UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito do tratamento com agentes hipometilantes: modulação das funções
de monócitos e macrófagos e possível repercussão terapêutica**

Fabiana Albani Zambuzi

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito do tratamento com agentes hipometilantes: modulação das funções
de monócitos e macrófagos e possível repercussão terapêutica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Aluna: Fabiana Albani Zambuzi

Orientadora: Profa. Dra. Fabiani Gai Fratz

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia no dia 07/10/2019. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.**

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Zambuzi, Fabiana Albani

Efeito do tratamento com agentes hipometilantes: modulação das funções de monócitos e macrófagos e possível repercussão terapêutica. Ribeirão Preto, 2019.

163 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Frantz, Fabiani Gai.

1. Agentes hipometilantes. 2. Monócitos/macrófagos. 3. Resposta imune. 4. Síndrome Mielodisplásica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Fabiana Albani Zambuzi

Título do trabalho: Efeito do tratamento com agentes hipometilantes: modulação das funções de monócitos e macrófagos e possível repercussão terapêutica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores, à
minha maior torcida, às orações e preocupações mais
verdadeiras, ao amor incondicional. Dedico a conclusão de
mais uma etapa a vocês: pai, mãe, irmã e noivo!*

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de
gigantes!” Isaac Newton*

*E vocês foram meus gigantes! Gigantes no amor, na
preocupação, na compreensão, no incentivo! Dedicar este
trabalho a vocês é minha forma de agradecer por serem
meu tudo.*

Amo vocês! Sempre!

Agradecimientos

*“Nunca podemos esquecer quem nos ajuda, nos apoia
e nos incentiva. Reconhecer todo o bem recebido é
espalhar luz”*

(Flordaka)

A Deus, força maior que me guia, me protege e me encoraja a buscar sempre o meu melhor, como pessoa e como profissional. Obrigada por me mostrar os caminhos e por colocar tantas pessoas do bem nesta minha caminhada!

À minha orientadora, Profa. Fabiani G. Frantz. Obrigada por me ensinar e aconselhar, por torcer por mim e vibrar comigo em cada pequena conquista. Agradeço muito por todo incentivo, por acreditar no meu trabalho e nas minhas ideias, mesmo quando elas fugiam um pouco da nossa zona de conforto científica. Obrigada por me permitir crescer tanto profissionalmente. Estes anos de convívio e aprendizado foram cruciais para minha formação. Tenho imensa admiração pela pessoa e profissional que é e desejo muito sucesso. Espero que nossas coincidências de vida continuem e eu consiga trilhar um caminho tão bonito como o seu.

Aos meus pais, João e Adenilse. Obrigada por serem minha maior torcida e por acreditarem tanto em mim, bem mais do que eu mesma acredito. Agradeço todos os dias pelo imenso amor, preocupação e dedicação. Se cheguei até aqui, foi porque vocês não mediram esforços para que conquistássemos nossos sonhos. Obrigada por acreditarem neles comigo e por serem meus maiores exemplos de vida! Amo vocês!

À minha irmã, Isabela. Obrigada por dividir comigo a vida, a casa, as experiências profissionais e pessoais. Obrigada por torcer por mim, vibrar a cada conquista e me incentivar sempre! Agradeço os conselhos e o amor que sempre tem para esta irmã mais velha, mais chorona e mais insegura. Amo você!

Ao meu noivo, Rogério. Obrigada pelo imenso amor e compreensão, por me incentivar a sempre crescer pessoal e profissionalmente, a buscar novos desafios e, assim como meus pais, por acreditar em mim mais do que eu mesma. Obrigada por ser meu companheiro de vida, por me acalmar nos momentos de crise e sempre estar disposto a encarar as loucuras desta vida comigo! Amo você! Estendo o agradecimento aos meus futuros sogros, obrigada pelo apoio, torcida e amor sempre.

Aos meus avós, grande parte deles agora apenas em memória e à vó Maria, ainda aqui conosco. Agradeço o privilégio de ter convivido tanto com vocês, por poder aproveitar todo o carinho, amor e preocupação que sempre tiveram. Serei grata eternamente pelos conselhos,

pelas orações e pela família que formaram. Amo vocês! A saudade é grande, mas o amor é maior ainda!

Aos companheiros de Laboratório, especialmente a Caroline Fontanari, Ricardo Cardoso Castro e Priscilla Mariane Cardoso da Silva! Ah, palavras não são suficientes para agradecer toda ajuda de vocês na execução deste trabalho. Obrigada pelos ELISAs, pelas separações de células, pelas companhias na P3, pelas idas a São Paulo, pelas coletas de pacientes. Sem contar os cafés, as conversas, os conselhos e o carinho que sempre tiveram comigo. Meu mais sincero obrigada. Sem vocês este trabalho não teria sido possível! Muito obrigada!

Ao Prof. Flávio da Silva Emery. Agradeço por entrar nesta ideia conosco, por ceder gentilmente o composto para que pudéssemos avaliar os efeitos imunomoduladores e por sempre estar disposto a discutir resultados. Agradeço seu olhar sempre positivo e torcida! Obrigada!

À Profa. Dra. Fabíola Traina. Agradeço muito pela colaboração e auxílio na triagem e coleta de amostras dos pacientes. Estendo o agradecimento ao seu aluno, Juan, fundamental para que o trabalho com os pacientes acontecesse. Obrigada por toda ajuda, pelas inúmeras listas de pacientes, por todo conhecimento transmitido e por sempre estar disposto a colaborar. Agradeço por me acolherem no laboratório e por toda disponibilidade para que este trabalho desse certo. Obrigada!

À Profa. Elvira D. Rodrigues Pereira. Agradeço por todo auxílio com a inclusão dos pacientes em tratamento, tão difíceis de encontrar e tão fundamentais para o enriquecimento deste trabalho. Estendo aqui, os agradecimentos a sua equipe, especialmente Helena e Maria Gabriella. Obrigada pela disponibilidade em responder e-mails, em auxiliar na coleta dos pacientes e no processamento das amostras. As idas a São Paulo teriam sido mais difíceis sem a ajuda de vocês. Obrigada!

A todos os pacientes atendidos no HC-FMRP/USP e HC-FMUSP, bem como a todos os voluntários que através de doação de amostras de sangue foram parte fundamental para o desenvolvimento do trabalho. Sem a participação de vocês nada do que foi desenvolvido seria possível.

Ao Prof. Célio Lopes Silva. Agradeço por me receber em seu laboratório e permitir a execução dos experimentos em sala de segurança nível 3. Estendo este agradecimento as suas funcionárias, Iza, Wendy e Aninha, sempre dispostas a ajudar, a ouvir e a aconselhar. Obrigada pelo carinho, preocupação e incentivo sempre. Que bom conviver um pouquinho com vocês. Obrigada!

À Profa. Lúcia Helena Faccioli. Obrigada pelos conselhos, auxílio e por compartilhar conosco o laboratório e as experiências de vida. Tenho grande admiração pela senhora. Estendo meus agradecimentos aos seus alunos, por dividirem comigo a bancada, os cafés e a vida na pós-graduação.

À Margarida, minha mãe ribeirão-pretana, por toda ajuda desde o mestrado, pelas horas de conversa e conselhos sempre sábios, pelas experiências trocadas e por todo carinho dedicado.

Aos funcionários FCFRP – Alyne, Carlos, Caroline e Fabiana. Agradeço as ajudas técnicas, científicas e não científicas.

Aos professores do Programa de Biociências e Biotecnologia. Agradeço a todos aqueles que, em algum momento desta jornada, me ensinaram, me aconselharam e me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, seja discutindo o projeto, metodologia ou nos auxiliando com pacientes, colaborações e equipamentos. Vocês foram fundamentais para a formação do conhecimento que tenho hoje e pela execução deste trabalho. Obrigada!

Aos amigos que fiz no decorrer desta jornada, em especial Caroline, Luana, Morgana, Priscilla, Verônica, Karina, Milena, Maira e Ana Paula. Sinta falta de vocês todos os dias. Agradeço por serem minhas companheiras de bancada e de discussões científicas. Agradeço ainda mais por serem companheiras na vida, pela preocupação, pelos momentos de diversão, pelas conversas não científicas, pelos conselhos e pela torcida sempre! Do laboratório para a vida! Vocês tem um lugar muito especial no meu coração!!

Aos velhos e maravilhosos amigos. De Paraíso, da Faculdade, da Rep. TPM, da vida! Obrigada por sempre estarem presentes, apesar dos quilômetros de distância, dos compromissos, dos diferentes rumos que a vida toma. Agradeço todos os momentos que passamos juntos, o carinho que sempre tiveram comigo e os pensamentos e energias positivas! Obrigada! Amo vocês!

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela infraestrutura. Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia pela formação diferencial e humana de seus alunos. Sou muito feliz com a escolha de fazer doutorado nesta instituição.

Às agências de fomento à pesquisa. à CAPES, ao CNPq e à FAPESP (Projeto Regular - processo nº 2017/05365-8) pelo suporte financeiro e recursos fundamentais para a execução deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos membros da banca, agradeço desde já a contribuição científica para o contínuo aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente tenham participado desta etapa da minha vida. Sou muito grata por ter conseguido concluir este trabalho, pelas dificuldades que surgiram no caminho, pois elas me fizeram crescer, pelos aprendizados e pelas pessoas que encontrei nesta jornada. O conhecimento que adquiri e as amizades que levo comigo são motivos de sobra para agradecer! Obrigada por me fazerem acreditar que tudo vai dar certo!

Epígrafe

*“Você nunca sabe que resultados virão
da sua ação. Mas se você não fizer nada,
não existirão resultados”*

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

ZAMBUZI, F.A. **Efeito do tratamento com agentes hipometilantes: modulação das funções de monócitos e macrófagos e possível repercussão terapêutica.** 2019. 170f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A utilização de estratégias terapêuticas baseadas na manipulação das alterações epigenéticas tem despertado interesse de diferentes grupos de pesquisa. Dentre as *epidrugs*, os agentes hipometilantes tem um papel bem estabelecido no tratamento de pacientes com síndrome mielodisplásica e outras neoplasias hematológicas. Além dos efeitos diretos sobre as células tumorais, existem várias evidências que indicam que as células do sistema imune sejam diretamente afetadas pelo tratamento, com efeitos demonstrados sobre a função de células NK, linfócitos e células dendríticas. Porém, pouco foi descrito sobre a modulação exercida pelos agentes hipometilantes sobre a função de monócitos e macrófagos humanos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi definir os efeitos do tratamento com Decitabina no fenótipo e funções de monócitos e macrófagos e a possível imunomodulação em pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) tratados Azacitidina. Inicialmente, monócitos foram isolados de indivíduos saudáveis (n=30) e tratados com 5µM de Decitabina por 24 horas. Após o tratamento, as células foram infectadas *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) para avaliação dos efeitos sobre as funções celulares importantes no controle da infecção. Os monócitos também foram diferenciados em macrófagos na presença do agente hipometilante para determinação do perfil de polarização celular, através de expressão gênica e de marcadores de superfície. O tratamento com Decitabina induziu aumento na fagocitose e liberação de IL-8, porém prejudicou a atividade microbida dos monócitos em resposta ao Mtb. Além disso, observou-se que o tratamento favoreceu a polarização de macrófagos para o perfil M2, determinado por alterações morfológicas e aumento da expressão de CD206 e ALOX15. Funcionalmente, essas células demonstraram redução do controle da infecção, apesar de produzirem mediadores inflamatórios de maneira semelhante às células não tratadas. Apesar disso, quando co-cultivados com linfócitos em modelo de granuloma *in vitro*, Decitabina promoveu redução na produção de IL-1β, TNF-α e IFN-γ, com produção semelhante de IL-10, sugerindo um efeito imunomodulador que poderia induzir mecanismos reguladores da resposta imune. Por fim, para avaliação da imunomodulação em pacientes com SMD, foram recrutados 17 indivíduos em tratamento de suporte e 4 pacientes em tratados com o agente hipometilante Azacitidina. A partir de amostras de sangue periférico, o plasma foi separado para quantificação de mediadores imunológicos e a fração celular foi utilizada para a expressão gênica e isolamento de monócitos para avaliações funcionais após infecção por Mtb. Foram observadas alterações na quantificação de mediadores no plasma, com aumento de IL-2, IL-4, IL-12, IL-17, IFN-γ, TNF-α e IL-1β nos pacientes em tratamento com azacitidina em relação aos não tratados, restabelecendo níveis semelhantes ao grupo controle, além de aumento de IL-8 e IP-10 quando comparados aos indivíduos saudáveis. Em relação à função dos monócitos, observou-se aumento na produção de IL-8 e IL-12 após a infecção por Mtb, porém nenhuma modulação sobre a função fagocítica e microbida foi observada nestes pacientes. Assim, os dados sugerem que os agentes hipometilantes exercem modulação importante sobre a função de monócitos e macrófagos, podendo influenciar no padrão de resposta e, desta forma, constituindo uma potencial estratégia terapêutica de manipulação do sistema imune.

Palavras-chave: agentes hipometilantes, macrófagos, resposta imune, Síndrome Mielodisplásica

ABSTRACT

ZAMBUZI, F.A. **Effect of hypomethylating agents treatment: modulation of monocyte and macrophage functions and possible therapeutic repercussion.** 2019. 170f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The use of therapeutic strategies based on the manipulation of epigenetic alterations has raised interest of different research groups. Among the epidrugs, hypomethylating agents have a well-established role in the treatment of myelodysplastic syndrome and other haematological malignancies. In addition to direct effects on tumor cells, there are several evidences indicating that immune cells are directly affected by treatment, as already demonstrated for NK cell, lymphocyte and dendritic cell function. However, few studies have been developed on human monocytes and macrophages. In this context, we aimed to define the treatment effects of Decitabine on the phenotype and functions of monocytes and macrophages and the possible immunomodulation AZA-treated Myelodysplastic Syndrome (MDS) patients. Initially, monocytes were isolated from healthy subjects ($n = 30$) and treated with $5\mu\text{M}$ Decitabine for 24 hours. After treatment, cells were infected *in vitro* with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) to evaluate the effects on cellular functions important to infection control. Monocytes were also differentiated into macrophages in the presence of the hypomethylating agent to determine the cell polarization profile, through gene expression and surface markers. Treatment with Decitabine induced increased phagocytosis and IL-8 release but impaired the microbicidal activity of monocytes in response to Mtb. In addition, it was observed that the treatment favored the polarization of macrophages to the M2 profile, determined by morphological alterations and increased expression of CD206 and ALOX15. Functionally, these cells showed reduced infection control, despite producing inflammatory mediators in a manner similar to untreated cells. However, when co-cultured with lymphocytes during an *in vitro* granuloma model, Decitabine promotes a reduction in the production of IL- 1β , TNF- α and IFN- γ , with similar production of IL-10, suggesting an immunomodulatory effect that could lead to mechanisms of immune response regulation. Finally, for evaluation of immunomodulation in MDS patients, 17 individuals undergoing supportive treatment and 4 AZA-treated patients were recruited. From peripheral blood samples, plasma was separated for the quantification of immunological mediators and the cell fraction was used for gene expression and monocyte isolation for functional evaluations following Mtb infection. We identified alteration in the quantification of plasma immune mediators, with increased levels of IL-2, IL-4, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α and IL- 1β in AZA-treated patients, to similar levels to the control group, in addition to an increase of IL-8 and IP-10 when compared to healthy individuals. Regarding monocyte function, IL-8 and IL-12 production increased after Mtb infection, but no modulation of phagocytic and microbicidal function was observed in these patients. Thus, the data suggest that hypomethylating agents exert important modulation on the function of monocytes and macrophages, and may influence the response pattern and, thus, constitute a potential therapeutic strategy for the manipulation of the immune system.

Keywords: hypomethylating agentes, macrophages, imune response, Myelodysplastic syndrome

LISTA DE ABREVIATURAS

5-AZA – 5-azacitidina

5AZA-DC- 5-deoxi-azacitidina

AcH4 – acetilação da histona 4

ADCC – Citotoxicidade delular mediada por anticorpos

ALOX15 - Arachidonate 15-Lipoxygenase

ANOVA – análise de variância

APC – célula apresentadora de antígeno

ARA-c - citarabina

ASXL1- ASXL transcriptional regulator 1

ATCC - American Type Culture Collection

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

BCG - bacilo de Calmette-Guérin

CD14 - cluster of differentiation 14

CD16 - cluster of differentiation 16

CD163 - cluster of differentiation 163

CD206 - cluster of differentiation 206

CD209 (DC-SIGN) - cluster of differentiation 209 (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin)

CD4 - cluster of differentiation 4

CD40 - cluster of differentiation 40

CD80 - cluster of differentiation 80

CD86 - cluster of differentiation 86

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CFU – unidades formadoras de colônia

CHK2 - Checkpoint kinase 2

CO2 – dióxido de carbono

CpG – citosina – fosfato- guanina

CSF1 - Colony Stimulating Factor 1

CTLA4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

CXCL10 (IP-10) - C-X-C motif chemokine 10 (interferon-inducible protein 10)

DECI - Decitabina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase

DNMTi – inibidor de DNA metiltransferase

DNTPs - desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EHZ2 - Enhancer of zeste homolog 2 (histone-lysine N-methyltransferase enzyme)

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

EPO - eritropoetina

EROs – espécies reativas de oxigênio

FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FDA – Food and Drug Administration

FOXP3 - forkhead box P3

GM-CSF- Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

H3k27me2 ou 3 – di ou trimetilação da lisina 27 da histona 3

H3K4me3 – trimetilação da lisina 4 da histona 3

H3K9Ac – acetilação da lisina 9 da histona 3

H3k9me2 – dimetilação da lisina 9 da histona 3

H4K20me3 – trimetilação da lisina 20 da histona 4

HAT – histona acetiltransferase

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HC-FRMP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HCV – vírus da hepatite C

HDAC – histona deacetilase

HDACi – inibidor da enzima histona deacetilase

HDM – histona demetilase

HIV – virus da imunodeficiência humana

HLA – antígeno leucocitário humano

HLA-DR - Antígeno leucocitário humano – isotipo DR

HMT – histona metiltransferase

HMTi – inibidor da enzima histona metiltransferase

IFN- γ – interferon-gama

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

IL-13 - Interleucina-13

IL-17 - Interleucina-17

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-2 - Interleucina-2

IL-21 - Interleucina-21

IL-27- Interleucina-27
IL-4 - Interleucina-4
IL-6 - Interleucina-6
IL-8 - Interleucina-8
IP-10 – Proteína-induzida por interferon- γ / C-X-C motif chemokine 10
JMJD3 - Jumonji Domain Containing 3(histone H3K27 demethylase)
KIRs - Killer-cell immunoglobulin-like receptors
LMA – Leucemia mieloide aguda
LMMC – Leucemia mielomonocítica crônica
lncRNA – long non-coding RNA
LPS - lipopolissacarídeo
MCH-II – Complexo maior de histocompatibilidade II
MFI – média de intensidade de fluorescência
MO – Medula óssea
MOI – multiplicidade de infecção
Mtb – Mycobacterium tuberculosis
NaOH – hidróxido de sódio
NK – natural killer cell
NKG2D - Natural Killer Group 2D
NSB3- Nível de segurança biológica 3
OADC - Oleic Albumin Dextrose Catalase
OMS – Organização Mundial da Saúde
oxLDL – lipoproteína de baixa densidade oxidada
p16 - tumor suppressor protein 16
PBMC – células mononucleares de sangue periférico
PBS - phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PCR – reação em cadeia da polimerase
PD-1 - Proteína de morte celular programada 1
PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPAR- γ - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
CCL5 (RANTES) – chemokine ligand 5 (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)
RFU – unidades relativas de fluorescência
RNA – ácido ribonucleico
RPMI – meio de cultura celular (Roswell Park Memorial Institute)
RPS14 - Ribosomal Protein S14

RT – Transcriptase reversa
RUNX3- RUNX family transcription factor 3
SAHA - suberoylanilide hydroxamic acid
SAM - S-adenosilmetionina
sCD163 - CD163 solúvel
SD – Desvio padrão
SFB – soro fetal bovino
SMD – Síndrome Mielodisplásica
SMD-5q - Síndrome mielodisplásica com deleção do braço longo do cromossomo 5
SMD-AZA - Síndrome Mielodisplásica em tratamento com azacitidina
SMD-EB - Síndrome mielodisplásica com excesso de blastos
SMD-DML - Síndrome mielodisplásica com displasia de múltiplas linhagens
SMD-NMP - Síndrome Mielodisplásica/ Neoplasia mieloproliferativa
SMD-AS - Síndrome mielodisplásica com sideroblastos em anel
SMD-DUL - Síndrome mielodisplásica com displasia de única linhagem
SPARC - Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich
T CD8+ - linfócitos T positivos para cluster of differentiation 8
TAM – macrófago associado ao tumor
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido
TE – tampão de eluição
TET - ten eleven translocation enzymes (DNA demetilase)
TGF- β - fator de transformação do crescimento beta
Th1 – linfócitos T helper 1
Th17 - linfócitos T helper 17
Th2 - linfócitos T helper 2
TLR – receptores semelhantes a Toll (“toll-like receptors”)
TNF- α – fator de necrose tumoral - alfa
Treg – célula T reguladora
TRIS – tampão tris-hidroximetilaminometano
U - Uracila
WT1 - Wilms tumor 1 (fator de transcrição – diferenciação célula)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental desenvolvido no estudo	47
Figura 2. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a viabilidade celular.....	64
Figura 3. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a viabilidade de <i>M. tuberculosis</i> . ..	66
Figura 4. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade fagocítica de monócitos infectados <i>in vitro</i> com Mtb	68
Figura 5. Avaliação do efeito do tratamento <i>in vitro</i> com Decitabina em relação à atividade microbicida e produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos	69
Figura 6. Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com Decitabina na produção de citocinas por monócitos em modelo de infecção <i>in vitro</i> por Mtb	72
Figura 7. Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com Decitabina na produção de quimiocinas por monócitos em modelo de infecção <i>in vitro</i> por Mtb	73
Figura 8. Alterações morfológicas em macrófagos diferenciados e polarizados na presença de agente hipometilante Decitabina	75
Figura 9. Efeito do tratamento com Decitabina na expressão dos receptores de superfície, CD206 e CD163, durante a polarização <i>in vitro</i> de macrófagos M1 e M2	77
Figura 10. Efeito do tratamento com Decitabina na expressão gênica dos marcadores CXCL10 e ALOX15 durante a polarização <i>in vitro</i> de macrófagos M1 e M2	78
Figura 11. Modulação exercida pelo tratamento com Decitabina sobre a expressão das citocinas IL-12 e IL-10 durante a polarização de macrófagos	81
Figura 12. Efeito do tratamento com Decitabina em relação à expressão de marcadores de ativação de macrófagos	82
Figura 13. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade microbicida de macrófagos	84
Figura 14. Avaliação da influência do tratamento hipometilante sobre produção de citocinas pelos macrófagos após estimulação com Mtb	85
Figura 15. Expressão das enzimas DNMTs: modulação durante a polarização de macrófagos e avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante	87
Figura 16. Microscopia óptica da formação de estrutura semelhante ao granuloma <i>in vitro</i> após infecção com Mtb H37R	89
Figura 17. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade microbicida em modelo de granuloma <i>in vitro</i>	92

Figura 18. Modulação na produção de mediadores imunológicos após tratamento com agente hipometilante Decitabina durante infecção por Mtb	93
Figura 19. Avaliação do efeito do agente hipometilante sobre a viabilidade celular em modelo de granuloma <i>in vitro</i>	94
Figura 20. Avaliação do efeito do tratamento com azacitidina sobre os parâmetros clínicos em pacientes com SMD	102
Figura 21. Avaliação dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com azacitidina	104
Figura 22. Quantificação de citocinas e quimiocinas: avaliação da modulação exercida pela SMD e o efeito do tratamento com azacitidina	106
Figura 23. Avaliação da modulação do tratamento hipometilante sobre o padrão de expressão gênica	108
Figura 24. Avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante sobre a atividade funcional de monócitos de pacientes SMD: determinação do controle da infecção por Mtb	111
Figura 25. Avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante sobre a atividade funcional de monócitos de pacientes SMD: produção de mediadores imunológicos	112
Figura 26. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a viabilidade celular de monócitos de pacientes SMD	115
Figura 27. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade fagocítica e microbicida de monócitos de pacientes SMD infectados <i>in vitro</i> com Mtb	116
Figura 28. Efeito do tratamento com Decitabina sobre produção de mediadores imunológicos por monócitos de pacientes SMD infectados <i>in vitro</i> com Mtb.....	117
Figura 29. Representação esquemática dos resultados obtidos	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas da SMD	39
Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes do grupo SMD em tratamento de suporte	98
Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes do grupo SMD em tratamento hipometilante...	99
Tabela 4. Perfil dos grupos de estudo.....	100

Sumário

1. Introdução	26
1.1. Epigenética: conceito e importância nas doenças	27
1.2. As modificações epigenéticas na regulação da resposta imune	31
1.3. Modulação farmacológica das alterações epigenéticas e as implicações sobre as células do sistema imune.....	33
1.4. Síndrome Mielodisplásica: características clínicas, imunopatogênese e impacto do tratamento com agentes hipometilantes.....	37
2. Objetivo	44
2.1 Objetivo Geral	45
2.2. Objetivos específicos	45
3. Delineamento Experimental	46
4. Materiais e Métodos	48
4.1. Casuística	49
4.2. Isolamento de monócitos de sangue periférico	50
4.3. Obtenção de Mycoacterium tuberculosis e estimulação <i>in vitro</i> das células	50
4.4. Preparo do composto Decitabina para tratamento <i>in vitro</i> dos monócitos	51
4.5. Avaliação da viabilidade celular e micobacteriana	52
4.6. Determinação da atividade fagocítica	52
4.7. Avaliação da atividade microbicida	53
4.8. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	54
4.9. Caracterização imunofenotípica através de citometria de fluxo	54
4.10. Quantificação de citocinas e quimiocinas	55
4.11. Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	56
4.12. Indução da formação de estruturas semelhantes ao granuloma e avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante	57
4.13. Diferenciação e polarização de macrófagos	58
4.14. Análises estatísticas	59

5. Resultados	60
5.1. O tratamento com agente hipometilante modula a função de monócitos em resposta a estímulo infeccioso.....	63
5.2. Efeito do tratamento hipometilante na diferenciação e polarização de macrófagos derivados de monócitos do sangue periiférico.....	74
5.3. Tratamento com Decitabina modula a resposta imune na infecção por Mtb: modelo de co-cultura e indução de estruturas granuloma- <i>like</i>	88
5.4. Uso de agentes hipometilantes no tratamento da SMD: implicações hematológicas e imunológicas	96
5.5. Avaliação da função de monócitos de pacientes SMD tratados com agente hipometilante em modelo de infecção por Mtb.....	109
5.6. Avaliação do efeito do tratamento <i>in vitro</i> com agente hipometilante Decitabina sobre a função de monócitos de pacientes SMD.....	113
6. Discussão.....	118
7. Considerações finais	130
8. Conclusão	134
9. Referências Bibliográficas	136
10. Anexos	155

1. *INTRODUÇÃO*

1.1. Conceito e importância das alterações epigenéticas nas doenças

As funções celulares dependem de uma precisa regulação dos mecanismos de expressão gênica. Alterações no perfil celular de expressão podem ser moduladas por diversos mecanismos, dentre os quais se encontram as modificações epigenéticas. As alterações no epigenoma são mecanismos importantes para o desenvolvimento do indivíduo, constituindo um mecanismo fisiológico de regulação de diversos processos celulares. Dentre os processos epigeneticamente regulados estão a diferenciação celular – que garante que células com o mesmo genótipo se diferenciem em células especializadas (Reik, 2007; Boland *et al.*, 2014), bem como o “*imprinting*” e a inativação do cromossomo X (Paulsen e Ferguson-Smith, 2001; Portela e Esteller, 2010). Tais mecanismos epigenéticos são fortemente regulados por fatores ambientais, como nutrição, estresse e patógenos, estando por esta razão associados à adaptação do organismo e, conseqüentemente, a diferentes processos patológicos (Bagot e Meaney, 2010; Fernández-Morera *et al.*, 2010; Portela e Esteller, 2010).

Classicamente o termo epigenética refere-se aos mecanismos que controlam a expressão gênica não relacionada à variações na sequência de nucleotídeos no DNA e que determinam os estados de atividade dos genes, ou seja, que resultam em alterações na acessibilidade física ao DNA atuando como ativadores ou silenciadores da expressão gênica (Wu Ct e Morris, 2001; Sharma *et al.*, 2010). As alterações epigenéticas podem ocorrer diretamente no DNA ou em resíduos de aminoácidos na cauda das histonas, proteínas responsáveis pela compactação do DNA na estrutura de nucleossomos. Tais modificações são resultados de mecanismos distintos, dentre os quais a adição ou remoção de grupamentos químicos a cauda de histonas (Bannister e Kouzarides, 2011), metilação direta do DNA (Paulsen e Ferguson-Smith, 2001) ou através da expressão de RNAs não codificantes, como os microRNAs e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (Kaikkonen *et al.*, 2011).

Modificações químicas nas histonas, tais como metilação, acetilação e fosforilação resultam em alterações na acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA, direcionando o enrolamento ou desenrolamento do DNA associado às histonas. Desta forma, tais modificações controlam o estado de ativação gênica, podendo tanto ativar como reprimir a expressão dos genes. Esse estado de ativação ou repressão gerado por tais modificações depende da natureza química e da localização da modificação no core de histonas (Wang *et al.*, 2008; Carson *et al.*, 2011). Por exemplo, a acetilação de resíduos específicos de aminoácidos parece atuar como ativador transcricional, independentemente de sua localização (Eberharther e Becker, 2002), enquanto a metilação pode ser tanto ativadora quanto repressora da expressão gênica,

dependendo do tipo e da localização da modificação (Hublitz *et al.*, 2009). Sabe-se que a acetilação da histona 4 (AcH4) ou a tri-metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) geralmente aumentam o acesso ao DNA para fatores de transcrição (Eberharter e Becker, 2002; Schneider *et al.*, 2004), em contrapartida, a di- ou tri-metilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me2 ou me3) fecham o DNA resultando em silenciamento gênico (Cao e Zhang, 2004).

Por sua vez, a metilação do DNA acontece principalmente na região promotora dos genes através da inserção de um radical metil no carbono 5 da base nitrogenada citosina, levando a formação de 5-metilcitosina. A inserção deste grupamento químico ocorre em regiões ricas em citosina que são adjacentes a guaninas, também denominadas ilhas CpG. Diferentemente da metilação das histonas que pode ativar ou reprimir a transcrição, a inserção deste grupamento diretamente ao DNA resulta majoritariamente no silenciamento gênico, uma vez que são recrutadas proteínas que resultam na compactação do DNA e, desta forma, não permitem que a maquinaria de transcrição se ligue a região promotora do gene, bloqueando, consequentemente, a expressão gênica (Boyce e Bird, 1991; Hendrich e Bird, 1998; Mohn *et al.*, 2008).

Por fim, outra forma de regulação epigenética descrita corresponde aos RNAs não codificantes, como os RNAs de interferências (RNAi), long-non coding RNA (lncRNA) e microRNAs (miRNA), que promovem a regulação da expressão gênica principalmente através de mecanismos pós transcricionais. A ação destes RNAs resulta na degradação do RNA mensageiro ou no bloqueio da maquinaria de tradução celular, impedindo a síntese protéica da célula. Desta forma, assim como a metilação do DNA, tais RNAs não codificantes estão relacionados ao silenciamento gênico. Os microRNAs, por exemplo, podem se ligar ao seu RNA mensageiro alvo e reprimir sua expressão gênica através da inibição da tradução ou pela degradação do RNA, estando associados a diversas funções fisiológicas e patológicas. Além destes mecanismos, os microRNAs podem também promover o silenciamento gênico por possuírem habilidade de inibir a ligação de fatores de transcrição ao DNA, impedindo a expressão de RNAs mensageiros (Sato *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018). De maneira semelhante, os RNAis e lncRNAs também estão relacionados a regulação de expressão gênica, atuando na maquinaria transcricional, promovendo alterações na cromatina, e ainda através de modulação dos mecanismos pós-transcricionais, ocasionado principalmente o silenciamento gênico (Castel e Martienssen, 2013; Bhat *et al.*, 2016)

As alterações descritas são controladas por um conjunto de enzimas que possuem a habilidade de adicionar ou remover estes grupamentos químicos, e assim, de atuarem na regulação do perfil de expressão gênica da célula. As histonas podem ser modificadas por uma

diversa classe de enzimas, dependendo do grupamento químico a ser adicionado ou removido. Desta forma, a enzima histona acetiltransferase (HAT) promove a adição de grupamento acetil aos resíduos de aminoácidos das histonas, enquanto a histona deacetilase (HDAC) promove a remoção do radical químico. Por sua vez, os grupamentos metil podem ser adicionados pelas enzimas histona metiltransferases (HMTs) e removidos pelas histonas demetilases (HDMs), dentre outras enzimas que são responsáveis por outros grupamentos químicos menos descritos (Biel *et al.*, 2005).

A metilação do DNA é controlada por outro grupo de enzimas, que assim como para as histonas podem inserir ou remover o grupamento químico da citosina. A adição do radical metil acontece através da ação de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), que levam a formação da 5-metilcitosina através da transferência do grupamento químico da S-adenilmetionina (SAM) para a base nitrogenada citosina no DNA (Moore *et al.*, 2013). Atualmente são descritas e estudadas três principais DNMTs, dentre as quais a DNMT1, responsável pela manutenção da metilação do DNA, prevenindo demetilações espontâneas e conservando o padrão de metilação durante a replicação celular (Jeltsch, 2006). Já as outras DNMTs – DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela metilação de novo de DNA, estando assim diretamente relacionadas às alterações na expressão gênica, e consequentemente apresentam papel importante na diferenciação e ativação celular (Okano *et al.*, 1999). Assim como para as histonas, o grupamento metil também pode ser removido do DNA por ação de outras classes de enzimas, dentre as quais a proteínas de domínio TET (Rasmussen e Helin, 2016).

Como já mencionado, as alterações epigenéticas estão associadas a diversos processos fisiológicos e patológicos, e sua importância no desenvolvimento e progressão de diversas doenças constitui interesse de grupos de pesquisa, na busca de compreender os mecanismos moleculares envolvidos e determinar biomarcadores que possibilitem auxiliar no diagnóstico, progressão e tratamentos destes processos patológicos. Tais modificações tem sido estudadas no desenvolvimento e progressão tumoral (Baxter *et al.*, 2014; Toh *et al.*, 2017; Nebbioso *et al.*, 2018), bem como em doenças infecciosas (Samanta *et al.*, 2017; Espíndola *et al.*, 2018; Grabiec e Potempa, 2018), neurológicas (Qureshi e Mehler, 2014), autoimunes (Ciechomska *et al.*, 2014), cardiovasculares (Ordovás e Smith, 2010), metabólicas – como no diabetes e obesidade (Rosen *et al.*, 2018), dentre várias outras .

No contexto tumoral, as alterações epigenéticas constituem vasto campo de investigação. Alterações no padrão global de metilação já foram descritas em vários tipos tumorais quando comparados às células saudáveis (Baylin e Herman, 2000). De maneira geral, observa-se uma

hipometilação da maior parte do DNA, principalmente em regiões que normalmente seriam mais metiladas e regiões de sequências repetidas, enquanto as regiões CpG normalmente não metiladas, tornam-se hipermetiladas durante o desenvolvimento tumoral, e consequentemente inativas. Tais regiões compreendem principalmente genes relacionados à maturação e crescimento celular, regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose, angiogênese, metástase e genes supressores tumorais (Flavahan *et al.*, 2017). Tais alterações no epigenoma são alvos de estudo para a detecção de novos marcadores para o diagnóstico e progressão tumoral (Baxter *et al.*, 2014; Hatzimichael *et al.*, 2014). Como exemplo, estudos tem demonstrado a associação da expressão das enzimas responsáveis pela metilação do DNA, como DNMT1 a progressão de certos tipos tumorais (Subramaniam *et al.*, 2014). Aumento na expressão desta enzima já foi descrito como indicativo de pior prognósticos em pacientes com câncer gástrico (Mutze *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2017), e também com piora na sobrevida de pacientes com câncer cervical (Piyathilake *et al.*, 2017). Assim, cada vez mais as alterações epigenéticas tem ganhado espaço e importância no desenvolvimento, progressão e detecção tumoral, sendo importantes alvos de estudo e compreensão.

Além de papel marcante no desenvolvimento de tumores, as alterações nas histonas, na metilação do DNA e expressão de microRNAs também desempenham função importante durante doenças infecciosas e constituem um campo amplamente estudado. Trabalho recente relatou a dinâmica da metilação do DNA após a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), nos quais perfis de metilação de células dendríticas antes e depois da infecção por Mtb mostraram regiões diferencialmente metiladas (DMRs) (Pacis *et al.*, 2015). Outro estudo sugeriu que os macrófagos humanos apresentavam modulação no padrão de metilação do DNA após a infecção pelo Mtb, sendo observadas principalmente alterações significativas nos níveis de metilação dos genes inflamatórios. Com esses achados, os autores concluíram que a assinatura de metilação do DNA poderia ser explorada como uma ferramenta diagnóstica para a tuberculose (Zheng *et al.*, 2016).

Além disso, já foi relatado que os macrófagos de THP-1 infectados com H37Rv Mtb apresentaram mudanças na metilação do DNA global e identificaram 23000 metilados diferencialmente por meio de metilação-Seq com base em proteína MBD. A partir dessas regiões diferencialmente metiladas, cerca de 90% mostraram o ganho de metilação do DNA após a infecção por Mtb, sendo observado enriquecimento significativo em genes relacionados à resposta imune, modificações de cromatina e reparo e repetições de DNA (Sharma *et al.*, 2016). Adicionalmente aos mecanismos de regulação da resposta do próprio hospedeiro, a hipermetilação pode ser resultado da ação do próprio bacilo. Já foi descrito que Rv2966c, uma

proteína secretada pelo Mtb, pode promover a inserção de grupamentos metil ao DNA e, assim, induzir o silenciamento de genes importantes para a resposta imune do hospedeiro (Sharma *et al.*, 2015).

Por fim, trabalho publicado pelo nosso grupo demonstrou a associação entre as alterações epigenéticas e os mecanismos da resposta imune durante a infecção pelo HIV. Espíndola MS e colaboradores mostraram que monócitos de pacientes HIV+ apresentaram atividade fagocítica e microbicida reduzida, bem como desregulação na produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio após estimulação *in vitro* com Mtb. A disfunção imune foi associada a alterações no perfil de expressão de enzimas epigenéticas induzidas pela infecção com HIV, dentre as quais, a expressão da histona acetiltransferase 1 (HAT1). Em pacientes progressores rápidos, determinados pelos altos níveis do biomarcador plasmático sCD163, o aumento da expressão de HAT1 apresentou potencial utilização como marcador na infecção pelo HIV, podendo ser alvo de estratégias terapêuticas com objetivo de reduzir a ativação imune sistêmica observada nestes pacientes (Espíndola *et al.*, 2018).

1.2. As modificações epigenéticas na regulação da resposta imune

Além de estarem diretamente envolvidas com o processo patológico, as alterações epigenéticas estão associadas com a resposta imunológica desenvolvida pelo organismo. O desenvolvimento da resposta é orquestrado por células funcionalmente especializadas, que estão sob influência direta do microambiente, e desta forma, as alterações epigenéticas constituem importante mecanismo de regulação, contribuindo para a plasticidade celular e determinação dos diferentes padrões de resposta. Estímulos intrínsecos como a produção de citocinas e hormônios, bem como fatores ambientais externos, tais como infecções e agentes químicos são capazes de alterar o perfil epigenético, influenciando diretamente a expressão gênica, a diferenciação e a ativação das células do sistema imunológico, e assim, modulando a resposta gerada (Zhang e Cao, 2019).

Neste sentido, as alterações epigenéticas constituem importante mecanismo da regulação da diferenciação e da polarização de monócitos e macrófagos, células alvo deste trabalho. Tais células desempenham funções essenciais para a homeostase tecidual e para o desenvolvimento da resposta imune em diferentes processos patológicos, incluindo infecções, câncer, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas. Uma vez recrutados para o tecido, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, os quais podem assumir perfis de

ativação funcionalmente opostos, fator que influencia diretamente o desfecho da resposta imune (Hoeksema e De Winther, 2016).

Os perfis de macrófagos são obtidos *in vitro* através da estimulação celular com distintas combinações de citocinas, enquanto *in vivo* estão presentes em diferentes condições inflamatórias. Os monócitos podem ser diferenciados *in vitro* em M1 com o uso de GM-CSF associado a IFN- γ e um agonista de TLR (receptores toll-like), como LPS, ou em perfil M2a com M-CSF e IL-4 ou IL-13 (Murray e Wynn, 2011; Murray, 2017). Já foram descritos marcadores que caracterizam o perfil M1, como expressão do gene CXCL10 em humanos, e para M2, com aumento de expressão de ALOX15, bem como de moléculas de superfície celular, dentre as quais CD163 e CD206 (Kittan *et al.*, 2013). Funcionalmente, os macrófagos M1 estão mais associados a perfis pró-inflamatórios de resposta, com secreção de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6, sendo células predominantes em doenças inflamatórias crônicas (Enderlin Vaz Da Silva *et al.*, 2014; De Groot e Pienta, 2018). Por sua vez, macrófagos M2 estão relacionados ao reparo tecidual, doenças alérgicas, bem como na patogênese de tumores, quando recebem a denominação de macrófagos associados aos tumores (TAMs) por favorecerem o crescimento e progressão tumoral. Tais macrófagos secretam principalmente citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (Gordon e Martinez, 2010; Fleming e Mosser, 2011; De Groot e Pienta, 2018).

Durante a diferenciação e polarização dos macrófagos, o microambiente promove alterações transcricionais nestas células que são amplamente reguladas por modificações epigenéticas, tanto as alterações nas histonas quanto a metilação direta do DNA. Já foi demonstrado que macrófagos M1 apresentam aumento da trimetilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4me3) na região promotora da quimiocina CXCL10, marcador do perfil em humanos, em decorrência do aumento da expressão e da atividade da enzima metiltransferase MLL1 (Kittan *et al.*, 2013). Outra enzima já descrita por modular a diferenciação de macrófagos é a histona desacetilase 3 (HDAC3), relacionada com a regulação da polarização para o perfil M1. Quando a enzima é bloqueada ou apresenta redução na expressão, demonstrou-se a inibição da ativação de genes inflamatórios, que consequentemente bloqueiam a polarização M1, favorecendo o perfil M2 de resposta (Mullican *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Os genes marcadores do perfil M2, por sua vez, são regulados epigeneticamente pela demetilação em H3K4 e H3K27 através da atuação da enzima demetilase JMJD3, a qual demonstrou atuar inibindo a adição de modificações repressoras, H3K27me2 e H3K27me3, favorecendo a expressão de IRF4 e consequentemente, a expressão de genes relacionados aos macrófagos M2 (Ishii *et al.*, 2009; Satoh *et al.*, 2010).

A metilação direta do DNA também já foi descrita como alteração importante na diferenciação e polarização de macrófagos. Estudos já demonstraram que quando monócitos se encontram na presença de fatores estimuladores de colônia (CSF1), que promovem a diferenciação destas células em macrófagos, mais de 100 regiões gênicas são rapidamente demetiladas por ação das enzimas TET2, levando a alterações na estrutura da cromatina e a ocorrência de modificações nas histonas ativadoras da transcrição. Tais regiões estão relacionadas a genes envolvidos na atividade fagocítica, resposta imune, bem como a genes do citoesqueleto, relacionados à morfologia celular. Ademais, mostraram que a inibição da enzima TET2, durante a diferenciação, promove a perda da aderência celular e altera a morfologia, resultando em células mais arredondas (Wallner *et al.*, 2016).

Além de estar envolvida na diferenciação de monócitos, a metilação do DNA está relacionada à polarização destas células em macrófagos M1 e M2. Dentre as enzimas responsáveis pela inserção do grupamento metil ao DNA, DNMT3B já teve seu papel demonstrado na modulação da indução de perfil M1. Estudo realizado com camundongos obesos demonstrou aumento da expressão desta enzima em macrófagos do perfil M1 e redução da mesma em macrófagos polarizados para o perfil M2, sugerindo função de DNMT3B na polarização destas células. Adicionalmente, mostraram que a inibição da expressão de DNMT3B em macrófagos de linhagem RAW264.7, bem como em macrófagos murinos derivados de medula óssea, promoveu a inibição do perfil M1 em detrimento a indução de macrófagos M2 e redução da produção de TNF- α por estas células. A atuação desta enzima na polarização de células para o perfil M1 pode ser explicada pelo aumento da metilação da região promotora de PPAR- γ , fator de transcrição importante para a polarização de macrófagos M2 (Yang, X. *et al.*, 2014). Assim, os vários estudos aqui mencionados comprovam a importância das modificações epigenéticas na regulação e modulação da resposta imune, sendo primordial para a plasticidade celular e, desta forma, para o desfecho dos processos patológicos relacionados.

1.3. Modulação farmacológica das alterações epigenéticas e as implicações sobre as células do sistema imune

As alterações epigenéticas, como discutido até aqui, apresentam papel central no desenvolvimento de várias doenças, como no desenvolvimento tumoral, bem como na regulação dos mecanismos da resposta imune inata e adaptativa. Tais modificações são consideradas potencialmente herdáveis e reversíveis, sendo esta última característica essencial

para que as mesmas se tornassem alvo de estudo para o desenvolvimento de novas terapias. Neste sentido, estratégias terapêuticas foram pensadas para controlar as mudanças epigenéticas, conhecidas como “*epidrugs*”. Em geral, os compostos moduladores das modificações epigenéticas são direcionados, em sua maior parte, às enzimas responsáveis pela inserção ou remoção dos grupamentos químicos ao DNA ou à cauda de histona. Dentre os fármacos encontram-se os inibidores de histonas acetiltransferases (HDACi), de DNA metiltransferases (DNMTi), inibidores de histona metiltransferases (HMTi) e diversos outros compostos que inibem a ocorrência das alterações (Rodríguez-Paredes e Esteller, 2011; Ivanov *et al.*, 2014).

A terapia baseada em epigenética constitui um campo inovador, que possibilita a edição reversível do epigenoma, e desta maneira, uma abordagem que busca modular a função celular. A modulação epigenética constitui, então, uma estratégia que pode ser direcionada a fim de solucionar desordens inflamatórias, reduzir susceptibilidade às infecções, bem como controlar crescimento tumoral, seja por agir diretamente sobre as células em proliferação, ou através da manipulação da resposta imunológica, sendo desta maneira amplamente estudada nos mais diversos processos patológicos.

A utilização destes compostos moduladores das alterações epigenéticas já foi demonstrada em modelos de doenças infecciosas, como na hepatite C e HIV. Na infecção pelo HIV, mecanismos epigenéticos, principalmente aqueles relacionados às modificações nas histonas estão associados à latência viral. A quebra desta latência representa um importante passo no tratamento como forma de eliminar reservatórios virais. Neste sentido a administração de inibidores de HDAC, como Vorinostat (SAHA) constituem a primeira etapa da estratégia denominada “*Shock and Kill*”. Uma vez interrompida a latência, respostas imunes citotóxicas e a administração de anitretrovirais podem eliminar de maneira mais eficaz os vírus em replicação (Deeks, 2012; Cole *et al.*, 2016). O uso de inibidores epigenéticos também teve eficácia demonstrada em modelos de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV). A administração de inibidores de DNMT (DNMTi) *in vitro* em células hepáticas mostraram inibir a infecção, bem como a replicação viral e a expressão de proteínas, constituindo um promissor agente terapêutico (Chen *et al.*, 2013).

Dentre as “*epidrugs*” descritas, o presente trabalho tem por objetivo a avaliação daquelas relacionadas à metilação direta do DNA, as quais são representadas principalmente por dois fármacos importantes com efeito inibidor sobre as enzimas DNMTs: Azacitidina (5-azacitidina) e Decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina). Os agentes hipometilantes pertencem ao grupo de compostos análogos do nucleosídeo citosina, com alterações estruturais, com a substituição do cabono 5 do anel de pirimidina por um nitrogênio (Momparker, 2005). Tal

alteração confere aos compostos a habilidade de estabelecer ligações covalentes irreversíveis com a enzima DNMT, levando a degradação da mesma, e desta forma, inibindo a metilação do DNA (Creusot *et al.*, 1982; Jüttermann *et al.*, 1994). Uma vez administrados, os análogos de citosina são rapidamente interiorizados pelas células através de transportadores específicos de nucleosídeos (Wiley *et al.*, 1982) e são, então, fosforilados e convertidos em 5-azacitina trifosfato (5AZA-dCTP) que corresponde à droga metabolicamente ativa e importante substrato para ação da DNA polimerase, levando à incorporação do análogo durante a síntese de DNA (Bouchard e Momparler, 1983; Christman, 2002) e mecanismos de reparo (Pali SS *et al.*, 2008).

Os mecanismos de ação dos inibidores de DNMT ainda não estão claros, embora existam hipóteses de que os agentes causem hipometilação e reexpressão de genes supressores tumorais e assim atuem como importantes agentes antineoplásicos. Além disto, existe a possibilidade de tais fármacos atuarem de maneira independente de metilação, por meio da indução de vias de resposta a dano celular ou de toxicidade associada à incorporação dos mesmos diretamente ao DNA (Szyf, 2009). Apesar de ainda não serem totalmente esclarecidos os mecanismos de ação, os agentes hipometilantes já representam importante forma de tratamento para pacientes com algumas neoplasias hematológicas, como a síndrome mielodisplásica (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), com aprovação dos órgãos regulamentadores, como FDA, apresentando vantagens clínicas para os pacientes, com aumento de sobrevida em relação às outras formas de terapia utilizadas (Kantarjian *et al.*, 2006; Fenaux *et al.*, 2009; Fenaux, Mufti, *et al.*, 2010; Hourigan e Karp, 2010).

Entretanto, apesar de atuarem sobre as células alteradas, como observado nos tratamentos antitumorais, os agentes hipometilantes também podem atuar em células do sistema imunológico, cujas funções e expansão são finamente reguladas por mecanismos epigenéticos. Desta forma, a administração dos moduladores epigenéticos pode influenciar diretamente o funcionamento destas células, e consequentemente, direcionar o padrão de resposta gerada nos diversos processos patológicos. Neste sentido, a atuação dos agentes hipometilantes sobre a função de células do sistema imune já foi demonstrada em células NK, células dendríticas e células T, além de atuarem em pontos de regulação da resposta imune, como a expressão de PD-1, CTLA-4 e outras moléculas importantes na modulação da resposta (Lindblad *et al.*, 2017).

Os efeitos destes compostos sobre as células NK foram avaliados por vários grupos de pesquisa, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* e demonstraram diferentes resultados quanto à modulação exercida. O tratamento de células NK com azacitidina *in vitro* acarreta uma redução

na atividade citotóxica destas células contra célula alvo K562, atribuindo-se o efeito observado à ação do agente hipometilante sobre o aumento da expressão de receptores inibidores (KIRs) e redução da produção de granzimas e perforinas (Gao *et al.*, 2009). De maneira semelhante, Sohberg e colaboradores observaram o aumento da expressão de KIRs em células NK tratadas *in vitro* com azacitidina, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com Síndrome Mielodisplásica. Entretanto, neste mesmo estudo, o tratamento induziu um aumento na citotoxicidade mediada pelas células NK, com aumento da produção de IFN- γ (Sohlberg *et al.*, 2015).

Adicionalmente, Schmiedel *et al* demonstraram que a administração de azacitidina e Decitabina na concentração de 5 μ M desencadeiam respostas celulares distintas. Enquanto o tratamento com Decitabina aumenta a atividade citotóxica de NKs, a administração de azacitidina inibe a produção de IFN- γ e a citotoxicidade destas células (Schmiedel *et al.*, 2011). Em adição, ensaio clínico demonstrou que pacientes em tratamento com Decitabina apresentaram aumento da atividade citotóxica mediadas por anticorpos (ADCC), bem como aumento da expressão de NKG2D após 28 dias de tratamento quando comparados às amostras controle coletadas pré-quimioterapia (Vasu *et al.*, 2016).

Em relação às células dendríticas, já é bem descrito que as alterações epigenéticas, principalmente a metilação do DNA, estão relacionadas ao desenvolvimento e maturação destas células, com redução de regiões metiladas e diminuição da expressão das enzimas DNA metiltransferases (Zhang *et al.*, 2014). Neste sentido, apesar de ainda pouco estudado, o tratamento com agentes hipometilantes pode exercer modulação importante no fenótipo e na função destas células, e consequentemente, no desenvolvimento de padrões de respostas de células T. Dentre os poucos trabalhos, Frikeche e colaboradores determinaram que a administração de azacitidina durante a diferenciação de células dendríticas derivadas de PBMC de indivíduos saudáveis induziu aumento na expressão de CD40 e CD86 após maturação celular com estímulo de LPS. Adicionalmente, as células dendríticas tratadas com o agente hipometilante produziram quantidades inferiores de IL-27 e IL-10 quando comparadas aos controles não tratados. Por fim, em avaliação *in vivo* conduzida pelo mesmo grupo, demonstrou-se que o tratamento com azacitidina alterou a polarização de células T CD4+, reduzindo a população de células produtoras de IL-4 e aumentando a população produtora de IL-17 e IL-21. Assim, apesar de ainda escassos, os dados obtidos permitiram sugerir o efeito do tratamento sobre a população de células dendríticas, alterando a expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas, e consequentemente, a perfil de resposta de células T (Frikeche *et al.*, 2011).

Em adição, o tratamento com agentes hipometilantes apresentou efeitos sobre a expressão de moléculas supressoras da atividade de células T, como PD-1 e CTLA-4 (Yang, H. *et al.*, 2014; Ørskov *et al.*, 2015). Pacientes com doenças hematológicas, como síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda, em tratamento com azacitidina demonstraram aumento na expressão gênica e de moléculas de PD-1 na superfície de células T CD8+, decorrentes de hipometilação do promotor deste gene observada após o tratamento. Tais achados podem contribuir para a exaustão na resposta de células T e, consequentemente, a piores respostas clínicas (Ørskov *et al.*, 2015). O aumento da expressão de PD-1, bem como a imunorregulação exercida por estes compostos, vem sendo explorada atualmente em novas estratégias de tratamento que propõe a combinação de inibidores epigenéticos e imunoterapia (Masarova *et al.*, 2018; Yalniz *et al.*, 2018; Daver *et al.*, 2019).

Finalmente, os compostos epigenéticos também foram reportados por atuarem aumentando a imunogenicidade de células tumorais, aumentando, por exemplo, a expressão de moléculas co-estimuladoras, suprimidas em células tumorais (Héninger *et al.*, 2015). Esta alteração na expressão de moléculas CD80 foi observada por Wang LX e colaboradores, que demonstraram que o tratamento com Decitabina aumentou a expressão de CD80 em células tumorais em modelo animal de linfoma, acarretando em aumento de atividade citotóxica e produção de IFN- γ por células T CD8+ (Wang *et al.*, 2013). A mesma regulação positiva foi observada em modelo de câncer colorretal, com aumento da expressão gênica e expressão proteica após o tratamento com o agente hipometilante (Scarpa *et al.*, 2016). Adicionalmente, o tratamento já mostrou aumentar a expressão de antígenos associados aos tumores, como observado por Li H *et al.* (2014), em que baixas doses de azacitidina aumentaram a expressão diversos antígenos tumorais em linhagens de câncer de mama, colorretal e de ovário, possibilitando maior reconhecimento pelo sistema imunológico (Li *et al.*, 2014).

1.4. Síndrome mielodisplásica: características clínicas, imunopatogênese e impacto do tratamento com agentes hipometilantes

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo heterogêneo de doenças clonais de precursores hematopoiéticos, com ampla variação de manifestações clínicas. Em geral, a SMD é caracterizada por falhas na produção de células sanguíneas maduras pela medula óssea, displasia celular e potencial para evolução clonal (Tefferi e Vardiman, 2009; Arber *et al.*, 2016). Tais alterações resultam em hiperplasia medular e variados graus de citopenias no sangue periférico, que podem ser de uma ou mais linhagens mieloides, além de

estarem associados à evolução para leucemia mieloide aguda (LMA) secundária a SMD, que ocorre em cerca de um terço dos casos (Vardiman *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2012). Estima-se que a incidência anual da doença seja de 3 a 4 casos a cada 100.000 indivíduos na população norte americana, sendo a prevalência aumentada com o aumento da idade, atingindo de 7 a 35 em 100.000 dentro do grupo com faixa etária acima de 60 anos (Goldberg *et al.*, 2010). A doença afeta principalmente homens e pode se manifestar de maneira primária, relacionada às anomalias genéticas ou, em menor número de casos, secundária à exposição a quimioterápicos ou radiação ionizante (Nimer, 2008).

Os pacientes diagnosticados podem apresentar diferentes manifestações clínicas, as quais apresentam nomenclatura estabelecida pela OMS, baseada no número de linhagens celulares afetadas, no percentual de blastos na medula óssea e presença de alterações citogenéticas recorrentes. Assim, de acordo com esta classificação a SMD pode ser dividida nos seguintes subtipos: SMD com displasia de única linhagem (SMD-UL), SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA), que pode ser unilinhagem ou multilinhagem, SMD com displasia de múltiplas linhagens (SMD-ML), SMD com excesso de blastos (SMD-EB), síndrome com deleção do braço longo do cromossomo 5 (SMD-5q) ou SMD não classificável. Além da classificação descrita, algumas neoplasias mieloproliferativas apresentam características que sobrepõe os sinais clínicos presentes na síndrome mielodisplásica, sendo as mesmas classificadas como síndrome mielodisplásica/neoplasias mieloproliferativas (SMD/NMP), que incluem a leucemia mielomonocítica crônica, leucemia mieloide crônica atípica, leucemia mielomonocítica juvenil, SMD/NMP com sideroblastos e trombocitose e SMD/NMP inclassificável (Vardiman *et al.*, 2009; Arber *et al.*, 2016). As características que determinam cada classificação estão resumidas na tabela abaixo (Tabela 1).

Além desta nomenclatura definida pela OMS, os pacientes também são classificados quanto ao risco de progressão da doença através do *International Prognostic Scoring-System (IPSS-R)*. Neste sistema de classificação os pacientes são avaliados quanto às alterações citogenéticas, porcentagem de blastos na medula óssea, valores de hemoglobina, número absoluto de plaquetas e neutrófilos. Baseados nestes parâmetros, o sistema de classificação confere uma pontuação aos pacientes, que varia de $\leq 1,5$ a >6 e é traduzida em risco muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto, sendo os pacientes de alto risco aqueles com maior probabilidade de progredir para LMA (Greenberg *et al.*, 2012).

Tabela 1. Classificação da SMD baseada na classificação de OMS-2016

Classificação	Sangue periférico	Medula óssea
SMD-DUL	Citopenia de única linhagem	Displasia de única linhagem; blastos <5%
SMD-DML	Citopenias	Displasia de mais de uma linhagem; blastos <5%
SMD-SA	Anemia	Presença de sideroblastos em anel
SMD-EB	Citopenias	Displasia de uma ou mais linhagens, blastos 5-19%
SMD-5q	Anemia, plaquetose	blastos <5%

SMD-EB: síndrome mielodisplásica com excesso de blastos; SMD-DML: síndrome mielodisplásica com displasia de múltiplas linhagens; SMD-DUL: síndrome mielodisplásica com displasia de única linhagem; SMD-SA: síndrome mielodisplásica com sideroblastos em anel, SMD-5q: síndrome mielodisplásica com deleção do braço longo do cromossomo 5

Apesar de pouco compreendido, o desenvolvimento da SMD envolve mecanismos que constituem alterações genéticas, epigenéticas e alterações no microambiente da medula óssea (Visconte *et al.*, 2014). As anormalidades citogenéticas constituem importantes alterações, principalmente quando compreendem regiões que contenham genes essenciais para o desenvolvimento da SMD, tais como genes supressores tumorais. Estima-se que 40 a 60% dos casos de SMD primária apresentem alterações citogenéticas, as quais são determinantes de prognóstico clínico da doença. Dentre as alterações citogenéticas, destaca-se a deleção do braço longo o cromossomo 5 – del(5q), que caracteriza um subtipo específico de SMD (Bacher *et al.*, 2009; Estephan e Tiu, 2014). Tal deleção afeta a expressão de genes importantes para a patogênese da SMD, como RPS14 e SPARC, que estão associados com falhas na maturação de eritrócitos e expressão de gene supressor tumoral, respectivamente (Sage *et al.*, 2003; Boultonwood *et al.*, 2010).

Além de alterações cromossômicas, mutações pontuais também foram identificadas e estão relacionadas à doença. Mutações no gene de TET2, cuja proteína é associada à demetilação do DNA, foi descrita em mais de 20% dos pacientes (Jankowska *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2017), assim como mutações em *ASXL1* e *EHZ2*, genes associados às modificações de histonas (Makishima *et al.*, 2010; Bejar *et al.*, 2011; Abdel-Wahab *et al.*, 2013; Shivarov *et al.*, 2015). Tais mutações indicam que a desregulação epigenética também apresenta importante envolvimento na patogênese e progressão da doença. Reafirmando a

relação da modulação epigenética e as neoplasias mieloides, mutações nas enzimas DNA metiltransferases também foram observadas em estudos que demonstraram que de 4,1 a 22,1 % dos pacientes com SMD apresentam mutação de enzima DNMT3A, estando associada a piores prognósticos da doença, com maior dependência transfusional (Ley *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018)

Assim como as mutações nas enzimas responsáveis pela metilação do DNA, alterações epigenéticas também foram associadas a regulação da expressão de genes importantes na patogênese da doença. Estudo publicado por Hopfer e colaboradores demonstrou evidências de que genes envolvidos no controle do ciclo celular (*p16*, *CHK2*), apoptose (*survivin*) e diferenciação (*WT1*) apresentaram região promotora hipermetilada em pacientes com SMD e estavam diretamente associados à classificação de risco da doença (Hopfer *et al.*, 2007). Em adição, outro grupo observou, através de análises de biópsias de medula óssea de pacientes, aumento significativo na expressão de DNMTs, principalmente DNMT1 e DNMT3A, reforçando a participação desta alteração na SMD (Länger *et al.*, 2005)

O microambiente da medula óssea também desempenha função essencial para o desenvolvimento da SMD, uma vez que a composição e produção de fatores de crescimento e citocinas regulam a produção e maturação de células hematopoiéticas (Aggarwal *et al.*, 2011; Visconte *et al.*, 2014). Podemos destacar a deficiência de fatores de crescimento, produção de citocinas inibidoras, como a secreção de TGF- β (Bhagat *et al.*, 2013), bem como a produção de sinais de morte celular, como TNF- α (Zang *et al.*, 2001). Neste sentido, a desregulação do sistema imunológico atua no microambiente medular, e por esta razão, são importantes fatores na patogênese da mielodisplasia, assim como para a progressão para casos mais avançados da doença (Aggarwal *et al.*, 2011).

Aumento nos níveis de citocinas pró-apoptóticas, disfunção de células B (Pellagatti *et al.*, 2010), redução no número de células T reguladoras (Kordasti *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009; Mailloux *et al.*, 2012) e aumento de células Th17 (Kordasti *et al.*, 2009) são alterações observadas no início do processo patológico, enquanto quadros mais graves são caracterizados por evasão dos mecanismos do sistema imune, com alterações populacionais e disfunção de células NK quando comparados aos indivíduos saudáveis (Epling-Burnette *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018) e aumento de células T reguladoras (Kordasti *et al.*, 2007).

Além das células descritas, os macrófagos são importantes constituintes do microambiente medular, tendo frequência aumentada em pacientes com SMD. O aumento no número de macrófagos na medula óssea está diretamente relacionado ao aumento da secreção de citocinas pró-apoptóticas, dentre as quais TNF- α e IFN- γ , explicando o aumento de apoptose

observada no microambiente medular destes pacientes (Kitagawa *et al.*, 1993; Sadahira *et al.*, 1999; Aggarwal *et al.*, 2011). Ademias, trabalhos recentes associaram os diferentes perfis de macrófagos na medula óssea com a progressão da doença, demonstrando que pacientes com alto risco apresentam maior infiltrado de macrófagos M2, apresentando correlação negativa com a taxa de sobrevida destes pacientes (Yang Y e Y, 2018)

Visto a diversidade de manifestações clínicas, o diagnóstico da SMD é complexo e exige a exclusão de diversos fatores que possam alterar a produção de células sanguíneas. De maneira geral, o diagnóstico baseia-se na avaliação do sangue periférico para identificação de citopenias presentes, bem como na avaliação da medula óssea através de mielograma e estudo histopatológico. Adicionalmente, a avaliação do cariótipo também é utilizada para determinação das alterações citogenéticas e assim, juntamente com os outros parâmetros, possibilitar a estratificação de risco do paciente. A completa avaliação do paciente é importante para determinação da conduta terapêutica, que considera o risco biológico da doença, a idade e as condições clínicas do paciente (Montalban-Bravo e Garcia-Manero, 2018).

Desta maneira, o tratamento de pacientes com baixo risco compreende cuidados de suporte aos sinais clínicos e comorbidade apresentadas, através de transfusões de sangue para casos com anemia e plaquetopenia severa, antibióticos para pacientes com suspeita de infecções decorrentes da neutropenia e administração de fatores de crescimento hematopoiéticos, como a eritropoetina (EPO). Para os pacientes com alto risco de progressão, são utilizadas estratégias terapêuticas semelhante aos pacientes com LMA, com utilização de quimioterapia com citarabina e/ou antracíclicos e imunossupressores. Adicionalmente, visto a participação de alterações epigenéticas na patogênese da SMD, agentes hipometilantes vem ganhando espaço no tratamento destes pacientes, demonstrando vantagens principalmente para os pacientes de alto risco, correspondendo, atualmente, ao tratamento de primeira escolha (Montalban-Bravo e Garcia-Manero, 2018; Steensma, 2018).

Neste sentido, o tratamento com agentes hipometilantes apresentou vantagens evidentes para os pacientes com SMD, principalmente quanto às taxas de sobrevida. A utilização de azacitidina (AZA) foi avaliada em ensaio clínico controlado com 117 pacientes de baixo e alto risco. Neste estudo observou-se uma resposta de 60% no grupo que recebeu o agente hipometilante (7% com resposta completa) comparado com 5% de resposta no grupo controle, que recebeu tratamento de suporte. Adicionalmente, demonstrou-se que o composto epigenético prolongou a sobrevida livre de evolução para LMA e sobrevida global, sendo o tempo médio para pacientes tratados com AZA de 21 meses, enquanto para o grupo controle de apenas 13 meses de sobrevida global ou livre de evolução para LMA. (Silverman *et al.*, 2002).

Assim como AZA, o outro agente hipometilante aprovado, Decitabina, também demonstrou importante melhora para os pacientes com SMD. Estudo clínico de fase II, que incluiu 66 pacientes com a doença tratados com baixas doses de Decitabina ($45 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$) por período de 3 dias, mostrou taxa de sobrevida global de 49%, e resposta completa, com desaparecimento de sintomas em resposta ao tratamento de 20% dos pacientes (Wijermans *et al.*, 2000). Em adição, em teste clínico de fase III com pacientes com SMD, classificados em grau de risco intermediário 2 e alto, o tratamento com Decitabina mostrou taxa global de sobrevida de 19% enquanto o grupo que recebeu tratamento de suporte convencional não obteve boa resposta. Além da melhora no tempo de sobrevida, foi observado aumento significativo na média de tempo de evolução para leucemia mielóide aguda ou óbito, que aumentou de 7,8 para 12,1 meses nos pacientes tratados com Decitabina (Kantarjian *et al.*, 2006).

Assim, visto o crescente interesse na utilização dos moduladores epigenéticos no tratamento de várias doenças, bem como a aprovação dos agentes hipometilantes para o tratamento de neoplasias mieloides, dentre as quais a SMD, torna-se fundamental o entendimento do efeito destes compostos sobre a regulação da resposta imune. Os mecanismos da resposta imune são essenciais para contenção de tumores, bem como para o controle de infecções, que constituem juntamente com a progressão para a LMA e quadros de hemorragia, as principais causas de morte nos pacientes com SMD (Montoro *et al.*, 2011; Nachtkamp *et al.*, 2016). As infecções são consideradas causas de mortalidade e morbidade em pacientes com Síndrome Mielodisplásica, e são atribuídas preferencialmente a prejuízo na quantidade e atividade dos neutrófilos (Cunningham *et al.*, 1995). Em estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos, 273 pacientes diagnosticados SMD foram acompanhados por período de 1998 a 2004, nos quais as infecções corresponderam a principal causa de morte - 38%, seguidas por progressão para leucemia mielóide aguda e hemorragias, com 15% e 13%, respectivamente (Dayyani *et al.*, 2010).

Porém pouco se sabe sobre o efeito do tratamento com os agentes hipometilantes no desenvolvimento das infecções nos pacientes com doenças hematológicas, ainda que os mesmos atuem de maneira importante sobre as células do sistema imunológico. Alguns trabalhos demonstraram que o tratamento com Azacitidina reduziu as taxas de infecção nos pacientes quando comparados ao suporte convencional ou ao tratamento com baixas doses de citarabina (Fenaux *et al.*, 2009; Fenaux, Gattermann, *et al.*, 2010). Em contrapartida, trabalho recentemente publicado sugere aumento de infecções nestes pacientes (Shargian-Alon *et al.*, 2018).

Desta maneira, os diversos trabalhos expostos demonstram o importante papel que os agentes epigenéticos exercem sobre a frequência, polarização e função das células do sistema imune. Esta capacidade de imunomodulação associada ao crescente interesse em utilizar estes compostos no tratamento dos mais diversos processos patológicos, dentre os quais os pacientes com SMD, exige uma maior compreensão dos desfechos do tratamento, principalmente do ponto de vista imunológico. Este entendimento se faz necessário, pois, além da importância na própria resposta antitumoral, o tratamento pode influenciar a resposta contra agentes infecciosos e processos inflamatórios, que constituem importantes comorbidades dos pacientes oncológicos. Assim, o presente trabalho buscou correlacionar os pontos aqui discutidos para elucidar os efeitos do tratamento com os agentes hipometilantes sobre os mecanismos da resposta imune, especialmente sobre a função de monócitos e macrófagos.

2. *OBJETIVO*

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a modulação na função e no fenótipo de monócitos e macrófagos cultivados *in vitro* na presença do agente hipometilante Decitabina em resposta à infecção por Mtb, bem como, determinar o efeito do tratamento com os agentes hipoemtilantes sobre as alterações imunológicas em pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliação do tratamento com Decitabina sobre a função de monócitos em modelo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* – fagocitose, atividade microbicida, produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio;

2.2.2. Determinação do impacto do tratamento na diferenciação e polarização de macrófagos derivados de monócitos – avaliação de marcadores M1 e M2, controle de infecção e produção de citocinas;

2.2.3. Avaliação do efeito do tratamento em estruturas semelhantes ao granuloma – avaliação de citocinas e capacidade de controle de infecção *in vitro*;

2.2.4. Avaliação das alterações hematológicas e imunológicas em pacientes tratados com agentes hipometilantes – quantificação de citocinas plasmáticas, parâmetros clínicos, e expressão de genes relacionados à resposta imune em pacientes não tratados ou em tratamentos com azacitidina, bem como a modulação na função de monócitos em modelo de infecção.

3. *DELINEAMENTO EXPERIMENTAL*

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental desenvolvido no estudo.

O trabalho foi delineado em duas etapas, sendo a primeira etapa correspondente à avaliação da modulação do agente hipometilante Decitabina na função e diferenciação de monócitos em modelo de infecção *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*. Para esta etapa foram recrutados indivíduos saudáveis, dos quais foram isolados monócitos para as avaliações de função fagocítica, microbicida, produção de citocinas, polarização de macrófagos em perfil M1 e M2 e formação de estruturas semelhantes ao granuloma após tratamento *in vitro* com Decitabina. A segunda etapa consistiu na determinação do efeito do tratamento sobre a resposta imunológica em pacientes com SMD, sendo os mesmos divididos em dois grupos: SMD (não tratados/tratamento suporte) e SMD-AZA (tratados com azacitidina). Após coleta de sangue periférico, o plasma foi coletado para quantificação de citocinas e as células soladas por gradiente de densidade. As células foram utilizadas para ensaios funcionais em monócitos e análise de expressão de genes relacionados à resposta imune. Dados clínicos, como contagem de leucócitos, plaquetas e hemoglobina foram coletados para análises de correlação com os achados imunológicos, bem como estratificação de risco dos pacientes.

4. *MATERIAIS E MÉTODOS*

4.1. Casuística

Foram recrutados 30 indivíduos saudáveis para realização da primeira etapa do projeto, que consistiu na avaliação do efeito do tratamento *in vitro* sobre a função de monócitos e macrófagos, avaliando a capacidade destas células em responder a estímulos infecciosos. Também foram convidados a participar deste estudo, compreendendo as análises realizadas na segunda etapa, 20 pacientes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica (SMD), doença para a qual os fármacos epigenéticos em estudo apresentam aprovação e utilização clínica comprovada. Os pacientes foram divididos em dois grupos de análise com base na realização ou não de tratamento com os agentes hipometilantes.

Nos experimentos referentes ao Capítulo 1, foram selecionadas amostras de sangue de indivíduos previamente saudáveis (n=30), sem histórico de doenças crônicas, de ambos os gêneros e com idade superior a 18 anos, recrutados na própria comunidade USP. Esta etapa do projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, com Protocolo CEP/FCFRP nº 421 – CAAE nº 59466716.1.0000.5403 (Anexo I).

Para os ensaios referentes ao Capítulo 2, a seleção e contato com os pacientes, coleta de amostras de sangue e acompanhamento clínico foram realizados em colaboração com o serviço de Hematologia – ambulatório de Leucemias Agudas, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP), através do apoio da Profa. Dra. Fabíola Traina – com seleção dos pacientes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica não tratados com agentes hipometilantes (n=16) e que recebiam no momento da coleta apenas tratamento de suporte aos sinais e sintomas clínicos. Os pacientes em tratamento com Azacitidina (Vidaza – 75mg/m²/dia) – (n=4) foram recrutados em colaboração com o serviço de Hematologia do Hospital Dia, no Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina USP (HC-FMUSP), campus São Paulo, com auxílio da Profa. Dra. Elvira D. Rodrigues Pereira Velloso e sua equipe.

Para as avaliações dos parâmetros hematológicos e produção de citocinas e outros mediadores no plasma destes pacientes, utilizou-se amostras de plasmas de indivíduos previamente saudáveis, com idade semelhante aos pacientes SMD incluídos no estudo, provenientes do “Biorrepositório do Laboratório de Hematologia da FCFRP”, coordenado pela Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro (Biorrepositório FCFRP nº 003) (Anexo III). Tal estratégia foi utilizada a fim de evitarmos novas coletas de sangue de indivíduos com idade já avançada, que na maioria das vezes apresentam difícil acesso ou comorbidades que poderiam causar vieses nas análises realizadas. Esta segunda etapa também obteve aprovação pelo Comitê de

Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, com Protocolo CEP/FCFRP nº 428 – CAAE nº 62375516.9.0000.5403 (Anexo II).

Vale ressaltar que as avaliações funcionais realizadas com os monócitos dos pacientes SMD em tratamento ou não com agente hipometilante não puderam ser realizadas com todos os indivíduos incluídos no estudo, em razão do baixo rendimento celular após separação por gradiente de densidade e beads magnéticas. Assim, o número de pacientes incluído em cada um dos experimentos realizados foi descrito na legenda de cada figura.

Todos os participantes foram convidados a participar voluntariamente do estudo, registrando a sua autorização através de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) após breve esclarecimento dos objetivos, metodologias empregadas no estudo e eventuais dúvidas (Anexos IV e V). Após a devida autorização, as amostras de sangue (20 a 30 mL) foram coletadas através de punção venosa em tubo contendo o anticoagulante Heparina (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), identificadas e posteriormente processadas.

4.2. Isolamento de monócitos de sangue periférico

Após coleta das amostras de sangue periférico, o plasma foi separado através de centrifugação a 400 xg por 10 minutos à temperatura ambiente e estocado à temperatura de -20 °C até o momento da dosagem de citocinas e mediadores plasmáticos.

Para a obtenção dos monócitos, após remoção do plasma, a porção de células sanguíneas foi diluída em tampão fosfato (PBS) (1:2), pH 7,4 e aplicadas cuidadosamente sobre gradiente de Ficoll-PaqueTM PLUS, com densidade de 1,078 g/mL (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia). Em seguida, foram centrifugadas a 600 xg por 30 minutos à temperatura ambiente para separação da camada de células mononucleares. As células mononucleares de sangue periférico presentes na interfase do gradiente de separação foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo e lavadas duas vezes em tampão PBS para obtenção do precipitado celular.

As células mononucleares isoladas na etapa anterior foram purificadas por seleção imunomagnética positiva com kit específico (MiltenyBiotec, Auburn, CA, EUA). Através desta ferramenta, as células da fração mononuclear foram adicionadas à *beads* magnéticas complexadas a anticorpos monoclonais anti-CD14 e a solução foi aplicada à coluna de separação magnética. Após eluição das células aderidas à coluna, apenas os monócitos (fração CD14+) foram obtidos para realização dos demais experimentos.

4.3. Obtenção de *Mycobacterium tuberculosis* e estimulação *in vitro* das células

Todos os experimentos relacionados à infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) foram desenvolvidos em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Célio Lopes Silva, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em sala de segurança biológica nível 3 (NSB3).

As cepas de Mtb H37Rv (ATCC 27294), estocadas em banco a -70 °C, foram repicadas em meio líquido Midlebrook 7H9 (BD Biosciences, Sparks, EUA) enriquecidos com 10% de ácido oléico, albumina, dextrose e catalase (OADC – Difco™, Detroit, EUA) e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ e por período de 11 dias para crescimento bacteriano. Após período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2300 xg por 20 minutos e o precipitado ressuspensionado em tampão PBS 1X e transferido para tubo de vidro estéril contendo pérolas de vidro. A suspensão ajustada para 1×10^7 bacilos/mL com auxílio de escala nefelométrica de Mc Farland. Uma vez atingida a turbidez correspondente, a suspensão de bactérias foi recuperada, novamente centrifugada a 2300 xg por 20 minutos para ressuspensão em meio de cultura RPMI ou DMEM sem antibióticos.

Para avaliação da influência do tratamento sobre os diferentes mecanismos da resposta imune, realizamos a estimulação *in vitro* das células isoladas de sangue periférico, tratadas ou não com o composto epigenético, com suspensão de Mtb, preparada de acordo com o descrito neste item. De maneira geral, após o período determinado de tratamento, as células foram desafiadas com o bacilo na proporção de cinco bactérias para cada célula (MOI 5). Para os experimentos de formação do granuloma, foi utilizado MOI 0,01. O período de infecção foi determinado de acordo com o delineamento de cada ensaio e será descrito nos respectivos itens a seguir.

4.4. Preparo do composto Decitabina para tratamento *in vitro* dos monócitos

Dentre os dois compostos hipometilantes disponíveis, os ensaios *in vitro* foram realizados com o fármaco 5-AZA-2-deoxicitidina (Decitabina - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As concentrações utilizadas foram determinadas de acordo com dados da literatura que avaliaram o nível plasmático encontrado em pacientes que utilizam o fármaco no tratamento (Mompalmer *et al.*, 1997; Marcucci *et al.*, 2005), bem como outros trabalhos da literatura que avaliaram o efeito do tratamento sobre a função das células do sistema imune (Frikeche *et al.*, 2011; Schmiedel *et al.*, 2011).

O composto foi reconstituído em solução de DMSO em concentração mãe de 50 mM e armazenadas a -80 °C, para manutenção da estabilidade do composto. No dia do tratamento foram realizadas diluições para a concentração inicial de trabalho de 5µM. Como parâmetros de comparação foram utilizadas células não tratadas ou que receberam o veículo DMSO na

concentração de 0,2%, mesma concentração utilizada na diluição do composto. Assim, após ajuste da suspensão celular em meio de cultura, as células foram tratadas com diferentes concentrações do composto, conforme indicado na descrição dos resultados por diferentes períodos do acordo com o delineamento experimental.

4.5. Avaliação da viabilidade celular e micobacteriana

A determinação do efeito do tratamento sobre a viabilidade de células mononucleares e dos bacilos foram realizadas através de ensaios de metabolização celular da resazurina. Desta forma, as células e as bactérias foram tratadas com o composto hipometilante, em diferentes concentrações e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por período de 24 horas. Depois da incubação, 10 µL de resazurina (50 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram adicionados, seguido de nova incubação por mais 24 horas para metabolização da resazurina. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro (µQuant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente.

Em alguns ensaios a avaliação da viabilidade celular também foi realizada através de citometria de fluxo, com a utilização de kit LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). Nesta avaliação, após período de tratamento e infecção *in vitro*, as células foram centrifugadas a 400 xg por 10 minutos, o precipitado celular foi ressuspendido em 1 mL de PBS contendo 1 µL da sonda fluorescente diluída em DMSO (conforme instruções do fabricante) e a suspensão foi incubada à temperatura ambiente, protegida da luz por 30 minutos. Após incubação, as células foram lavadas através da adição de PBS e centrifugadas a 400 xg por 10 minutos. O precipitado celular foi ressuspendido em PBS 2% de soro fetal bovino (SFB) para realização das demais marcações de citometria, seguida de fixação em PBS 1% formol. A avaliação da viabilidade foi realizada através de citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, EUA), sendo as células não viáveis aquelas marcadas pela sonda. A análise dos dados foi realizada no software FlowJo versão 7.6.5, com auxílio da especialista responsável Fabiana Rosseto de Moraes.

4.6. Determinação da atividade fagocítica

Para avaliação do efeito do tratamento com Dicitabina sobre capacidade fagocítica de monócitos, a suspensão de monócitos isolados após separação magnética foi ajustada para 1x10⁵/poço, distribuída em placa de 96 poços em volume final de 200 µL. Neste momento, as células foram tratadas com diferentes concentrações da droga, variando de 0,25 a 5µM e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas, tempo estipulado de tratamento. Após tal período, o

sobrenadante foi retirado e adicionado novo meio contendo Mtb, ajustado para MOI 5 - 5×10^5 Mtb/poço. As células foram então incubadas novamente a 37°C, 5% CO₂, período determinado pelo grupo para avaliação da fagocitose (Espíndola *et al.*, 2018). Passadas 2 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com solução salina (PBS 1X) a temperatura ambiente por 2 vezes. Com este passo, as bactérias não fagocitadas foram removidas da placa. Foram adicionados à placa 200 µL de saponina (0,05%), para lise das células e exposição das bactérias interiorizadas. A seguir, a avaliação da atividade fagocítica foi avaliada indiretamente através da metabolização de resazurina, composto azul a resafarina, de coloração rosa, pela bactéria. Para tal, 10µL de resazurina (50 µg/mL) foram adicionados em todos os poços da placa, com nova incubação por 24 horas no escuro. A leitura da metabolização da resazurina foi realizada em espectrofluorímetro (µQuant, Biotek Instruments Inc) com comprimento de onda de excitação a 560 nm e de emissão em 590 nm. Os resultados foram expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU) descontando a metabolização residual dos poços apenas com células lisadas, bem como em índice fagocítico, considerando a fagocitose das células não tratadas como 100%, através da fórmula: Índice fagocítico = RFU célula tratada (DMSO ou Decitabina)*100/ RFU célula não tratada.

4.7. Avaliação da atividade microbicida

Para determinação do efeito do tratamento sobre a capacidade dos monócitos de eliminar agentes patogênicos, os monócitos isolados de sangue periférico foram ajustados 2×10^5 /poço, distribuídos em placa de 96 poços e incubados a 37°C, 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas com Decitabina 5µM ou veículo, infectadas com suspensão bacteriana ajustada para 1×10^6 Mtb/poço (MOI 5) e então, novamente incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas, período determinado pelo grupo para avaliação da atividade microbicida (citar artigo Milena). Após tal período, 50µL de saponina 0,2% (4X concentrada) foram adicionados à placa para lise das células e exposição das bactérias interiorizadas. A seguir, a avaliação da atividade microbicida foi avaliada indiretamente através da metabolização de resazurina, composto azul a resafarina, de coloração rosa, pela bactéria. Para tal, 10µL de resazurina (50 µg/mL) foram adicionados em todos os poços da placa, com nova incubação por 24 horas no escuro. A leitura da metabolização da resazurina foi realizada em espectrofluorímetro (µQuant, Biotek Instruments Inc) com comprimento de onda de excitação a 560 nm e de emissão em 590 nm. Os resultados foram expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU) descontando a metabolização residual dos poços apenas com células lisadas. Assim como para a fagocitose, o índice microbicida também foi calculado, usando como parâmetro a atividade microbicida das

células não tratadas, consideradas 100%, através da fórmula: Índice microbicida = RFU célula tratada (DMSO ou Decitabina)*100/ RFU célula não tratada.

A capacidade microbicida também foi avaliada nos ensaios de formação de granuloma e polarização de macrófagos. Para estes ensaios, as bactérias recuperadas após 7 dias e 24 horas de infecção, respectivamente, foram avaliadas por contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Para tal, após o período de infecção nestes protocolos, foi adicionado aos poços saponina 0,2% (4X concentrada), em volume que permitisse que a concentração no poço atingisse 0,05% - concentração utilizada nos ensaios de fagocitose e atividade microbicida. Após homogeneização, 100µL da suspensão bacteriana obtida foi diluída em tampão PBS em diluição sequencial de base 10. As três últimas diluições (10^2 , 10^3 e 10^4) foram plaqueadas em meio 7H11 e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 28 dias para contagem das colônias recuperadas.

4.8. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de EROs pelos monócitos após o tratamento com Decitabina foi avaliada através de ensaios de quimiluminescência amplificada por Luminol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), utilizando PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como estímulo para a liberação de EROs pelos monócitos. Assim, após separação, as células foram ajustadas para 2×10^5 células/poço em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol e distribuídas em placas brancas, específicas para o ensaio de quimiluminescência, seguido de tratamento com o agente hipometilante (5µM) e incubação por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. No momento da leitura, após o período de tratamento estabelecido, foi adicionado luminol (100 µM) em todos os poços da placa para detecção das EROs. Como estímulo, utilizamos PMA (10^{-7} M) nos respectivos poços, bem como avaliamos a modulação da produção espontânea – sem adição de estímulo. A análise da produção foi realizada em luminômetro, no Laboratório da Profa. Yara Maria Lucisano Valim. Os resultados foram registrados em contagem de fótons por minuto (cfm) e expressos na forma de área integrada sob a curva de quimiluminescência obtida.

4.9. Caracterização imunofenotípica através de citometria de fluxo

Para caracterização celular após o tratamento com Decitabina foram avaliadas moléculas expressas na superfície celular através da técnica de citometria de fluxo. A expressão de moléculas de superfície foi avaliada após o tratamento Decitabina nos experimentos para determinação do perfil de polarização de macrófagos. Desta forma, a suspensão celular obtida após o protocolo experimental foi ajustada em 1×10^6 , centrifugada a 400 xg e ressuspendidas em 100 µL tampão PBS 1X contendo 2% de SFB e os anticorpos específicos para as moléculas

analisadas. Foram utilizados os seguintes anticorpos: CD14PE/Cy7 (clone 63D3), CD163 APC (clone GHI/61), CD206 Alexa Fluor® 488 (clone 15-2), CD86 PE (clone IT2.2) e HLA-DR PerCP (clone L243) adquiridos da BioLegend (BioLegend Inc., San Diego, EUA) e CD16 BV510 (clone 3G8) da BD Biosciences (BD Biosciences, San Diego, EUA). Para marcação, as células foram incubadas por 25 min a 4°C, no escuro. Após este período, 2 mL de PBS 2% SFB foram adicionados e os tubos centrifugados a 400 xg por 10 min a 4°C. O precipitado celular foi ressuspensionado em 200 µL de PBS com 1% de formaldeído, para fixação da marcação até o momento da leitura. As análises de expressão foram realizadas através de citômetro FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, EUA) e a análise realizada no software FlowJo versão 7.6.5, com auxílio da especialista responsável Fabiana Rosseto de Moraes.

4.10. Quantificação de citocinas e quimiocinas

A produção de citocinas e quimiocinas foi realizada tanto em sobrenadante de cultura de células tratadas e infectadas *in vitro* com Mtb, bem como diretamente em amostras de plasma separadas de sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com SMD. O ensaio para detecção dos mediadores IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-12, IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, RANTES e IP-10 foi realizado em plataforma multiplex utilizando o kit Magnetic Luminex Assay (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Conforme a metodologia do fabricante, as amostras foram adicionadas às placas específicas para o ensaio e diluídas em tampão fornecido pelo kit e, após a incubação com microesferas magnéticas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura, foi realizada a leitura das amostras no equipamento. A detecção dos mediadores foi realizada em leitor de placas Luminex Multiplexing Instrument (EMD Millipore, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) e a análise dos dados de leitura foi realizada através de *software* MilliplexAnalyst®, que identifica cada microesfera e quantifica a fluorescência emitida nas amostras e na curva padrão do kit, associando estes valores à concentração de cada analito.

Em alguns ensaios, como na formação do granuloma e polarização de macrófagos, a quantificação de citocina em sobrenadante de cultura após tratamento e infecção *in vitro* com Mtb foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA – R&D systems, Minneapolis, EUA). Através desta metodologia foram quantificados IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-10. Para tal, 100 µL de anticorpo de captura para cada analito foram adicionados a placas de 96 poços e as mesmas foram incubadas overnight à temperatura ambiente. No dia seguinte, após lavagem com solução de PBS contendo 0,05% de *Tween20*, a solução de bloqueio foi adicionada em todos os poços e incubada por uma hora, seguida de nova lavagem, adição de 50 µL de amostra

previamente diluídas (quando necessário) e curva padrão, sendo então incubadas por mais duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e solução contendo anticorpos de detecção foi adicionada às respectivas placas. Após nova incubação de duas horas, as placas foram lavadas e 100 µL da enzima estreptoavidina-HRP foram adicionados em cada poço. Por fim, a reação foi revelada através da adição do substrato TMD, seguida de interrupção por ácido sulfúrico (H₂SO₄) (2N). A absorbância das amostras e da curva padrão foram obtidas através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm (µQuant, Biotek Instruments Inc) e as concentrações dos analitos determinadas através de curva de regressão linear obtida.

4.11. Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Para avaliação da expressão gênica foi inicialmente realizada a extração de RNA através do kit PureLink™ RNA minikit (Ambion, Life Technologies™, Carlsbad, EUA). De acordo com protocolo, ao precipitado celular foi adicionado tampão de lise fornecido pelo kit, contendo 1% de 2-mercaptoetanol em volume final de 600 µL. As amostras lisadas foram agitadas em vórtex e, então, centrifugadas a 12000 xg por 2 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, igual volume de etanol 70% foi adicionado ao sobrenadante recuperado e a amostra foi transferida para coluna de purificação, seguida de centrifugação a 12000 xg por 15 segundos à temperatura ambiente. Uma vez retido na coluna, o RNA foi submetido a etapa de lavagens com tampões específicos, fornecidos pelo fabricante. Por fim, a eluição do RNA da coluna foi realizada através da adição de 50 µl de água livre de nucleases e centrifugação a > 12000 xg por dois minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, o RNA recuperado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop®2000, no Laboratório da Profa. Dra. Juliana Pfizer Falcão, com razão 260/280 próximas a 1,80, e então, armazenado a -80 °C até o momento da utilização.

Para realização do PCR, as amostras de RNA foram convertidas em DNA complementar (cDNA) com auxílio de kit cDNA High Capacity Archive (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Sendo assim, as amostras de RNA foram incubadas com 2µL de tampão RT 10X, 0,8µL de dNTPs mix, 2 µL de random primers e 1 µL de enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ µL), fornecidos pelo fabricante, acrescidos de água livre de nucleases para volume final de reação de 20 µL. A reação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com ciclo de incubação por 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C e 5 minutos a 85°C

Por fim, após a síntese de cDNA, a expressão dos genes alvo foi determinada através reação de PCR em tempo real. Os genes avaliados foram: enzimas responsáveis pela metilação

do DNA - DNMT1, DNMT3A, DNMT3B; marcadores de polarização de macrófagos humanos - CXCL10, ALOX15, IL-12, IL-10, bem como a expressão de genes que caracterizem os perfis de células T, como IFN- γ , IL-17, IL-10, TGF- β , FOXP3 . A reação foi construída através da adição de 10 μ L de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 1 μ L de primer e 9 μ L de cDNA (50 ng) e água livre de nuclease para volume final de 20 μ L. A reação foi realizada em equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA), sendo as condições de amplificação: 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. A normalização dos resultados de CT (*cycle threshold*) dos genes alvos foi realizada através da utilização de gene constitutivo β -actina (*actb*). A expressão relativa de cada gene foi calculada através da fórmula $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ em relação ao grupo não tratado.

4.12. Indução da formação de estruturas semelhantes ao granuloma e avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante

A formação de agregados celulares semelhantes ao granuloma foi induzida através de metodologia adaptada de protocolos descritos por (Birkness *et al.*, 2007; Je *et al.*, 2016; Yamashiro *et al.*, 2016). Para tal, as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) isoladas foram ajustadas em 1×10^6 células/poço em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e distribuídas em placas de 48 poços. As placas foram previamente revestidas com agarose (230 μ L/poço) para impedir a aderência celular e favorecer a formação dos agregados celulares. As células foram então tratadas com 5 μ M do agente hipometilante Decitabina ou DMSO (0,2%) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por período de 24 horas. Após período de pré-tratamento, para indução da formação do granuloma, 1×10^4 bacilos foram adicionados a cada poço, e então as células mononucleares infectadas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por período de 7 dias. O tratamento com agente hipometilante foi reforçado após 3 dias de infecção. A formação das estruturas de agregados celulares foi avaliada através de microscópio invertido e fotografadas ao final dos 7 dias de infecção. Além disso, os agregados foram analisados quanto ao aspecto microscópico. Para tal, as células foram fixadas com solução contendo formol (1%) e aderidas às lâminas de vidro através de Cytospin (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Para avaliação do aspecto citológico, as lâminas foram coradas através de técnica de Ziehl-Neelsen para visualização das bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e contra coloração com azul de metileno para avaliação das células, em colaboração com a Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos. As imagens das lâminas foram capturadas usando câmera acoplada a microscópio (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha). Para avaliação do efeito do tratamento sobre a

função celular neste modelo, após os sete dias de infecção, o sobrenadante celular foi coletado para quantificação das citocinas IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-1 β através de ensaio imunoenzimático, como descrito no item 4.10 e as células recuperadas para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo (4.5). Por fim, a capacidade de controle da infecção por Mtb foi realizada a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) viáveis em cada condição após 7 dias de infecção após lise celular por saponina (0,05%) , como descrito no item 4.7.

4.13. Diferenciação e polarização de macrófagos

Os monócitos isolados de sangue periféricos por separação magnética também foram utilizados para avaliação do efeito do tratamento com Decitabina na diferenciação e polarização de macrófagos *in vitro*. Para a obtenção de macrófagos, os monócitos foram ajustados para 1×10^6 células/poço e distribuídos em placas de 24 poços em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e citocina recombinante humana GM-CSF (50 ng/mL), de acordo com protocolo de diferenciação e polarização descrito por (Kittan *et al.*, 2013). Para avaliação do efeito do tratamento, 5 μ M de Decitabina ou 0,2% do veículo DMSO foram adicionados durante o período de diferenciação, juntamente com o meio suplementado com a citocina recombinante. As células foram então incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por sete dias. No meio do período (dia 3), DMEM suplementado com o fator de crescimento foi adicionado à cultura. Após sete dias de incubação, as células foram lavadas com PBS e novo meio suplementado com as citocinas polarizantes foram adicionados para indução dos perfis de polarização M1 através da adição de IFN- γ (100ng/mL) e para o perfil M2, IL-4 e IL-13 na concentração de 10 ng/mL de cada. Após 24 horas de estimulação com as citocinas polarizantes, as células foram utilizadas para avaliação da morfologia, expressão de marcadores de superfície – CD206, CD163, CD86 e HLA-DR por citometria de fluxo (como descrito no item 4.9) e análise da expressão gênica de marcadores M1 e M2 – CXCL10 e ALOX15, respectivamente, através de PCR em tempo real (como descrito no item 4.11).

O efeito do tratamento também foi avaliado através de ensaios funcionais dos macrófagos diferenciados através de estimulação com Mtb. Para isto, os macrófagos foram diferenciados na presença de GM-CSF, com adição de Decitabina ou DMSO por período de 7 dias. Após diferenciação, o meio foi substituído por DMEM suplementado 10% SFB e as células foram infectadas com Mtb (MOI 5) e incubadas a 37°C, 5%CO₂ por novo período de 24 horas. No dia seguinte, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior quantificação de citocinas, seguindo metodologia imunoenzimática (ELISA) descrita no item

4.10 e as células foram armazenadas a -80°C para avaliação do padrão de metilação global e gene específico. Neste mesmo ensaio, poços foram destinados a avaliação da recuperação de bacilos após o período de infecção. Para tal, após as 24 horas, as células foram lisadas com adição de saponina 0,05%. Após homogeneização, 100 μL da suspensão bacteriana obtida foi diluída em tampão PBS em diluição sequencial de base 10. As três últimas diluições (10^2 , 10^3 e 10^4) foram plaqueadas em meio 7H11 e incubadas a 37°C , 5% CO_2 por 28 dias para contagem das colônias recuperadas (CFU), como mencionado no item 4.7.

4.14. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas com auxílio de programa GraphPad Prism 6.0. (GraphPad Software Inc.). Os testes para análise foram determinados a partir da distribuição dos dados através de teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov with Dallal-Wilkinson-Lilliefors P value*.

Para os ensaios de tratamento *in vitro*, utilizamos análises pareadas dos dados, uma vez que as células do mesmo doador foram submetidas a diferentes condições experimentais. Desta forma, para os dados considerados paramétricos, utilizamos *teste t* pareado, para comparação de dois grupos, e ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos, para os ensaios com mais de dois grupos amostrais. Para os dados não-paramétricos, utilizamos o teste de *Friedman*, seguindo do teste *Dunn's*, para comparações múltiplas pareadas, assim como, o teste *Wilcoxon*, para análises pareadas entre dois grupos experimentais. Para os ensaios com os pacientes em tratamento ou não com o agente hipometilante realizou-se análises estatísticas não pareadas. Para os dados com distribuição normal realizamos o teste *t* e para os não paramétricos, o teste de Mann-Whitney. Os dados foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão e para todos os testes realizados foram considerados significativos valores de *p* menor que 0,05 (*two tailed*).

5. *RESULTADOS*

Os resultados estão apresentados em dois capítulos para melhor contextualização e interpretação dos dados obtidos:

- ✓ **Capítulo 1** – Efeito do tratamento *in vitro* com agentes hipometilantes sobre a função e diferenciação de monócitos e macrófagos em modelo de infecção

- ✓ **Capítulos 2** – Efeito do tratamento com agentes hipometilantes: avaliação de alterações imunológicas e hematológicas em pacientes com Síndrome Mielodisplásica

CAPÍTULO 1

5.1. O tratamento com agentes hipometilantes modula a função de monócitos de indivíduos saudáveis em resposta a estímulo infeccioso

Inicialmente, antes de avaliarmos a modulação exercida pelo composto sobre os aspectos funcionais destas células, determinamos o efeito do tratamento com o agente hipoemtilante Decitabina (Deci) sobre a viabilidade celular. Para tal, os monócitos foram isolados de sangue periférico, distribuídos em placas de cultura e tratados com diferentes concentrações de Decitabina por 24 horas. As concentrações utilizadas, bem como o período de tratamento estabelecido foram baseados em outros trabalhos que avaliaram a modulação exercida pelo composto sobre a função de outras células do sistema imune, como células NK e dendríticas (Frikeche *et al.*, 2011; Schmiedel *et al.*, 2011). Após incubação, a viabilidade celular foi determinada através da avaliação da metabolização celular de resazurina. Como controle positivo de morte celular, foi utilizada a metabolização celular após adição de solução de lise (saponina 0,05%), e como controle da viabilidade foram consideradas as células que não receberam nenhum tipo de tratamento, nem veículo.

Como observado na Figura 2A, o tratamento com Decitabina em diferentes concentrações e o veículo de reconstituição do composto não promoveram alterações significativas na metabolização de resazurina pelos monócitos de indivíduos saudáveis quando comparados às células que não foram tratadas. O controle positivo de morte celular apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos. Para normalização dos dados, calculamos a porcentagem de células viáveis, considerando a medida da metabolização da célula não tratada como 100%, demonstrado na Figura 2B, e nenhuma diferença na frequência de células vivas foi encontrada em relação aos tratamentos, indicando ausência de efeito do agente hipometilante sobre a viabilidade das células, nas concentrações e período avaliados.

Figura 2. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a viabilidade celular.

Monócitos isolados de sangue periférico foram ajustados para 1×10^5 céls/poço e tratados por período de 24 horas com as diferentes concentrações de Decitabina (5, 1 and 0,25 μ M), DMSO ou não tratados para avaliação da viabilidade celular. Após período de tratamento, viabilidade foi determinada através da metabolização pelas células viáveis, da resazurina no composto fluorescente resorufina. Para tal, 10 μ L de resazurina (50 μ g/mL) foram adicionados aos poços e a placa incubada novamente por 24 horas para metabolização do composto em resorufina, de coloração rosa. Como controle positivo de morte celular, utilizou-se saponina 0,05% para promover a lise celular. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. **(A)** Os resultados expressos em unidade relativa de fluorescência (RFU) e **(B)** porcentagem de monócitos viáveis, determinada considerando-se as células não tratadas como 100% de viabilidade através da fórmula: $\text{RFU célula tratada (DMSO ou Decitabina)} \times 100 / \text{RFU célula não tratada}$. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=6$) da porcentagem de células viáveis, foram analisados por teste de ANOVA, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p < 0.05$ (*).

Assim como para os monócitos, avaliamos o efeito do tratamento com Decitabina em relação à viabilidade micobacteriana, uma vez que se o composto apresentasse alguma influência, poderia atrapalhar as análises de fagocitose e atividade microbica, que foram avaliadas mais adiante neste trabalho. Desta maneira, a suspensão bacteriana foi distribuída em placas de cultura ajustadas para 5×10^5 bactérias/poço e tratadas com o composto hipometilante na maior concentração (5 μ M) e DMSO, sendo incubadas por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂, pelo tempo máximo em que estariam em contato com a droga durante avaliação de atividade microbica dos monócitos. Neste ensaio, usamos como controle de crescimento, bacilos não tratados, que receberam apenas meio de cultura e como controle positivo de morte bacteriana, o antibiótico rifampicina, utilizado no tratamento da tuberculose pulmonar.

Como observado na Figura 3, o tratamento com antibiótico reduziu a viabilidade do bacilo, porém o tratamento com DMSO e com 5 μ M de Decitabina não alterou a metabolização de resazurina pela bactéria quando comparados aos bacilos não tratados, indicando assim, ausência de toxicidade sobre o Mtb.

Figura 3. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a viabilidade de *M. tuberculosis*.

Bacilos de Mtb H37Rv (ATCC 27294) foram repicados em meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecidos com 10% de OADC e incubados a 37 °C, 5% CO₂ e por período de 11 dias para crescimento bacteriano. Após este período a suspensão foi ajustada de acordo com escala nefelométrica de Mc Farland, atingindo turbidez referente a 1x10⁷ bacilos/mL. A partir desta suspensão, a determinação do efeito do tratamento sobre a viabilidade dos bacilos foi realizada através de ensaios de metabolização celular da resazurina. Para isso, as bactérias foram ajustadas para 5 x10⁵ bacilos/poço e tratadas com 5 μM do composto hipometilante e DMSO, e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por período de 24 horas. Depois da incubação, 10 μL de resazurina (50 μg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram adicionados, seguido de nova incubação por mais 24 horas para metabolização da resazurina. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro (μQuant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560 nm e 590 nm, respectivamente. Os resultados, expressos em média ± desvio padrão (n=6) de unidade relativa de fluorescência (RFU), foram analisados por teste de ANOVA, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando p<0.05 (*).

Uma vez que não observamos toxicidade celular e bacteriana em nosso modelo de estudo, iniciamos as avaliações do efeito do tratamento sobre as atividades funcionais das células. A primeira função celular analisada foi a capacidade fagocítica dos monócitos, importante habilidade no controle de processos infecciosos. Para tal, os monócitos foram tratados por 24 horas com o composto hipometilante em diferentes concentrações ou DMSO. No dia seguinte, as células pré-tratadas foram infectadas com Mtb (MOI 5) e após duas horas de infecção, tempo determinado para avaliação da fagocitose, os poços foram lavados para remoção das bactérias não internalizadas e as células foram lisadas para exposição das bactérias internalizadas. A avaliação da fagocitose foi realizada de maneira indireta, através da metabolização de resazurina pelas bactérias fagocitadas após lise celular.

Como demonstrado, o tratamento com o Decitabina na maior concentração testada – 5 μ M resultou em maior detecção de unidades relativas de fluorescência quando comparado ao grupo controle não tratado e às células que receberam apenas o veículo – DMSO, indicando a presença de maior número de bactérias no interior das células após o tratamento (Figura 4A). Visto a variação individual nas taxas de fagocitose, normalizamos cada indivíduo avaliado em relação a sua célula não tratada, considerando 100% a taxa de fagocitose deste grupo. Desta forma, observamos na Figura 4B, que semelhante ao determinado pelo RFU, o tratamento com 5 μ M de Decitabina promoveu aumento no índice fagocítico em relação ao grupo não tratado e veículo, com aumento de aproximadamente quatro vezes na capacidade destas células de reconhecer e internalizar o bacilo.

Figura 4. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade fagocítica de monócitos infectados *in vitro* com Mtb

(A) Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de separação magnética, ajustados para 1×10^5 céls/poço e tratados *in vitro* por período de 24 horas com Decitabina (5, 1 e 0,25 μ M), DMSO ou não tratados. Após tempo de tratamento, as células foram infectadas *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*, na proporção de 5 bacilos para 1 célula (MOI 5). Duas horas após a infecção, período estabelecido para avaliação da fagocitose, os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X em temperatura ambiente para remoção das bactérias não internalizadas e foram adicionados 200 μ L de saponina para lise celular e liberação das bactérias fagocitadas. Então, foram adicionados 10 μ L de resazurina e a placa incubada por mais 24 horas para metabolização do composto, lido em espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=6) da Unidade Relativa de Fluorescência (RFU), foram analisados por teste de ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). (B) O Índice Fagocítico foi calculado a partir dos dados de RFU obtidos, considerando como 100% de fagocitose os monócitos não tratados, de acordo com a fórmula: $[(RFU \text{ dos tratamentos} - DMSO \text{ ou Decitabina} \times 100) / RFU \text{ não tratado}]$. Os resultados foram analisados por teste de ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

Determinada a modulação positiva do tratamento com Decitabina sobre a atividade fagocítica, uma vez que demonstramos aumento na quantidade de bactérias internalizadas pelos monócitos tratados, avaliamos a capacidade destas células de promover o controle da infecção, bem como de produzir fatores microbicidas.

Desta forma, avaliamos o efeito do tratamento com Decitabina em relação a capacidade dos monócitos de promoverem a morte das bactérias internalizadas após 24 horas de infecção. Na Figura 5A, na qual determinamos a quantidade de bactérias viáveis após o tempo de incubação, observamos que as células tratadas com o agente hipometilante não foram capazes de eliminar as bactérias na mesma magnitude daquelas células não tratadas ou tratadas apenas com o veículo. Na Figura 5B, quando analisamos os dados em termos de proporção, considerando as células não tratadas como 100% de capacidade microbicida, percebemos um aumento de aproximadamente 50% na recuperação de bactérias nas células tratadas com Decitabina em relação ao controle, indicando que o tratamento com o agente hipometilante tornou os monócitos incapazes de controlar a infecção *in vitro*.

Dentre os mecanismos microbicidas descritos em monócitos humanos, a produção de espécies reativas de oxigênio desempenha função importante nas infecções. Desta maneira, avaliamos os efeitos exercidos pelo tratamento com agente hipometilante na produção de EROs pelas células mononucleares em condições espontâneas (Figura 5C) ou estimuladas com PMA (Figura 5D). Observamos que o tratamento com 5 μ M de Decitabina não foi capaz de alterar a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos monócitos em nenhuma das condições avaliadas, sendo detectada de maneira muito semelhante às células não tratadas ou às que receberam apenas DMSO. Sugerimos assim que o prejuízo observado na atividade microbicida acontece independentemente de modulação na produção de EROs, podendo ser resultado de outros mecanismos, como a produção de outros mediadores microbicidas, bem como pela liberação de citocinas e quimiocinas, que podem auxiliar no recrutamento de outras células para o sítio infecciosos e potencializar o controle da infecção pelos monócitos.

Figura 5. Avaliação do efeito do tratamento *in vitro* com Decitabina em relação à atividade microbicida e produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos.

(A) Monócitos foram purificados de sangue periférico (2×10^5) e tratados com Decitabina 5 μ M, DMSO ou não tratados e, concomitantemente, infectados com Mtb H37Rv na proporção de 5 bacilos para cada célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção e tratamento, foram adicionados 50 μ L de saponina (0,2% - 4 vezes concentrada) para volume final de 200 μ L no poço para promover a lise das células. Adicionou-se, então 10 μ L de resazurina para avaliação da metabolização pelas bactérias viáveis por espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=7$) da Unidade Relativa de Fluorescência (RFU), foram analisados por teste de ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**). **(B)** A atividade microbicida foi calculada a partir dos dados de RFU obtidos, considerando como 100% a quantidade de bacilos recuperados em cultura de monócitos não tratados, de acordo com a fórmula: $[(\text{RFU dos tratamentos} - \text{DMSO ou Decitabina}) * 100] / \text{RFU não tratado}$. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=7$), foram analisados por teste de ANOVA para medidas repetidas não paramétrico (Friedman), seguido de teste post-hoc Dunn's, considerando $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**). **(C e D)** Células mononucleares isoladas de sangue periférico (2×10^5) foram tratadas ou não com Decitabina ou DMSO por período de 24 horas. Posteriormente, tais células foram estimuladas ou não com PMA e a produção de EROs foi monitorada durante 1 hora em luminômetro através da detecção de quimiluminescência na presença de luminol. O gráfico **(C)** representa a produção em condições espontâneas e **(D)** após estimulação com PMA. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=5$) das áreas sob a curva (AUC) calculadas para cada contagem de fótons por minuto, foram analisadas por teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p<0,05$.

Neste sentido, também avaliamos o impacto do tratamento com Decitabina sobre a produção de citocinas e quimiocinas pelos monócitos, função fundamental para o desenvolvimento da resposta imune apropriada. Assim para demonstrar o efeito do agente hipometilante em relação a esta atividade dos monócitos, as células foram tratadas com o fármaco e infectadas *in vitro* com o bacilo. Após 24 horas de desafio com Mtb, o sobrenadante coletado foi utilizado para quantificação dos mediadores imunológicos produzidos em resposta à infecção.

Podemos observar que o tratamento com Decitabina na concentração de 5 μ M promoveu aumento da produção da citocina IL-8 após estimulação com o bacilo quando comparado com controle infectado não tratado (Figura 6C). Nenhuma alteração foi observada quanto à produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Figura 6A, B e D, respectivamente). Adicionalmente, quando avaliamos a produção de quimiocinas, foi possível notar que o tratamento promoveu aumento na produção de MIP-1 α e MIP-1 β na ausência de infecção por Mtb quando comparado ao grupo não tratado, porém esta modulação não foi observada após a infecção, com aumento na produção da quimiocinas de maneira semelhantes em ambos os grupos (Figura 7C e 7D). Após a estimulação com o bacilo, detectamos apenas o aumento na liberação de RANTES (CCL5) pelos monócitos tratados com o composto hipometilante em relação às células não tratadas e infectadas com Mtb (Figura 7B). Nenhuma diferença foi observada quanto à produção da quimiocina MCP-1 (Figura 7A). Vale ressaltar que a modulação observada para estas quimiocinas foi muito pequena e em concentrações baixas, o que pode não demonstrar, do ponto de vista biológico, efeitos relevantes.

Figura 6. Efeito do tratamento *in vitro* com Decitabina na produção de citocinas por monócitos em modelo de infecção *in vitro* por Mtb

Monócitos (2×10^5) foram isoladas de sangue periférico de indivíduos saudáveis e tratadas ou não com 5μ M de Decitabina por 24 horas. Posteriormente, as células foram desafiadas com Mtb H37Rv, na proporção de 5 bactérias para cada célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas e quimiocinas através de ensaio multiplex. Os gráficos A - D representam a quantificação de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , respectivamente. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=8$), foram analisados através de *test t* pareado, comparando a produção de citocinas pelas células tratadas em relação ao controle não tratado, considerando $p < 0.05$ (*) e $p < 0.01$ (**).

Figura 7. Efeito do tratamento *in vitro* com Decitabina na produção de quimiocinas por monócitos em modelo de infecção *in vitro* por Mtb.

Monócitos (2×10^5) foram isoladas de sangue periférico de indivíduos saudáveis e tratadas ou não com 5μ M de Decitabina por 24 horas. Posteriormente, as células foram desafiadas com Mtb H37Rv, na proporção de 5 bactérias para cada célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas e quimiocinas através de ensaio multiplex. Os gráficos A - D representam a quantificação MCP-1, RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , respectivamente. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8), foram analisados através de *teste t* pareado, comparando a produção de citocinas pelas células tratadas em relação ao controle não tratado, considerando $p < 0.05$ (*) e $p < 0.01$ (**).

5.2. Efeito do tratamento hipometilante na diferenciação e polarização de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico

Até o momento, os dados apresentados permitem a conclusão de que o tratamento com Decitabina promoveu alterações funcionais em monócitos, aumentando a capacidade fagocítica destas células e produção de quimiocinas e citocinas, principalmente IL-8. Entretanto, de maneira contraditória, apesar de inicialmente induzir uma modulação potencialmente positiva para o controle da infecção, reduziu a capacidade microbicida destas células. Com base neste conjunto de dados, aliados aos conhecimentos prévios da importância das alterações epigenéticas para a diferenciação e polarização de macrófagos, perguntamos se o tratamento poderia influenciar este processo e, com isso, alterar o padrão de resposta imune.

Assim, buscamos avaliar o efeito do tratamento durante a polarização *in vitro* de macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico. Para tal, as células mononucleares isoladas de sangue periférico e purificadas por seleção magnética foram mantidas em cultura por seis dias em meio suplementado com GM-CSF, na presença de Decitabina ou DMSO (veículo) para diferenciação em macrófagos. Após este período, os macrófagos diferenciados foram então estimulados com citocinas polarizantes para os perfis M1, através da adição de IFN- γ e M2, com IL-4 e IL-13, bem como as células que receberam apenas meio e foram mantidas na condição M0 (*resting*).

O efeito do tratamento com agentes hipometilantes sobre a diferenciação e polarização de macrófagos foi inicialmente avaliado em relação à sua morfologia celular. (Figura 8). Já foi descrito que macrófagos apresentam diferentes padrões morfológicos quando polarizados para os perfis M1 e M2. Macrófagos polarizados na presença de IFN- γ apresentam morfologia de fuso, com projeções celulares, enquanto as células na presença de IL-4 e IL-13 demonstram morfologia mais arredondada, com emissão de menos projeções e menor aderência à placa, como demonstrado por (Pelegrin e Surprenant, 2009; Buchacher *et al.*, 2015; Toniolo *et al.*, 2015). Baseados nestes padrões, pode-se observar que o tratamento com Decitabina na concentração de 5 μ M na condição de “*resting*” evidenciou maior quantidade de macrófagos arredondados, bem como na condição que recebeu IL-4 e IL-13 durante a polarização celular, sugerindo um perfil mais semelhante aos macrófagos M2 quando comparados às mesmas condições na presença de DMSO. Apesar de parecer induzir o perfil alternativo de diferenciação, quando estimuladas com IFN- γ , os macrófagos diferenciados na presença de Decitabina apresentaram, de maneira semelhante ao observado no grupo veículo, morfologia em fuso, indicando a polarização para o perfil M1, independente do tratamento utilizado.

Figura 8. Alterações morfológicas em macrófagos diferenciados e polarizados na presença de agente hipometilante Decitabina.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5µM. ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram estimulados com citocinas para polarização de macrófagos. O perfil M1 foi definido pela adição no meio de cultura de IFN- γ (100 ng/mL), M2 por IL-4 e IL-13 (50 ng/mL cada) e M0 sem adição de nenhuma citocinas polarizantes, As células foram mantidas em cultura por mais 24 horas e posteriormente, foram fotografadas em microscópio invertido (campo claro) para análises de alterações morfológicas. Imagens são representativas de macrófagos nas diferentes concentrações de um mesmo doador.

A avaliação da modulação da polarização dos macrófagos também foi avaliada através de marcadores de superfície por citometria de fluxo (Figura 9), bem como pela expressão de genes associados aos diferentes perfis (Figura 10). Dentre os marcadores de superfície, foram demonstradas as expressões de CD206 e CD163, definidos como marcadores da polarização de macrófagos. A avaliação da polarização permitiu observar que, como esperado, houve redução da frequência de células CD206+ quando as mesmas foram submetidas à condição polarizante para M1, com adição de IFN- γ quando comparados ao grupo que receberam IL-4 e IL-13 ou apenas meio (Figura 9A). Ademais, podemos observar que ao avaliar o efeito do tratamento na expressão deste marcador, demonstramos um aumento na porcentagem de células positivas para CD206 quando comparamos os grupos tratados com Decitabina com aqueles que receberam apenas o veículo, nas mesmas condições polarizantes para M1 e M2, bem como na expressão média por célula, representada pela intensidade média de fluorescência (Figura 9A e 9B, respectivamente). Quanto à expressão de CD163, nenhuma diferença foi observada em relação às condições polarizantes, bem como o tratamento com Decitabina não promoveu nenhuma regulação na expressão deste receptor de superfície, como demonstrado nas Figuras 9C e 9D.

Adicionalmente, o efeito do tratamento sobre a polarização de macrófagos foi também avaliado pela expressão gênica de CXCL10 e ALOX15, utilizados respectivamente como marcadores para os perfis M1 e M2. Como observado na Figura 10, independente do tratamento com o agente hipometilante, macrófagos polarizados na presença de IFN- γ apresentaram aumento na expressão gênica de CXCL10, apesar de não significativo, mostrando que o tratamento não impede a polarização para este perfil celular (Figura 10A). Em relação aos marcadores M2, corroborando o aumento do receptor de superfície CD206, observamos que a expressão de ALOX15 foi maior nas condições que receberam IL-4 e IL-13 para polarização deste perfil de macrófagos, quando comparados aos cultivados com IFN- γ e meio. De maneira interessante, o tratamento com Decitabina, quando comparados aos macrófagos diferenciados na presença do veículo, nas três condições analisadas – M0, M1 e M2, demonstrou induzir a expressão gênica de ALOX15 (Figura 10B), sugerindo um possível efeito do tratamento com o agente hipometilante na polarização celular de macrófagos para um perfil alternativo de resposta.

Figura 9. Efeito do tratamento com Decitabina na expressão dos receptores de superfície, CD206 e CD163 durante a polarização *in vitro* de macrófagos M1 e M2.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5 μ M. ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram estimulados com citocinas para polarização de macrófagos. O perfil M1 foi definido pela adição no meio de cultura de IFN- γ (100 ng/mL), M2 por IL-4 e IL-13 (50 ng/mL cada) e M0 sem adição de nenhuma citocinas polarizantes. As células foram mantidas em cultura por mais 24 horas e posteriormente, foram marcadas para análises da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo. Foram analisadas as expressões de CD206 (Alexa flúor 488) e CD163 (APC). Os resultados foram expressos em % de células positivas e média de intensidade de fluorescência (MFI). Os dados, representados em caixa de distribuição (n=6), foram analisados através de teste ANOVA para mediadas repetidas, seguido de teste Tukey para avaliação do efeito da estimulação com as condições polarizantes, com $p < 0,05$ (#) M0 vs M1, M2 vs M1). Para avaliação do efeito do tratamento em relação ao seu veículo em cada uma das condições, utilizamos teste *t* pareado com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

Figura 10. Efeito do tratamento com Decitabina na expressão gênica dos marcadores CXCL10 e ALOX15 durante a polarização *in vitro* de macrófagos M1 e M2.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5 μ M ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram estimulados com citocinas para polarização de macrófagos. O perfil M1 foi definido pela adição no meio de cultura de IFN- γ (100 ng/mL), M2 por IL-4 e IL-13 (50 ng/mL cada) e M0 sem adição de nenhuma citocinas polarizantes. As células foram mantidas em cultura por mais 24 horas e posteriormente, foram submetidas a protocolo de extração de cDNA para avaliação da expressão gênica de CXCL10 (A) e ALOX15 (B), marcadores respectivamente do perfil M1 e M2. A expressão relativa foi calculada através da fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ utilizando para normalização a média do Ct do grupo M0 veículo. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD (n=5). Os dados foram analisados através de teste ANOVA para mediadas repetidas, seguido de teste Tukey para avaliação do efeito da estimulação com as condições polarizantes, com $p < 0,05$ (#) M2 vs M0, M2 vs M1). Para avaliação do efeito do tratamento em relação ao seu veículo em cada uma das condições, utilizamos teste t pareado com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

Além da caracterização dos marcadores de polarização descritos, a modulação da expressão de marcadores de superfície e produção de citocinas que auxiliam na função dos macrófagos em direcionar a resposta de células T também foram avaliados. Assim, determinamos a expressão gênica das citocinas IL-12, importante para a polarização do perfil Th1 de resposta e de IL-10, associada com respostas reguladoras, direcionada principalmente por macrófagos do perfil M2.

Como observado na Figura 11, não foi possível observar diferenças quanto à expressão de IL-12. Apesar de não significativo, o tratamento com Decitabina, de maneira contrária ao esperado com base no observado nos resultados anteriores, apresentou maior expressão de IL-12 quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo, na condição de “*resting*”, ou seja, sem adição das citocinas polarizantes. Nas avaliações com adição de IFN- γ ou IL-4 e IL-13, a expressão foi muito semelhante entre os tratamentos, indicando ausência de efeito do agente hipometilante (Figura 11A). Ao avaliarmos a expressão de IL-10 (Figura 11B), uma tendência de aumento na expressão desta citocina foi observada quando os macrófagos foram diferenciados na presença de Decitabina, tanto na condição M0, quanto na indução do perfil M2 com adição das citocinas polarizantes para o perfil. Adicionalmente, a polarização na presença de IFN- γ pareceu reduzir a expressão de IL-10 em ambos os tratamentos.

Juntamente com as citocinas, a expressão de moléculas de MHCII (HLA-DR) e moléculas co-estimuladoras são primordiais para a estimulação da resposta adaptativa, estando associada à ativação ou anergia destas células. Assim, a expressão destas moléculas de superfície foi avaliada nos diferentes perfis de macrófagos, diferenciados e polarizados na presença ou não do agente hipometilante. De maneira geral, observamos que a polarização, independente do tratamento das células, não modulou a expressão de HLA-DR, sendo semelhante entre os macrófagos M0, M1 e M2. Quando observamos o efeito do tratamento com Decitabina, demonstramos um aumento na frequência de células positivas para HLA-DR nos macrófagos que receberam estimulação de IL-4 e IL-13 (Figura 12A). Em relação à expressão média por célula, o tratamento com Decitabina aumentou a expressão de HLA-DR nas células nas condições M0 e M1 (Figura 12B), bem como foi observada uma tendência de aumento para a população M2 diferenciada na presença do composto.

A expressão média de moléculas co-estimuladoras, por sua vez, foi maior em macrófagos ativados para o perfil M2 (Figura 12D), de maneira contraditória ao esperado, visto que a expressão deste marcador está mais associada ao perfil M1. Por fim, ao avaliar o efeito do tratamento hipometilante, foi possível observar uma redução na porcentagem de células positivas para CD86 (Figura 13C), bem como uma inibição na expressão média por células

deste marcador em macrófagos polarizados para M2 (Figura 12D), corroborando os outros achados até o momento, que sugerem modulação destas células para o perfil mais imunoregulador.

Figura 11. Modulação exercida pelo tratamento com Decitabina sobre a expressão das citocinas IL-12 e IL-10 durante a polarização de macrófagos.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5 μ M ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram estimulados com citocinas para polarização de macrófagos. O perfil M1 foi definido pela adição no meio de cultura de IFN- γ (100 ng/mL), M2 por IL-4 e IL-13 (50 ng/mL cada) e M0 sem adição de nenhuma citocinas polarizantes. As células foram mantidas em cultura por mais 24 horas e posteriormente, foram submetidas a protocolo de extração de RNA para avaliação da expressão gênica de IL-12 (A) e IL-10 (B), importantes citocinas produzidas por macrófagos, associadas a regulação de respostas de células T. A expressão relativa foi calculada através da fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ utilizando para normalização a média do Ct do grupo M0 veículo. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD (n=4). Os dados foram analisados através de teste ANOVA para mediadas repetidas, seguido de teste Tukey para avaliação do efeito da estimulação com as condições polarizantes, com $p < 0,05$ (#) M2 vs M0, M2 vs M1). Para avaliação do efeito do tratamento em relação ao seu veículo em cada uma das condições, utilizamos teste t pareado com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

Figura 12. Efeito do tratamento com Decitabina em relação à expressão de marcadores de ativação de macrófagos

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5 μ M ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram estimulados com citocinas para polarização de macrófagos. O perfil M1 foi definido pela adição ao meio de cultura de IFN- γ (100 ng/mL), M2 por IL-4 e IL-13 (50 ng/mL cada) e M0 sem adição de nenhuma citocinas polarizantes. As células foram mantidas em cultura por mais 24 horas e posteriormente, foram marcadas para análises da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo. Foram analisadas as expressões HLA-DR (A e B) e CD86 (C e D). Os resultados foram expressos em % de células positivas e média de intensidade de fluorescência (MFI). Os dados, representados em caixa de distribuição (n=6), foram analisados através de teste ANOVA para mediadas repetidas, seguido de teste Tukey para avaliação do efeito da estimulação com as condições polarizantes, com $p < 0,05$ (#) M0 vs M1, M2 vs M1). Para avaliação do efeito do tratamento em relação ao seu veículo em cada uma das condições, utilizamos teste t pareado com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

Visto a possível modulação na diferenciação destas células e sabendo que o perfil de polarização dos macrófagos influencia diretamente o controle dos mecanismos da resposta imune, dentre os quais processos infecciosos, avaliamos o controle da infecção por Mtb pelos macrófagos diferenciados na presença do agente hipometilante. Assim, após a diferenciação na presença de Decitabina ou DMSO, os macrófagos foram infectados com Mtb por 24 horas para determinação das bactérias recuperadas (Figura 13) e a produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 após o período de infecção (Figura 14).

Assim, corroborando o efeito do tratamento em potencializar a polarização para o perfil M2, observamos maior quantidade de bactérias recuperadas após 24 de infecção dos macrófagos quando os mesmos foram diferenciados na presença de Decitabina, indicando uma redução na capacidade microbicida destas células, como já demonstrado nos experimentos de pré-tratamento de monócitos (Figura 13). Em conjunto com a atividade microbicida, a produção de citocinas pelos macrófagos após a infecção por Mtb também foi determinada, como pode ser observado na Figura 14. Podemos observar que o modelo de infecção estudado promoveu aumento na produção dos três mediadores imunológicos avaliados, tanto nas células controle como no grupo tratado com o agente hipometilantes, não havendo prejuízo da resposta pelo tratamento. Porém, apesar do aumento da expressão dos marcadores para o perfil M2, os macrófagos diferenciados na presença de Decitabina não demonstraram perfil anti-inflamatório de produção de citocinas, apresentando a mesma capacidade dos macrófagos tratados apenas com o veículo de produzir elevadas quantidades de IL-1 β (Figura 14A), TNF- α (Figura 14B) e IL-10 (Figura 14C).

Figura 13. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade microbicida de macrófagos.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5µM ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram infectadas com Mtb H37Rv (MOI 5) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após este período, a atividade microbicida foi avaliada através da quantificação das unidades formadoras de colônia (CFUs) recuperadas. Para tal, foi adicionada saponina 0,2% para promover a lise das células e recuperação das bactérias internalizadas. A suspensão bacteriana foi diluída em PBS 1X e distribuídas em placas de 7H11, que foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, quantificação de CFUs após 21 dias de incubação. Os dados estão apresentados em média ± SD (n=6), foram analisados através de teste t pareado, considerando p<0.05.

Figura 14. Avaliação da influência do tratamento hipometilante sobre produção de citocinas pelos macrófagos após estimulação com Mtb.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5 μ M ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram infectadas com Mtb H37Rv (MOI 5) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas (A) IL-1 β , (B) TNF- α e (C) IL-10 através de ensaio multiplex. Os dados estão apresentados em média $\pm$ SD (n=6), foram analisados através ANOVA para medidas repetidas, seguida de teste Tukey, considerando $p < 0,05$ (# – não infectados vs infectado com Mtb). Para avaliação do efeito do tratamento em relação ao seu veículo em cada uma das condições, utilizamos teste t pareado com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

Uma vez analisado o perfil de polarização e os efeitos funcionais gerados pelo tratamento com os agentes hipometilantes, buscamos também compreender a modulação exercida pelo composto epigenético sobre a regulação das enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Assim, sabendo-se que as DNMTs apresentam importante papel durante a diferenciação e polarização de macrófagos e constituem o principal alvo do tratamento com os agentes hipometilantes, avaliou-se expressão das principais enzimas desta classe: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, demonstrado nas Figuras 15A, B e C, respectivamente. Como observado, a expressão gênica das enzimas foi muito variável entre os indivíduos de cada um dos grupos, principalmente após o tratamento com Decitabina, não permitindo a detecção de diferenças significativas quando comparamos os macrófagos diferenciados na presença de 5 μ M de Decitabina e as células tratadas apenas com o veículo.

Quando avaliamos o envolvimento destas enzimas na polarização de macrófagos, independente do tratamento, ou seja, quando comparamos apenas as células que receberam veículo durante a diferenciação e foram estimuladas para os diferentes perfis de macrófagos, foi possível observar uma tendência à redução na expressão das DNMTs nos macrófagos polarizados para o perfil M2, encontrando diminuição significativa na expressão da enzima DNMT1 nos macrófagos M2 quando comparados às células M1 (Figura 15A). As enzimas DNMT3A e DNMT3B também apresentaram diminuição em células deste perfil, porém não foi possível obter diferenças estatísticas em nossa avaliação (Figura 15B e 15C).

Figura 15. Expressão das enzimas DNMTs:modulação durante a polarização de macrófagos e avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante.

Monócitos de indivíduos saudáveis foram isolados de sangue periférico através de seleção magnética CD14⁺ e cultivados por 6 dias em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 ng/mL de GM-CSF na presença de Decitabina 5μM ou DMSO para diferenciação em macrófagos. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram estimulados com citocinas para polarização de macrófagos. O perfil M1 foi definido pela adição no meio de cultura de IFN-γ (100 ng/mL), M2 por IL-4 e IL-13 (50 ng/mL cada) e M0 sem adição de nenhuma citocinas polarizantes, As células foram mantidas em cultura por mais 24 horas e posteriormente, foram submetidas a protocolo de extração de RNA para avaliação da expressão gênica de DNMT1 (A) e DNMT3A (B) e DNMT3B (C). A expressão relativa foi calculada através da fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ utilizando para normalização a média do Ct do grupo M0 veículo. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD (n=4). Os dados foram analisados através de teste ANOVA para mediadas repetidas, seguido de teste Tukey com $p < 0.05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

5.3. Tratamento com Decitabina modula a resposta imune na infecção por Mtb: modelo de co-cultura e indução de estruturas granuloma-like

Sabemos que durante a infecção por Mtb, além da modulação da função dos monócitos e macrófagos, a interação destas células com os linfócitos T pode direcionar a resposta desenvolvida pelo hospedeiro e garantir o controle da doença. Neste sentido, propusemos avaliar a modulação exercida em ensaios de co-cultura de células mononucleares de sangue periférico, mimetizando estruturas de granuloma *in vitro*, como já descrito por outros autores (Birkness *et al.*, 2007; Je *et al.*, 2016; Yamashiro *et al.*, 2016). Baseados nestes trabalhos, as células mononucleares foram cultivadas em placas revestidas com agarose, para reduzir a aderência celular, favorecendo a formação de agregados celulares após a infecção por Mtb. Em nosso modelo, após isolamento das células, as mesmas foram distribuídas em placas de 48 poços revestidas com agarose, tratadas com DMSO ou 5 μ M de Decitabina e incubadas por 24 horas. Após este período, as células foram infectadas com bacilos de Mtb (MOI 0,01) e avaliamos o efeito do agente hipometilante sobre a função celular após sete dias de infecção.

Inicialmente, através de imagens obtidas em microscopia de inversão, avaliamos a formação dos granulomas, como mostrado na Figura 16. Observamos que tais estruturas foram formadas de maneira semelhante para as três condições observadas – células não tratadas, controle DMSO e tratamento com 5 μ M de Decitabina, correspondente às Figuras 16A, 16B e 16C, respectivamente. Para visualização mais precisa das estruturas formadas, os agregados celulares foram coletados e fixados em lâminas por Cytospin para observação das bactérias e células através de técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen, com contra coloração de azul de metileno. Assim, como demonstrado na Figura 16D, 16E e 16F, podemos observar maior dispersão celular (em azul) e presença de maior quantidade de bactérias, formando aglomerados, nas estruturas que foram formadas na presença do composto hipometilante, porém tais achados são meramente ilustrativos e sugestivos de afrouxamento da estrutura de granuloma, sendo necessária a confirmação por outras técnicas mais precisas.

Figura 16. Microscopia óptica da formação de estrutura semelhante ao granuloma *in vitro* após infecção com Mtb H37R.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de Ficoll e distribuídas (1×10^6 células/poço) em placas de 24 poços revestidas com camada de agarose ($230 \mu\text{L}$ /poço). As células foram então, incubadas em meio RPMI suplementada com soro humano (10%) por período de 24 horas na presença de $5 \mu\text{M}$ de Decitabina, DMSO ou apenas meio. No dia seguinte, as células foram infectadas com Mtb H37Rv (1×10^4 bactérias/poço) e incubadas a 37°C e 5% CO_2 para indução do granuloma por 7 dias. Após o período de infecção, as células foram analisadas em microscópio invertido (objetiva 5X) e as imagens foram capturadas através de câmera fotográfica. As fotos correspondem a (A) não tratadas, (B) DMSO e (C) Decitabina $5 \mu\text{M}$, respectivamente. As estruturas formadas após 7 dias de infecção foram recuperadas da placa, fixadas com solução de formaldeído 1% e aderidas em lâmina através de técnica de Cytospin, seguida de coloração de Ziehl-Neelsen e azul de metileno para avaliação dos bacilos (corados em rosa) e das células (coradas em azul). As imagens (D), (E) e (F) representam respectivamente as células não tratadas, DMSO e Decitabina e foram obtidas através câmera acoplada a microscópio, objetiva de 40X (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha). As imagens correspondem as estruturas obtidas de um indivíduo, representativo de 8 experimentos independentes.

Para avaliar quantitativamente a modulação exercida pelo tratamento com Decitabina neste modelo de infecção, determinou-se a atividade microbida através da quantificação de bacilos viáveis recuperados após sete dias de infecção. Como demonstrado na Figura 17A, o tratamento não influenciou a capacidade das células de controlar a infecção, visto a similaridade entre as médias obtidas para a contagem de CFU nos diferentes grupos, apesar das imagens com coloração de Ziehl-Neelsen sugerirem a presença de maior número de bacilos quando os granulomas foram formados na presença do composto epigenético. Em virtude da grande variação individual na recuperação dos bacilos, calculamos a porcentagem de atividade microbida, considerando a contagem de CFU das células não tratadas como 100%. Através desta normalização, apesar de não observar diferenças significativas, demonstrou-se que as células tratadas com Decitabina apresentaram prejuízo no controle do bacilo, com aumento de aproximadamente 38% na quantidade de bactérias viáveis recuperadas após os sete dias de infecção avaliados (Figura 17B).

Adicionalmente à avaliação do controle da infecção, foi possível observar modulação exercida pelo tratamento na produção de mediadores imunológicos produzidos por estas células. Ao avaliar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , demonstrou-se que o tratamento com Decitabina reduziu de maneira significativa a produção destes mediadores após 7 dias de infecção, quando comparados ao grupo que recebeu apenas o veículo DMSO (Figura 18A, 18B e 18C). Tal efeito do tratamento não foi observado na quantificação da citocina anti-inflamatória IL-10, uma vez que o tratamento não influenciou a produção deste mediador após os sete dias de infecção (Figura 19D), promovendo uma desregulação entre os mediadores pró e anti-inflamatórios.

A redução no controle da infecção, demonstrado pelo número maior de bactérias recuperadas após os sete dias de cultura, bem como a diminuição das citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta à infecção poderiam ser resultado de toxicidade celular do tratamento. Assim, para demonstrar que tais efeitos são decorrentes de imunomodulação, avaliou-se a viabilidade celular através de marcação com sonda por citometria de fluxo. Como observado na Figura 19, quando as células foram tratadas com agente hipometilante houve redução da viabilidade, com aumento significativo na porcentagem de células mortas quando comparadas ao grupo controle na condição sem infecção. Demonstrou-se também que a infecção não induziu alterações na viabilidade celular e, nas condições infectadas, o tratamento com Decitabina não apresentou efeitos sobre a sobrevivência das células. Sendo assim, a modulação induzida pelo tratamento após a infecção por Mtb, observada pela alteração na produção de citocinas, não foi decorrente de redução das células viáveis, mas sim, de efeitos do

tratamento sobre esta função celular, corroborando os achados de macrófagos, com indução de perfis reguladores da resposta imune.

Figura 17. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade microbicida em modelo de granuloma *in vitro*

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de Ficoll e distribuídas (1×10^6 células/poço) em placas de 24 poços revestidas com camada de agarose ($230 \mu\text{L}$ /poço). As células foram então, incubadas em meio RPMI suplementada com soro humano (10%) por período de 24 horas na presença do $5 \mu\text{M}$ de Decitabina, DMSO ou não tratadas. No dia seguinte, as células foram infectadas com Mtb H37Rv (1×10^4 bactérias/poço) e incubadas a 37°C e 5% CO_2 para indução do granuloma por 7 dias. Após o período de infecção, foi adicionada saponina 0,2% para promover a lise das células e recuperação das bactérias internalizadas. A suspensão bacteriana foi diluída em PBS 1X e distribuídas em placas de 7H11, que foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 , quantificação de unidades formadoras de colônia. (A) As CFUs foram quantificadas após 21 dias de incubação. Os dados estão apresentados em média $\pm$ SEM ($n=7$), foram analisados através de teste ANOVA para amostras repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p<0.05$. (B) A atividade microbicida foi calculada a partir da contagem de CFU, considerando como 100% a quantidade de colônias recuperadas no grupo não tratado, de acordo com a fórmula: $[(\text{CFU dos tratamentos} - \text{DMSO ou Decitabina}) * 100] / \text{CFU não tratado}$. Os resultados, expressos em média $\pm$ SEM ($n=7$) da Unidade Relativa de Fluorescência (RFU), foram analisados por teste de ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p<0.05$.

Figura 18. Modulação na produção de mediadores imunológicos após tratamento com agente hipometilante Decitabina durante infecção por Mtb.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de Ficoll e distribuídas (1×10^6 células/poço) em placas de 24 poços revestidas com camada de agarose (230 μ L/poço). As células foram então, incubadas em meio RPMI suplementada com soro humano (10%) por período de 24 horas na presença do 5 μ M de Decitabina, DMSO ou não tratadas. No dia seguinte, as células foram infectadas com Mtb H37Rv (1×10^4 bactérias/poço) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ para indução do granuloma por 7 dias. Após o período de infecção, o sobrenadante da cultura foi coletado para quantificação de IL-1 β (A), TNF- α (B), IFN- γ (C) e IL-10 (D) através de ELISA. Os dados estão apresentados em média $\pm$ SEM (n=8), foram analisados através de teste ANOVA para amostras repetidas, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando p<0.05 (*), p<0,01 (**).

Figura 19. Avaliação do efeito do agente hipometilante sobre a viabilidade celular em modelo de granuloma *in vitro*

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de Ficoll e distribuídas (1×10^6 células/poço) em placas de 24 poços revestidas com camada de agarose ($230 \mu\text{L}$ /poço). As células foram então, incubadas em meio RPMI suplementado com soro humano (10%) por período de 24 horas na presença do $5 \mu\text{M}$ de Decitabina, DMSO ou não tratadas. No dia seguinte, as células foram infectadas com Mtb H37Rv (1×10^4 bactérias/poço) e incubadas a 37°C e 5% CO_2 para indução do granuloma por 7 dias. Após o período de infecção, as células foram recuperadas a placa e o precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de PBS contendo $1 \mu\text{L}$ da sonda fluorescente diluída em DMSO (conforme instruções do fabricante). A suspensão foi incubada à temperatura ambiente, protegida da luz por 30 minutos. Após incubação, as células foram lavadas através da adição de PBS 1X e fixadas em solução de formaldeído (PBS 1% formol). A avaliação da viabilidade foi realizada através de citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, EUA), sendo as células não viáveis aquelas marcadas pela sonda. **(A), (B) e (C)** Imagens representativas das análises de citometria de fluxo de um indivíduo, sendo célula não tratada, DMSO e Decitabina $5 \mu\text{M}$, respectivamente. **(D)** Média dos indivíduos analisados. Os resultados, expressos em porcentagem de células vivas e mortas (marcadas ou não) ($n=3$), foram avaliados através de teste ANOVA não paramétrico para mediadas repetidas, considerando $p < 0,05$ (*).

CAPÍTULO 2

5.4. Uso de agentes hipometilantes no tratamento da SMD: implicações hematológicas e imunológicas

Para esta etapa do trabalho, visando avaliar sistemicamente a ação dos agentes hipometilantes, utilizou-se como estratégia a determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) em tratamento ou não com azacitidina. Para avaliação deste efeito imunomodulador, foram recrutados 16 pacientes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica que são acompanhados no Ambulatório de Leucemias Agudas (HLA) – Hematologia, no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, com colaboração da Profa. Dra. Fabíola Traina, médica hematologista. Os dados gerais dos pacientes já coletados podem ser observados na Tabela 2, que compreende informações sobre idade, gênero e classificação da doença hematológica, com dados clínicos do momento do diagnóstico. A média de idade dos pacientes foi de 62 anos, variando de 26-76 anos, sendo 9 homens e 7 mulheres. Quanto à classificação, podemos observar 3 pacientes classificados como SMD-EB, que correspondem aos casos mais graves, com porcentagem de blastos na medula óssea entre 5 e 19%, 7 pacientes SMD-DML, com displasia de múltiplas linhagens, 5 SMD-DUL, com displasia de linhagem única, 1 caso de SMD com sideroblasto em anel, tendo as quatro últimas classificações com frequência de blastos inferior a 5% na medula óssea. Todos os pacientes não receberam nenhum tratamento específico para mielodisplasia, como quimioterápicos, apenas reposição de hemocomponentes ou de nutrientes.

O grupo de pacientes em tratamento com agente hipometilante Azacitidina (5-AZAC), composto por pacientes SMD com tempo de tratamento superior a seis ciclos, foi recrutado em colaboração com o serviço de Hematologia do Hospital Dia, no Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina USP (HC-FMUSP), campus São Paulo, com auxílio da Profa. Dra. Elvira D. Rodrigues Pereira Velloso e sua equipe, os dados gerais deste grupo estão descritos na Tabela 3. Neste grupo a média de idade dos participantes foi de 72 anos, variando de 68 a 79 anos, sendo 3 homens e 1 mulher. Quanto à classificação da OMS, 2 pacientes apresentavam SMD-DML, sendo um destes com presença de sideroblastos em anel, um com SMD-EB e um paciente com SMD/NMP, sendo classificado com leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). Dentre os pacientes, dois encontravam-se no sexto ciclo de tratamento, um no oitavo e, o último, no trigésimo ciclo.

Por fim, para composição do grupo controle, como mencionado no item Casuística em Materiais e Métodos, foram utilizadas amostras de Biorepositório pertencente ao Laboratório da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro. A média de idade dos indivíduos do grupo controle foi

de 56 anos, com variação de 23 a 78 anos, sendo constituído por 18 mulheres e 12 homens. A tabela 4 mostra a composição dos três grupos de estudos que serão avaliados quanto aos parâmetros hematológicos e imunológicos na data da coleta.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes do grupo SMD em tratamento suporte

ID	Gênero	Idade (anos)	Classificação OMS	IPSS	HB (g/dL)	Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	Plaqueta ($10^3/\mu\text{L}$)	Blastos M.O. (%)	Cariótipo
SMD01	M	59	SMD-EB	Alto	8,7	0,9	24	12,00%	51-57,XY, del(3)(p13),-3,-5, del(11)(q23), -16,-18,+8,~15,mar [16]/46, XY [4]
SMD02	M	73	SMD-EB	Alto	7,8	2,7	83	15	46,XY
SMD04	M	66	SMD-DML	Baixo	12,5	1,1	126	0	46,XY
SMD05	F	48	DUL/HIPOPLÁSTICA	Baixo	12,9	1,4	30	0	46,XX
SMD06	F	52	SMD-DUL	Baixo	9,3	3,3	575	3	46,XX
SMD07	M	67	SMD-DUL	Intermediário	10,1	0,7	165	7	46,XY,del(20)(q11)[23]/47,idem,+mar[2]
SMD08	F	60	SMD-DUL	Baixo	14,2	2,1	177	0	46,XX
SMD09	M	49	SMD-EB	Alto	13,8	2,7	149	15	INCONCLUSIVO
SMD10	F	72	SMD-DML	Baixo	7,5	1,9	135	2	46,XX
SMD11	M	67	SMD-DML	Baixo	13,3	1,7	97	4	46,XY
SMD12	F	64	SMD-DUL	Baixo	9,1	2,1	246	2	NÃO
SMD13	F	76	SMD-SA	Baixo	9	4,3	636	1	46,XX
SMD14	M	26	SMD-DML	Intermediário	12,2	7,6	44	3	46,XY
SMD15	F	70	SMD-DML	Baixo	12,5	1,3	70	2	46,XX
SMD16	M	75	SMD-DML	Baixo	14,4	0,4	84	4	46,XY
SMD17	M	69	SMD-DML	Intermediário	6,7	2	56	2	46, XY, del(20)(q11)

Características gerais dos pacientes em tratamento de suporte. SMD: Síndrome Mielodisplásica; M: masculino; F: feminino; SMD-EB: síndrome mielodisplásica com excesso de blastos; SMD-DML: síndrome mielodisplásica com displasia de múltiplas linhagens; SMD-DUL: síndrome mielodisplásica com displasia de única linhagem; SMD-SA: síndrome mielodisplásica com sideroblastos em anel, SMD-5q: síndrome mielodisplásica com deleção do braço longo do cromossomo 5; OMS: Organização Mundial de Saúde, IPSS: *International Prognostic Scoring-System*; Hb: hemoglobina

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes do grupo SMD em tratamento hipometilante

Grupo	Gênero	Idade (anos)	Nº de ciclo de azacitidina	Classificação OMS	IPSS	Hb (g/dL)	Neutrófilos (10³/µL)	Plaquetas (10³/µL)	Blastos M.O. (%)	Cariótipo
SMD-AZA1	M	79	06	LMMC	n.a.	12	9,82	40	19,6	46,XY[20]
SMD-AZA2	M	70	06	SMD-DML	Intermediário	10,3	2,4	14	1,6	46,XY[20]
SMD-AZA3	F	71	30	SMD-EB	Intermediário	10,5	0,8	139	8,4	46,XX[20]
SMD-AZA4	M	68	08	SMD-DML- SidA	Intermediário	5,4	2,51	94	0,8	46,XY,i(17)(q10)[20]

Características gerais dos pacientes em tratamento de suporte. SMD-AZA: Síndrome Mielodisplásica em tratamento com azacitidina; M: masculino; F: feminino; LMMC – Leucemia Mielomonocítica crônica; SMD-EB: síndrome mielodisplásica com excesso de blastos; SMD-DML: síndrome mielodisplásica com displasia de múltiplas linhagens; SMD-SA: síndrome mielodisplásica com sideroblastos em anel; OMS: Organização Mundial de Saúde, IPSS: *International Prognostic Scoring-System* ;Hb: hemoglobina

Tabela 2. Perfil dos grupos de estudo

Grupo	Número amostral	Idade (anos)	Gênero (M/F)
CTRL	30	56 (23-78)	12/18
SMD	16	62 (26-76)	9/7
SMD-AZA	04	72 (68-79)	3/1

Características gerais dos grupos de trabalho, evidenciando o número de indivíduos por grupo (n), média de idade e variação dentro de cada grupo (idade mínima e máxima) e gênero (distribuição de gênero masculino (M) e feminino (F)).

Inicialmente os pacientes foram avaliados quanto às características hematológicas, principais alterações clínicas observadas na doença. Como demonstrado na Figura 20, os pacientes com SMD apresentaram redução na quantificação de hemoglobina, na contagem absoluta de neutrófilos e de plaquetas quando comparados aos indivíduos do grupo controle. A diminuição destes parâmetros em relação aos indivíduos hígidos era esperada, decorrente da disfunção medular observada na Síndrome Mielodisplásica com manifestações periféricas de citopenias, principalmente anemia, neutropenia e plaquetopenia, também demonstrados em nosso grupo amostral (Figura 20).

De maneira semelhante aos pacientes não tratados, o grupo SMD-AZA demonstrou redução significativa em relação ao grupo controle na concentração de hemoglobina, número de neutrófilos e de plaquetas. Observamos também uma diminuição significativa na contagem absoluta de linfócitos nos pacientes em tratamento quando comparados aos indivíduos hígidos. Em relação a contagem absoluta de monócitos, células alvo para avaliação dos efeitos dos agentes hipometilantes neste trabalho, não foi possível observar nenhuma alteração decorrentes da doença, nem do tratamento com AZA. Vale ressaltar que o indivíduo SMD-AZA1, que compõe o grupo de pacientes em tratamento, apresenta-se como “*outlier*”, com contagem de monócitos muito acima da média do grupo. Tal alteração é decorrente da classificação da doença, que corresponde a SMD/NMP, caracterizada clinicamente pelo aumento desta população celular no sangue periférico.

Por fim, assim como para os demais parâmetros avaliados, não se observou alterações significativas em relação à porcentagem de blastos na medula. Este parâmetro foi obtido através

de análise de dados clínicos dos pacientes, com avaliação dos mielogramas realizados para diagnóstico, não sendo aplicado para os indivíduos do grupo controle.

Figura 20. Avaliação do efeito do tratamento com azacitidina sobre os parâmetros clínicos em pacientes com SMD

Dados de hemograma e porcentagem de blastos na medula óssea foram obtidos através de análises de parâmetros clínicos (prontuários) de pacientes com SMD que receberam apenas tratamento de suporte, SMD em tratamento com agente hipometilante azacitidina (SMD-AZA) e indivíduos saudáveis. Os grupos foram avaliados quanto à concentração de hemoglobina (A), contagem absoluta de neutrófilos (B), contagem de plaquetas (C), número absoluto de monócitos (D), linfócitos (E) e porcentagem de blastos na medula óssea. Cada ponto representa um indivíduo, sendo os dados analisados através de teste de análise de variância não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn's para comparações entre os grupos, considerando $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Os dados de porcentagem de blastos foram avaliados através de teste não paramétrico Mann Whitney, comparando apenas os grupos de pacientes com SMD. A faixa cinza representa os valores de referência para cada um dos parâmetros avaliados. NA – não avaliado

Tendo em vista a heterogeneidade dos pacientes incluídos neste estudo, sobretudo quando avaliamos os pacientes em tratamento com o agente hipometilantes, os indivíduos foram avaliados em relação a estes parâmetros comparando a condição apresentada antes do início dos ciclos de azacitidina com o momento mais próximo da realização da nossa coleta para inclusão no estudo. Como demonstrado na Figura 21, observou-se uma grande variação na resposta dos indivíduos ao tratamento, e consequentemente, nenhuma alteração significativa pôde ser detectada quanto à quantificação de hemoglobina, contagem absoluta de neutrófilos, plaquetas, monócitos, linfócitos e porcentagem de blastos na medula óssea. Dentre os parâmetros, apesar de não significativos, houve redução na porcentagem de blastos na medula óssea para a três dos quatro pacientes avaliados (Figura 21F) e aumento na contagem absoluta de plaquetas para todos os pacientes, mesmo que de maneira sutil (Figura 21C). A concentração de hemoglobina apresentou aumento expressivo em apenas um dos pacientes avaliados, sendo nos demais inalterada ou com variação sutil (Figura 21A), enquanto o número absoluto de neutrófilos, monócitos e linfócitos apresentou redução para a maioria dos pacientes após a realização dos ciclos de azacitidina, como esperado pelo efeito da terapia (Figura 21B, D e E, respectivamente).

Figura 21. Avaliação dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com azacitidina

Dados de hemograma e porcentagem de blastos na medula óssea foram obtidos através de análises de parâmetros clínicos (prontuários) de pacientes com SMD em tratamento com agente hipometilante azacitidina (SMD-AZA) em momento anterior ao início dos ciclos e após o tratamento. Os indivíduos foram avaliados quanto à concentração de hemoglobina (A), contagem absoluta de neutrófilos (B), contagem de plaquetas (C), número absoluto de monócitos (D), linfócitos (E) e porcentagem de blastos na medula óssea. Cada ponto representa um indivíduo, sendo os dados analisados através de teste pareado não paramétrico, considerando $p < 0,05$ (*).

Também avaliamos os pacientes do ponto de vista imunológico, através da quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma destes pacientes, buscando compreender os efeitos do tratamento com os compostos epigenéticos sobre os mecanismos da resposta imune (Figura 22). Para esta compreensão, fez-se necessário inicialmente avaliar as alterações decorrentes da doença em si, e foi possível observar que os pacientes com SMD que receberam apenas o tratamento de suporte apresentaram redução nas concentrações plasmáticas da maioria das citocinas observadas. Quando comparados ao grupo controle, demonstrou-se diminuição significativa para TNF- α , IL-1 β , RANTES (CCL5), IL-12, IFN- γ , IL-17 e IL-2 para o grupo com mielodisplasia. Em adição, os pacientes SMD apresentaram aumento na concentração de IP-10, bem como citocinas que não foram alteradas com a doença, tais quais, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-4.

Quando os pacientes em tratamento com azacitidina foram avaliados, pode-se notar que dentre as citocinas avaliadas, o tratamento induziu a liberação de IL-8, com aumento significativo em relação ao grupo controle e ao grupo SMD em tratamento de suporte, bem como intensificou a quantificação da já aumentada quimiocina IP-10. De maneira interessante, porém, no grupo em tratamento com agente hipometilante observou-se aumento significativo nas concentrações da maioria das citocinas e quimiocinas que apresentaram redução decorrente da doença observada no grupo não tratado, com níveis séricos semelhantes ao grupo controle. Desta maneira, demonstrou-se aumento TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-17 e IL-2, bem como aumentou IL-4 em relação ao grupo SMD em tratamento de suporte. Nenhuma alteração foi observada para IL-6 e IL-10, tanto quando se considerou apenas a doença, quanto o efeito do tratamento. Apesar das diferenças observadas entre o grupo de paciente em tratamento com azacitidina, não se pode sugerir efeito direto do agente hipometilante, visto a heterogeneidade da doença, como já mencionado.

Figura 22. Quantificação de citocinas e quimiocinas: avaliação da modulação exercida pela SMD e o efeito após o tratamento com azacitidina

Quantificação de citocinas e quimiocinas em amostras de plasma de indivíduos controle (n=30), pacientes com SMD em tratamento de suporte (n=14) e tratados com azacitidina (n=4). Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, IL-8, IP-10, IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-2, RANTES e IL-10. Cada ponto é representativo de um indivíduo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de teste de análise de variância não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn's para comparações entre os grupos, considerando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

Juntamente com as citocinas, os parâmetros imunológicos também foram analisados através da avaliação do perfil de expressão de genes importantes. Foram selecionados genes relacionados aos diferentes padrões de resposta imune, principalmente de células T, através de reação de PCR quantitativa em células circulantes de indivíduos controle, paciente SMD em tratamento de suporte e em pacientes tratados com o composto hipometilante. Como observado na Figura 23, nenhuma diferença foi encontrada quanto à expressão gênica para IFN- γ , IL-17, que determinam padrões de resposta Th1 e Th17. Também não foi possível observar modulação em relação à expressão de genes associados à regulação da resposta imune, como IL-10, TGF- β e FOXP3, determinantes do perfil de células T reguladoras.

A expressão destes genes foi analisada através de heatmap, que demonstrou padrão muito semelhante entre os grupos, evidenciando apenas alguns pacientes SMD que apresentam aumento na expressão dos genes avaliados. Apesar da variabilidade encontrada, nenhuma associação com o grau de risco foi determinada, podendo a mesma ser resultados de outras condições não avaliadas neste trabalho (Figura 23A). A média de expressão relativa também foi determinada e expressa em gráficos, como observado na Figura 23B-F, na qual não observamos alterações significativas na expressão dos genes avaliados.

Figura 23. Avaliação da modulação do tratamento hipometilante sobre o padrão de expressão gênica

Células mononucleares isoladas de indivíduos controle (n=3), pacientes com SMD em tratamento de suporte (n=8) e tratados com azacitidina (n=3) foram submetidas a protocolo de extração de RNA para avaliação da expressão gênica. A expressão relativa foi calculada através da fórmula ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) utilizando para normalização a média do Ct do grupo CTRL. (A) Heatmap demonstrando o padrão de expressão por indivíduo, construído com auxílio de site <http://www2.heatmapper.ca/>. A expressão gênica foi normalizada para *score z* e representada em escala de cores do azul à rosa, descrevendo respectivamente, menor e maior expressão. Gráficos com expressão dos genes (B) IFN- γ , (C) IL-17, (D) IL-10, (E) TGF- β e (F) FOXP3. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD. Cada ponto é representativo de um indivíduo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de teste de análise de variância não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn's para comparações entre os grupos, considerando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

5.5. Avaliação da função de monócitos de pacientes SMD tratados com agente hipometilante em modelo de infecção por Mtb

Como já observamos anteriormente, em células de indivíduos saudáveis, o tratamento por si só, é capaz de modular a função de monócitos após estimulação com agente infeccioso, promovendo alterações na capacidade fagocítica e microbicida destas células, bem como a produção de citocinas (Capítulo 1). Adicionalmente, pacientes em tratamento com agente hipometilantes apresentam quantificação de citocinas circulantes semelhantes aos indivíduos saudáveis, as quais também pode afetar diretamente as células circulantes e refletir em alterações funcionais destas células. Assim, baseados neste conjunto de dados prévios, o próximo passo foi avaliar a função dos monócitos dos pacientes em tratamento com composto epigenético azacitidina em relação às células de indivíduos SMD que receberam apenas o tratamento de suporte.

Para tal avaliação funcional, utilizou-se modelo de infecção *in vitro* com Mtb, de maneira semelhante aos ensaios iniciais com controles saudáveis. A resposta a agentes infecciosos foi alvo das avaliações funcionais dos monócitos, uma vez que tais processos patológicos consistem na principal causa de morte dentre os pacientes com mielodisplasia. Desta forma, os monócitos de pacientes SMD tratados ou não com azacitidina foram purificados e infectados com Mtb para avaliação da atividade fagocítica e microbicida, e ainda, para determinação da produção de citocinas e quimiocinas, como demonstrado nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Como é possível observar, os monócitos de pacientes SMD em tratamento com agente hipometilante não demonstraram alterações significativas em relação à atividade fagocítica quando comparados aos pacientes em tratamento de suporte, apesar de apresentarem redução na média de bactérias internalizadas (Figura 24A). Quanto à atividade microbicida, de maneira semelhante, o tratamento não modulou a habilidade destas células em conter a infecção, sendo as médias de bactérias viáveis após o período determinado para avaliação do “*killing*” muito semelhante entre os dois grupos avaliados (Figura 24B), contrariando os achados obtidos com o tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos hígidos.

Apesar de não apresentar efeitos diretos sobre a habilidade dos monócitos em reconhecer, internalizar e destruir agentes infecciosos, o tratamento com azacitidina demonstrou modular a produção de algumas das citocinas e quimiocinas avaliadas após a estimulação com Mtb. A Figura 25 apresenta os dados obtidos de liberação destes mediadores, com alterações significativas quanto à produção de IL-8 e IL-12, ambas aumentadas no sobrenadante de cultura de monócitos provenientes de pacientes SMD em tratamento epigenético. Adicionalmente,

apesar de não significativas, foram possíveis as observações de redução na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelos monócitos. Nenhuma alteração foi observada quanto à liberação de IL-10, com médias de concentração detectadas muito semelhantes entre os pacientes, independente do tratamento utilizado (Figura 26).

Figura 24. Avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante sobre a atividade funcional de monócitos de pacientes SMD: determinação do controle da infecção por Mtb.

(A) Fagocitose - Monócitos de pacientes SMD em tratamento de suporte ou sob administração de azacitidina foram isolados de sangue periférico através de separação magnética, ajustados para 1×10^5 céls/poço. Após incubação *overnight*, as células foram infectadas *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*, na proporção de 5 bacilos para 1 célula (MOI 5). Duas horas após a infecção, período estabelecido para avaliação da fagocitose, os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X em temperatura ambiente para remoção das bactérias não internalizadas e foram adicionados 200 μ L de saponina para lise celular e liberação das bactérias fagocitadas. Então, foram adicionados 10 μ L de resazurina e a placa incubada por mais 24 horas para metabolização do composto, a placa foi avaliada em espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. **(B) Atividade Microbicida** - Monócitos foram purificados de sangue periférico (2×10^5) e, infectados com Mtb H37Rv na proporção de 5 bacilos para cada célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção e tratamento, foram adicionados 50 μ L de saponina (0,2% - 4 vezes concentrada) para volume final de 200 μ L no poço para promover a lise das células. Adicionou-se, então 10 μ L de resazurina para avaliação da metabolização pelas bactérias viáveis por espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão (SMD n=4 a 6 e SMD-AZA n=3) da Unidade Relativa de Fluorescência (RFU), foram analisados por teste T não paramétrico Mann Whitney, considerando $p < 0.05$.

Figura 25. Avaliação do efeito do tratamento com agente hipometilante sobre a atividade funcional de monócitos de pacientes SMD: produção de mediadores imunológicos.

Monócitos de indivíduos pacientes SMD em tratamento de suporte ou sob administração de azacitidina foram isolados de sangue periférico através de separação magnética, ajustados para 1×10^5 céls/poço. Após incubação *overnight*, as células foram infectadas *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*, na proporção de 5 bacilos para 1 célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção, o sobrenadante de cultura foi coletado para quantificação dos mediadores imunológicos através de ensaio multiplex. Foram avaliadas as concentrações de TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), IL-12 (D), IL-8(E) e IL-10 (F), principais mediadores liberados por monócitos. Cada ponto é representativo de um indivíduo (grupo SMD n=8 e SMD-AZA n=3). As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de teste T não paramétrico Mann Whitney, considerando $p < 0.05$.

5.6. Avaliação do efeito do tratamento *in vitro* com agente hipometilante Decitabina sobre a função de monócitos de pacientes SMD

Em virtude do baixo número de pacientes utilizando azacitidina e como forma de compreender melhor os efeitos do tratamento diretamente sobre a função dos monócitos em pacientes com Síndrome Mielodisplásica, avaliou-se também a modulação exercida pela administração *in vitro* do agente hipometilante Decitabina sobre as células provenientes de pacientes que receberam apenas o tratamento de suporte.

Inicialmente, assim como realizado para as células de indivíduos saudáveis, avaliou-se o efeito da concentração de trabalho sobre a viabilidade celular, como apresentado na Figura 26. Desta forma, o tratamento dos monócitos com 5 μ M de Decitabina não alterou a viabilidade das células, demonstrado pela ausência de diferenças significativas na metabolização de resazurina por estas células, seja na detecção direta das unidades relativas de fluorescência (Figura 26A) ou na porcentagem de células viáveis calculadas a partir da leitura de resazurina, considerando a viabilidade do grupo que recebeu apenas meio como 100% (Figura 26B). Adicionalmente, o veículo utilizado para diluição da droga, DMSO, também não apresentou toxicidade celular, apresentando igual metabolização do composto utilizado no ensaio.

Após a detecção de ausência de efeitos tóxicos da concentração de trabalho sobre os monócitos dos pacientes, a modulação funcional destas células foi determinada através de ensaios de infecção com Mtb, com avaliação da atividade fagocítica, microbicida e produção de citocinas. Ao serem desafiados com agentes infecciosos, de maneira diferentes das células dos indivíduos controle, o tratamento com Decitabina não promoveu alterações significativas em relação à quantidade de bactérias internalizadas e não modulou o controle da infecção por estas células, demonstradas pela metabolização muito semelhante entre os tratamentos, demonstrada nas Figuras 27A e 27B para a fagocitose e 27C e 27D para a atividade microbicida. Os resultados do tratamento *in vitro* corroboram os dados já demonstrados nos pacientes em uso de agentes hipometilantes, que assim como as células tratadas, não apresentaram modulação quando estas funções efetoras foram avaliadas.

Em relação a produção de citocinas e quimiocinas, o tratamento *in vitro* dos monócitos de pacientes SMD não demonstrou o mesmo perfil de resposta das células provenientes dos pacientes em tratamento com AZA ou quando avaliados os efeitos da administração *in vitro* em células de indivíduos saudáveis. Aqui, por sua vez, o tratamento não alterou o padrão de citocinas liberadas após a estimulação com Mtb, sendo detectadas concentrações de TNF- α , IL-

6, IL-1 β , IL-12, IL-8 e IL-10 muito semelhantes aos grupos que receberam apenas o veículo ou não receberam nenhum tratamento, como visto na Figura 28.

Figura 26. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a viabilidade celular de monócitos de pacientes com SMD.

Monócitos isolados de sangue periférico foram ajustados para 1×10^5 céls/poço e tratados por período de 24 horas com de Decitabina ($5 \mu\text{M}$), DMSO ou não tratados para avaliação da viabilidade celular. Após período de tratamento, viabilidade foi determinada através da metabolização de resazurina pelas células viáveis. Para tal, $10 \mu\text{L}$ de resazurina foram adicionados aos poços e a placa incubada novamente por 24 horas para metabolização do composto em resorufina, de coloração rosa. Para comparação, utilizou-se saponina 0,05%, que promove a lise celular e foi utilizada como controle positivo de morte celular neste ensaio. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro (μQuant , Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. **(A)** Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=8$) unidade relativa de fluorescência (RFU), foram analisados por teste de ANOVA, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p < 0.05$ (*). **(B)** A porcentagem de monócitos viáveis foi determinada considerando-se as células não tratadas como 100% de viabilidade através da fórmula: $\text{RFU célula tratada (DMSO ou Decitabina)} \times 100 / \text{RFU célula não tratada}$. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=8$) da porcentagem de células viáveis, foram analisados por teste de ANOVA, seguido de teste post-hoc Tukey's, considerando $p < 0.0001$ (***)

Figura 27. Efeito do tratamento com Decitabina sobre a atividade fagocítica e microbicida de monócitos de pacientes SMD infectados *in vitro* com Mtb

(A) Monócitos pacientes SMD foram isolados de sangue periférico através de separação magnética, ajustados para 1×10^5 céls/poço e tratados *in vitro* por período de 24 horas com Decitabina (5 μ M), DMSO ou não tratados. Após tempo de tratamento, as células foram infectadas *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*, na proporção de 5 bacilos para 1 célula (MOI 5). Duas horas após a infecção, período estabelecido para avaliação da fagocitose, os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X em temperatura ambiente para remoção das bactérias não internalizadas e foram adicionados 200 μ L de saponina para lise celular e liberação das bactérias fagocitadas. Então, foram adicionados 10 μ L de resazurina e a placa incubada por mais 24 horas para metabolização do composto, espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. (B) O Índice Fagocítico foi calculado a partir dos dados de RFU obtidos, considerando como 100% de fagocitose os monócitos não tratados, de acordo com a fórmula: $[(RFU \text{ dos tratamentos} - DMSO \text{ ou Decitabina} * 100) / RFU \text{ não tratado}]$. (C) Monócitos foram tratados com Decitabina 5 μ M, DMSO ou não tratados e, concomitantemente, infectados com Mtb H37Rv na proporção de 5 bacilos para cada célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção e tratamento, foram adicionados 50 μ L de saponina (0,2% - 4 vezes concentrada) para volume final de 200 μ L no poço para promover a lise das células. Adicionou-se, então 10 μ L de resazurina para avaliação da metabolização pelas bactérias viáveis por espectrofluorímetro (μ Quant, Biotek Instruments Inc) com emissão e excitação de 560nm e 590 nm, respectivamente. (D) A atividade microbicida foi calculada a partir dos dados de RFU obtidos, considerando como 100% a quantidade de bacilos recuperados em cultura de monócitos não tratados, de acordo com a fórmula: $[(RFU \text{ dos tratamentos} - DMSO \text{ ou Decitabina} * 100) / RFU \text{ não tratado}]$. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=6 para fagocitose e n=5 para a atividade microbicida), foram analisados por teste de ANOVA para medidas repetidas não paramétrico (Friedman), seguido de teste post-hoc Dunn's, considerando $p < 0.05$ (*) e $p < 0.01$ (**).

Figura 28. Efeito do tratamento com Decitabina sobre produção de mediadores imunológicos por monócitos de pacientes SMD infectados *in vitro* com Mtb

Monócitos (1×10^5) foram isoladas de sangue periférico de pacientes SMD em tratamento de suporte e tratados ou não com 5 μ M de Decitabina por 24 horas. Posteriormente, as células foram desafiadas com Mtb H37Rv, na proporção de 5 bactérias para cada célula (MOI 5). Após 24 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas e quimiocinas através de ensaio multiplex. Os gráficos de A a F representam a quantificação de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-8 e IL-10, respectivamente. Os resultados, expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8), foram analisadas através de teste de ANOVA para medidas repetidas não paramétrico (Friedman), seguido de teste post-hoc Dunn's, considerando $p < 0.05$ (*) e $p < 0.01$ (**).

6. DISCUSSÃO

O interesse em buscar novas alternativas de tratamento para as doenças baseadas nas alterações epigenéticas é crescente e, desta forma a utilização de compostos que modulem o epigenoma compreendem objetivo de estudo de diferentes grupos de pesquisa. Neste sentido, visto os resultados positivos encontrados para o tratamento de SMD, principalmente em relação ao aumento da sobrevida dos pacientes, os agentes hipometilantes obtiveram aprovação para o tratamento de algumas neoplasias mieloides. Além do tratamento das neoplasias, estes agentes vêm sendo estudados em outras doenças inflamatórias, infecciosas, neurodegenerativas, autoimunes e tumores sólidos, sendo essencial a compreensão dos efeitos destes fármacos para o organismo como um todo, principalmente sobre a função das células do sistema imune, componentes essenciais em todo processo patológico, seja na sua patogênese ou nos mecanismos de defesa e controle de doenças.

Recentemente revisão publicada por Lindblad e colaboradores reuniu trabalhos que demonstram a regulação exercida pelo tratamento com agentes hipometilantes em diversos aspectos e células da resposta imune (Lindblad *et al.*, 2017). Destacou-se a modulação exercida sobre a função de células NK e células T, nas quais o tratamento demonstrou exercer diferentes perfis de modulação. Como exemplo, o tratamento de células NK com azacitidina induziu redução da atividade citotóxica destas células, com aumento da expressão de receptores inibidores, bem como redução da produção de IFN- γ . Contraditoriamente, a utilização de Decitabina aumentou a produção desta citocina e, conseqüentemente a destruição de células tumorais pelas células NK (Schmiedel *et al.*, 2011).

Pouco foi mostrado em relação a função de monócitos humanos, sendo relacionados trabalhos que avaliaram a diferenciação destas células em células dendríticas e a modulação exercida neste contexto. Dentre os poucos trabalhos já publicados, Frikeche (Frikeche *et al.*, 2011) e colaboradores determinaram que a administração de azacitidina durante a diferenciação de células dendríticas derivadas de PBMC de indivíduos saudáveis induziu aumento na expressão de CD40 e CD86 após maturação celular com estímulo de LPS. Adicionalmente, as células dendríticas tratadas com o agente hipometilante produziram quantidades inferiores de IL-27 e IL-10 quando comparadas aos controles não tratados, sugerindo a atuação destes compostos na modulação da resposta de monócitos (Frikeche *et al.*, 2011).

Assim, sabendo-se da importância dos monócitos para os mecanismos inatos e direcionamento das funções efetoras de células T, auxiliando no controle infeccioso, resposta tumoral e remodelamento tecidual, bem como o papel exercido pelas alterações epigenéticas na regulação da função e diferenciação destas células, na primeira etapa deste trabalho, buscamos compreender a modulação exercida pela administração *in vitro* de agente hipometilante,

Decitabina, sobre a função de monócitos, bem como o impacto deste tratamento para a diferenciação e polarização nos diferentes perfis de macrófagos.

Inicialmente demonstramos que o tratamento com Decitabina promoveu modulação importante sobre a função fagocítica de monócitos, aumentando a capacidade destas células de internalizar o bacilo de Mtb. Nossos dados em relação a esta atividade funcional corroboram o aumento da fagocitose observada após o tratamento com composto hipometilante, 5-AZA, já demonstrada em macrófagos murinos J774 infectados com fungo *Paracoccidioides brasiliensis* após duas e seis horas de avaliação (Oliveira, 2012).

Sabe-se também que a internalização dos microorganismos pelos monócitos depende do reconhecimento através de receptores, dentre os quais os receptores semelhantes a *toll* (TLRs), como TLR2, envolvido no reconhecimento inato de Mtb e crítico para impulsionar uma resposta imune protetora (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011). Alguns estudos já descreveram a associação entre metilação e expressão de TLR, e mostraram que a redução da expressão de TLR2 durante a infecção por *P. gingivalis* em células epiteliais gengivais desreguladas foi causada pela hipermetilação do promotor deste gene. Além disso, os autores demonstraram que o tratamento destas células com inibidores de DNMT (1 μ M de Decitabina) mostrou recuperar a expressão de TLR2 nas células da mucosa oral e ainda, pareceu ser importante na indução de resposta inflamatória durante a infecção (Benakanakere *et al.*, 2015). Desta forma, o aumento da fagocitose observada em nossos dados pode ser resultante da modulação na expressão de receptores de reconhecimento padrão. Apesar de não demonstrados, obtivemos alguns resultados que sugerem regulação positiva do tratamento epigenético em relação a expressão de TLR2, com indução de aumento significativo após a administração de Decitabina em relação ao grupo não tratado ou que recebeu apenas DMSO.

O aumento na expressão de receptores de reconhecimento padrão e internalização do bacilo desencadeiam vias de ativação intracelulares, que culminam na expressão de mediadores celulares. Estudo demonstrou que o tratamento com azacitidina modulou a expressão de mediadores inflamatórios, com aumento da expressão gênica de fatores de transcrição e moléculas adaptadoras, como NF- κ B e Myd88, bem como TNF- α , porém a mesma modulação não foi detectada na liberação da proteína no sobrenadante de cultura (Oliveira, 2012). Dados preliminares não demonstrados do nosso trabalho em modelo de ativação de NF- κ B em células RAW-Blue, demonstraram que o tratamento com Decitabina aumenta a ativação deste fator de transcrição.

Apesar do aumento na ativação de NF- κ B, ao avaliarmos a produção de citocinas e quimiocinas, não observamos alterações na produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β , bem como, não

conseguimos detectar a produção da citocina IL-10. A ausência de modulação na expressão de citocinas pró-inflamatórias após o tratamento com o agente hipometilante corroboram trabalho realizado em células dendríticas estimuladas com LPS, o qual demonstrou apenas a redução da liberação de IL-10 e IL-27 (Frikeche *et al.*, 2011).

A produção de quimiocinas também foi avaliada, com destaque para a observação de aumento na liberação de IL-8 pelos monócitos tratados com Decitabina após a estimulação com Mtb, bem como aumento na quantificação desta citocina em monócitos de pacientes em tratamento com o agente hipometilante azacitidina. A regulação da expressão e liberação desta citocina está diretamente associada com alterações no padrão de metilação do DNA, já demonstrados em modelos de câncer colorretal e casos de inflamação da mucosa oral (Oliveira *et al.*, 2009; Dimberg *et al.*, 2012). Assim, o papel do agente em inibir a metilação do DNA, e a importante regulação que este mecanismo exerce na produção deste mediador, sustentam o aumento observado em células tratadas com o composto epigenético e em monócitos dos pacientes SMD em tratamento com azacitidina.

Funcionalmente, a produção de IL-8 por monócitos e macrófagos é induzida em fases iniciais de infecção por Mtb e outras infecções, apresentando como principal atividade o recrutamento de outras células inflamatórias, principalmente neutrófilos (Kurashima *et al.*, 1997; Sadek *et al.*, 1998). Além disso, estudos recentes demonstraram que a IL-8 poderia interagir com Mtb e que, essa associação, culminaria diretamente no aumento da fagocitose e morte do bacilo pelas células inflamatórias. (Krupa *et al.*, 2015), fornecendo suporte novamente ao aumento de fagocitose observado em nossos dados. Apesar dos efeitos importantes em modelos de infecção, a produção desta quimiocina está claramente associada à progressão tumoral. Já foi demonstrado que a secreção de IL-8, juntamente com IL-6, TGF- β e metaloproteinases, correspondem aos principais mediadores produzidos por macrófago associados aos tumores, e podem estar associados aos eventos de angiogênese, metástase e, conseqüentemente, a progressão tumoral (Schmid e Varner, 2010).

Apesar do aumento da fagocitose e modulação sobre a secreção de IL-8, observamos que o tratamento induziu, em nosso modelo, a redução da atividade microbicida dos monócitos, observada através do aumento da carga bacteriana recuperada após 24 horas de infecção, demonstrando menor controle do processo infeccioso. Tal redução, contudo, não demonstrou modulação sobre a produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo outras formas de ação do fármaco em modular a função microbicida destas células. Assim, do ponto de vista funcional, as características observadas na função de monócitos após o tratamento com Decitabina, destacando atividade fagocítica aumentada e menor capacidade microbicida, bem

como a modulação da produção de quimiocinas, sugeriram uma possível modulação da função destas células para um perfil semelhante aos macrófagos M2 após o tratamento com Decitabina. (Fuentes *et al.*, 2010; Bohlson *et al.*, 2014; Röszer, 2015).

As alterações na metilação do DNA, bem como na expressão das enzimas responsáveis pela inserção ou remoção do grupamento metil apresentam importante regulação durante o processo de diferenciação e polarização celular. Neste sentido, estudo realizado com animais obesos demonstrou aumento da expressão da enzima DNMT3B em macrófagos do perfil M1 e redução em macrófagos polarizados para o perfil M2, com ação na indução de aumento da metilação da região promotora de PPAR- γ , fator de transcrição importante para a polarização de macrófagos M2 (Yang, X. *et al.*, 2014). DNMT1 também regula a polarização de macrófagos para perfil M1, demonstrado pelo aumento na expressão desta enzima nesta subpopulação celular, com ação na indução de metilação na região promotora de SOCS1, e consequente aumento na expressão de IL-6 e TNF- α por macrófagos RAW264.7 após estimulação com LPS. Corroborando estes estudos, demonstramos que, na ausência de tratamento com o composto epigenético, a polarização celular para perfil M2, com administração de IL-4 e IL-13, promoveu redução na expressão das enzimas DNMTs quando observada em relação com grupo M1 e M0, sendo significativamente diferente para a expressão de DNMT1 entre os macrófagos M1 e M2.

Além da redução das DNMTs em macrófagos polarizados para o perfil M2, foi possível observar que a presença de Decitabina durante a diferenciação potencializou a expressão de marcadores de superfície característicos deste perfil, como CD206, e reduziu a expressão de HLA-DR e CD86, moléculas mais expressas em macrófagos M1. Corroborando estes achados, a expressão de genes relacionados ao perfil M2 também foi diferencialmente expressa na presença do composto hipometilante, demonstrando aumento da expressão de ALOX15 em condição de “resting” e após polarização com IL-4 e IL13. Apesar de não impedir a polarização para o perfil inflamatório na presença de IFN- γ , visto a semelhança na expressão de CXCL10, foi possível observar maior expressão de ALOX15 nesta condição quando os macrófagos foram diferenciados na presença de Decitabina.

Muitas são as evidências de que a utilização de inibidores de DNMTs leva a redução da inflamação por atuar na polarização de macrófagos, constituindo atrativas estratégias de controle de infecções, como a sepse, e doenças inflamatórias. Em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, o tratamento com combinação de inibidores de DNMT e HDAC, azacitidina e tricostatina A (TSA), reduziu a inflamação pulmonar, com diminuição do recrutamento celular e infiltrado inflamatório. Adicionalmente, a melhora do score clínico foi decorrente de alterações nas subpopulações de macrófagos, favorecendo a regulação da resposta

inflamatória. Assim, mostrou-se que o tratamento promoveu a redução de mediadores pró-inflamatórios como CXCL10, IL-6, IL-1 β e TNF α , ao passo que aumentou a quantidade de IL-10 detectada nas amostras de animais tratados com os compostos epigenéticos, bem como promoveu aumento na frequência de células positivas para arginase 1(Arg1)s, importante marcador M2 em camundongos (Thangavel *et al.*, 2015).

Outro exemplo de modulação nas subpopulações de macrófagos foi demonstrado em modelo de infarto agudo do miocárdio, no qual o tratamento com inibidor de DNMT, azacitidina, melhorou a lesão cardíaca por promover a redução da inflamação, redução da expressão de iNOS e, consequente, diminuição da produção de óxido nítrico. Tal redução foi acompanhada de aumento de células positivas para CD206 no infiltrado cardíaco e de citocinas do perfil M2, como IL-4. Os autores sugerem, então, que 5-AZA auxilia no controle da lesão cardíaca por potencializar a polarização de macrófagos M2 neste contexto (Jeong *et al.*, 2015).

A polarização para o perfil M2, por sua vez, pode apresentar diferentes padrões de resposta, sendo considerados macrófagos M2a, M2b, dentre outros, assim definidos pela produção de citocinas e expressão de moléculas de superfície (Röszer, 2015). Ao avaliarmos as moléculas de superfície e padrão de expressão gênico, como mencionado, obtivemos perfil semelhante ao apresentado pelos macrófagos M2, com aumento de CD206 e ALOX15 após o tratamento com Decitabina. Apesar da modulação para o perfil alternativamente ativado, as análises funcionais destas células não demonstram alteração quanto a expressão gênica das citocinas IL-10 e IL-12, sendo possível observar apenas uma modulação positiva na expressão de ambas quando comparamos o efeito do tratamento na ausência de condições polarizantes. Adicionalmente, nenhuma diferença foi encontrada em relação a produção das citocinas, pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e anti-inflamatória, como IL-10, após infecção dos macrófagos com Mtb. Por fim, ao infectarmos os macrófagos diferenciados na presença do agente hipometilante, como esperado para macrófagos M2, demonstramos redução na capacidade microbicida destas células.

Apesar desta caracterização, trabalhos demonstram que os tecidos apresentam populações mistas de macrófagos, com diferentes estados de ativação. Ademais, discute-se que infecções micobacterianas, como avaliada neste trabalho, podem induzir macrófagos M2 atípicos, que exibem padrões de transcrição gênica associados tanto ao perfil M1 e M2 (Röszer, 2015; Patel *et al.*, 2017). Estes macrófagos M2 atípicos expressam marcadores de superfície M2, como CD206, Ym1, CD163 e produzem diversos mediadores inflamatórios, dentre os quais IL-12, IL-10, TNF- α e IL-6 (Joshi *et al.*, 2010; Tatano *et al.*, 2014).

Assim, com base nas características apresentadas pelos macrófagos em nosso modelo, sugerimos uma potencial modulação do tratamento com Decitabina no favorecimento de populações de macrófagos M2, porém estas células podem assumir padrão atípico na resposta ao bacilo, produzindo tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias para atuar no controle da infecção e principalmente no controle da lesão tecidual induzida pela inflamação exacerbada típica da tuberculose. A polarização para perfil M2 foi recentemente descrita como protetora em modelos de tuberculose murina, no qual a infecção pelo bacilo mostrou-se mais branda em camundongos previamente desafiados com OVA em modelo de alergia experimental. Os macrófagos M2 nestes camundongos, quando em ambiente rico em IFN- γ , desencadeado pela infecção por Mtb, foram capazes de fagocitar e eliminar melhor os bacilos, e assim, apresentaram menor susceptibilidade à infecção (Piñeros *et al.*, 2017).

A interação dos monócitos/macrófagos com outras células, como células T, principais produtoras de IFN- γ , é importante para o desenvolvimento de respostas imunes efetoras. Neste sentido, a avaliação do efeito do tratamento em co-cultura celular, mimetizando a formação de estruturas semelhantes ao granuloma, demonstrou uma redução na produção de mediadores inflamatórios. Os níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β foram significativamente reduzidos após 7 dias de infecção nas culturas de células tratadas com Decitabina, porém a quantificação de IL-10 se manteve inalterada, sugerindo controle da inflamação. Tal diminuição da inflamação foi decorrente de modulação funcional destas células, visto a ausência de toxicidade celular do composto, como manutenção da viabilidade semelhante entre os grupos após a infecção.

A regulação da resposta inflamatória mediada por células T já foi demonstrada no tratamento com Decitabina. Trabalho realizado em animais com encefalomielite autoimune experimental, dados *ex vivo* demonstraram que o tratamento com Decitabina reduziu o infiltrado de células T no sistema nervoso central, bem como a ativação de macrófagos e células residentes, com redução da expressão de CD45 e MHC de classe II. Adicionalmente, demonstraram que os animais tratados apresentaram menor expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e iNOS, mediadores responsáveis pelo dano celular, assim como diminuição da maioria das citocinas e quimiocinas avaliadas, dentre as quais IL-6, IL-12, CXCL10, associadas ao recrutamento de células inflamatórias. O mesmo grupo também demonstrou efeitos positivos do tratamento com Decitabina na rejeição de transplante cardíaco, com aumento da sobrevivência do grupo tratado com o agente hipometilante. Esta melhora clínica mostrou associação com a modulação da função de células T, com redução da proliferação e diferenciação destas células para os perfis Th1 e Th17 e na produção de IL-17, IFN- γ e TNF- α por células do baço dos animais tratados (Wang *et al.*, 2017).

Neste mesmo sentido, outros trabalhos demonstraram modulação na resposta inflamatória após tratamento com agentes hipometilantes através de indução de células T reguladoras. Em modelo de neurite autoimune experimental, mimetizando a síndrome de Guillain-Barré, o tratamento com Decitabina demonstrou redução do escore clínico por aumentar a frequência de células FOXP3+ no timo, reduzir as células Th1 e Th17 nos animais tratados e, ainda, induzir redução na produção de citocinas pró-inflamatórias em células do baço estimuladas *in vitro* (Fagone *et al.*, 2018). Ademais, durante infecções, como na infecção ocular causada pelo vírus do herpes (HSV-1), o tratamento com azacitidina no início do processo infeccioso resultou em redução na gravidade da lesão, com números significativamente diminuídos de neutrófilos, macrófagos e células T. Corroborando a redução da inflamação, os autores demonstraram predomínio de células T reguladoras em relação às demais células efetoras, tanto no local da infecção quanto nos tecidos linfoides, apresentando aumento na atividade supressora *in vitro* quando comparadas às células T reguladoras de animais não tratados (Varanasi *et al.*, 2017).

Contrariando estes estudos, Costantini e colaboradores demonstraram que pacientes com SMD em tratamento com agente hipometilante apresentaram aumento na frequência de células T reguladoras em relação aos indivíduos saudáveis, com redução aos níveis normais após 9 meses de tratamento. Porém, a população de células T FOXP3 identificada nestes pacientes também mostrou marcação IL17+, caracterizando uma população funcionalmente diferentes das células reguladoras classicamente descritas. Os indivíduos tratados também apresentaram redução na frequência de células Th1 e Th2 e mantiveram a porcentagem de células Th17 inalteradas. Assim, apesar de aumentar a população positiva para FOXP3, marcador característicos de células T reguladoras, tais células demonstraram, em ensaios *in vitro*, redução na atividade supressora e aumento na produção de IL-17. (Costantini *et al.*, 2013).

Outros trabalhos também demonstraram que os agentes hipometilantes favorecem respostas inflamatórias e as respostas citotóxicas por aumentar a população de células Th1 e produção de IFN- γ , como demonstrado por Li X. e colaboradores. Neste trabalho, o tratamento com baixas doses de Decitabina promoveu aumento na ativação e proliferação de células T positivas para IFN- γ , polarização para o perfil Th1 e aumento da atividade citotóxica em análises *in vitro* e *in vivo*. Em adição, ensaios clínicos em pacientes com tumores sólidos demonstraram os mesmos efeitos obtidos *in vitro* e em modelo animal, sugerindo melhora no controle tumoral e na sobrevivência da população estudada (Li *et al.*, 2017). Além do perfil Th1, células Th17 também já foram relatadas aumentadas em pacientes SMD após tratamento com

azacitidina (Frikeche *et al.*, 2011). Assim, além da modulação da função dos monócitos/macrófagos, a regulação da produção de citocinas apresentada nos ensaios de co-cultura, podem ser resultantes de concomitante modulação na função das células T, evidenciada pela redução de IFN- γ . Apesar da redução desta citocina *in vitro*, ao avaliarmos o perfil de células T *in vivo*, não identificamos nenhuma diferença entre os pacientes tratados em relação ao grupo controle e SMD não tratado, com igual expressão para IFN- γ , IL-17, IL-10, TGF- β e FOXP3, não corroborando a maioria dos dados da literatura que observaram modulação nestas populações celulares.

No contexto da SMD, a presença de macrófagos M2, definidos pela expressão de CD163, demonstrou relação com a piora da sobrevida. Estudo mostrou que pacientes, com quadros mais graves de doença, apresentaram maior infiltrado de macrófagos CD163+ na medula óssea, enquanto pacientes de baixo risco apresentaram predomínio de células iNOS+. O mesmo trabalho também demonstrou que o tempo médio de sobrevida no grupo com alta infiltração de macrófagos CD163+ foi significativamente menor quando comparada ao grupo que apresentava baixa infiltração destas células na medula, sendo de 13 meses para aqueles com alta frequência de macrófagos M2 e de 43 meses, para o grupo com menor infiltrado (Yang Y e Y, 2018).

Vale ressaltar, porém, que não observamos a mesma modulação exercida na função de monócitos de indivíduos saudáveis ao avaliarmos o efeito do tratamento *in vitro* com Dicitabina nas células de pacientes SMD. Nestes pacientes o tratamento com agente hipometilante não apresentou efeito sobre a atividade fagocítica, microbicida e na produção de citocinas pelos monócitos infectados com Mtb. A determinação do impacto do tratamento em monócitos de pacientes em ciclos de azacitidina, entretanto, demonstrou modulação na produção dos mediadores IL-12 e IL-8 após a infecção. O aumento de IL-8 corrobora os achados em indivíduos saudáveis tratados *in vitro*, os quais também apresentaram aumento na liberação desta quimiocina.

Existem evidências de que a função de monócitos pode estar prejudicada em pacientes com SMD. Trabalho de Han Y. e colaboradores demonstrou que pacientes com mielodisplasia apresentaram maior frequência de monócitos quando comparados aos indivíduos controle. Apesar do aumento em número, os monócitos destes pacientes apresentaram deficiências na diferenciação *ex vivo* em macrófagos e na atividade fagocítica (Han *et al.*, 2016), podendo explicar a ausência na modulação após o tratamento com agente hipometilante em nosso estudo. De maneira contraditória, porém, outros trabalhos indicam que a função fagocítica e a produção de citocinas não é alterada nestes pacientes, que apresentam habilidade semelhante aos

indivíduos saudáveis em responder a estimulação com LPS e internalizar partículas de *E. coli*. O mesmo estudo também demonstrou que monócitos de pacientes em diferentes tratamentos, dentre os quais Azacitidina e Decitabina, não apresentaram alteração funcional quanto à fagocitose e produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 quando comparados aos indivíduos saudáveis e aos pacientes não tratados (Pollyea *et al.*, 2018). Assim, nossos dados corroboram estes achados, com ausência de modulação na produção destas citocinas, na função fagocítica e microbicida, tanto nos ensaios de tratamento *in vitro* com Decitabina, quanto em pacientes em tratamento com o agente hipometilante, nos quais observamos apenas aumento na produção de IL-12 e IL-8 após a estimulação com Mtb.

Os resultados em relação a função dos monócitos em pacientes com SMD, como demonstrado por Pollyea e colaboradores (Pollyea *et al.*, 2018) e em nossos dados, sugerem que os monócitos poderiam compensar as deficiências imunológicas destes pacientes, como a redução na contagem de neutrófilos, podendo auxiliar no controle de processos infecciosos, que correspondem a uma das principais causas de morte nestes pacientes. Apesar das análises funcionais, trabalho recentemente publicado identificou associação entre o tratamento epigenético e aumento nas taxas de infecção destes pacientes. Concomitantemente, demonstraram aumento de incidência de episódios de febre e neutropenia (Shargian-Alon *et al.*, 2018). Corroborando este dado, ao avaliar os sinais clínicos nos pacientes antes e após o tratamento com azacitidina observamos também uma redução na contagem de neutrófilos após os ciclos de agente hipometilante, presente em três dos quatro indivíduos analisados neste grupo, bem como redução no número de linfócitos e monócitos. Embora o número de infecções esteja aumentado nos pacientes em tratamento com azacitidina, não foram encontradas diferenças em relação à incidência de infecções fatais, e positivamente, o tratamento reduziu a quantidade de mortes (Shargian-Alon *et al.*, 2018).

A contagem de plaquetas corresponde a outro parâmetro clínico alterado nos pacientes e que apresenta regulação pelo tratamento hipometilante. Apesar de não observarmos alterações significativas em nossa população de estudo, o tratamento aumentou ou manteve o número de plaquetas quando comparado aos dados anteriores ao início do tratamento. Dados de outros grupos demonstraram que o uso de agentes hipometilantes acarretou aumento no número de plaquetas, sendo importante para a melhora deste sinal clínico, podendo duplicar a quantificação deste parâmetro após os primeiros ciclos de tratamento (Zeidan *et al.*, 2014). Em adição, outro trabalho demonstrou que em 80% dos pacientes avaliados apresentaram aumento na contagem de plaquetas, com diferenças importantes após apenas um ciclo de tratamento. A média de contagem passou de $36,85 \pm 24,54$ para $84,90 \pm 61$ após o primeiro ciclo, sendo o

aumento decorrente de estimulação da diferenciação e maturação dos megacariócitos nestes pacientes (Ding *et al.*, 2016).

Os agentes hipometilantes também já apresentaram efeitos sobre a concentração de hemoglobina, podendo auxiliar no controle da anemia nos pacientes SMD. Em nossa população, a concentração de hemoglobina foi muito semelhante antes e depois do tratamento, promovendo aumento relevante em apenas um dos pacientes avaliados. Em trabalho em pacientes com anemia falciforme, o tratamento com Decitabina promoveu redução no número de neutrófilos, aumento a contagem de plaquetas, a concentração de hemoglobina total e hemoglobina fetal (Sauntharajah *et al.*, 2003).

De maneira diferente dos parâmetros hematológicos, foi possível demonstrar alterações em relação a quantificação de citocinas e quimiocinas plasmáticas. O perfil de citocinas plasmáticas é importante no direcionamento da resposta imune, e estudos tem demonstrado uma desregulação nos pacientes com SMD (Feng *et al.*, 2011; Pardanani *et al.*, 2012; Kittang *et al.*, 2016; D'silva *et al.*, 2019). Trabalho de Kittang e colaboradores demonstrou que, em comparação aos indivíduos saudáveis, os pacientes com SMD apresentaram aumento na quantificação das citocinas e quimiocinas IL-5, IL-6, IL-8(CXCL8), IL-13, CCL3 e CXCL10 (IP-10) e redução de IL-10, IFN- γ , CCL5 (RANTES) e CXCL5 (Kittang *et al.*, 2016). Nossos dados corroboram a modulação de algumas destas citocinas na doença, como a redução de IFN- γ e RANTES e aumento de IL-8 e CXCL10. Não observamos, porém, a redução na citocina IL-10 e aumento de IL-6, mediadores que em nossos pacientes apresentaram-se muito semelhantes aos demais grupos estudados. Outro estudo com citocinas plasmáticas também evidenciou o papel destes dois últimos mediadores na SMD, demonstrando aumento na detecção destas citocinas em amostras de plasma de pacientes em relação aos indivíduos saudáveis. Ressalta-se que, IL-8 e IP-10 destacaram-se como os mediadores mais relevantes nas correlações fenotípicas, e IP-10, juntamente com IL-6 e IL-7, demonstraram impactos significativos na progressão da doença, estando elevadas nos pacientes com maior risco (Pardanani *et al.*, 2012).

Em nossos dados, as concentrações de citocinas plasmáticas apresentadas pelo grupo de pacientes SMD em tratamento com AZA foi semelhante à apresentada pelo grupo controle, com exceção de IL-8 e IP-10, que tem expressão intensificada pelos agentes hipometilantes. Em relação aos efeitos do tratamento, trabalhos tem demonstrado aumento significativo na detecção de IL-8, IP-10, MCP-1 e IL-27 e redução de IL-12 em amostras de plasma de medula óssea de pacientes SMD em comparação aos doadores saudáveis. Nossos dados corroboram estes estudos, principalmente em relação à indução de aumento progressivo de IL-8 no tratamento com azacitidina (Moudra *et al.*, 2016). Tal aumento de IL-8 no tratamento já havia sido

observado em nosso trabalho nos ensaios de tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos saudáveis, bem como em monócitos pacientes SMD em tratamento com AZA, sugerindo, mais uma vez, uma possível regulação epigenética via metilação do DNA na expressão deste mediador.

Adicionalmente, Moudra e colaboradores sugerem que, de maneira geral, a SMD promoveu um padrão de desregulação imune das citocinas, com aumento de mediadores pro-inflamatórios na medula óssea, dos quais nossos achados de sangue periférico discordam, uma vez que nossa população de pacientes não tratados apresentou redução nas concentrações séricas para a maioria das citocinas analisadas. Porém, nossos dados corroboram o fato de que este perfil inflamatório é intensificado durante a terapia com agentes hipometilantes (Moudra *et al.*, 2016), visto o aumento na quantificação da maioria dos mediadores, estabelecendo um padrão semelhante ao apresentado pelos indivíduos saudáveis.

A expressão de citocinas reguladoras, como a IL-10 mostrou-se elevada em casos de SMD alto risco, estando associada à redução das células T CD8+ e ao escape dos mecanismos de resposta antitumoral e progressão da doença (Lopes *et al.*, 2013). Outros trabalhos também mostraram que ao comparar os diferentes graus de risco da SMD, o grupo de baixo risco apresentou níveis elevados de citocinas como IL-1 β , IL-17, IL-8 e IL-12, enquanto pacientes de alto risco expressavam níveis mais altos de citocinas reguladoras (D'silva *et al.*, 2019). Adicionalmente, os parâmetros clínicos também podem influenciar a concentração sérica de citocinas e quimiocinas, como já demonstrado pela associação do número de plaquetas com níveis de citocinas. Em outras condições patológicas, como na anemia aplástica e na púrpura trombocitopênica imunológica, observou-se que concentração de CCL5 (RANTES) e outros mediadores mostrou-se reduzida em indivíduos com baixa contagem de plaquetas (Feng *et al.*, 2012). Em nossos dados, os pacientes com SMD, independente do tratamento, demonstraram redução de plaquetas em relação aos indivíduos saudáveis, com concomitante redução de RANTES. Desta forma, vale ressaltar que as divergências encontradas entre nossa população de estudo e os trabalhos na literatura podem ser resultado da variação nos quadros clínicos apresentados nos pacientes SMD e do grau de risco dos pacientes, sendo necessários futuras análises do grupo de pacientes incluídos no estudo para melhor compreensão da desregulação imune na SMD e avaliação de um possível efeito do tratamento hipometilantes sobre as alterações imunológicas encontradas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, sugerimos que o tratamento com Decitabina aumenta a capacidade fagocítica e a produção de quimiocinas pelos monócitos, enquanto diminui a habilidade destas células de controlar a infecção, visto a redução na atividade microbicida. Adicionalmente, demonstramos que o tratamento tem efeitos sobre a diferenciação e polarização de monócitos em macrófagos, favorecendo o perfil M2, com indução de morfologia e marcadores desta população celular, com aumento na expressão de CD206 e ALOX15 nos macrófagos diferenciados na presença de Decitabina. Funcionalmente, observamos prejuízo na função efetora destas células em conter a infecção por Mtb. Corroborando este efeito imunomodulador, em co-cultura de monócitos e células T, observamos redução da produção dos mediadores inflamatórios IFN- γ , IL-1 β e TNF- α .

A modulação constatada nas funções de monócitos de indivíduos saudáveis não foi observada em monócitos de pacientes com SMD, os quais não tiveram suas funções afetadas pelo tratamento *in vitro* com o agente hipometilante Decitabina. Porém, ao avaliarmos os monócitos de pacientes em tratamento com azacitidina, demonstramos aumento na produção dos mediadores IL-8 e IL-12, que podem modular o recrutamento e polarização celular, tanto na resposta contra infecções, como proposto neste trabalho, quanto na resposta antitumoral, principal alvo deste tipo de terapia. Por fim, sistemicamente, demonstramos que a utilização do composto epigenético no tratamento da SMD, nos pacientes incluídos neste estudo, não alterou de maneira significativa os parâmetros clínicos, mas promoveu mudanças no perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas, com aumento da maioria dos mediadores analisados. A síntese dos resultados apresentados neste trabalho está representada na figura 29.

Porém, apesar dos resultados indicarem modulação sobre a função dos monócitos e uma alteração na resposta imunológica nos pacientes SMD, nosso grupo amostral em tratamento com agente hipometilante ainda é muito pequeno e com classificações da doença muito divergente da população não tratada, dificultando a obtenção de conclusões consistentes sobre o efeito do tratamento. Novos pacientes já iniciaram o tratamento e serão incluídos em breve em nosso estudo, assim que atingirem o ciclo mínimo estipulado para as avaliações experimentais e clínicas, o que permitirá uma melhor segregação dos pacientes em relação a fisiopatologia da doença.

Ressaltamos aqui a dificuldade em obter as amostras de indivíduos tratados, decorrentes, principalmente, do medicamento não ser disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde, sendo necessário muitas vezes ações judiciais para realização do tratamento. As análises realizadas foram possíveis através de colaboração com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (FMUSP), com auxílio da Profa. Dra Elvira, que possuía em seu serviço, no momento das

coletas, os quatro pacientes incluídos até o momento. Apesar do pequeno número amostral, nossos dados sugerem uma possível modulação, que será confirmada com a inclusão de mais pacientes, o que nos permitirá compreender a repercussão das alterações encontradas na resposta clínica, na incidência de comorbidades e na progressão da doença.

Figura 29. Representação esquemática dos resultados obtidos.

O tratamento com agentes hipometilantes demonstrou modular a função de monócitos e macrófagos, prejudicando o controle da infecção por Mtb ao favorecer o perfil M2 de resposta, determinado pelo aumento de marcadores deste padrão de polarização. Nos pacientes, observamos modulação importante na detecção de mediadores plasmáticos, com restabelecimento de padrões semelhantes ao grupo controle. Quanto à função de monócitos de pacientes em tratamento com azacitidina observou-se aumento na produção de IL-8 e IL-12 em resposta a Mtb. Apesar do aumento nas citocinas, a atividade fagocítica e microbicida foram iguais ao grupo não tratado. Assim, demonstramos um potencial efeito dos agentes hipometilantes em regular os mecanismos da resposta imune.

8. CONCLUSÃO

Concluimos que o tratamento *in vitro* com Decitabina altera a função de monócitos e macrófagos, favorecendo um perfil regulador de resposta imune. Adicionalmente, nos pacientes com SMD em tratamento com azacitidina, sugerimos modulação na produção de citocinas pelos monócitos em resposta a infecção, bem como no perfil de citocinas circulantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - Formato (Autor/data)

ABDEL-WAHAB, O. et al. Deletion of *Asx11* results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. **J Exp Med**, v. 210, n. 12, p. 2641-59, Nov 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24218140> >.

AGGARWAL, S. et al. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. **Br J Haematol**, v. 153, n. 5, p. 568-81, Jun 2011. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21488861> >.

AL-ANAZI, K. A.; AL-JASSER, A. M.; EVANS, D. A. Infections caused by mycobacterium tuberculosis in patients with hematological disorders and in recipients of hematopoietic stem cell transplant, a twelve year retrospective study. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 6, p. 16, Nov 2007. ISSN 1476-0711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021401> >.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, 05 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254> >.

BACHER, U. et al. Distribution of cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes, Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms, and the overlap MDS/MPN category. **Ann Hematol**, v. 88, n. 12, p. 1207-13, Dec 2009. ISSN 1432-0584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415278> >.

BAGOT, R. C.; MEANEY, M. J. Epigenetics and the biological basis of gene x environment interactions. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 49, n. 8, p. 752-71, Aug 2010. ISSN 1527-5418. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643310> >.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res**, v. 21, n. 3, p. 381-95, Mar 2011. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321607> >.

BAXTER, E. et al. Epigenetic regulation in cancer progression. **Cell Biosci**, v. 4, p. 45, 2014. ISSN 2045-3701. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949794> >.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet**, v. 16, n. 4, p. 168-74, Apr 2000. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729832> >.

BEJAR, R. et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, v. 364, n. 26, p. 2496-506, Jun 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21714648> >.

BEKKERING, S. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 8, p. 1731-8, Aug 2014. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903093> >.

BENAKANAKERE, M. et al. TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis. **J Dent Res**, v. 94, n. 1, p. 183-91, Jan 2015. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389002> >.

BHAGAT, T. D. et al. miR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF- β signaling. **Blood**, v. 121, n. 15, p. 2875-81, Apr 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23390194> >.

BHAT, S. A. et al. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. **Noncoding RNA Res**, v. 1, n. 1, p. 43-50, Oct 2016. ISSN 2468-0540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30159410> >.

BIEL, M.; WASCHOLOWSKI, V.; GIANNIS, A. Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 44, n. 21, p. 3186-216, May 2005. ISSN 1433-7851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15898057> >.

BIRKNESS, K. A. et al. An in vitro model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 160-8, 2007 Feb-Mar 2007. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199112> >.

BOHLSON, S. S. et al. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. **Front Immunol**, v. 5, p. 402, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25191325> >.

BOLAND, M. J.; NAZOR, K. L.; LORING, J. F. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. **Circ Res**, v. 115, n. 2, p. 311-24, Jul 2014. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989490> >.

BONTKES, H. J. et al. Azacitidine differentially affects CD4(pos) T-cell polarization in vitro and in vivo in high risk myelodysplastic syndromes. **Leuk Res**, v. 36, n. 7, p. 921-30, Jul 2012. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503132> >.

BOUCHARD, J.; MOMPARTLER, R. L. Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. **Mol Pharmacol**, v. 24, n. 1, p. 109-14, Jul 1983. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6191192> >.

BOULTWOOD, J. et al. Advances in the 5q- syndrome. **Blood**, v. 116, n. 26, p. 5803-11, Dec 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20733155> >.

BOYES, J.; BIRD, A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1123-34, Mar 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004419> >.

BUCHACHER, T. et al. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen Chlamydia pneumoniae. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143593, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26606059> >.

BULLWINKEL, J. et al. Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. **Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 45-51, Jan 2011. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818162> >.

CAO, R.; ZHANG, Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. **Curr Opin Genet Dev**, v. 14, n. 2, p. 155-64, Apr 2004. ISSN 0959-437X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196462> >.

CARSON, W. F. et al. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 273-83, Mar 2011. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048427> >.

CASTEL, S. E.; MARTIENSSEN, R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nat Rev Genet**, v. 14, n. 2, p. 100-12, Feb 2013. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329111> >.

CHAN, A. O. et al. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with Helicobacter pylori infection and in gastric cancer. **Gut**, v. 52, n. 4, p. 502-6, Apr 2003. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631658> >.

CHEN, C. et al. DNA methyltransferases 1 and 3B are required for hepatitis C virus infection in cell culture. **Virology**, v. 441, n. 1, p. 57-65, Jun 2013. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545144> >.

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**, v. 109, n. 42, p. E2865-74, Oct 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802645> >.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5483-95, Aug 2002. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154409> >.

CIECHOMSKA, M.; VAN LAAR, J. M.; O'REILLY, S. Emerging role of epigenetics in systemic sclerosis pathogenesis. **Genes Immun**, v. 15, n. 7, p. 433-9, Oct 2014. ISSN 1476-5470. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25030429> >.

COLE, J. et al. The therapeutic potential of epigenetic manipulation during infectious diseases. **Pharmacol Ther**, v. 167, p. 85-99, 11 2016. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27519803> >.

COSTANTINI, B. et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 98, n. 8, p. 1196-205, Aug 2013. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242597> >.

CREUSOT, F.; ACS, G.; CHRISTMAN, J. K. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. **J Biol Chem**, v. 257, n. 4, p. 2041-8, Feb 1982. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6173384> >.

CUNNINGHAM, I. et al. The myelodysplastic syndromes: an analysis of prognostic factors in 226 cases from a single institution. **Br J Haematol**, v. 90, n. 3, p. 602-6, Jul 1995. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647000> >.

DAVER, N. et al. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. **Cancer Discov**, v. 9, n. 3, p. 370-383, 03 2019. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30409776> >.

DAYYANI, F. et al. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2174-9, May 2010. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162709> >.

DE GROOT, A. E.; PIENTA, K. J. Epigenetic control of macrophage polarization: implications for targeting tumor-associated macrophages. **Oncotarget**, v. 9, n. 29, p. 20908-20927, Apr 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29755698> >.

DEEKS, S. G. HIV: Shock and kill. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 439-40, Jul 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22836995> >.

DIMBERG, J. et al. DNA promoter methylation status and protein expression of interleukin-8 in human colorectal adenocarcinomas. **Int J Colorectal Dis**, v. 27, n. 6, p. 709-14, Jun 2012. ISSN 1432-1262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22108905> >.

DING, K. et al. Effects of decitabine on megakaryocyte maturation in patients with myelodysplastic syndromes. **Oncol Lett**, v. 11, n. 4, p. 2347-2352, Apr 2016. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27073478> >.

D'SILVA, S.; RAJADHYAKSHA, S. B.; SINGH, M. **Immune Dysregulation in MDS: The Role of Cytokines and Immune Cells**. Recent Developments in Myelodysplastic Syndromes: 2019.

EBERHARTER, A.; BECKER, P. B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. **EMBO Rep**, v. 3, n. 3, p. 224-9, Mar 2002. ISSN 1469-221X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882541> >.

EL GAZZAR, M. et al. Dynamic and selective nucleosome repositioning during endotoxin tolerance. **J Biol Chem**, v. 285, n. 2, p. 1259-71, Jan 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901031> >.

ENDERLIN VAZ DA SILVA, Z.; LEHR, H. A.; VELIN, D. In vitro and in vivo repair activities of undifferentiated and classically and alternatively activated macrophages. **Pathobiology**, v. 81, n. 2, p. 86-93, 2014. ISSN 1423-0291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457836> >.

EPLING-BURNETTE, P. K. et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4816-24, Jun 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341666> >.

ESPÍNDOLA, M. S. et al. Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5505, Apr 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615725> >.

ESTEPHAN, F.; TIU, R. V. Current and novel therapeutic approaches in myelodysplastic syndromes. **J Community Support Oncol**, v. 12, n. 7, p. 236-49, Jul 2014. ISSN 2330-7749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25830232> >.

FAGONE, P. et al. Decitabine induces regulatory T cells, inhibits the production of IFN-gamma and IL-17 and exerts preventive and therapeutic efficacy in rodent experimental autoimmune neuritis. **J Neuroimmunol**, v. 321, p. 41-48, Aug 2018. ISSN 1872-8421. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29957387> >.

FALVO, J. V. et al. Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation. **Adv Immunol**, v. 118, p. 37-128, 2013. ISSN 1557-8445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683942> >.

FENAUX, P. et al. Prolonged survival with improved tolerability in higher-risk myelodysplastic syndromes: azacitidine compared with low dose ara-C. **Br J Haematol**, v. 149, n. 2, p. 244-9, Apr 2010. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136825> >.

_____. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 3, p. 223-32, Mar 2009. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230772> >.

_____. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 4, p. 562-9, Feb 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026804> >.

FENG, X. et al. Decreased plasma cytokines are associated with low platelet counts in aplastic anemia and immune thrombocytopenic purpura. **J Thromb Haemost**, v. 10, n. 8, p. 1616-23, Aug 2012. ISSN 1538-7836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537155> >.

_____. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 96, n. 4, p. 602-6, Apr 2011. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160069> >.

FERNÁNDEZ-MORERA, J. L. et al. Epigenetic regulation of the immune system in health and disease. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 6, p. 431-9, Dec 2010. ISSN 1399-0039. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21058938> >.

FLAVAHAN, W. A.; GASKELL, E.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science**, v. 357, n. 6348, Jul 2017. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28729483> >.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 9, p. 2498-502, Sep 2011. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952805> >.

FOSTER, S. L.; HARGREAVES, D. C.; MEDZHITOV, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 972-8, Jun 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17538624> >.

FRIKECHE, J. et al. Impact of the hypomethylating agent 5-azacytidine on dendritic cells function. **Exp Hematol**, v. 39, n. 11, p. 1056-63, Nov 2011. ISSN 1873-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856273> >.

FUENTES, L.; ROSZER, T.; RICOTE, M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 219583, 2010. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508742> >.

GAO, X. N. et al. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. **Mol Immunol**, v. 46, n. 10, p. 2064-70, Jun 2009. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19394699> >.

GOLDBERG, S. L. et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 17, p. 2847-52, Jun 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421543> >.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510870> >.

GRABIEC, A. M.; POTEMPA, J. Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. **Crit Rev Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 336-350, May 2018. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28971711> >.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-65, Sep 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740453> >.

HAN, Y.; WANG, H.; SHAO, Z. Monocyte-Derived Macrophages Are Impaired in Myelodysplastic Syndrome. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 5479013, 2016. ISSN 2314-7156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074192> >.

HATZIMICHAEL, E. et al. Epigenetics in diagnosis, prognostic assessment and treatment of cancer: an update. **EXCLI J**, v. 13, p. 954-76, 2014. ISSN 1611-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417314> >.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 11, p. 6538-47, Nov 1998. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774669> >.

HOEKSEMA, M. A.; DE WINTHER, M. P. Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. **Antioxid Redox Signal**, v. 25, n. 14, p. 758-774, 11 2016. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26983461> >.

HOPFER, O. et al. DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. **Exp Hematol**, v. 35, n. 5, p. 712-23, May 2007. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577921> >.

HOURIGAN, C. S.; KARP, J. E. Development of therapeutic agents for older patients with acute myelogenous leukemia. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 6, p. 669-77, Jun 2010. ISSN 2040-3429. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496262> >.

HUBLITZ, P.; ALBERT, M.; PETERS, A. H. Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 2-3, p. 335-54, 2009. ISSN 1696-3547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412890> >.

HÉNINGER, E.; KRUEGER, T. E.; LANG, J. M. Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents. **Front Immunol**, v. 6, p. 29, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25699047> >.

ISHII, M. et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3244-54, Oct 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567879> >.

IULDASHEVA, N. E.; KARACHUNSKIĬ, M. A.; PIVNIK, A. V. [Various approaches to tuberculosis diagnosis in patients with hemoblastosis]. **Ter Arkh**, v. 74, n. 4, p. 35-8, 2002. ISSN 0040-3660. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12043235> >.

IVANOV, M.; BARRAGAN, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 8, p. 384-96, Aug 2014. ISSN 1873-3735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24993164> >.

JANKOWSKA, A. M. et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6403-10, Jun 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372255> >.

JE, S. et al. An in vitro model of granuloma-like cell aggregates substantiates early host immune responses against Mycobacterium massiliense infection. **Biol Open**, v. 5, n. 8, p. 1118-27, Aug 2016. ISSN 2046-6390. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27489303> >.

JELTSCH, A. On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 63-6, 2006 Apr-Jun 2006. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965604> >.

JEONG, H. Y. et al. 5-Azacytidine modulates interferon regulatory factor 1 in macrophages to exert a cardioprotective effect. **Sci Rep**, v. 5, p. 15768, Oct 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26510961> >.

JOSHI, A. D. et al. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. **BMC Immunol**, v. 11, p. 52, Oct 2010. ISSN 1471-2172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20958987> >.

JÜTTERMANN, R.; LI, E.; JAENISCH, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 25, p. 11797-801, Dec 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527544> >.

KAIKKONEN, M. U.; LAM, M. T.; GLASS, C. K. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. **Cardiovasc Res**, v. 90, n. 3, p. 430-40, Jun 2011. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558279> >.

KANTARJIAN, H. et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. **Cancer**, v. 106, n. 8, p. 1794-803, Apr 2006. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16532500> >.

KIM, H. C. et al. Tuberculosis in patients with myelodysplastic syndromes. **Clin Radiol**, v. 57, n. 5, p. 408-14, May 2002. ISSN 0009-9260. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014940> >.

KITAGAWA, M.; KAMIYAMA, R.; KASUGA, T. Increase in number of bone marrow macrophages in patients with myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol**, v. 51, n. 1, p. 56-8, Jul 1993. ISSN 0902-4441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8348949> >.

KITAJIMA, Y. et al. Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for Runx3 methylation in gastric cancer. **Oncol Rep**, v. 19, n. 1, p. 197-202, Jan 2008. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097595> >.

KITTAN, N. A. et al. Cytokine induced phenotypic and epigenetic signatures are key to establishing specific macrophage phenotypes. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78045, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205083> >.

KITTANG, A. O. et al. The Systemic Profile of Soluble Immune Mediators in Patients with Myelodysplastic Syndromes. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 7, Jul 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27399678> >.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 405310, 2011. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603213> >.

_____. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. **Clin Immunol**, v. 155, n. 2, p. 213-9, Dec 2014. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25451159> >.

KORDASTI, S. Y. et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol**, v. 145, n. 1, p. 64-72, Apr 2009. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210506> >.

_____. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). **Blood**, v. 110, n. 3, p. 847-50, Aug 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412885> >.

KRUPA, A. et al. Binding of CXCL8/IL-8 to Mycobacterium tuberculosis Modulates the Innate Immune Response. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 124762, 2015. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300588> >.

KURASHIMA, K. et al. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, n. 4, p. 1474-7, Apr 1997. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105097> >.

LANGEMEIJER, S. M. et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. **Nat Genet**, v. 41, n. 7, p. 838-42, Jul 2009. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483684> >.

LEY, T. J. et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 363, n. 25, p. 2424-33, Dec 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067377> >.

LI, H. et al. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. **Oncotarget**, v. 5, n. 3, p. 587-98, Feb 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583822> >.

LI, X. et al. Increased IFN γ . **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 20, p. 6031-6043, Oct 2017. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706011> >.

LIN, M. E. et al. Dynamics of. **Clin Epigenetics**, v. 10, p. 42, 2018. ISSN 1868-7083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29619119> >.

LINDBLAD, K. E. et al. Immunological effects of hypomethylating agents. **Expert Rev Hematol**, v. 10, n. 8, p. 745-752, 08 2017. ISSN 1747-4094. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28644756> >.

LIU, H. et al. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. **Mol Cancer**, v. 17, n. 1, p. 64, 02 2018. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29471827> >.

LOPES, M. R. et al. IL10 inversely correlates with the percentage of CD8⁺ cells in MDS patients. **Leuk Res**, v. 37, n. 5, p. 541-6, May 2013. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23453286> >.

LÄNGER, F. et al. **Up-regulation of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in myelodysplastic syndrome**. Leukemia Research. 29: 325–329 p. 2005.

MA, T. et al. DNMT1 overexpression predicting gastric carcinogenesis, subsequent progression and prognosis: a meta and bioinformatic analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 96396-96408, Nov 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221215> >.

MACHUCA, I. et al. Tuberculosis in immunosuppressed patients. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 36, n. 6, p. 366-374, 2018 Jun - Jul 2018. ISSN 1578-1852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29223319> >.

MAEKITA, T. et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 3 Pt 1, p. 989-95, Feb 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467114> >.

MAILLOUX, A. W. et al. Expansion of effector memory regulatory T cells represents a novel prognostic factor in lower risk myelodysplastic syndrome. **J Immunol**, v. 189, n. 6, p. 3198-208, Sep 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875800> >.

MAKISHIMA, H. et al. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. **Leukemia**, v. 24, n. 10, p. 1799-804, Oct 2010. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724984> >.

MARCUCCI, G. et al. Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndromes. **J Clin Pharmacol**, v. 45, n. 5, p. 597-602, May 2005. ISSN 0091-2700. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831784> >.

MARTÍN, I. et al. Prognostic impact of gene mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. **Blood Cancer J**, v. 7, n. 12, p. 630, 11 2017. ISSN 2044-5385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29235468> >.

MASAROVA, L. et al. A phase 2 study of ruxolitinib in combination with azacitidine in patients with myelofibrosis. **Blood**, v. 132, n. 16, p. 1664-1674, Oct 2018. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30185431> >.

MCNAMARA, D.; EL-OMAR, E. *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of gastric cancer: a paradigm for host-bacterial interactions. **Dig Liver Dis**, v. 40, n. 7, p. 504-9, Jul 2008. ISSN 1878-3562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486572> >.

MOHN, F. et al. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. **Mol Cell**, v. 30, n. 6, p. 755-66, Jun 2008. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514006> >.

MOMPARLER, R. L. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). **Semin Hematol**, v. 42, n. 3 Suppl 2, p. S9-16, Jul 2005. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16015507> >.

MOMPARLER, R. L. et al. Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. **Anticancer Drugs**, v. 8, n. 4, p. 358-68, Apr 1997. ISSN 0959-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180389> >.

MONTALBAN-BRAVO, G.; GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 93, n. 1, p. 129-147, 01 2018. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29214694> >.

MONTORO, J. et al. **Study of causes of death in patients with Myelodysplastic Syndrome: a single institutuion experience.** *Blood: The American Society of Haemetology*. v ol. 118 n o. 21 5026 2011.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, Jan 2013. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781841> >.

MOUDRA, A. et al. Dynamic alterations of bone marrow cytokine landscape of myelodysplastic syndromes patients treated with 5-azacytidine. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 10, p. e1183860, 2016. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27853634> >.

MUKHERJEE, R. et al. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. **Sci Rep**, v. 5, p. 13886, Sep 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358827> >.

MULLICAN, S. E. et al. Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. **Genes Dev**, v. 25, n. 23, p. 2480-8, Dec 2011. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156208> >.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annu Rev Physiol**, v. 79, p. 541-566, 02 2017. ISSN 1545-1585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27813830> >.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723-37, Oct 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997792> >.

MUTZE, K. et al. DNA methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric cancer. **Eur J Cancer**, v. 47, n. 12, p. 1817-25, Aug 2011. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21458988> >.

NACHTKAMP, K. et al. Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol**, v. 95, n. 6, p. 937-44, May 2016. ISSN 1432-0584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025507> >.

NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS Genet**, v. 14, n. 6, p. e1007362, 06 2018. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29879107> >.

NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4841-51, May 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467609> >.

NOVAKOVIC, B. et al. β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1354-1368.e14, 11 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863248> >.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-57, Oct 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141> >.

OLIVEIRA, L. D. C. **Efeito de Drogas Moduladoras da estrutura da cromatina sobre a interação entre Macrófagos Murinos e Paracoccidioides brasiliensis**. 2012. Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12370/1/2012_LuanaCastroOliveira.pdf.

OLIVEIRA, N. F. et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 9, p. 719-25, Sep 2009. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659670> >.

ORDOVÁS, J. M.; SMITH, C. E. Epigenetics and cardiovascular disease. **Nat Rev Cardiol**, v. 7, n. 9, p. 510-9, Sep 2010. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603647> >.

PACIS, A. et al. Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. **Genome Res**, v. 25, n. 12, p. 1801-11, Dec 2015. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26392366> >.

PARDANANI, A. et al. IPSS-independent prognostic value of plasma CXCL10, IL-7 and IL-6 levels in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 26, n. 4, p. 693-9, Apr 2012. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912394> >.

PATEL, U. et al. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discov Today**, v. 22, n. 1, p. 186-193, 01 2017. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554801> >.

PAULSEN, M.; FERGUSON-SMITH, A. C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. **J Pathol**, v. 195, n. 1, p. 97-110, Sep 2001. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568896> >.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates. **EMBO J**, v. 28, n. 14, p. 2114-27, Jul 2009. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536133> >.

PELLAGATTI, A. et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 756-64, Apr 2010. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220779> >.

PIYATHILAKE, C. J. et al. A higher degree of expression of DNA methyl transferase 1 in cervical cancer is associated with poor survival outcome. **Int J Womens Health**, v. 9, p. 413-420, 2017. ISSN 1179-1411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652820> >.

PIÑEROS, A. R. et al. M2 macrophages or IL-33 treatment attenuate ongoing Mycobacterium tuberculosis infection. **Sci Rep**, v. 7, p. 41240, Jan 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28128217> >.

POLLYEA, D. A. et al. Monocyte function in patients with myelodysplastic syndrome. **J Leukoc Biol**, v. 104, n. 3, p. 641-647, 09 2018. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29656609> >.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1057-68, Oct 2010. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944598> >.

QURESHI, I. A.; MEHLER, M. F. Epigenetic mechanisms underlying the pathogenesis of neurogenetic diseases. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 4, p. 708-20, Oct 2014. ISSN 1878-7479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261112> >.

RASMUSSEN, K. D.; HELIN, K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. **Genes Dev**, v. 30, n. 7, p. 733-50, Apr 2016. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036965> >.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425-32, May 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522676> >.

RODRÍGUEZ-PAREDES, M.; ESTELLER, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 330-9, Mar 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21386836> >.

ROSEN, E. D. et al. Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. **Diabetes**, v. 67, n. 10, p. 1923-1931, 10 2018. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30237160> >.

RÖSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 816460, 2015. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26089604> >.

SADAHIRA, Y. et al. Immunohistochemical assessment of human bone marrow macrophages in hematologic disorders. **Pathol Int**, v. 49, n. 7, p. 626-32, Jul 1999. ISSN 1320-5463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504523> >.

SADEK, M. I. et al. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 19, n. 3, p. 513-21, Sep 1998. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730880> >.

SAEED, S. et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. **Science**, v. 345, n. 6204, p. 1251086, Sep 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25258085> >.

SAGE, E. H. et al. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 39, p. 37849-57, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867428> >.

SAMANTA, S. et al. Epigenetic dysfunctional diseases and therapy for infection and inflammation. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1863, n. 2, p. 518-528, 02 2017. ISSN 0925-4439. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27919711> >.

SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics. **FEBS J**, v. 278, n. 10, p. 1598-609, May 2011. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395977> >.

SATOH, T. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 936-44, Oct 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729857> >.

SAUNTHARARAJAH, Y. et al. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 3865-70, Dec 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907443> >.

SCARPA, M. et al. CD80 down-regulation is associated to aberrant DNA methylation in non-inflammatory colon carcinogenesis. **BMC Cancer**, v. 16, p. 388, 07 2016. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27377375> >.

SCHMID, M. C.; VARNER, J. A. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. **J Oncol**, v. 2010, p. 201026, 2010. ISSN 1687-8469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490273> >.

SCHMIEDEL, B. J. et al. Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. **Int J Cancer**, v. 128, n. 12, p. 2911-22, Jun 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960460> >.

SCHNEIDER, R. et al. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 73-7, Jan 2004. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661024> >.

SHARGIAN-ALON, L. et al. Hypomethylating Agents-associated Infections-Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 18, n. 9, p. 603-610.e1, Sep 2018. ISSN 2152-2669. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29921527> >.

SHARMA, G. et al. Genome-wide non-CpG methylation of the host genome during M. tuberculosis infection. **Sci Rep**, v. 6, p. 25006, Apr 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112593> >.

_____. The interaction of mycobacterial protein Rv2966c with host chromatin is mediated through non-CpG methylation and histone H3/H4 binding. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. 8, p. 3922-37, Apr 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824946> >.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, Jan 2010. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752007> >.

SHIVAROV, V. et al. ASXL1 mutations define a subgroup of patients with acute myeloid leukemia with distinct gene expression profile and poor prognosis: a meta-analysis of 3311 adult patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 56, n. 6, p. 1881-3, Jun 2015. ISSN 1029-2403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25308295> >.

SILVERMAN, L. R. et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 10, p. 2429-40, May 2002. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011120> >.

SOHLBERG, E. et al. Imprint of 5-azacytidine on the natural killer cell repertoire during systemic treatment for high-risk myelodysplastic syndrome. **Oncotarget**, v. 6, n. 33, p. 34178-90, Oct 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497557> >.

STEENSMA, D. P. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. **Blood Cancer J**, v. 8, n. 5, p. 47, 05 2018. ISSN 2044-5385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29795386> >.

SUBRAMANIAM, D. et al. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Front Oncol**, v. 4, p. 80, 2014. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24822169> >.

SUGIMOTO, C. et al. Differentiation Kinetics of Blood Monocytes and Dendritic Cells in Macaques: Insights to Understanding Human Myeloid Cell Development. **J Immunol**, v. 195, n. 4, p. 1774-81, Aug 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26179903> >.

SZYF, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 243-63, 2009. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18851683> >.

TATANO, Y.; SHIMIZU, T.; TOMIOKA, H. Unique macrophages different from M1/M2 macrophages inhibit T cell mitogenesis while upregulating Th17 polarization. **Sci Rep**, v. 4, p. 4146, Feb 2014. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553452> >.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, v. 361, n. 19, p. 1872-85, Nov 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890130> >.

THANGAVEL, J. et al. Epigenetic modifiers reduce inflammation and modulate macrophage phenotype during endotoxemia-induced acute lung injury. **J Cell Sci**, v. 128, n. 16, p. 3094-105, Aug 2015. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26116574> >.

TOH, T. B.; LIM, J. J.; CHOW, E. K. Epigenetics in cancer stem cells. **Mol Cancer**, v. 16, n. 1, p. 29, 02 2017. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28148257> >.

TOMA, A. et al. Infections in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 97, n. 10, p. 1459-70, Oct 2012. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733024> >.

TONIOLO, A. et al. Alternative activation of human macrophages is rescued by estrogen treatment in vitro and impaired by menopausal status. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 1, p. E50-8, Jan 2015. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25303489> >.

VAN DER HEIJDEN, C. D. C. C. et al. Epigenetics and Trained Immunity. **Antioxid Redox Signal**, v. 29, n. 11, p. 1023-1040, Oct 2018. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978221> >.

VARANASI, S. K. et al. Azacytidine Treatment Inhibits the Progression of Herpes Stromal Keratitis by Enhancing Regulatory T Cell Function. **J Virol**, v. 91, n. 7, 04 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100624> >.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394> >.

VASU, S. et al. Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. **Blood**, v. 127, n. 23, p. 2879-89, 06 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013443> >.

VISCONTE, V.; TIU, R. V.; ROGERS, H. J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. **Blood Res**, v. 49, n. 4, p. 216-27, Dec 2014. ISSN 2287-979X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548754> >.

WALLNER, S. et al. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. **Epigenetics Chromatin**, v. 9, p. 33, 2016. ISSN 1756-8935. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27478504> >.

WALTER, M. J. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 366, n. 12, p. 1090-8, Mar 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417201> >.

WANG, L. X. et al. Low dose decitabine treatment induces CD80 expression in cancer cells and stimulates tumor specific cytotoxic T lymphocyte responses. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62924, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671644> >.

WANG, X. et al. Decitabine inhibits T cell proliferation via a novel TET2-dependent mechanism and exerts potent protective effect in mouse auto- and allo-immunity models. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 56802-56815, Aug 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28915632> >.

WANG, Z. et al. Histone Posttranslational Modifications of CD4⁺ T Cell in Autoimmune Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 10, Sep 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669210> >.

_____. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. **Nat Genet**, v. 40, n. 7, p. 897-903, Jul 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552846> >.

WEI, G. et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 155-67, Jan 2009. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144320> >.

WIJERMANS, P. et al. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 5, p. 956-62, Mar 2000. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694544> >.

WILEY, J. S. et al. Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. **J Clin Invest**, v. 69, n. 2, p. 479-89, Feb 1982. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6948829> >.

WILSON, C. B.; ROWELL, E.; SEKIMATA, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 2, p. 91-105, Feb 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151746> >.

WOLK, K. et al. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. **Pathobiology**, v. 67, n. 5-6, p. 253-6, 1999. ISSN 1015-2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725796> >.

WU CT; MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1103-5, Aug 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498582> >.

YALNIZ, F. F. et al. A Pilot Trial of Lirilumab With or Without Azacitidine for Patients With Myelodysplastic Syndrome. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 18, n. 10, p. 658-663.e2, Oct 2018. ISSN 2152-2669. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30001986> >.

YAMASHIRO, L. H. et al. Isoniazid-induced control of Mycobacterium tuberculosis by primary human cells requires interleukin-1 receptor and tumor necrosis factor. **Eur J Immunol**, v. 46, n. 8, p. 1936-47, 08 2016. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230303> >.

YANG, B. H. et al. Development of a unique epigenetic signature during in vivo Th17 differentiation. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. 3, p. 1537-48, Feb 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25593324> >.

YANG, H. et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1280-8, Jun 2014. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270737> >.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark Res**, v. 2, n. 1, p. 1, Jan 2014. ISSN 2050-7771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398220> >.

YANG, X. et al. Epigenetic regulation of macrophage polarization by DNA methyltransferase 3b. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 4, p. 565-74, Apr 2014. ISSN 1944-9917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24597547> >.

YANG Y; Y, W. **The clinical significance of tumor associated macrophages in myelodysplastic syndrome**. Blood: The American Society of Hematology. doi: 10:1182 2018.

ZAMBUZI, F. A. et al. Identification of promising plasma immune biomarkers to differentiate active pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 88, p. 99-107, 12 2016. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27591510> >.

ZANG, D. Y. et al. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. **Blood**, v. 98, n. 10, p. 3058-65, Nov 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698291> >.

ZEIDAN, A. M. et al. Platelet count doubling after the first cycle of azacitidine therapy predicts eventual response and survival in patients with myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukaemia but does not add to prognostic utility of the revised IPSS. **Br J Haematol**, v. 167, n. 1, p. 62-8, Oct 2014. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24995683> >.

ZHANG, Q.; CAO, X. Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. **Nat Rev Immunol**, Mar 2019. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30918351> >.

ZHANG, W. et al. Abnormal populations and functions of natural killer cells in patients with myelodysplastic syndromes. **Oncol Lett**, v. 15, n. 4, p. 5497-5504, Apr 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29556297> >.

ZHANG, X. et al. DNA methylation dynamics during ex vivo differentiation and maturation of human dendritic cells. **Epigenetics Chromatin**, v. 7, p. 21, 2014. ISSN 1756-8935. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161698> >.

ZHENG, L. et al. Unraveling methylation changes of host macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 98, p. 139-48, May 2016. ISSN 1873-281X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156630> >.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, Oct 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628149> >.

ZOU, J. X. et al. Altered naive and memory CD4+ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, v. 23, n. 7, p. 1288-96, Jul 2009. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282834> >.

ØRSKOV, A. D. et al. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. **Oncotarget**, v. 6, n. 11, p. 9612-26, Apr 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25823822> >.

Anexo I – Aprovação do CEP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 034/2016
kms

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2016.

Ao Pós-graduanda
Fabiana Albani Zambuzi
Orientadora: Profª. Drª. Fabiani Gai Frantz
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “AÇÃO DO TRATAMENTO COM DECITABINE (DAC) SOBRE A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NA INFECÇÃO IN VITRO COM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 421 - CAAE nº 59466716.1.0000.5403, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 157ª reunião ordinária, realizada em 07/10/2016.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

nexo II – Aprovação do CEP – paciente SMD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 020/2017
kms

Ribeirão Preto, 30 de março de 2017.

À Pós-graduanda
Fabiana Albani Zambuzi
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiani Gai Frantz
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO IN VITRO COM DECITABINE (DAC) SOBRE A FUNÇÃO IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 428 - CAAE nº 62375516.9.0000.5403**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 161ª reunião ordinária, realizada em 13.03.2017.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^ª. DR^ª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo III – Aprovação Biorrepositório Profa. Fabíola

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 033/2013
dfav

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2013.

A

Prof.^a Dr.^a Fabíola Attié de Castro
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou em sua 118ª Sessão Extraordinária realizada em 24 de junho de 2013, o reconhecimento do Biorrepositório FCFRP nº 003, intitulado "**BIORREPOSITÓRIO DO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DA FCFRP**", sob sua responsabilidade.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos. Lembramos que ainda, que, de acordo com a Resolução 441, toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado deverá ser submetida para aprovação deste CEP e que a legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biorrepositórios.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Regina Torqueti", is written over the typed name.

Prof.^a Dr.^a Maria Regina Torqueti
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCFRP/USP

Anexo IV – TCLE – grupo controle**Termo de Consentimento**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**NOME DA PESQUISA: “Ação do tratamento com Decitabine (DAC) sobre a ativação de células do sistema imune na infecção *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*”****PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:** Fabiana Albani Zambuzi, Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Sua participação será importante para o desenvolvimento desta pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com Decitabine, normalmente utilizado no tratamento de doenças hematológicas, sobre a atividade das células do sistema imunológico. Para tal necessitaremos realizar coleta de amostras de sangue que serão utilizadas para separação de células – leucócitos totais (células brancas) de indivíduos previamente saudáveis **que não realizem tratamento com o fármaco** para controle quanto à resposta imunológica.

Qual o objetivo desta pesquisa?

O estudo tem como objetivo avaliar o efeito causado pelo tratamento com Decitabine sobre as células do sistema imunológico, importantes para a defesa do hospedeiro frente infecções e outras doenças. Para tal, iremos coletar as células e realizar todo o tratamento *in vitro* com o medicamento a fim de avaliar a resposta imunológica quando a célula é infectada também *in vitro* com bactérias.

Como você, voluntário, vai participar da pesquisa?

A participação é **voluntária** e acontecerá através da doação de pequena quantidade de sangue (30 mL). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. Os riscos presentes em nosso procedimento são aqueles inerentes à coleta de sangue, tais como desconforto e dor da picada, formação de hematomas e riscos biológicos. Para evitar a ocorrência de tais desconfortos e riscos, todas as técnicas de biossegurança serão aplicadas, como a utilização de agulhas e tubos descartáveis, bem como as coletas serão realizadas por profissional capacitado.

Informamos ainda que você poderá recusar ou retirar o consentimento em qualquer tempo e/ou fase da pesquisa, a qual deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, sem acarretar nenhum prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão ao pesquisador responsável.

Garantimos que dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa, bem como quando houver perdas ou destruição das amostras biológicas, e que as mesmas serão descartadas após a realização das análises e exames necessários e não serão utilizadas em estudos futuros. Esta pesquisa não trará benefício direto para você, mas os resultados dela poderão ajudar na descoberta de novos procedimentos e de novos tratamentos. A sua participação na pesquisa não lhe trará despesas e nenhum ganho em dinheiro.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com pelos telefones: Fabiana Albani Zambuzi (16) 3315-4189 ou (17) 98205-5000 ou Profª Dra Fabiani Gai Frantz (16) 3315-0241. Também pode entrar em contato diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, unidade responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa e promover a avaliação ética do desenvolvimento da mesma, pelo telefone (16) 3315-4213 ou pelo e-mail cep@fcfrp.usp.br para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos à pesquisa.

Sendo assim, se desejar colaborar com o presente estudo, solicitamos que assine este documento. Deverão ser emitidas e assinadas duas vias do mesmo documento, uma para arquivo do pesquisador e outra que ficará com você, participante voluntário desta pesquisa.

Nome do participante/RG: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Anexo V – TCLE – grupo pacientes

Termo de Consentimento (Pacientes)

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “Avaliação do tratamento com agentes hipometilantes sobre a resposta imunológica em paciente com neoplasias mieloides”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Fabiana Albani Zambuzi, Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS NAS INSTITUIÇÕES COPARTICIPANTES: Profa. Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso (HC-FMUSP) e Dr. Nelson Hamerschlag (Hospital Albert Einstein)

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Sua participação será importante para integrar o grupo de **PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOIDES** desta pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) em conjunto com os pesquisadores do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), Hospital das Clínicas de São Paulo (FMUSP) e do Hospital Albert Einstein (SP) com o objetivo é avaliar o efeito do tratamento com **Decitabine ou Azacitidina**, medicamentos utilizados no tratamento de doenças hematológicas, sobre a atividade das células do sistema imunológico. Para tal, necessitaremos realizar coleta de amostras de sangue que serão utilizadas para separação de células – **leucócitos totais (células brancas) e plasma** de indivíduos **previamentediagnosticados com tais doenças, dentre as quais Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mieloide Aguda**. Para realização desta pesquisa, os indivíduos com a doenças hematológicas em questão serão divididos em dois grupos: **indivíduos não tratados/anterior ao tratamento e em tratamento com o medicamento – após cada ciclo de tratamento**.

Qual o objetivo desta pesquisa?

O estudo tem como objetivo avaliar o efeito causado pelo tratamento com Decitabine ou AZA sobre as células do sistema imunológico, importantes para a defesa do hospedeiro frente a infecções e outras doenças. Para tal, iremos coletar o plasma e as células de pacientes tratados ou não com o agente hipometilante. Com as amostras coletadas, iremos avaliar a produção de mediadores inflamatórios e a função celular quando a célula é infectada *in vitro* com bactérias para compreender como o fármaco pode modular a resposta imunológica.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

A participação é **voluntária** e acontecerá através da doação de pequena quantidade de sangue (20mL). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. Os riscos presentes em nosso procedimento são aqueles inerentes à coleta de sangue, tais como desconforto e dor da picada, formação de hematomas e riscos biológicos, que serão evitados. Para evitar a ocorrência de tais desconfortos e riscos, todas as técnicas de biossegurança serão aplicadas, como a utilização de agulhas e tubos descartáveis, bem como as coletas serão realizadas por profissional capacitado.

Informamos ainda que você poderá recusar ou retirar o consentimento em qualquer tempo e/ou fase da pesquisa, a qual deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, sem acarretar nenhum prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão ao pesquisador responsável.

Garantimos que dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa, bem como quando houver perdas ou destruição das amostras biológicas, e que as mesmas serão descartadas após a realização das análises e exames necessários e não serão utilizadas em estudos futuros. Esta pesquisa não trará benefício direto para você, mas os resultados dela poderão ajudar na descoberta de novos procedimentos e de novos tratamentos. A sua participação na pesquisa não lhe trará despesas e nenhum ganho em dinheiro.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com pelos telefones: Fabiana Albani Zambuzi (16) 3315-4189 ou (17) 98205-5000 ou Profa. Dra Fabiani Gai Frantz (16) 3315-0241. Também pode entrar em contato diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, unidade responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa e promover a avaliação ética do desenvolvimento da mesma, pelo telefone (16) 3315-4213 ou pelo e-mail cep@fcfrp.usp.br para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos à pesquisa.

Sendo assim, se desejar colaborar com o presente estudo, solicitamos que assine este documento. Deverão ser emitidas e assinadas duas vias do mesmo documento, uma para arquivo do pesquisador e outra que ficará com você, participante voluntário desta pesquisa. Nome do participante/RG:

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____