantes na regulação da diferenciação celular [48]. Na diferenciação de Mo-DCs a partir de monócitos humanos, o gene para DC-SIGN (CD209), um importante marcador fenotípico desta população [49], apresenta elevada acetilação em H3K9Ac (relacionadas com ativação da transcrição), ao mesmo tempo em que há uma redução de H3K9me3, H4K20me3 e metilação do DNA, (associadas com a repressão da transcrição). Adicionalmente, estudos vêm analisando a distribuição genômica de marcadores epigenéticos como H3K4me3 e H3K27me3 na diferenciação de Mo-DCs [50]. Já foi demonstrado que a inibição de HDACs e da lisina metiltransferase Kmt1c resultou em inibição da diferenciação de monócitos humanos em células dendríticas *in vitro* [51,52]. Ainda, a via de sinalização NF-κB mediada por LPS, que desempenha um papel crítico na resposta inflamatória, está envolvida na redistribuição de H3K4me3 em Mo-DCs [53].

Alterações epigenéticas, sejam elas por aumento da frequência de enzimas ou pelo aumento de sua atividade enzimática, já foram descritas em diversas doenças como câncer, doenças neuro-degenerativas, autoimunes e infecciosas [54]. Na sepse, diversas alterações epigenéticas foram associadas a funções alteradas de células imunes [55]. Durante a resposta imune, a enzima HDAC3 é necessária para a expressão de genes inflamatórios, tais como *il6* e *ifng*, induzidos por LPS em macrófagos [56]. Durante a infecção por *Listeria monocytogenes* a deficiência da enzima demetilase Kdm5a prejudica a ativação de células NK, com consequente diminuição na produção de IFN-γ e uma resposta menos efetiva a infecção [57]. Na diabetes tipo I, há uma diminuição de expressão do gene HDAC e aumento da dimetilação em H3K4 em linfócitos, o que pode estar relacionado com a resposta imune alterada dessas células ao destruírem as células β produtoras de insulina no pâncreas [58].

Assim, tanto a metilação do DNA como modificação de histonas podem ser considerados importantes alvos terapêuticos [59] . Além de agentes hipometilantes e inibidores de HDAC, que estão no mercado há vários anos, outras drogas que tem como alvo a metilação de histona e remodelação da cromatina entraram mais recentemente na clínica, principalmente para o tratamento de câncer como agente único ou terapia combinada [59] .

Por outro lado, o envolvimento de mecanismos epigenéticos na regulação de eventos como a ativação e diferenciação celular tem sido cada vez mais explorado. Apesar dos avanços já feitos, mais estudos ainda são necessários envolvendo os mecanismos epigenéticos que controlam as características fenotípicas de células do sistema imunológico, e sua contribuição para a imunopatologia de doenças infecciosas. Sendo assim, o estudo de mecanismos epigenéticos em Mo-DCs, assim como o papel regulador do IFN- γ , podem fornecer informações importantes sobre o programa genético associado com a diferenciação destas células, e como esses processos são estimulados por patógenos e/ou estímulos inflamatórios.

Considerando que a malária acomete anualmente cerca de 200 milhões de indivíduos, causando aproximadamente 600.000 mortes, há um grande impacto negativo sobre a estabilidade política, social e econômica, dificultando o desenvolvimento de sociedades menos favorecidas. Assim, novas terapias visando a modulação de enzimas epigenéticas são estratégias inovadoras e racionais na regulação da imunopatologia desta e outras doenças infecciosas.

2 OBJETIVO GERAL

Identificar os mecanismos epigenéticos e o papel regulatório do IFN- γ na diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Identificar citocinas com potencial papel regulador da diferenciação de Mo-Dcs durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA;

2.1.2 Avaliar a expressão de enzimas modificadoras de histonas e de DNA (DNA metiltransferases, histona metiltransferases, acetiltransferases, demetilases e desacetilases) em Mo-DCs isoladas de camundongos WT (*wild type*) e IFN $\gamma^{-/-}$ infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;

3 METODOLOGIA

3.1 Modelo experimental de malária cerebral;

3.1.1 Animais

Para o modelo de malária cerebral experimental (MCE), camundongos fêmeas (8-12 semanas) da linhagem C57BL/6 (WT) foram obtidas do Biotério Central da UFMG e camundongos fêmeas (8-12 semanas) da linhagem IFN- $\gamma^{-/-}$, IL-4 $^{-/-}$, IL-12 $^{-/-}$ e IL-17 $^{-/-}$ do biotério de produção do Centro de Pesquisas René Rachou. Esses animais foram mantidos em mini-isoladores recebendo água e ração autoclavadas *ad libitum*. Esse projeto foi submetido para avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz e aprovado sob a licença de número LW-15/14. Assim, atendendo as normas dispostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e pela Lei 11794/08.

3.1.2 Infecção

A infecção experimental foi realizada utilizando-se a cepa *P.b* ANKA, cujo os determinantes da resposta imunológica se assemelham à resposta em humanos [57]. Para isto, os parasitos conservados em nitrogênio líquido, foram descongelados e mantidos em camundongos WT por até 10 passagens feitas a cada 5 dias. Para infecções experimentais, hemácias infectadas com *P.b*. ANKA foram coletadas dos animais em tubos heparinizados e 1×10^6 hemácias parasitadas foram injetadas por via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados para a realização dos experimentos no 6º dia de infecção (fase aguda), que é caracterizado por intensa resposta inflamatória [45]. Para determinação da parasitemia foram feitos esfregaços sanguíneos a partir da obtenção de uma gota de sangue da veia da cauda do animal e em seguida estes foram corados com panóticos (Laborclin). A parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células

3.2 Obtenção de células do baço e medula óssea

No 6º dia de infecção os animais receberam uma dose de 180 mg/kg de ketamina e 26 mg/kg de xilazina para serem eutanasiados. Posteriormente, baços e fêmures foram extraídos e armazenados em tubos falcon de 15 mL contendo meio de cultura RPMI

incompleto (SIGMA). Para o preparo de suspensões de células de medula óssea, as epífises dos fêmures foram seccionadas e, com o auxílio de seringa contendo meio de cultura RPMI incompleto foi realizado o *flushing* de células. Os baços foram macerados com auxílio de êmbolo de seringa e filtro de 70µm. As suspensões celulares obtidas foram então tratadas com tampão de lise de hemácias (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 100 mM EDTA; pH 7.4) e lavadas duas vezes. As células obtidas foram contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer, a concentração ajustada e por fim incubadas com anticorpos para a análise por citometria de fluxo.

3.3 Citometria de fluxo

Foram obtidas células do baço de camundongos IL-4^{-/-}, IL-12^{-/-}, IL-17^{-/-}, IFN-γ^{-/-} e WT e da medula óssea de camundongos IL-12^{-/-}, IFN-γ^{-/-} e WT infectados ou controle (não infectado) de acordo com o item 4.2.2. Para citometria de fluxo, as células foram incubadas com anticorpos específicos conjugados com diferentes fluorocromos (eBioscience/Biolegend) por 20 minutos em temperatura ambiente (Quadro 1). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão (PBS 1X, Soro bovino fetal 2%). A citometria foi realizada em citômetro LSRFortessa e analisada com o *software* FlowJo versão 10.0.8.

Quadro 1. Pannel de anticorpos para citometria de fluxo

	Anticorpo	Fluorocromo	
Cell Sorting	CD11b	PECy7	Positivo
	F4/80	PErCP Cy5.5	Positivo
	MHC II	APC Cy7	Positivo
	DC-SIGN	APC	Alto
	CD11c	FITC	Positivo
	Ly6G	PE	Negativo
Análise Fenotípica	CD11b	PECy7	Positivo
	F4/80	PECy5.5	Positivo
	CCR2	FITC	Alto
	MHC-II	APC Cy7	Positivo
	DC-SIGN	APC	Alto
	CD11c	PE	Positivo
	Ly6C	Pacific Blue	Baixo-alto

3.4 Análise da expressão de enzimas modificadoras de histonas e de DNA;

3.4.1 – Purificação por citometria (Cell Sorting)

Células do baço e da medula óssea de camundongos WT ou IFN- $\gamma^{-/-}$, infectados com *P.b.* ANKA ou controles (pool de 5 animais de cada grupo) foram obtidas para o preparo de uma única suspensão celular de acordo com o item 4.2. Estas células foram incubadas com 10 μ L de beads magnéticas recobertas com anticorpo anti-CD11b (CD11b MicroBeads – Miltenyi Biotec) para cada 10x10⁶ de células por 15 minutos a 4° C. Após 2 lavagens com tampão MACs (0,5% de BSA, 2mM EDTA em PBS) as células foram passadas por coluna magnética, para seleção positiva de células CD11b. Em seguida, essas células foram incubadas com anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos (Quadro 1) e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Para a separação por *cell sorting* (FACS Aria) as populações celulares foram separadas da seguinte forma: monócitos (Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁻MHC⁻) em camundongos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ controles, Mo-DCs (Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN^{hi}MHC-II⁺) em camundongos WT infectados e monócitos inflamatórios (CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁻) em camundongo IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados. Após selecionadas as populações de interesse, as células foram recuperadas em um novo tubo de 5 mL não aderente. A amostra obtida foi adquirida novamente no citômetro, com o intuito de certificar a pureza da população de interesse. Após a separação, as células foram armazenadas em tampão RNeasy[®] (Qiagen) e mantidas a -80°C até o momento da extração do RNA.

3.4.2. Extração de RNA e conversão em cDNA

O RNA das populações celulares separadas por *cell sorting* foi extraído utilizando-se o kit de extração illustra[™] RNeasy Mini Kit (GE Healthcare). As células foram lisadas com 350 μ L da solução de lise e então transferidas para filtro, fornecido pelo fabricante (RNeasy Mini), seguido por centrifugação a 11.000 g por 1 minutos. O filtro foi descartado e, ao filtrado, foi adicionado 350 μ L de etanol 70%. Logo após, a amostra foi transferida para Mini Coluna RNeasy (fornecido pelo fabricante) e centrifugada por 30 segundos a 8.000g. Em seguida, a coluna foi transferida para um outro tubo de coleta, foi adicionado 200 μ L de tampão de lavagem e centrifugada por 11.000g por 1 minuto. Após esta centrifugação a coluna foi colocada em um novo tubo de coleta e foi adicionado 600 μ L do tampão de lavagem 2 e centrifugada a 11.000g por 1 minuto. A coluna foi colocada

novamente em outro tubo de coleta para adição de 250µL do tampão de lavagem 2 e seguido por centrifugação a 11.000 g por 2 minutos para secagem da membrana da coluna por completo. A coluna foi colocada em um tubo livre de nucleases e então o RNA foi eluído em 40µL de água livre de RNase e centrifugada a 11.000g por 1 minuto. A quantificação da concentração de RNA de cada amostra foi realizada em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) utilizando-se 1µL da amostra de RNA.

Para conversão do RNA extraído em cDNA, utilizamos o kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen). Foi utilizado 4µL do mastermix e 16µL da amostra totalizando o volume final de 20µL. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR em tempo real. Dada a pouca quantidade de RNA obtido das populações celulares purificadas, convertemos todo o volume de RNA em cDNA e a padronização foi realizada antes do PCR, usando 10ng de amostra por poço da placa de PCR.

3.4.3. PCR- Real Time

A avaliação da expressão gênica foi realizada utilizando 3 replicatas biológicas por grupo por meio da técnica de PCR Array pelo método TaqMan® (Applied Biosystems). Esta técnica consiste em um painel contendo sondas específicas para detectar a expressão de genes codificadores para DNA metiltransferases, histona metiltransferases, acetiltransferases, demetilases e desacetilases (Quadro 2).

A concentração de cDNA por amostra foi normalizada em 10ng por poço. A quantidade dos demais reagentes para a reação de PCR foi utilizada de acordo com as informações do fabricante e estão expressas na Quadro 2.

Quadro 2. Reagente utilizados na reação em cadeia da polymerase (PCR) em Tempo Real

Reagente	Quantidade
TaqMan® Universal Master Mix II (20x)	10µL
cDNA	10ng
H ₂ O livre de RNase	-
Volume final	20µL

A reação de PCR foi realizada utilizando o termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 10

minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços, contendo sondas para detectar a expressão de enzimas modificadoras de DNA e histonas (Quadro 3), assim como genes endógenos *GAPDH*, (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *HPRT* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), e *GUSB* (beta glucuronidase).

3.4.4 Análise da expressão gênica por qPCR

Para análise da expressão gênica por meio de Real-time PCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta C_T$). Calculou-se inicialmente o ΔC_T de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_T (*threshold cycle*) dos genes endógenos (usando a média geométrica) dos valores de C_T dos genes alvo. Após determinação do ΔC_T das amostras, comparou-se o grupo de animais infectados com amostras normalizadoras (animais controles). Para cálculo do $\Delta\Delta C_T$ utilizou-se a seguinte fórmula: ΔC_T (amostra infectada) – ΔC_T (amostra controle). Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_T$ aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa e os resultados foram expressos na forma de *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste *t* Student e as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7).

Quadro 3: Lista de genes alvo avaliados por PCR em tempo real

Classe	Enzima	Sinônimo	Modificação
DNA Metiltransferase	Dnmt1		Metilação DNA
	Dnmt3a		Metilação DNA
	Dnmt3b		Metilação DNA
Histona Acetiltransferase	Ciita		
	Hat1		H4K5Ac e H4K12Ac
	Kat2	GCN5	H3k9Ac, H4K8Ac,H4K12Ac
	Kat2b	Pcaf	H3 3 H4
	Kat5	Tip60	H4K5Ac,H4K8Ac,H4K12Ac
	Kat6a	MOZ	H3K9Ac
Histona Metiltransferase	Ehmt2	G9a	H3K9me
	Kmt2c	MLL3	H3K4me2 e me1
	Kmt6	EZH2	H3K27me3
	Setdb2		H3K9me3 e H3K36me
	Smyd3		H3K4me3
	suV39h1		H3K9me3
	Ash1l		H3K9me3
	Kmt2a	MLL1	H3K4me3
	Kmt2e	MLL5	H3K4me2 e me1
	Nsd1		H3K36 e H4K20
	Setd7		H3K4me
DNA & Histona Demetilase	Kdm1a	Lsd1	H3K4 e H3K9
	Kdm5b	Plu1/Jarid1b	H3K4me
	Kdm4a	Jmjd2	H3K4me
	Kdm6b	Jmjd3	H3K4me
Histona Desacetilase	HDAC2		H3,H4,H2b,H2a
	HDAC3		H3,H4,H2b,H2a
	HDAC6		H3,H4,H2b,H2a
	HDAC7		H3,H4,H2b,H2a
	HDAC11		H3,H4,H2b,H2a

4 RESULTADOS

4.1 Análise fenotípica de Mo-DCs presentes no baço e medula óssea de camundongos infectados com *P.b. ANKA*.

Estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa identificou pela primeira vez a presença de Mo-DCs no baço de camundongos infectados com *P.b. ANKA* [26]. Esta população foi definida fenotipicamente como células $CD11b^+F4/80^+DC\text{-}SIGN^+MHC\text{-}II^+$. A Figura 3A detalha a estratégia de *gate* utilizada para identificação dessa população. Assim, monócitos $CD11b^+F4/80^+$ são avaliados para a expressão de DC-SIGN e MHC-II, caracterizando as Mo-DCs, nas quais também foi avaliada a expressão de CD11c e Ly6C. No baço de animais infectados, Mo-DCs passam a expressar CD11c, molécula característica da superfície de células dendríticas enquanto que a expressão de Ly6C, geralmente elevada em monócitos inflamatórios (denominados monócitos $Ly6C^{high}$) apresenta-se na forma de um espectro entre *low-high*. Após 5 dias de infecção com *P.b. ANKA*, observa-se no baço que a grande maioria das células $CD11b^+F4/80^+$ passam a apresentar fenótipo de Mo-DCs ($DC\text{-}SIGN^+MHC\text{-}II^+$) (62,2%) quando comparado com animais não infectados (19,2%), (Figura 3A) o que também foi acompanhado por um aumento no número dessas células (Figura 3B).

Sendo as Mo-DCs células derivadas de monócitos, avaliou-se a presença desta população também na medula óssea, principal nicho hematopoiético responsável pela diferenciação de monócitos que migram para o sangue e baço durante infecções [61]. Interessantemente, ao ser avaliada a expressão de DC-SIGN e MHC-II em células $CD11b^+F4/80^+$ da medula óssea de animais infectados, também observou-se que a maioria dessas células apresentavam fenótipo semelhante às Mo-DCs (81,3% vs. 15,3% no não infectado). No entanto, essas Mo-DCs da medula óssea não apresentam aumento na expressão CD11c e são $Ly6C^{high}$, sugerindo um perfil ainda imaturo dessas células em relação à população encontrada no baço (Figura 3C-D).

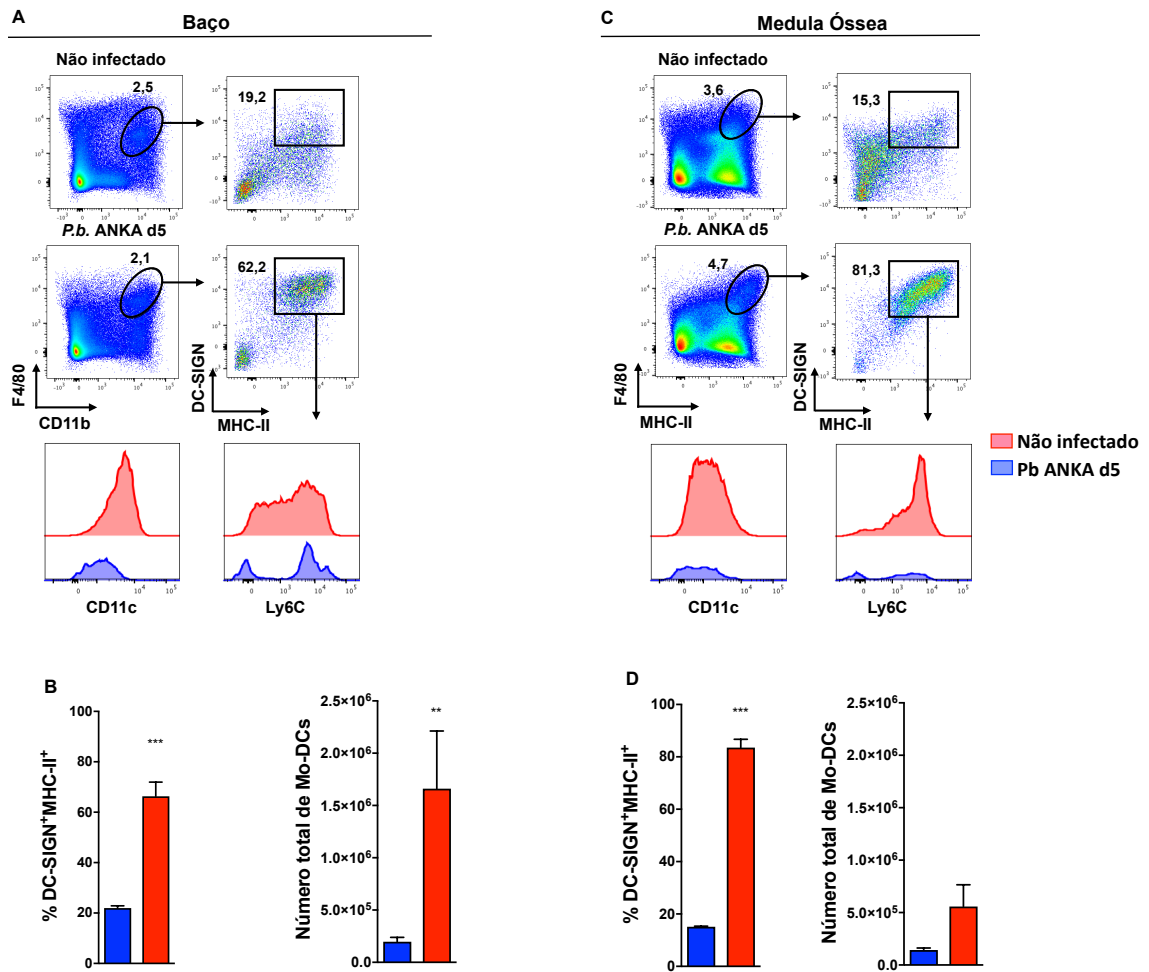


Figura 3. Análise da diferenciação de Mo-DCs no baço e medula óssea de camundongos infectados por *P.b. ANKA*. Camundongos WT foram infectados com *P.b. ANKA* e após 5 dias de infecção, células do baço e medula óssea foram obtidas e incubadas com anticorpos para detecção das moléculas de superfície CD11b, CD11c, F4/80, MHC-II, DC-SIGN (CD209) e Ly6C. Monócitos totais CD11b⁺F4/80⁺ do (A) baço e (C) medula óssea foram avaliados quanto a expressão de DC-SIGN e MHC-II. Em seguida, as Mo-DCs (DC-SIGN⁺MHC-II⁺) foram avaliadas quanto a expressão de CD11c e Ly6C. Gráfico de barras representativo da frequência de células DC-SIGN⁺MHC-II⁺ dentro da população CD11b⁺F4/80⁺ e número total Mo-DCs no baço (B) e medula óssea (D). As amostras foram adquiridas no LSRFortessa e analisados no software FlowJo. (A e C) Gráfico ilustrando uma amostra representativa; (B e D) Dados representam a média e SD (*standart deviation*) de quatro animais em três diferentes experimentos.. ***P<0,0001; **P<0,001; *P<0,05 utilizando o test t não pareado.

4.2 Cinética de diferenciação de Mo-DCs no baço e na medula de camundongos infectados com Pb ANKA.

Em seguida, avaliou-se a cinética de diferenciação de Mo-DCs tanto no baço quanto na medula óssea. Logo nos primeiros dias de infecção, Mo-DCs podem ser observadas tanto no baço quanto na medula óssea, sendo que a frequência desta população aumentou gradualmente até o 6º dia (tempo máximo de avaliação); paralelamente ao aumento da parasitemia, indicando que a diferenciação destas células está diretamente ligada à infecção (Figura 4A-B).

Interessantemente, pode-se observar que no dia 3 após a infecção, há um aumento das populações DC-SIGN⁺MHC-II⁺ (Mo-DCs) e de células DC-SIGN⁺MHC-II⁻, denominadas monócitos inflamatórios, enquanto que o monócitos DC-SIGN⁻MHC-II⁻ diminuem em frequência. Estes dados sugerem que Mo-DCs podem estar se diferenciando de monócitos inflamatórios. Além disso, apesar da frequência de Mo-DCs na medula óssea ser consideravelmente menor do que no baço, estas células se diferenciam simultaneamente em ambos tecidos.

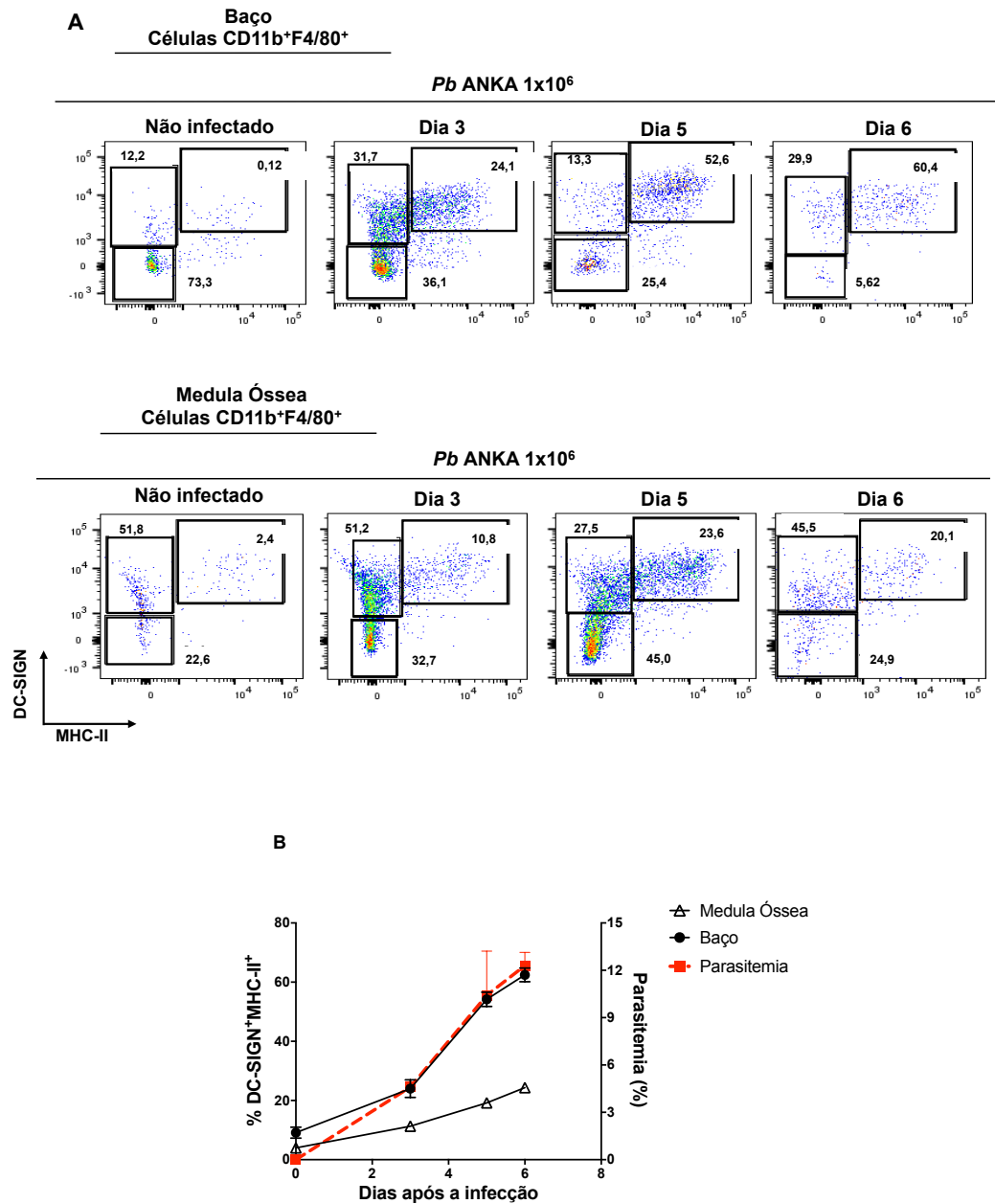


Figura 4. Cinética de diferenciação de Mo-DCs em animais infectados com *P.b.* ANKA. Camundongos WT foram infectados com *P.b.* ANKA e células do baço e medula óssea foram obtidas e incubadas com anticorpos para detecção das moléculas de superfície CD11b, F4/80, MHC-II, DC-SIGN (CD209). (A) Células CD11b⁺F4/80⁺ do baço (painel superior) e medula óssea (painel inferior) foram avaliadas quanto a expressão de DC-SIGN e MHC-II nos dias 0, 3, 5 e 6 após a infecção. Os valores expressos nos gates indicam a porcentagem de cada população. (B) Gráfico ilustrando a média da frequência de Mo-DCs em células CD11b⁺F4/80⁺ e parasitemia nos diferentes dias avaliados. As amostras foram adquiridas no LSRFortessa e analisados no software FlowJo. (A) Gráfico ilustrando uma amostra representativa; (B). Dados representam a média e SD de quatro animais em um experimento.

4.3 Identificação de citocinas com potencial papel regulador na diferenciação de Mo-DCs durante a infecção por *P.b. ANKA*.

Em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, observou-se a importância do IFN- γ para a diferenciação de Mo-DCs e seu papel na malária cerebral murina causada pelo *P.b. ANKA* [26]. Para dar continuidade a esses estudos, decidiu-se avaliar se outras citocinas poderiam também ter um papel na diferenciação de Mo-DCs. Assim, avaliou-se o papel de citocinas relacionadas a outros perfis de resposta imunológica, como Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17) e também IL-12, devido a sua participação na ativação de células T e para a produção de IFN- γ [62]. Para isto, camundongos *knockout* IL-4^{-/-}, IL-17^{-/-}, IL-12^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foram infectados com *P.b. ANKA* para avaliação por citometria de fluxo da presença de Mo-DCs no baço após 5 dias.

Conforme pode ser observado nos *dotplots* e no gráfico representativo (n=4), na ausência das citocinas IL-4 e IL-17 não houve diferença na frequência de Mo-DCs no baço (65,3% e 52,1%, respectivamente) quando comparados com animais WT (68,2%). Ainda, observa-se uma discreta diminuição na diferenciação dessas células em animais IL-12^{-/-} (41,3%) quando comparadas com animais WT. Por outro lado, em animais IFN- γ ^{-/-} infectados houve uma drástica redução na frequência desta população (20,3%) (Figura 5A-B). Resultado similar foi observado ao avaliar células da medula óssea e apenas IFN- γ mostrou-se essencial para diferenciação de Mo-DCs (7,8% em IFN- γ ^{-/-} vs 57,7% em animais WT) (Figura 5C-D).

Considerando a menor frequência de diferenciação de Mo-DCs no baço de animais IL-12^{-/-}, e ainda a importância dessa citocina para produção de IFN- γ [8,9] avaliou-se seu papel também na medula óssea. Contudo, apesar do menor percentual de diferenciação de Mo-DCs (37,4%) a ausência desta citocina não demonstrou influenciar na frequência de Mo-DCs quando comparados com animais WT (57,7%) (Figura 5C-D).

Assim, esses resultados sugerem que IFN- γ é uma citocina central na regulação da diferenciação de Mo-DCs, tanto no baço quanto na medula óssea, corroborando com dados prévios da literatura e de nosso grupo.

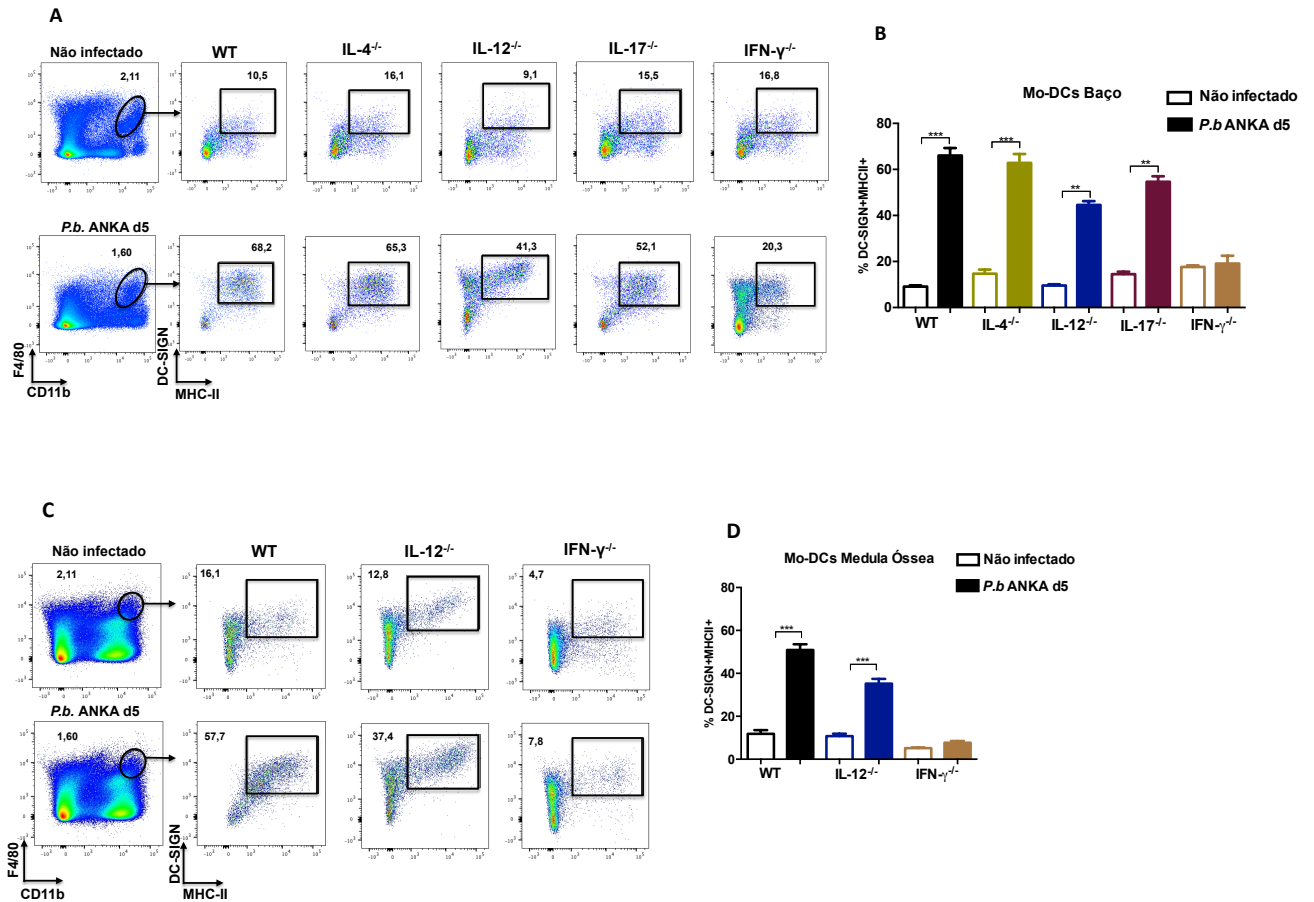


Figura 5. Mo-DCs presentes no baço de camundongos infectados por *P.b* ANKA. Camundongos IL-4^{-/-}, IL-12^{-/-}, IL-17^{-/-}, IFN-γ^{-/-} e WT foram infectados com *P.b*. ANKA e após 5 dias células do baço e medula óssea foram obtidas e avaliadas quanto a diferenciação de Mo-DCs. Células CD11b⁺F4/80⁺ foram analisadas quanto a expressão de DC-SIGN e MHC-II. Gráfico representativo do baço (A) de uma amostra de cada genótipo. Gráficos de barras representam a frequência de células DC-SIGN^{hi}MHC-II⁺ dentro da população CD11b⁺F4/80⁺ do baço (B) e da medula óssea (C) de animais infectados e controles. Os dados foram adquiridos no LSRFortessa e analisados no software FlowJo. (B e D). Dados representam a média de quatro animais em dois experimentos independentes. ***P<0,0001; **P<0,001; *P<0,05 utilizando o test t não pareado.

4.4 Purificação de células isoladas de camundongos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com *P.b. ANKA* e naive.

No presente trabalho, o próximo passo foi identificar possíveis mecanismos epigenéticos envolvidos na diferenciação de Mo-DCs. Para isto, avaliou-se a expressão de enzimas modificadoras de histona e DNA, comparando Mo-DCs (CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺) com monócitos (CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁻MHC-II⁻). Além disso, nosso resultado anterior confirmou a importância do IFN- γ para diferenciação de Mo-DCs durante a infecção, sendo assim, também avaliou-se a expressão destas enzimas em animais IFN- $\gamma^{-/-}$.

Desta forma, células do baço e da medula óssea de animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ foram obtidas, enriquecidas com *beads* CD11b⁺ e separadas por *cell sorting* de acordo com a população de interesse. Em animais WT infectados Mo-DCs (Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺), monócitos inflamatórios (Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁻) em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados e monócitos (Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁻MHC-II⁻) em animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ não infectados.

As figuras 6 e 7 detalham a estratégia de *gate* e fenótipo das populações isoladas para análise de expressão gênica. Como esperado, Mo-DCs isoladas do baço de animais WT apresentaram alta expressão de CD11c, o que não foi observado nas Mo-DCs da medula óssea e nos monócitos de animais não infectados (Figura 6A-B). Em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ não há grande diferenciação de Mo-DCs, no entanto podemos observar uma alta frequência de células com características fenotípicas de monócitos inflamatórios (CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁻ - células em verde) e somente uma pequena porcentagem em Mo-DCs (células em vermelho). Então, considerando a quantidade reduzida de Mo-DCs em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados e o nosso interesse em identificar o motivo pelo qual essas células, na ausência de IFN- γ , não diferenciam-se em Mo-DCs, isolamos a população de monócitos inflamatórios dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ (Figura 7A-B).

Após purificação, todas as amostras preparadas apresentaram um alto percentual de pureza, variando entre 91 e 99% e aproximadamente 1 milhão de células recuperadas. (Quadro 4).

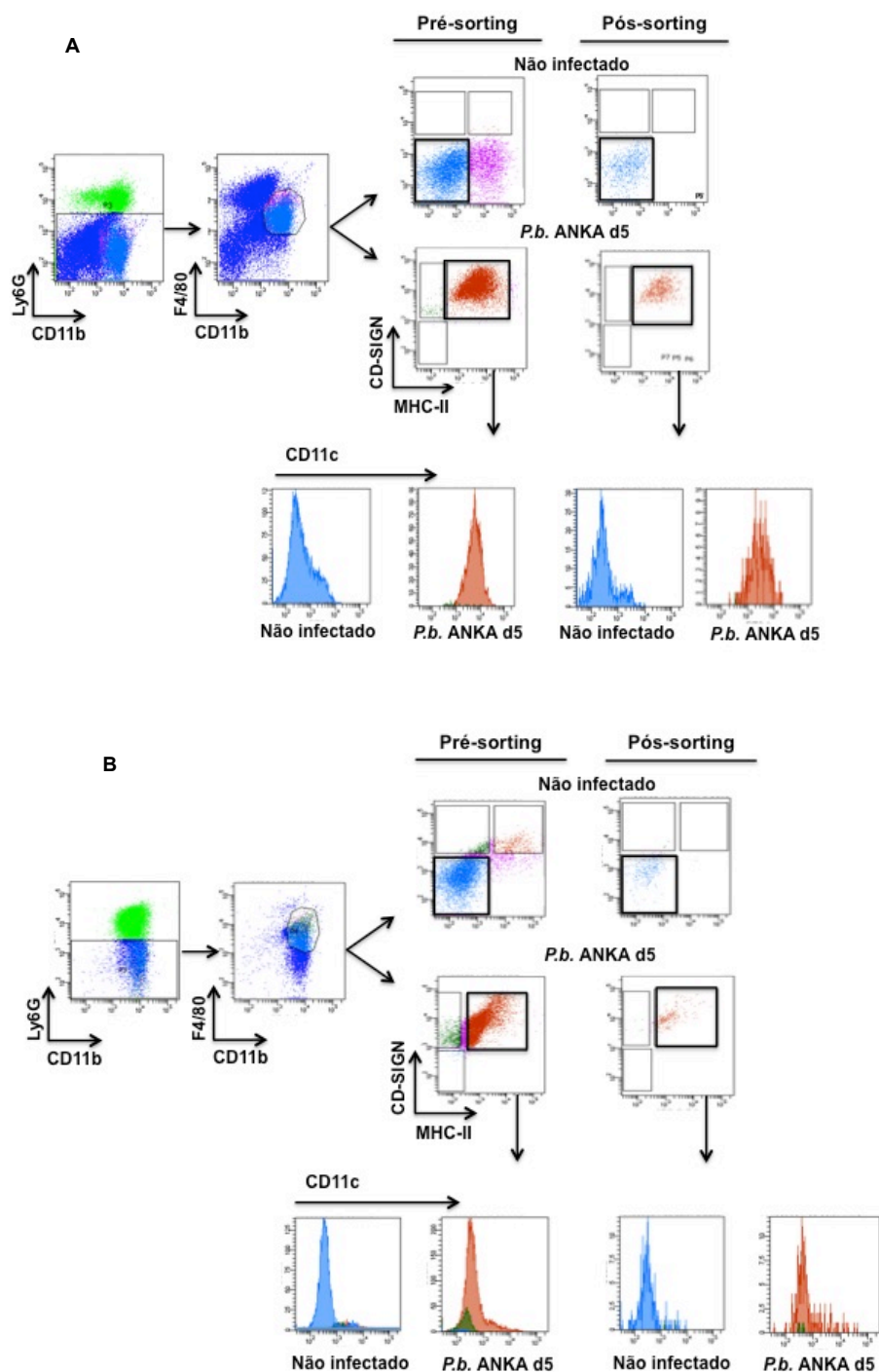


Figura 6. Mo-DCs, monócitos inflamatórios e monócitos de animais WT infectados e naive separados por cell sorting. Camundongos WT foram infectados com *P.b. ANKA* e após 5 dias de infecção células do baço e medula óssea foram obtidas e enriquecidas utilizando *beads* CD11b⁺ e posteriormente incubadas com anticorpos anti-Ly6G, CD11b, CD11c, F4/80, MHC-II e CD209 (DC-SIGN) para purificação por *cell sorting* utilizando-se o equipamento FACSARIA. As populações de interesse no (A) baço Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺CD11c⁺ (Mo-DCs) e (B) medula óssea Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺CD11c⁻ (Monócitos) estão indicadas no painel pré-sorting e após purificação no painel pós-sorting.

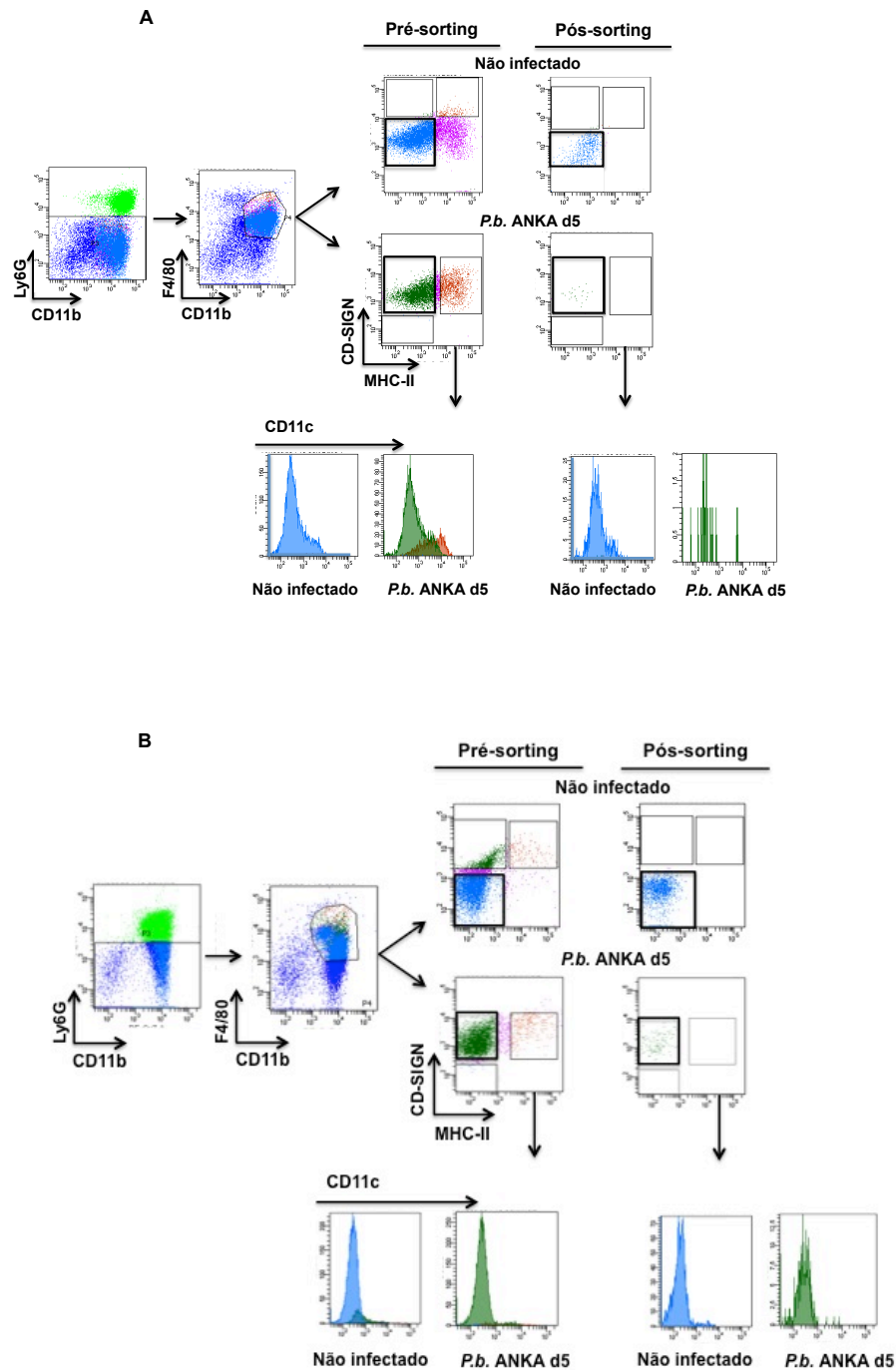


Figura 7. Mo-DCs ,monócitos inflamatórios e monócitos de animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados e naive separados por cell sorting. Comundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ foram infectados com *P.b* ANKA e após 5 dias de infecção células do baço e medula óssea foram obtidas e enriquecidas utilizando *beads* CD11b+ e posteriormente incubadas com anticorpos anti-Ly6G, CD11b, CD11c, F4/80, MHC-II e CD209 (DC-SIGN) para purificação por *cell sorting* utilizando-se o equipamento FACSaria. As populações de interesse no (A) baço Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺CD11c⁺ (Mo-DCs) e (B) medula óssea Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁻MHC-II⁻CD11c⁻ (Monócitos) estão indicadas no painel pré-sorting e após purificação no painel pós-sorting.

Quadro 4: Pureza e número de células após purificação.

Grupo	Amostra	Pureza (%)	Número de células (x10⁶)
Baço			
Monócito - WT não infectado	1	96	1.1
	2	97	1.2
	3	93	1.1
Mo-DC - WTP.b ANKA d5	1	95	1.4
	2	94	1.2
	3	97	1.1
Monócito IFN- γ -/- não infectado	1	97	1.4
	2	96	1.3
	3	96	1.1
Monócito inflamatório IFN- γ <i>P.b</i> ANKA d5	1	93	1.4
	2	91	1.3
	3	94	1.5
Medula Óssea			
Monócito – WT não infectado	1	99	1.1
	2	98	1.0
	3	96	1.1
Mo-DC – WTP.b ANKA d5	1	98	1.3
	2	94	1.2
	3	97	1.1
Monócito IFN- γ -/- não infectado	1	98	1.6
	2	99	1.4
	3	96	1.5
Monócito inflamatório IFN- γ <i>P.b</i> ANKA d5	1	99	1.1
	2	98	1.3
	3	98	1.3

4.5 Avaliação da expressão de enzimas modificadoras de histonas e de DNA em células isoladas de camundongos WT e IFN- γ ^{-/-} infectados com *P.b* ANKA.

Para avaliação dos mecanismos epigenéticos envolvidos na diferenciação de Mo-DCs o RNA das populações celulares descritas anteriormente foi isolado e utilizado para a análise de expressão de genes codificadores para enzimas modificadoras de histonas e de DNA (DNA metiltransferases, histona metiltransferases, acetiltransferases, demetilases e desacetilases) (Quadro 3). Primeiramente, avaliou-se a expressão de genes em Mo-DCs do baço e medula óssea de animais WT infectados comparado com monócitos isolados de animais não infectados. Em seguida, a mesma comparação foi feita nas populações isoladas de animais IFN- γ ^{-/-}.

No total, foram analisados 28 genes para cinco grupos diferentes de enzimas, entre eles: DNA metiltransferases, histona demetilases e histona desacetilases; estas relacionadas com a inibição da transcrição e histona metiltransferases e histonas acetiltransferases; relacionadas com a ativação da transcrição.

Primeiramente, as amostras dos animais WT e IFN- γ ^{-/-} foram analisadas utilizando a técnica de análise de componentes principais (ACP) para obter o agrupamento dessas diferentes amostras em relação à expressão dos genes aqui estudados. Na figura 8A, pode-se observar que as amostras do baço de animais WT formam dois grupos distintos, nos quais se separam monócitos e Mo-DCs. Por outro lado, na medula óssea, as duas populações estudadas se apresentam em um único grupo.

Esses dados sugerem que, no baço, a infecção induz expressão diferencial dos genes em questão entre monócitos e Mo-DCs. O mesmo não é observado na medula óssea, onde tanto monócitos como Mo-DCs apresentam perfil semelhante de expressão. Interessantemente, ao avaliar as amostras de animais IFN- γ ^{-/-}, observa-se que as amostras formam dois grupos distintos: um do baço e outro da medula óssea. Porém, não se observa o efeito da infecção e tanto monócitos como monócitos inflamatórios estão no mesmo grupo. Esse dado reafirma a importância do IFN- γ na diferenciação de Mo-DCs na malária e ainda sugere um papel regulatório do IFN- γ na transcrição gênica dessas populações celulares (Figura 8B).

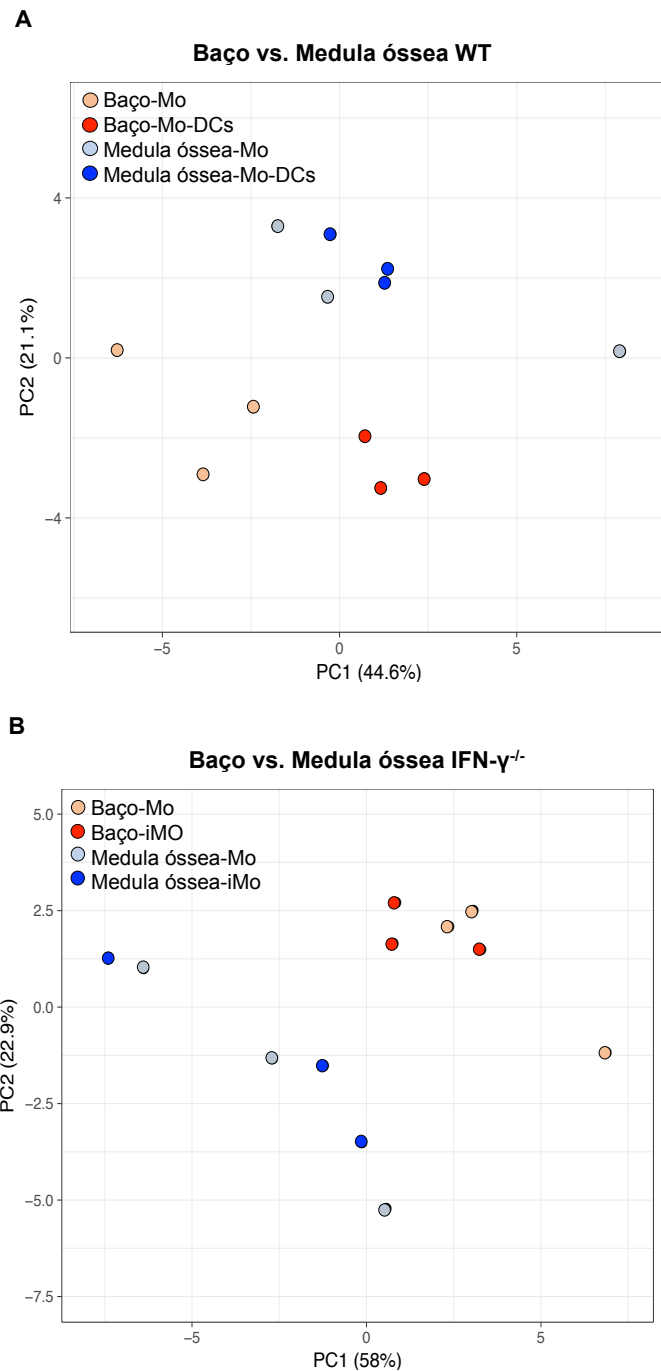


Figura 8. Análise de componentes principais (ACP) da expressão gênica de enzimas modificadoras de DNA e histona em animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados por *P.b* ANKA A análise da expressão de genes codificadores de enzimas DNMT, HAT, HMT, HDAC e HDMT foi realizada por PCR em Tempo Real em monócitos (Mo), Mo-DCs e monócitos inflamatórios (iMo) purificados do baço e medula óssea de animais infectados com *P.b*. ANKA e controles não infectado. Os valores de Delta Ct (ΔC_T) obtidos foram agrupados quanto a expressão gênica dessas enzimas nas diferentes populações celulares.(A) Mo-DCs isoladas do baço e medula óssea de animais WT infectados foram comparadas com monócitos de animais não infectados (B) Monócitos inflamatórios isolados do baço e medula óssea de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados foram comparados com monócitos de animais não infectados .

A análise das enzimas DNA metiltransferase em animais WT revelou que a infecção diminuiu em um quarto (0,25) a expressão gênica da enzima Dnmt3b em células do baço, porém o mesmo não foi observado na medula óssea. Ainda no baço desses animais, a expressão gênica da enzima Dnmt3a teve um aumento de aproximadamente duas vezes (1,8) em resposta a infecção e o mesmo não foi observado na medula óssea. A expressão gênica das enzimas desse grupo comportam-se de maneira semelhante em animais IFN- γ ^{-/-} quando comparadas com animais WT não demonstrando nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 9A).

Na figura 10A, observa-se que em resposta a infecção, a família das enzimas histona demetilase (HDMT) revela uma diminuição da expressão gênica das enzimas Kdm6b, Kdm4a e Kdm5b (0,48; 0,36 e 0,12 vezes respectivamente) no baço de animais WT, porém, o mesmo não é observado na medula óssea desses animais, na qual ocorre apenas o aumento da expressão gênica de Kdm1a (1,6 vezes). A expressão gênica das enzimas desse grupo comportam-se de maneira semelhante em animais IFN- γ ^{-/-} quando comparadas com animais WT não demonstrando nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Na família das histonas desacetilases (HDAC) observa-se que não houve diferença significativa na expressão gênica dessas enzimas no baço e nem na medula óssea em animais WT em resposta a infecção. Entretanto, em monócitos inflamatórios do baço de animais IFN- γ ^{-/-} observa-se a expressão estatisticamente significativa ($P < 0,001$) de Hdac6 comparada com animais WT (Figura 10B).

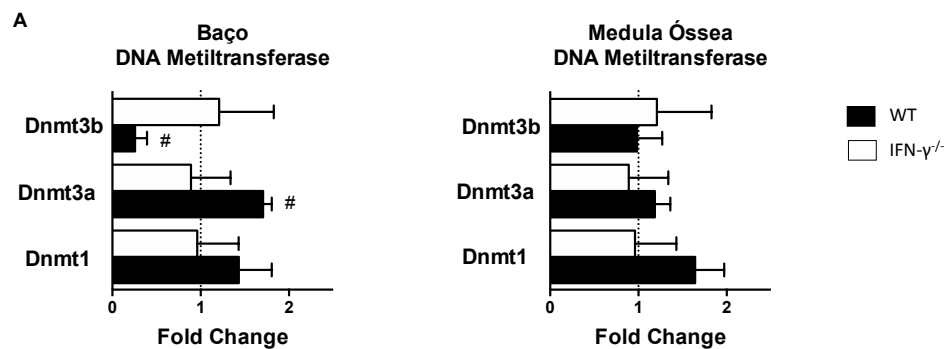


Figura 9. Expressão gênica de enzimas DNA metiltransferase. Análise da expressão de genes cofidicadores de enzimas DNA metiltransferase realizada por PCR em Tempo Real em monócitos, Mo-DCs e monócitos inflamatórios purificados do baço e medula óssea de animais infectados com *P.b.* ANKA e controles não infectados. Os valores de Fold Change foram calculados comparando-se as amostras de animais infectados vs. não infectados. A linha pontilhada indica a expressão gênica em monócitos não infectados (Fold Change =1). *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ utilizando o test t não pareado para comparação entre animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ e utilizando two-way ANOVA # $P < 0,05$ para comparação entre animais infectados vs não infectados. Os resultados são expressos com média e SD de três amostras independentes.

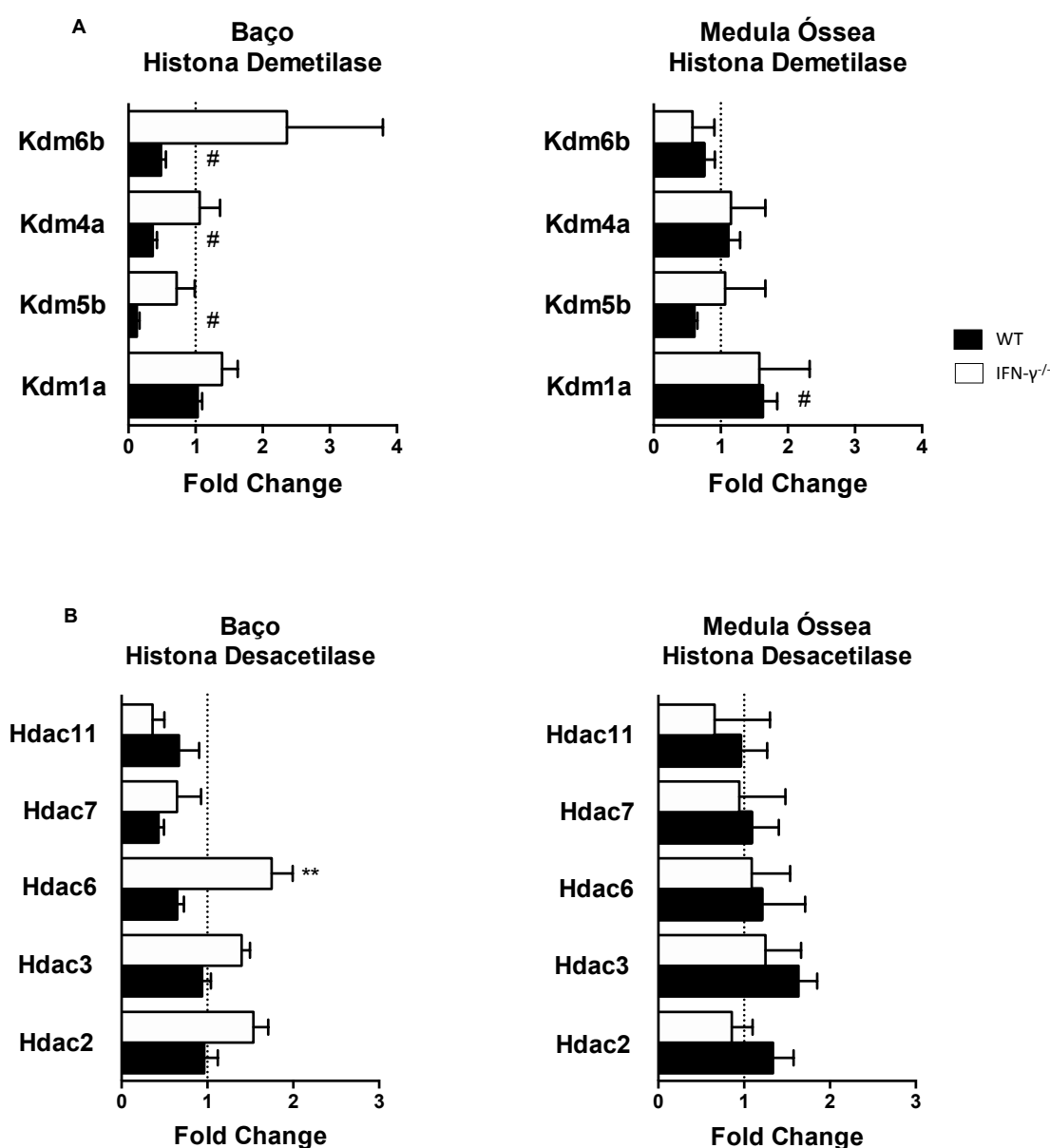


Figura 10. Expressão gênica de enzimas Histona Demetilase e Histona Desacetilase. Análise da expressão de genes codificadores de enzimas histona demetilase (A) e histona desacetilase (B) realizada por PCR em Tempo Real em monócitos, Mo-DCs e monócitos inflamatórios purificados do baço e medula óssea de animais infectados com *P.b.* ANKA e controles não infectados. Os valores de Fold Change foram calculados comparando-se as amostras de animais infectados vs. não infectados. A linha pontilhada indica a expressão gênica em monócitos não infectados (Fold Change =1). *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ utilizando o test t não pareado para comparação entre animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ e utilizando two-way ANOVA # $P < 0,05$ para comparação entre animais infectados vs não infectados. Os resultados são expressos com média e SD de três amostras independentes.

A análise da família de histona acetiltransferases (HAT) revela um aumento da expressão gênica no baço da enzima HAT1 de 4,7 vezes nas Mo-DCs de animais WT e 3,2 vezes em monócitos inflamatórios de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ em resposta a infecção, o mesmo não foi observado na medula óssea. Além disso, a expressão desta enzima não mostrou-se dependente de IFN- γ .

Observa-se também, que ocorreu um aumento da expressão gênica de Ciita de 4 vezes no baço e 6 vezes na medula óssea quando comparados Mo-DCs com monócitos em animais WT e ainda, quando comparados monócitos inflamatórios com monócitos em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ essa enzima também revela um aumento de 3,2 vezes no baço e 1,9 vezes na medula óssea. Também na medula óssea, a expressão de Ciita mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparadas as células de animais WT com IFN- $\gamma^{-/-}$ ($p < 0,05$). As demais enzimas desse grupo comportaram-se de maneira semelhante no baço e medula óssea durante a infecção, e a ausência de IFN- γ não resultou em diferença significativa quando comparada com o grupo WT (Figura 11A).

Avaliando o efeito da infecção em animais WT, no grupo das enzimas histona metiltransferases (HMT) apenas as enzimas Setdb2 e Kmt2c mostraram expressão gênica aumentada no baço (2,5 e 8 vezes, respectivamente) porém, na medula óssea observou-se o aumento da expressão gênica de Suv39h, Ezh2 e Ehmt2 (1,7; 1,9 e 2,9 respectivamente) (Figura 11B). Em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ a infecção aumentou em 6 vezes a expressão gênica da enzima Setdb2 no baço e 2 vezes de Ehmt2 na medula óssea. As demais enzimas desse grupo comportaram-se de maneira semelhante no baço e medula óssea durante a infecção.

Ainda no grupo das HMT a expressão gênica de Ezh2 em monócitos inflamatórios do baço de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ mostra um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparados com Mo-DCs de animais WT. (Figura 11B)

Entre todas as enzimas avaliadas, a Kmt2c mostrou o resultado mais interessante. Em Mo-DCs do baço de animais WT esta enzima apresentou um aumento de 8 vezes na expressão gênica em relação aos monócitos. Ainda, não foi observado o aumento de sua expressão em Mo-DCs da medula óssea nas células de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ sugerindo que esta enzima pode apresentar um papel específico na diferenciação de Mo-DCs no baço o qual é dependente de IFN- γ (Figura 11B).

As demais enzimas desse grupo comportaram-se de maneira semelhante no baço e medula óssea durante a infecção e quando comparados os grupos WT com IFN- $\gamma^{-/-}$ não foi observado nenhuma diferença significativa.

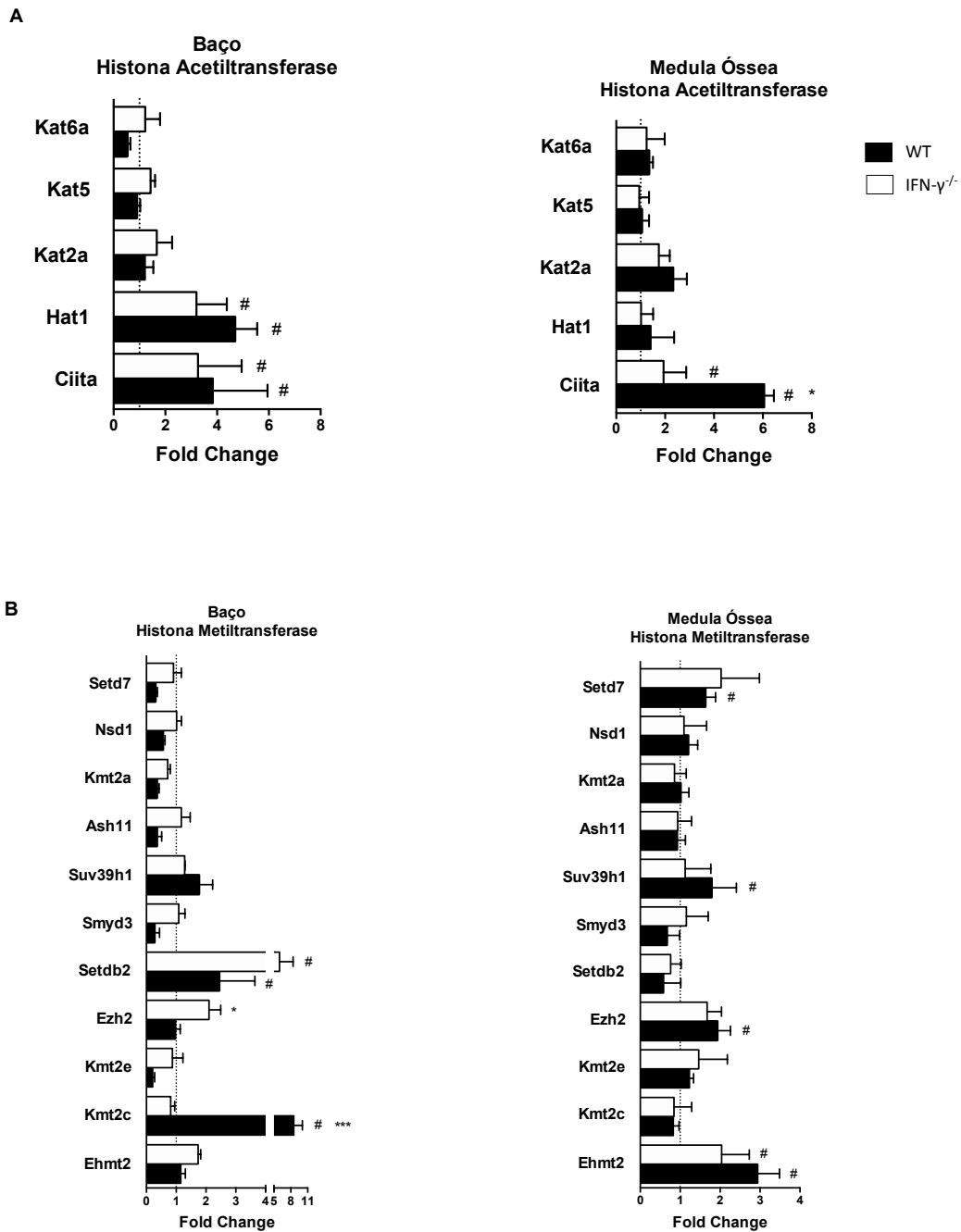


Figura 11. Expressão gênica de enzimas Histona Acetiltransferase e Histonas Metiltransferase. Análise da expressão de genes codificadores de enzimas histona acetiltransferase (A) e histonas metiltransferase (B) realizada por PCR em Tempo Real em monócitos, Mo-DCs e monócitos inflamatórios purificados do baço e medula óssea de animais infectados com *P.b. ANKA* e controles não infectados. Os valores de Fold Change foram calculados comparando-se as amostras de animais infectados vs. não infectados. A linha pontilhada indica a expressão gênica em monócitos não infectados (Fold Change = 1). *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ utilizando o test t não pareado para comparação entre animais WT e IFN- γ ^{-/-} e utilizando two-way ANOVA # $P < 0,05$ para comparação entre animais infectados vs não infectados. Os resultados são expressos com média e SD de três amostras independentes.

5 DISCUSSÃO

Monócitos, macrófagos e células dendríticas são populações celulares que constituem o sistema fagocítico mononuclear e apresentam importantes funções durante a resposta imune inata, ativação da resposta imune adaptativa e na manutenção da homeostase tecidual [63,64]. Os monócitos inflamatórios em especial, apresentam uma série de funções efetoras inatas, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase e até mesmo a polarização de células T [61]. Desta forma, essa população celular não deve ser mais considerada apenas um reservatório para geração de macrófagos, mas também uma população diferenciada com atividades específicas na resposta imune. Outra importante característica observada em monócitos inflamatórios, e que vêm despertando crescente interesse, é seu potencial para diferenciação em células dendríticas *in vivo*. Essas Células Dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) diferenciam-se localmente em focos inflamatórios e podem desempenhar um importante papel na indução e regulação da resposta imune contra patógenos além do desenvolvimento de doenças inflamatórias e auto- imunes [65,66].

A diferenciação de monócitos inflamatórios Ly6C^{high} em Mo-DCs foi formalmente demonstrada utilizando o modelo de infecção por *Leishmania major*. Nesses experimentos, monócitos Ly6C^{high} foram recrutados para a derme e linfonodos diferenciando em Mo-DCs em ambos locais. Após diferenciação, essas Mo-DCs eram CD11c^{int}MHC-II⁺CD11b⁺Ly6C⁺CCR5⁺ distinguindo de células dendríticas residentes (CD8⁺ e CD8⁻) que eram CD11c⁺Ly6C⁻CCR5⁻. As Mo-DCs da derme expressavam mais MHC-II, CD86 e CD40 e níveis mais baixos Ly6C do que as Mo-DCs encontradas nos linfonodos, sugerindo que nos linfonodos essas Mo-DCs apresentavam um perfil mais maduro. Além disso, demonstrou-se a migração das Mo-DCs da derme para os nódulos linfáticos, onde eram capazes de ativar resposta de células Th1 contra *Leishmania* [20].

Nosso grupo acumula experiências em identificar Mo-DCs em diferentes órgãos durante a malária murina. Fomos pioneiros em demonstrar que durante a infecção com *P.b.* ANKA ocorre uma diferenciação massiva de Mo-DCs no baço, a qual posteriormente emerge no sistema nervoso central (SNC) mediando a MCE [26]. Em trabalho ainda não publicado por nosso laboratório, essas células foram identificadas durante a infecção com cepa *Plasmodium berghei* NK65 na qual monócitos (F4/80⁺CD11b⁺Ly6c⁺) são recrutados para o pulmão durante o processo inflamatório e diferenciaram-se em células dendríticas que produzem grande quantidade de NOS2, fator essencial para desenvolvimento da

síndrome respiratória aguda associada à malária (MA-ARDS). Em ambos os casos IFN- γ mostrou-se fundamental para que ocorra a diferenciação de Mo-DCs.

Em animais infectados com *P.b.* ANKA, ao avaliarmos a medula óssea, principal fonte de monócitos durante infecções, observamos uma população com fenótipo semelhante às Mo-DCs observadas no baço. No entanto, conforme descrito por Hirako e colaboradores, essas células não expressam CD11c, um marcador característico de células dendríticas e são Ly6C^{high}, sendo que a perda ou redução da expressão de Ly6C seja uma característica específica da diferenciação para Mo-DCs [67]. Além disso, as células CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺ da medula óssea não expressam CCR5, esta última sendo um receptor de quimiocina essencial para migração dessas células do baço para o SNC [26]. Em conjunto, esses dados sugerem que essa população CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺ observada na medula óssea, que aqui chamaremos de Mo-DCs apresenta características mais imaturas e sem a capacidade de migração da medula óssea para o SNC. Interessantemente, camundongos CCR2^{-/-}, quimiocina envolvida na migração de monócitos da medula óssea para sítios inflamatórios, desenvolvem MCE induzida por *P.b.* ANKA e migração de Mo-DCs para o cérebro [26]. Isto pode indicar que as Mo-DCs responsáveis pela imunopatogênese sejam geradas apenas no baço ou que monócitos da medula óssea migrem para o baço por uma via independente de CCR2, onde irão se diferenciar em Mo-DCs.

No que se refere aos 28 genes estudados no presente trabalho, o agrupamento dessas amostras indica que as Mo-DCs do baço e da medula óssea são distintos entre si. Ainda, na medula óssea, não há uma separação clara entre Mo-DCs e monócitos, ou seja, a expressão deste grupo de genes é semelhante. Isto pode reforçar a hipótese de que as Mo-DCs da medula óssea ainda são células imaturas. Já as células IFN- γ ^{-/-} se agrupam independentemente da infecção, o que mostra o papel do IFN- γ na ativação da expressão desses genes. Em resumo, o papel destas células CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺ da medula óssea não está definido e outros estudos são necessários para elucidar sua função durante a malária murina.

A avaliação da diferenciação de ambas as populações do baço e da medula óssea durante a infecção por *P.b.* ANKA mostrou que Mo-DCs (CD11b⁺F4/80⁺DC-SIGN⁺MHC-II⁺) emergem neste dois tecidos paralelamente ao aumento da parasitemia (Figura 4) e ao aumento das concentrações de IFN- γ circulante [26]. IFN- γ tem um papel fundamental na resistência do hospedeiro à infecção por *Plasmodium*, além disso, é um importante mediador na patogênese da malária. O aumento de IFN- γ circulante durante a infecção por *Plasmodium*, leva a uma sensibilização pró-inflamatória que promove a inflamação sistêmica (3). Camundongos IFN- γ ^{-/-} ou tratados com anticorpos neutralizantes anti-IFN- γ e

infectados com *P.b. ANKA* não apresentam neuroinflamação e consequentemente não desenvolvem a MCE e são resistentes [68]. Outras funções são atribuídas para o IFN- γ no desenvolvimento da MCE, que inclui o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais da vasculatura cerebral [69].

A diferenciação de monócitos em Mo-DCs pode ser obtida *in vitro* cultivando monócitos da medula óssea de camundongos ou monócitos CD14⁺ isolados do PBMC com GM-CSF e IL-4 [66]. Entretanto, na infecção experimental por *T. gondii* foi demonstrado que o IFN- γ produzido por células NK possui um papel central na diferenciação de monócitos em Mo-DCs na cavidade peritoneal [65]. Ainda, diferentes trabalhos utilizando o modelo de malária cerebral causada pela infecção por *P.b. ANKA* relatam o papel de outras citocinas como IL-4, IL-12 e IL-17 na malária murina [70-72]. No presente trabalho, consistente com dados previamente publicados por nosso grupo, nossos dados indicam que IFN- γ é a citocina central na regulação da diferenciação de Mo-DCs, tanto no baço quanto na medula óssea durante a infecção por *P.b. ANKA* (Figura 5).

O potencial apresentado por monócitos de se diferenciarem em outras células, como macrófagos e Mo-DCs pode estar associado com sua plasticidade. Já é bem estabelecido que a plasticidade de uma célula depende da sua capacidade de permitir uma completa reprogramação genética em resposta a diferentes estímulos [73]. Este processo é caracterizado por mudanças precisas no transcriptoma celular que podem ser transitórias (por exemplo, resposta ao estresse) ou permanentes (por exemplo, diferenciação celular). Modificadores e remodeladores de cromatina conhecidos como “fatores epigenéticos” são indispensáveis neste processo de reprogramação celular para alterar e manter a resposta transcricional [74]. Pouco se sabe sobre fatores epigenéticos induzidos por doenças infecciosas, especialmente na malária. Dada a importância das Mo-DCs na imunopatogênese da malária cerebral [26] e outras doenças infecciosas [19-24] no presente trabalho avaliamos os possíveis mecanismos epigenéticos envolvidos na diferenciação de Mo-DCs. Além disso, sendo IFN- γ uma citocina chave para a diferenciação destas células, também avaliamos o seu papel como regulador epigenético deste processo.

Assim, para melhor entendermos os mecanismos envolvidos na diferenciação de Mo-DCs avaliamos diferentes enzimas envolvidas em modificação de DNA e histona já descritas por estarem envolvidas com a ativação ou inibição de transcrição. As histonas podem sofrer diferentes modificações pós-traducionais, e essas modificações afetam diretamente a expressão gênica, dependendo do contexto e dos resíduos modificados. Essas modificações estão associadas a um perfil transcricional específico, como por

exemplo a acetilação de histonas que resulta em ativação da transcrição. Por outro lado, a metilação de histonas, pode resultar em ativação ou inibição da transcrição dependendo do resíduo modificado [75].

Entre todos os genes analisados, *Kmt2c* apresentou a expressão mais aumentada em Mo-DCs do baço de animais WT (Figura 11B). A *Kmt2c*, também chamada MLL3 (Leucemia de Linhagem Mista) integra o complexo associado a SET1 (conhecido como COMPASS-*like*) que são compostos por proteínas da família Thithorax [76,77]. Essas enzimas são consideradas enzimas-chave na mono, di e trimetilação de H3K4, associadas com promotores abertos e ativação da transcrição gênica [78-80]. Ainda, *Kmt2c* não apresentou expressão diferencial na medula óssea ou em células IFN- $\gamma^{-/-}$, sugerindo que *Kmt2c* possa ter um papel chave na diferenciação e/ou ativação de Mo-DCs no baço durante a malária que é dependente de IFN- γ . As enzimas MLL3 foram previamente mostradas por serem as principais ativadoras de genes responsivos a hormônios [81]. Alterações no transcriptoma dependente de *kmt2c* (MLL3) também são descritas durante a diferenciação de célula-tronco embrionária (ESC) [82], transformação leucêmica [83] ou resposta celular a estímulos externos por exemplo, lipopolissacarídeo [84] e ácido retinóico [85]. Em macrófagos foi demonstrado que a MLL3 é a principal HMT envolvida na ativação da transcrição induzida após estímulo via TLR4 [86]. Em conjunto, estes dados reforçam a importância de MLL3 no contexto de ativação e diferenciação celular.

Ainda entre as histonas metiltransferases, *Setdb2* apresentou expressão aumentada em Mo-DCs do baço de animais WT e monócitos inflamatórios de animais IFN- $\gamma^{-/-}$. A atividade metiltransferase de *Setdb2* é específica para a histona 3 lisina 9 (H3K9me3), a qual reprime a expressão gênica [87]. O papel de *Setdb2* na resposta imune foi demonstrado na infecção por vírus Influenza, na qual esta metiltransferase foi associada a supressão de diversos genes com funções pró-inflamatórias. Além disso, a expressão de *Setdb2* por macrófagos inibiu a produção de IL-2, IL-10 e IFN- γ por células T CD4⁺ *in vitro* [88]. Assim, a função supressora da transcrição de *Setdb2* pode estar associada com um papel regulador durante a resposta inflamatória.

O aumento da expressão gênica de *Ezh2* no baço foi observada somente em monócitos inflamatórios de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ e o mesmo não aconteceu em Mo-DCs de animais WT. *Ezh2* é uma histona metiltransferase integrante do complexo repressivo de Polycomb-2 (PRC2). Possui atividade específica em relação a histona 3 na lisina 27 (H3K27) funcionando como iniciador do silenciamento epigenéticos [89]. Sugerindo que no baço, IFN- γ possa inibir a expressão de *Ezh2* o qual, por sua vez, pode ter papel repressor em monócitos inflamatórios. Ainda, a expressão gênica de *Ezh2* mostrou-se independente de IFN- γ tanto no baço quanto na medula óssea. Inicialmente o PRC2 foi identificado

como regulador negativo dos genes homeóticos (HOX) que são essenciais para a segmentação adequada em *Drosophila* [90]. Estudos demonstram que a deleção específica de *Ezh2* em células T regula a diferenciação de células T CD4⁺ suprimindo a diferenciação Th1, Th2 e Th17 [91]. Ainda, a deleção de EZH2 em múltiplos tecidos revelou papéis críticos desta metiltransferase na regulação da proliferação e diferenciação celular, identidade de células-tronco e pluripotência [92]. A regulação de fatores de transcrição relacionados à diferenciação celular como Gata, Sox, Fox, Pou, Pax, componentes das vias Wnt, TGF- β e ácido retinóico são silenciados por EZH2 [93-96]. Assim, esses dados destacam o papel repressor de *Ezh2* na regulação de diversos processos celulares, incluindo a diferenciação.

Como citado anteriormente, em conjunto, a análise da família das enzimas metiltransferase revela que em Mo-DCs do baço de animais WT ocorre o aumento da expressão gênica de *Kmt2c* que está relacionada com a ativação da transcrição, entretanto em monócitos inflamatórios do baço de animais IFN- γ ^{-/-} observa-se o aumento da expressão gênica de *Ezh2*, que está relacionada com a repressão da transcrição. Dados na literatura relatam que a dinâmica entre essas duas enzimas e suas marcas relacionadas, têm papéis cruciais, porém opostos, na regulação de diversos genes envolvidos na proliferação celular [97], identidade de células-tronco e câncer [98] *imprinting* genômico em plantas e mamíferos [99] e inativação de X [100].

Em células tronco hematopoéticas, nos progenitores mieloídes os níveis de H3K27me3 (e sua metiltransferase associada EZH2) foram diminuídos à medida que as células eritróides foram diferenciadas. Em contraste, os níveis de H3K4me3 (e sua metiltransferase associada MLL3), começaram a aumentar à medida que as células se diferenciavam em megacariócitos [101,102]. Este padrão de regulação é consistente com domínios de cromatina bivalentes, conhecidos por potencializar a expressão de genes permitindo a ativação oportuna ou mantendo a repressão na ausência de sinais de diferenciação, são encontrados em células pluripotentes e não pluripotentes [103,104].

Em células Mo-Dcs estimuladas por TGF- β e LPS, estudos *in vitro* observaram que a regulação positiva de moléculas coestimuladoras, citocinas/quimiocinas, bem como seus receptores, está relacionada ao aumento das marcas H3K4me3, e a regulação negativa de outros genes está associada a modificações da H3K27me3 [105]. Outro estudo analisou H3K4me3 e H3K27me3 em regiões promotoras de macrófagos e Mo-Dcs e observaram que durante a diferenciação, os níveis de H3K4me3 diminuíram em CD14, CCR2 e CX3CR1 específicos de monócitos, mas aumentaram em genes específicos para células dendríticas TM7SF4/DC-STAMP, TREM2 e CD209/DC-SIGN [106]. Portanto,

juntos esses trabalhos salientam a importância da presença destas marcas (H3K4me/H3K27me) na regulação da diferenciação de Mo-DCs.

Interessantemente, apenas em Mo-DCs da medula óssea de animais WT as enzimas Ezh2, Suv39h1, Ehmt2 apresentaram aumento na expressão gênica. Estas enzimas são responsáveis pelas modificações H3K27me3, H3K9me3, e H3K9me, respectivamente e correlaciona-se com regiões de cromatina estruturalmente condensadas e transcricionalmente inativas [107]. Ainda associada a repressão, a análise da família das enzimas histonas demetilase mostrou somente nessas células a expressão aumentada de Kdm1a, esta enzima retira o grupo metil especificamente em regiões de transcrição ativa (H3K4), levando a repressão [108]. Dessa forma, podemos considerar que nessas células a infecção pode induz um processo de repressão da transcrição.

Ao avaliarmos as histonas acetiltransferases, nossos resultados demonstraram um aumento do gene codificador de *Ciita* (Transativador do complexo de histocompatibilidade de classe II) de 4 vezes no baço 6 vezes na medula óssea em animais WT. *Ciita* atua como um regulador positivo da transcrição do gene de MHC-II (complexo de histocompatibilidade principal de classe II) sendo conhecido como o "fator de controle mestre". O recrutamento de *Ciita* para o complexo potenciador de classe II é essencial para a expressão de genes MHC-II e consequente ativação da resposta imune adaptativa através da apresentação de antígeno às células T CD4+ [109] .

A literatura relata que a expressão de MHC-II em células dendríticas é regulada dinamicamente por múltiplos mecanismos, incluindo a formação do complexo de ativação da transcrição dependente *Ciita* [110-113] . Nas células dendríticas imaturas, *CIITA* é ativamente transcrita, levando a altos níveis de expressão do mRNA de MHC-II, porém, com baixos níveis da proteína na superfície celular. Isso ocorre devido à ubiquitinação da cadeia MHC-II, mantendo a molécula internalizada no compartimento endossomal. Após a maturação das células dendríticas e/ou após estímulos via TLR, a ubiquitinação do MHC-II é perdida [114-116], permitindo a translocação do MHC-II para a superfície celular para apresentação de antígeno. Importante, a expressão de MHC-II observada na superfície de Mo-DCs difere de monócitos inflamatórios, os quais não expressam essa proteína na superfície, bem como apresentam baixa expressão de *Ciita*, sugerindo que *Ciita* pode ser ativada durante a diferenciação de monócitos para Mo-DCs. Ainda, o aumento de expressão de *Ciita* em células IFN- $\gamma^{-/-}$ indica que essa enzima não é dependente de IFN- γ , sendo que outros mecanismos podem estar envolvidos em sua ativação.

Ainda analisando as histonas acetiltransferases, HAT1 mostrou expressão gênica aumentada tanto no baço em Mo-DCs de animais WT como em monócitos inflamatórios de

animais IFN- $\gamma^{-/-}$, o mesmo não foi visto na medula óssea. Esta enzima é conhecida pela rápida acetilação de histonas citoplasmáticas recém sintetizadas, que são levadas para o núcleo e participam da montagem do nucleossomos durante a replicação e reparo do DNA, estando altamente expressa em células mitóticas [117]. Outra enzima que também tem ação citoplasmática, é a Hdac6 que faz parte da família de histona desacetilases e encontra-se aumentada somente em monócitos inflamatórios do baço de animais IFN- $\gamma^{-/-}$. Ao contrário de outras Hdacs com atividade predominantemente de remodelação da cromatina, Hdac6 exerce atividade de desacetilases principalmente em substratos não histônicos estando envolvida em muitas funções celulares relacionadas à dinâmica do citoesqueleto, incluindo migração celular e autofagia [118].

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que a expressão da enzima metiltransferase Kmt2c (MLL3) em Mo-DCs do baço é dependente de IFN- γ . Por outro lado, a enzima metiltransferase Ezh2, responsável pela repressão da transcrição, foi altamente expressa na ausência de IFN- γ . Esses achados sugerem que estas enzimas podem estar envolvidas na regulação da transcrição de genes essenciais para a diferenciação de Mo-DCs no baço durante a infecção por *P.b.* ANKA. Mais estudos são necessários para identificar os genes alvos envolvidos com esses mecanismos epigenéticos e quais os efeitos da inibição dessas enzimas na malária. Por fim, Kmt2c e Ezh2 podem representar importantes alvos para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da malária a cerebral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization: Malaria. WHO, 2016.
2. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, ano de 2015. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 20 mar 2017
3. Gazzinelli, R.T., et al., Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol*, 14(11): p. 744-57..2014
4. Franke-Fayard, B. et al. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *Plos Pathog* 6, e1001032 2010.
5. Franklin, Bernardo S. et al. "Plasma Circulating Nucleic Acids Levels Increase According to the Morbidity of *Plasmodium Vivax* Malaria." Ed. Fabio T. M. Costa. *PLoS ONE* 6.5 2011.
6. Li, S et al. "Priming with Recombinant Influenza Virus Followed by Administration of Recombinant Vaccinia Virus Induces CD8+ T-Cell-Mediated Protective Immunity against Malaria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.11: 5214–5218.1993
7. Goldie, P., et al., Biochemical characterization of *P. falciparum* hemozoin. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 43, 584-596,.1990.
8. Mohan, K, et al ., Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *P. chabaudi* AS infection. *J.Immunol.* 159, 4990-4998,1997.
9. Stevenson, MM., et al., IL-12-induced protection against blood-stage *P. chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J.Immunol.* **1995** 155, 2545-2556,
10. Amani, V., et al., Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol*,30(6): p. 1646-55, 2000.
11. Amani, V., et al., Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol*,2000. **30**(6): p. 1646-55
12. Amino, R.,et al., Quantitative imaging of *P.* transmission from mosquito to mammal. *Nat.Med.* 12, 220-224, Feb./2006.
13. Villegas-Mendez, Ana et al. "Long-Lived CD4⁺IFN- γ ⁺ T Cells rather than Short-Lived CD4⁺IFN- γ ⁺IL-10⁺ T Cells Initiate Rapid IL-10 Production To Suppress Anamnestic T Cell Responses during Secondary Malaria Infection." *The Journal of Immunology Author Choice* 197.8 (2016): 3152–3164
14. Howland, SW., Pathogenic CD8 T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol*, in press. 2015.
15. Haque, A., et al., Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol*186:6148–6156. 2011.
16. Heusel J. W et al., Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cell. . *Cell* 76:977–987.1994
17. Leon, B.,et al., Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol.* 17(4): p. 313-8. Sept/2005.
18. Cheong, C., et al., Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DCSIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*, 143(3): p. 416-29. 2010.
19. Leon, B., M. et al., Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*, 26(4): p. 519-31. 2007.

20. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 669-92
21. Cheong, C., et al., Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*, 2010. **143**(3): p. 416-29.
22. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 519-31
23. Serbina, N.V., et al., TNF/*i*NOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*.19(1): p. 59-70.(2003).
24. Goldszmid, R.S., et al.NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36, 1047-1059 (2012).
25. Belyaev, N.N., et al.,Extramedullary myelopoiesis in malaria depends on mobilization of myeloid-restricted progenitors by IFN-gamma induced chemokines. *PLoS Pathog.*, 9(6): p. e1003406. 2013.
26. Hirako, Isabella C. et al. "Splenic Differentiation and Emergence of CCR5⁺CXCL9⁺CXCL10⁺ Monocyte-Derived Dendritic Cells in the Brain during Cerebral Malaria." *Nature Communications* 7 2016
27. DEICHMANN, 2016
28. REIK; SANTOS; DEAN, 2003
29. Yosef N., et al., Writ large: Genomic Dissection of the Effect of Cellular Environment on Immune Response. *Science*.354:64–8. 2016.
30. Riggs, A.D., et al.,X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 14, 9-25 1975.
31. Pinheiro,I., "X Chromosome Inactivation: New Players in the Initiation of Gene Silencing." *F1000Research* 6 (2017): F1000 Faculty Rev–344.
32. KLOSE, R.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Biochemical Sciences*, v. 31, p. 89-97, 2006
33. TANG, W., et al . Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 8, p. 173
34. Straussman 2009
35. KLOSE, R., et al., Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Biochemical Sciences*, v. 31, p. 89-97, 2006.
36. JANSON, P.C.J.; WINERDAL, M.E.; WINQVIST, O. At the crossroads of T helper lineage commitment-Epigenetics points the ways. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790, p. 906-919, 2009
37. Paulsen, M., et al.,DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol.*, 195(1): p. 97-110. 2001
38. JANSON, P.C.J., et al.,Profiling of CD4⁺ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *The Journal of Immunology*, v. 186, p. 92-102, 2011
39. Zhang, X., et al., DNA methylation dynamics during ex vivo differentiation and maturation of human dendritic cells. *Epigenetics Chromatin.*, **7**: p. 21. 2014.
40. Long H. et al. "The critical role of epigenetics in systemic *lupus erythematosus* and *autoimmunity*." *J Autoimmun.* (2016) 74:118-138.
41. Rodríguez,P.,et al.,Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*, New York, v. 17, n. 3, p. 330-339, 2011.
42. Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. *Cell*, 7. 128(4): p. 693-705.2007.
43. Vadasz Z. Frontier issues in autoimmunity: Publications in 2009-2010. *The Israel Medical Association Journal*, v. 12, 757-761, 2010.

44. Shelley L., et al ., The complex language of chromatin regulation during transcription. n407-412. May 2007.
45. Cheung, P.,et al., Sassone-Corsi, Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103(2): p. 263-71.2000.
46. Van Heeringen, Simon J. et al. "Principles of Nucleation of H3K27 Methylation during Embryonic Development." *Genome Research* 24.3 (2014): 401–410
47. Schuettengruber, Bernd et al. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* , Volume 171 , Issue 1 , 34 – 57
48. Richly, H., et al, Setting and resetting of epigenetic marks in malignant transformation and development. *Bioessays*, 32: 669–679. 2010.
49. Bullwinkel, J., et al., Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. *Epigenetics*.6(1):p.45-51.,2011
50. Zhang, X., et al., DNA methylation dynamics during ex vivo differentiation and maturation of human dendritic cells. *Epigenetics Chromatin*, 2014. 7:p. 21.
51. Wang, B., et al., Butyrate inhibits functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Immunol*, 253(1-2): p. 54-8. 2008.
52. Wierda, R.J., et al., A role for KMT1c in monocyte to dendritic cell differentiation: Epigenetic regulation of monocyte differentiation. *Hum Immunol.* 76(6): p. 431-7.2015
53. Wen, H., et al., Dendritic cells at the interface of innate and acquired immunity: the role for epigenetic changes. *J Leukoc Biol*. 83(3): p. 439-46. , 2008
54. Portela, A. and M. Esteller, Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28(10): p. 1057-68.2010
55. Carson, W.F., et al., Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*, 6(3): p. 273-83. 2011.
56. Chen, X., et al., Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(42): p. E2865-74. 2012.
57. Zhao, D.,et al . H3K4me3 Demethylase Kdm5a Is Required for NK Cell Activation by Associating with p50 to Suppress SOCS1. *Cell Reports*, 15(2), 288–299.2016.
58. CooperR, M. E., et al Epigenetics: mechanisms and implications for diabetic complications. *Circulation Research*, *Baltimore*, v. 107, n. 12, p. 1403-1413, 2010.
59. Foulks, JM., et al. Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *J Biomol Screen*. 2012 Jan;17(1):2-17.
60. Robert A Copeland, et al.,Targeting epigenetic enzymes for drug discovery,Current Opinion in Chemical Biology,volume 14- 505-510, Issue 4,2010
61. Geissmann, F.,et al., Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*,327(5966): p. 656-61. 2010
62. Watford WT.,et ., Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunological reviews*: 202: 129-56. 2004
63. Hettinger, J., et al., Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol*, 2013. 14(8): p. 821-30.
64. Serbina, N.V., et al., Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 421-52.
65. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*, 2005. 17(4): p. 313-8.
66. Cheong, C., et al., Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*, 2010. 143(3): p. 416-29.
67. Cheong, C., et al., Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*, 2010. 143(3): p. 416-29.

68. A. Shilatifard., et al., The COMPASS family of histone H3K4 methylases: Mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2012. **81**, 65–95.
69. Amani, V., et al., Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(6): p. 1646-55.
70. Helegbe GK., et al., Elevated IL-17 levels in semi-immune anaemic mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Malar J.* 2018 Apr 17;17(1):169.
71. Saefel, Michael et al. "Mice Deficient in Interleukin-4 (IL-4) or IL-4 Receptor A Have Higher Resistance to Sporozoite Infection with *Plasmodium Berghei*(ANKA) than Do Naive Wild-Type Mice ." *Infection and Immunity* 72.1 (2004): 322–331
72. Settles, Erik W. et al. "Toxoplasma Gondii Upregulates Interleukin-12 To Prevent Plasmodium Berghei-Induced Experimental Cerebral Malaria." Ed. J. H. Adams. *Infection and Immunity* 2014 82.3
73. Costa, Fabricio F. "Epigenomics in Cancer Management." *Cancer management and research* 2 (2010): 255–265.
74. R. Jaenisch., et al., Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* (2003). **33** (Suppl), 245–254
75. -R. D. Kornberg., et al., Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999. **98**, 285–294.
76. P. A. Steffen., et al., What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. **15**, 340–356.
77. A. Shilatifard. et al., The COMPASS family of histone H3K4 methylases: Mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2012 **81**, 65–95.
78. Ansari KI, Mandal SS. Mixed lineage leukemia: roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing; *FEBS J*; 2010. pp. 1790–1804
79. Sze CC, Shilatifard A. MLL3/MLL4/COMPASS family on epigenetic regulation of enhancer function and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6
80. Shilatifard A. Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annu Rev Biochem.* 2006
81. Lee JE, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *Elife.* 2013;2:e01503
82. Ang YS, et al. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell.* 2011;145:183–197.
83. Cao F, et al. Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed-lineage leukemia. *Mol Cell.* 2014;53:247–261.
84. Austenaa L, et al. The histone methyltransferase Wbp7 controls macrophage function through GPI glycolipid anchor synthesis. *Immunity.* 2012;36:572–585.
85. Guo C, et al. Global identification of MLL2-targeted loci reveals MLL2's role in diverse signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:17603–17608.
86. Kaikkonen MU., et al., Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Molecular Cell.* 2013;51:310–325.

87. Zhang, Y., Leaves, N., et al., Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nature Genet.* 34: 181-186, 2003.
88. Kroetz DN, Allen RM., et al., Type I Interferon Induced Epigenetic Regulation of Macrophages Suppresses Innate and Adaptive Immunity in Acute Respiratory Viral Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005338.
89. Cao, R., et al. The role of histone H3 lysine methylation 27 in the polycomb group. *Science* 298: 1039-1043, 2002.
90. J. Muller, J.A. Kassiss. Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 16 (2006), pp. 476-484.
91. Yang, Xiang-Ping et al. "EZH2 Is Crucial for Both Differentiation of Regulatory T Cells and T Effector Cell Expansion." *Scientific Reports* 5 (2015): 10643.
92. Vire, E., et al., The polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439: 871-874, 2006.
93. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research* 2008;647(1-2): 21–9.
94. Bracken AP. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes & Development* 2006;20(9): 1123–36.
95. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 2006;441(7091): 349–53.
96. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, et al. Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 2006;125(2): 301–13.
97. Anne-Marie Martinez & Giacomo Cavalli .The role of Polycomb Group Proteins in Cell Cycle Regulation During Development, *Cell Cycle*, 5:11, 1189-1197
98. Sparmann, van Lohuize M., et al., Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):846-56.
99. Heard E., et al., Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, Volume 15, Issue 5, 2005, Pages 482-489.
- 100.
101. Cui K., et al., Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2014. 4: 80–93
102. Abraham BJ., et al., Dynamic regulation of epigenomic landscapes during hematopoiesis. *BMC Genom* 2013. 14: 193.
103. Voigt P., et al., A double take on bivalent promoters. *Genes Dev* 2013 27: 1318–1338
104. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K., et al., A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006. 125: 315–326
105. Mei, Shiyue et al. "Dendritic Cell-Associated miRNAs Are Modulated via Chromatin Remodeling in Response to Different Environments." Ed. Kithiganahalli N. Balaji. *PLoS ONE* 9.4 (2014): e90231
106. Tserel, Liina et al. "Genome-Wide Promoter Analysis of Histone Modifications in Human Monocyte-Derived Antigen Presenting Cells." *BMC Genomics* 11 (2010): 642.
107. Kouzarides. T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007. 128:693–705.
108. Shao, G.-B., et al., Dynamic patterns of histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases during mouse preimplantation development. *In Vitro Cell. 2014. Dev. Biol. Anim.* 50: 603-613.

109. Reith W., et al., Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:793–806.
110. Chin KC., et al., Molecular analysis of G1B and G3A IFN gamma mutants reveals that defects in CIITA or RFX result in defective class II MHC and li gene induction. *Immunity.* 1994;1:687–697
111. Ting JP, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell.* 2002;109(Suppl):S21–S33.
112. Riley JL., et al., Activation of class II MHC genes requires both the X box region and the class II transactivator (CIITA) *Immunity.* 1995;2:533–543.
113. Chang CH., et al., Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity.* 1996;4:167–178.
114. Shin JS, Ebersold M., et al., Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature.* 2006;444:115–118.
115. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y., et al., Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *J Immunol.* 2006;177:341–354.
116. Hmura-Hoshino M., et al., Cutting edge: requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. *J Immunol.* 2009;183:6893–6897
117. Campos, Eric I. et al. “The Program for Processing Newly-Synthesized Histones H3.1 and H4.” *Nature structural & molecular biology* 17.11 (2010): 1343–1351
 Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:769–84