UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neutrófilos humanos polarizados *in vitro* em perfis pró e anti-inflamatórios apresentam distintos padrões de alterações epigenéticas

Cícero José Luíz dos Ramos Almeida

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neutrófilos humanos polarizados *in vitro* em perfis pró e anti-inflamatórios apresentam distintos padrões de alterações epigenéticas

Cícero José Luíz dos Ramos Almeida

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Cícero José Luíz dos Ramos Almeida

Neutrófilos humanos polarizados *in vitro* em perfis pró e anti-inflamatórios apresentam distintos padrões de alterações epigenéticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 02/07/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2020

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

Almeida, Cícero José Luíz dos Ramos

Neutrófilos humanos polarizados *in vitro* em perfis pró e anti-inflamatórios apresentam distintos padrões de alterações epigenéticas. Ribeirão Preto, 2020. 113 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia. Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Frantz, Fabiani Gai.

1. Imunidade inata. 2. Neutrófilos. 3. Epigenética. 4. Plasticidade celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Cícero José Luíz dos Ramos Almeida

Título do Trabalho: Neutrófilos humanos polarizados *in vitro* em perfis pró e anti-inflamatórios apresentam distintos padrões de alterações epigenéticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre 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:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que me apoiaram e me incentivaram a estar aqui, fisicamente ou não. A todos que sempre entenderam meus momentos de ocupação, de fraqueza, de impaciência, mas que acima de tudo, nunca desistiram de mim. Este trabalho é uma vitória minha e de vocês.

Luz para todos!

Agradecimentos

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele eu seria nada. Deus sempre me protegeu, confortou em todos os momentos difíceis e me guiou quando os caminhos pareciam confusos. Eu sou grato por tudo a Ele e hoje, estou onde estou graças a Ele.

A minha orientadora, Profa. Dr. Fabiani Gai Frantz. Obrigado por ter aberto as portas do seu laboratório e me dado a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa. Obrigado por todos os ensinamentos, conselhos e pela orientação, que certamente irão impactar de forma positiva em minha vida e me ajudarão a ser um profissional melhor. A senhora é maravilhosa e Deus sempre estará te protegendo!

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Adelmo (in memorium). Durante em vida, sempre me apoiaram e investiram em meus estudos, mesmo sendo uma família de uma cidade pequena do sertão Pernambucano e não possuindo muitas condições financeiras, pois acreditavam que a educação seria umas das únicas formas de crescimento na vida. Se hoje estou terminando meu mestrado, é fruto do investimento que eles fizeram em mim. E mesmo que hoje não estejam presentes fisicamente, sei que eles estão felizes com a minha conquista, pois antes de tudo, esta é uma conquista deles. Sempre amarei vocês!

Ao meu irmão, Adelmo Júnior. Quando os nossos pais faleceram, ele na posição de irmão mais velho precisou ser pai e mãe de forma inesperada e, mesmo em meio às adversidades, sempre me incentivou para que eu não desistisse de mim, que eu sempre fui um orgulho para ele. Meu irmão representa minha família hoje, meu irmão é minha família e sempre serei grato a ele pelas coisas que conquistei. Te amo!

Aos demais membros da minha família, Tia Graça, Tia Zelândia, Tia Lúcia, Tio Lamartine, Tia Angela e a minha madrasta, Patrícia. Vocês foram grandes suportes para mim em momentos bons e ruins. Sou grato por todo o carinho e amor que vocês têm por mim. Obrigado! Um grande e forte abraço a todos.

Aos colegas do LIME, Caroline Fontanari, Fabiana Zambuzi, Felipe Lima, Patrick Fernandes, Ricardo Castro e Humberto Gravina. Todos vocês contribuíram de alguma forma para que o projeto de pesquisa fosse desenvolvido e eu sou muito grato a todo o suporte de vocês. Obrigado!

Aos colegas do laboratório, especialmente à Marcela Roveratto, Camila Oliveira e Jefferson Elias. Obrigado pelas risadas, pelo humor, a tolerância e os conselhos concedidos quando eu estava em conflito comigo mesmo. Vocês ajudaram para que os momentos de experimentação

fossem mais leves e o mestrado menos conflituoso. Vou sentir saudades de ter vocês no mesmo laboratório comigo. De coração, muito obrigado!

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pelos ensinamentos, pelo compartilhamento dos seus equipamentos no laboratório. Tenho muita admiração pela senhora e pelo exemplo de profissional que a professora é. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os participantes do projeto de pesquisa. Sem a contribuição das amostras de sangue de vocês nada disso seria possível. Muito obrigado!

Aos funcionários técnicos da FCFRP – Alyne, Carlos, Caroline e Fabiana. Obrigado pelos ensinamentos de bancada e resoluções científicas.

Aos professores do Programa de Biociências e Biotecnologia. Obrigado pela troca de conhecimentos, os conselhos prestados para minha evolução acadêmica e desenvolvimento do meu projeto de pesquisa. Abraços!

À Profa. Dra. Ana Patricia Yatsuda Natsui. Quando eu participei como aluno da escola de inverno, não imaginava que iria ganhar uma amiga como a senhora. Apesar de não ser aluno do seu grupo de pesquisa, a professora sempre me convidou para confraternizações, sempre teve empatia comigo, e mesmo muito ocupada, tentava me ajudar a solucionar problemas seja com a pós-graduação, comitê de ética ou da escola de inverno. Sou muito grato por toda atenção que a senhora teve e tem comigo. Saiba que a admiro muito. Sorria! O Cícero sempre ficará feliz com isso. Forte abraço!

Aos colegas que fiz em Ribeirão Preto durante esses dois anos, em especial Kelly, Romário, Reginaldo, Alana, Ana Júlia, Jhonatan, Lucas, Júlia Cunha, Thais Canassa, Thais Plebis, Péricles, Luciana, Marianne, Nathália, Robson, Tárik, Larissa e demais outros que não foram aqui citados. Muito obrigado.

As minhas amigas da graduação em Biomedicina da UFPE, em especial, Catarina, Elidianne, Elys, Fernanda, Mayara, Gabriela, Rita, Jeanne, Sueden, Isabela e Izabelly. Muito obrigado por todo o apoio que vocês me deram durante a graduação, as noites mal dormidas, os grupos de estudo e os momentos de comemoração. Sou muito grato por ter vocês!

Aos meus amigos de infância, adolescência e vida, Laura, Altemiza, Lívia, Maira e Walber. Vocês sempre estiveram em todos os momentos da minha vida me apoiando em todas as minhas decisões, sou muito lisonjeado te ver vocês como amigos. Amigos que considero como irmãos

e que, mesmo distante, desejo que nossos laços se fortaleçam cada vez mais. Quem tem um amigo que confia, tem tudo na vida. Amo cada um de vocês!

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela infraestrutura. Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pelo suporte e formação profissional. Obrigado a estas instituições.

Às agências de fomento em pesquisa. À FAPESP (Projeto de Mestrado – processo nº 2018/12641-4), à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro para 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.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste projeto e conclusão desta etapa da minha vida. Obrigado a todos!

Epígrafe

“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; É que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

RESUMO

ALMEIDA, C.J.L.R. **Neutrófilos humanos polarizados *in vitro* em perfis pró e anti-inflamatórios apresentam distintos padrões de alterações epigenéticas**. 2020. 115f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Alterações epigenéticas são por definição alterações herdáveis do genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Dentre os eventos sob controle epigenético, a diferenciação celular em macrófagos e células T são marcadas por mudanças como metilação/acetilação de histonas para que se diferenciem em M1, M2, Th1, Th2 e Th17, por exemplo. A plasticidade celular do sistema imune inato e adaptativo pode então estar sob controle epigenético, quando o microambiente infeccioso ou inflamatório define o perfil de diferenciação ou polarização celular. No ambiente tumoral foram identificados neutrófilos polarizados, associados ao controle ou à susceptibilidade tumoral. Aos neutrófilos já foram atribuídos papéis controversos também na tuberculose, ora inflamatório, ora anti-inflamatório. Nossa hipótese é que a polarização dos neutrófilos nestes perfis opostos possui regulação epigenética. Portanto, nosso objetivo foi investigar quais alterações epigenéticas controlam a polarização *in vitro* de neutrófilos, de acordo com o microambiente inflamatório. Para tanto, os neutrófilos foram isolados a partir de sangue periférico de 20 participantes hígidos. Estas células foram polarizadas *in vitro* com GM-CSF e IFN-γ para diferenciação do perfil pró-inflamatório (NI) ou com IL-4, IL-13 e TGF-β para diferenciação do perfil anti-inflamatório (NonI). Os neutrófilos foram caracterizados pela análise fenotípica e assinatura epigenética de cada perfil celular. A análise fenotípica consistiu da análise morfológica, produção de espécies reativas de oxigênios (EROs), produção e expressão gênica de citocinas, e expressão gênica de receptores de superfície celular. A assinatura epigenética foi realizada através da análise do perfil de metilação global do DNA, expressão de enzimas epigenéticas e metilação e acetilação de histonas. Os resultados demonstram que após 2h de polarização os NI apresentam modificações morfológicas nucleares, aumento de tamanho celular e aumento na produção de EROs quando comparados aos NonI. Adicionalmente, os NI possuem aumento da produção de IL-8, como também aumento na expressão gênica de TNF-α, IL-10, TLR2 e TLR4 quando comparados aos NonI. Além disso, os NonI apresentam maior expressão gênica de ALOX15 em relação aos neutrófilos NI. Quanto a assinatura epigenética das células, os neutrófilos NI possuem menor percentual de metilação global quando comparados aos outros perfis, e as células NonI possuem maior expressão gênica da enzima DNMT3A quando comparados aos neutrófilos NI. A frequência de modificações de histonas relacionadas a ativação e repressão da transcrição gênica também indicam possível modulação da expressão dos genes de TNF-α, IL-6 e IL-1β. Assim, sugerimos que o microambiente tecidual pode influenciar a diferenciação do perfil de neutrófilos em pró ou anti-inflamatório e que alterações epigenéticas estão envolvidas na plasticidade celular.

Palavras-chave: imunidade inata, neutrófilos, epigenética, plasticidade celular.

ABSTRACT

ALMEIDA, C.J.L.R. ***In vitro*** **polarized human neutrophils in pro and anti-inflammatory profiles show different patterns of epigenetic changes**. 2020. 115f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Epigenetic changes are, by definition, inheritable changes to the functional genome that do not alter the nucleotide sequence of DNA. Among some events under epigenetic control, cell differentiation in macrophages and T cells are marked by changes such as histone methylation / acetylation to differentiate into M1, M2, Th1, Th2 and Th17, for example. The innate and adaptive immune system plasticity is under epigenetic control, when the infectious or inflammatory microenvironment defines the cell differentiation or polarization profile. In the tumor environment, polarized neutrophils were identified, associated with tumor control or susceptibility. Controversial roles have also been attributed to neutrophils in tuberculosis, even inflammatory, or anti-inflammatory. Our hypothesis is that the neutrophil polarization in these opposite profiles is under epigenetic regulation. Therefore, our objective was to investigate which epigenetic changes are involved the *in vitro* polarization of neutrophils, according to the inflammatory microenvironment. Therefore, neutrophils were isolated from the peripheral blood of 20 healthy participants. These cells were polarized *in vitro* with GM-CSF and IFN-γ to differentiate cells to the pro-inflammatory profile (NI) or with IL-4, IL-13 and TGF-β to differentiate cells to the anti-inflammatory profile (NonI). Neutrophils were characterized by phenotypic analysis and epigenetic signature of each cell profile. Phenotypic analysis consisted of morphological analysis, reactive oxygen species (ROS) and cytokine production, and cell surface receptor and cytokine gene expression. The epigenetic signature was performed through the analysis of the global DNA methylation profile, expression of epigenetic enzymes and histone methylation and acetylation. After 2h of polarization, NI have nuclear morphological changes, increase in cell size and increase in ROS production when compared to NonI. Additionally, NI have increased IL-8 production, as well as increased TNF-α, IL-10, TLR2 and TLR4 gene expression when compared to NonI. In addition, NonI have higher gene expression of ALOX15 compared to NI neutrophils. As for the epigenetic signature of cells, NI neutrophils have a lower percentage of global methylation when compared to other profiles, and NonI cells have greater gene expression of the DNMT3A enzyme when compared to NI neutrophils. The frequency of histone changes related to activation and repression of gene transcription also indicates possible modulation of the expression of the TNF-α, IL-6 e IL-1β genes. Thus, we suggest that the tissue microenvironment can influence the differentiation of the neutrophil into pro or anti-inflammatory profile and that epigenetic changes are involved in cellular plasticity.

Keywords: innate immunity, neutrophils, epigenetics, cell plasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
ρg	Picograma
AcH4	Acetilação da histona 4
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
BCG	Bacilo Calmette-Guerrim
CCR7	Receptor de quimiocina tipo 7
CD80	*Cluster of differentiation* 80
CD86	*Cluster of differentiation* 86
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ChiP	Imunoprecipitação da cromatina
CpG	Citosina-fostato-guanina
cpm	Contagem de fótons por minuto
CR3	Receptor para complemento tipo 3
CTRL	Controle
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DCFDA	Diacetato de 2',7' - diclorofluorescina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA metiltransferase do tipo 1
DNMT2	DNA metiltransferase do tipo 2
DNMT3	DNA metiltransferase do tipo 3
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent assay*

ERO	Espécie reativa de oxigênio
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias monócitos granulócitos
GPCRs	*G protein-coupled receptor*s
H3k27me2 ou 3	Di ou trimetilação da lisina 27 da histona 3
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona deacetilase
HDNs	*high-density neutrophils*
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNP1	Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 1
HNP2	Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 2
HNP3	Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 3
HNP4	Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 4
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
IP-10	*Interferon gamma-induced protein 10*
JMJD3	*Jumonji Domain Containing 3(histone H3K27 demethylase)*
LAS	Leica *application* suíte
LDGs	*Low-density granulocytes*
LDNs	*Low-density neutrophils*

LES	Lupús eritrematoso sistêmico
lnRNA	*Long non-coding RNA*
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Cepas multidrogas resistentes
MFI	Intensidade média de fluorescência
mg	Miligrama
MHC-II	Complexo maior de histocompatibilidade II
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
M. tuberculosis(Mtb)	*Mycobacterium tuberculosis*
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NDNs	*Normal-density neutrophils*
NE	*Neutrophil elastase*
NET	*Neutrophil extracelullar trap*
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
N1	Neutrófilo tipo 1
N2	Neutrófilo tipo 2
NI	*Inflammatory*
NonI	*Non-Inflammatory*
NoP	*Non-polarized*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	*Phosphate buffered saline*
pg	Picogramas
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RFU	Unidades relativas de fluorescência
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura celular (*Roswell Park Memorial Institute*)
TB	Tuberculose
TB MDR	Cepas multirresistentes da tuberculose
T CD4+	Linfócitos T positivos para *cluster of differentiation* 4
T CD8+	Linfócitos T positivos para *cluster of differentiation* 8
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de transformação do crescimento tipo beta
Th1	*Type 1 T helper cell*
Th2	*Type 2 T helper cell*
Th17	*Type 17 T helper cell*
TLR2	Receptor semelhante ao Toll2
TLR4	Receptor semelhante ao Toll4
TLR7	Receptor semelhante ao Toll7
TLR8	Receptor semelhante ao Toll8
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores transcricionais e epigenéticos reguladores da diferenciação de células hematopoiéticas. 25
Figura 2 – Exemplos de citocinas que possuem a expressão gênica regulada por mecanismos epigenéticos em neutrófilos humanos. 35
Figura 3 - Esquema das etapas seguidas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa. 41
Figura 4 - Morfologia dos neutrófilos 53
Figura 5 - Após 2h de polarização os neutrófilos possuem tamanhos diferentes. 54
Figura 6 - A polarização celular induz a diferente expressão de marcadores de superfície nos neutrófilos. 55
Figura 7 - Os neutrófilos possuem diferenças na atividade metabólica. 56
Figura 8 - Liberação de citocinas no sobrenadante após 2h de diferenciação celular. 57
Figura 9 - Expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em neutrófilos após 2h de polarização *in vitro*. 58
Figura 10 - Expressão gênica dos receptores de superfície celular TLR2 e TLR4 após 2h de polarização *in vitro*. 59
Figura 11 - Expressão gênica do receptor CCR7 e da enzima ALOX15 após 2h de polarização *in vitro* 59
Figura 12- Perfil de metilação global do DNA dos neutrófilos polarizados por 2h *in vitro*. .. 61
Figura 13 - Expressão das enzimas epigenéticas DNMT1, DNMT3A E DNMT3B após 2h de polarização dos neutrófilos *in vitro*. 62
Figura 14 - Modificações epigenéticas de histonas associadas à região promotora de TNF-α. 64
Figura 15 - Modificações epigenéticas de histonas associadas à região promotora de IL-1β. 65
Figura 16 - Modificações epigenéticas de histonas associadas à região promotora de IL-6... 66

SUMÁRIO

1. Introdução 22

1.1 Epigenética 23

1.1.1 Epigenética Associada a Diferenciação e Polarização de Células do Sistema Imune 24

1.2 Neutrófilos e Resposta Imune 28

1.2.1 Neutrófilos e Polarização Celular 31

1.2.2 Neutrófilos e Epigenética 34

2. Objetivos 38

2.1 Objetivo Geral 39

2.2 Estratégias Utilizadas Para Alcançar o Objetivo 39

3. Delineamento Experimental 40

4. Materiais e Métodos 42

4.1 Casuística 43

4.2 Obtenção de Neutrófilos do Sangue Periférico 43

4.3 Polarização de Neutrófilos Para Os Perfis Pró e Anti-inflamatório 44

4.4 Ensaios para definição da assinatura fenotípica dos perfis de neutrófilos 44

4.4.1 Análise morfológica 44

4.4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) 44

4.4.3 Avaliação imunofenotípica de marcadores de superfície celular 45

4.4.4 Quantificação de citocinas por ELISA 45

4.4.5 Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real 45

4.5 Ensaios para avaliação das mudanças epigenéticas nos neutrófilos 47

4.5.1 Extração e análise de metilação global do DNA 47

4.5.2 Expressão de enzimas epigenéticas 48

4.5.3 Imunopreciptação da cromatina (ChiP) 48

4.6 Análise Estatística 50

5. Resultados: Parte I – Ensaios para definição da assinatura fenotípica dos neutrófilos polarizados 51

5.1 A polarização de neutrófilos induz modificações morfológicas 52

5.2 Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos 56

5.3 ELISA e quantificação do mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias expressas pelos neutrófilos 57

Resultados: Parte II – Ensaios para avaliação das mudanças epigenétticas nos neutrófilos 60

5.4 Determinação do padrão de metilação global do DNA 61

5.5 Análise da expressão de enzimas epigenéticas modificadoras do DNA 62

5.6 Investigação de modificações epigenéticas associadas às histonas em genes associados a resposta imune dos neutrófilos 63

6. Discussão..... 67

7. Resumo dos Resultados e Conclusão 80

8. Referências Bibliográficas 82

9. ANEXOS..... 112

9.1 ANEXO 1: Parecer Consubstanciado do Conselho de Ética e Pesquisa (CEP)..... 113

9.2 ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)..... 114

1. Introdução

1.1 Epigenética

Mudanças epigenéticas são variações não genéticas que podem ser herdadas, mas que não alteram a sequência do DNA (Sharma *et al.*, 2010). Estas podem estar envolvidas na orientação dos padrões de mudanças fenotípicas que acontecem em populações celulares, tais como diferenciação, amadurecimento e regulação (Reik, 2007; Boland *et al.*, 2014). Por exemplo, a expressão de fatores de transcrição nas células T que direcionam para o padrão Th1, Th2 ou Th17 está relacionada à regulação epigenética (Wei *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015), assim como a diferenciação dos monócitos em células dendríticas ou macrófagos teciduais (Tian *et al.*, 2017) e a ativação dos macrófagos nos perfis M1 e M2 (Zhou *et al.*, 2017). Neste contexto de plasticidade celular, existem evidências na literatura de que os neutrófilos também se distinguem dependendo do microambiente inflamatório (Deniset and Kubes, 2018; Giese *et al.*, 2019). Portanto, nossa hipótese é que alterações epigenéticas também poderiam acontecer em neutrófilos, direcionando a polarização para perfis pró ou anti-inflamatórios, de acordo com os estímulos de citocinas recebidos pelas células.

As mudanças epigenéticas acontecem por mecanismos distintos, como adição ou retirada de grupos químicos nas caudas de histonas (Bannister and Kouzarides, 2011), metilação direta do DNA (Mersfelder and Parthun, 2006) e expressão de RNAs não codificantes, exemplificados pelos microRNAs e *long non-coding* RNAs (Bernstein and Allis, 2005). Como resultado, as modificações epigenéticas variantes determinam a regulação da atividade transcricional e silenciamento de produtos gênicos.

A metilação do DNA parece estar mais relacionada ao silenciamento gênico, devido a mecanismos como a adição de um radical metil (CH3) no carbono 5 da base nitrogenada citosina em ilhas ricas de motivos CpG (citosina-guanina), levando à formação de 5-metilcitidina e a uma falha no reconhecimento de sequências de DNA (Moore *et al.*, 2013) Quando o DNA é metilado, há recrutamento de proteínas que causam a compactação da cromatina, assim a enzima RNA-polimerase não é capaz de se ligar ao DNA e a transcrição gênica é bloqueada (Boyes and Bird, 1991; Hendrich and Bird, 1998; Wang *et al.*, 2008).

Já as modificações químicas nas histonas, como metilação, acetilação ou fosforilação, resultam na mudança da acessibilidade física dos fatores transcricionais ao DNA, impedindo ou ativando a transcrição gênica (Moss and Wallrath, 2007). Por exemplo, a ativação gênica promovida pela acetilação de regiões funcionais facilitaria o acesso de fatores de transcrição (Wang *et al.*, 2008), o que é exemplificado pelas marcas de acetilação da histona 4 (AcH4) e a tri-metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) (Schneider *et al.*, 2004). O silenciamento, por

sua vez, poderia ocorrer com a metilação das lisinas 9 ou 27 (H3K9 e H3K27) (Cao *et al.*, 2002; Snowden *et al.*, 2002).

No caso dos RNAs não codificantes, os miRNAs podem promover silenciamento gênico devido a sua capacidade de inibir a ligação dos fatores transcricionais ao DNA (Klose and Bird, 2006; Liu *et al.*, 2018) ou podem estar associados à repressão de enzimas epigenéticas através do recrutamento de complexos de proteínas específicas que remodelam a estrutura da cromatina. Os miRNAs também podem ser epigeneticamente regulados pela metilação do DNA ou modificações nas histonas. Essas alterações interferem no perfil transcricional das células e contribuem para diversas funções fisiológicas e patológicas (Sato *et al.*, 2011; Moutinho and Esteller, 2017).

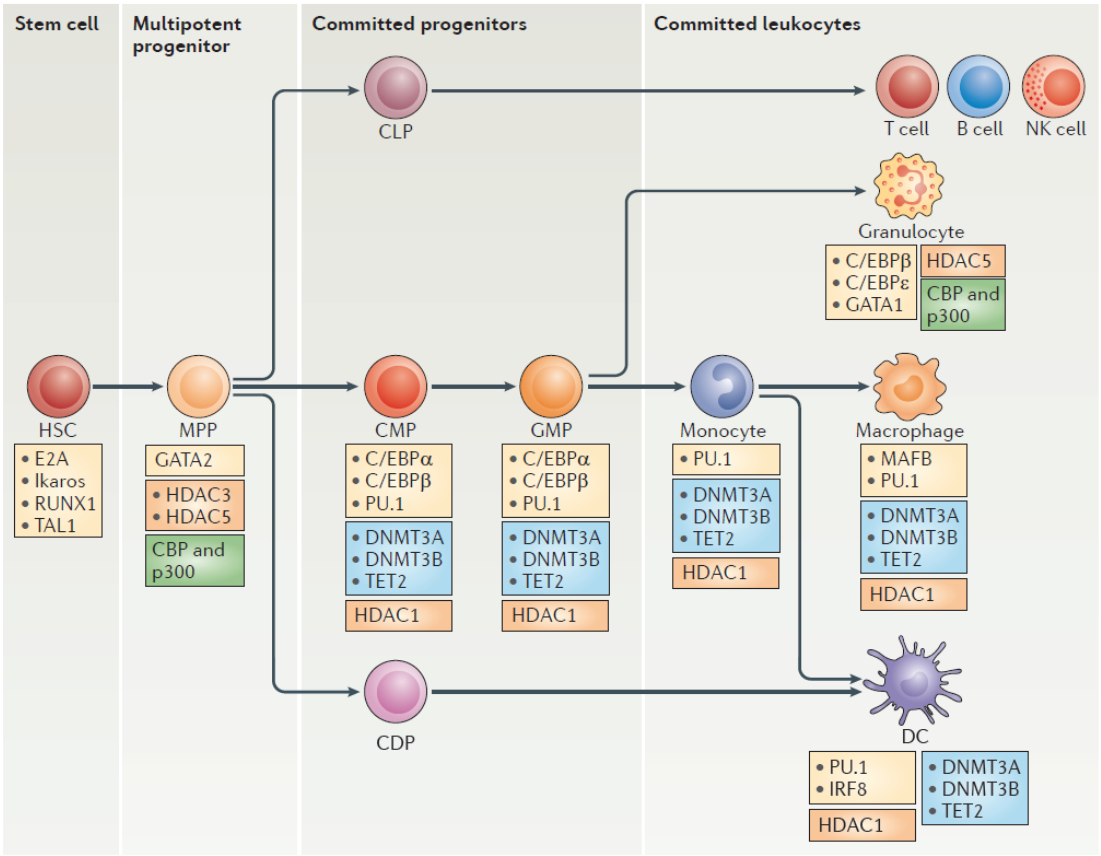
A adição ou retirada de grupamentos químicos são possíveis graças à ação de enzimas epigenéticas. Dentre as enzimas envolvidas em tais modificações nas histonas, estão as histonas acetiltransferases (HATs), histonas metiltransferases (HMTs), histonas demetilases (HDMs), histonas deacetilases (HDACs), histonas quinases (HKs), deubiquitinases (DUBs), entre outras (Biel *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2018). A metilação do DNA também depende da ação de DNA metiltransferases e suas isoformas (Klose and Bird, 2006; Fan *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2013). Algumas DNA metiltransferases, como a DNMT1, promovem a manutenção da metilação do DNA, evitando que o DNA seja demetilado espontaneamente e são responsáveis pela manutenção dos padrões de metilação do DNA que coordenam a mitose (Jeltsch, 2006). As enzimas DNMT 2 e 3 são responsáveis pela metilação *de novo*, o que garante a regulação da expressão gênica, sendo particularmente importantes durante o desenvolvimento embrionário (Okano *et al.*, 1999; Reik *et al.*, 2001) e de diferenciação celular.

Alterações epigenéticas são necessárias para o controle fisiológico da diferenciação celular ou de mudanças fenotípicas. Entretanto, diversas alterações epigenéticas já foram associadas ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Ciechomska *et al.*, 2014), câncer (Toh *et al.*, 2017) e desordens neurológicas (Qureshi and Mehler, 2014).

1.1.1 Epigenética associada à diferenciação e polarização de células do sistema imunológico

As células de origem mieloide desempenham um papel crucial no desenvolvimento da reposta imune inata e adaptativa, sendo o processo de diferenciação celular regulado por diversos fatores transcricionais e alterações epigenéticas (Figura 1) (Álvarez-Errico *et al.*, 2015).

Figura 1 - Fatores transcricionais e epigenéticos reguladores da diferenciação de células hematopoiéticas.



O comprometimento da linhagem e a diferenciação das células do sistema imune são regulados por fatores transcricionais, vias de sinalização de citocinas e alterações epigenéticas. A figura mostra os principais estágios de diferenciação mieloide (no eixo horizontal central) e indica os fatores de transcrição (caixas amarelas) e enzimas epigenéticas que poderiam estar envolvidas em cada estágio. Enzimas que participam de eventos de metilação do DNA são mostradas em caixas azuis (DNMTs), histonas deacetilases (HDACs) são mostradas em caixas de cor laranja e as histonas acetiltransferases são mostradas nas caixas verdes. *Fonte: Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function; Nature Reviews Immunology, 2015* (Álvarez-Errico *et al.*, 2015). *Reprodução autorizada de acordo com a licença de número 4596880134779 fornecida por Springer and Copyright Clearance Center.*

Na medula óssea, células-tronco hematopoiéticas (HSC) podem passa por modificações epigenéticas e transcricionais para induzir diferentes tipos celulares como células dendríticas, macrófagos, granulócitos e células linfoides. Nesse contexto, a metilação regula a renovação das HSC, como também a diferenciação de células mieloides e linfoides (Trowbridge *et al.*, 2009). A autorrenovação celular está relacionada ao silenciamento dos fatores de transcrição RUNX1 e GATA3 pelas enzimas DNMT3A e DNMT3B. Quando há inibição deste processo, é permitida a continuidade da diferenciação celular (Challen *et al.*, 2014). Durante a geração de diferentes linhagens, a metilação do DNA aumenta em células de origem linfoide, e diminui acentuadamente em células de origem mieloide (Klug *et al.*, 2010; Accomando *et al.*, 2014). O comprometimento com a identidade mieloide é garantido pela associação de fatores

transcricionais como o PU.1 e C/EBPα, sendo que o grau de metilação do DNA na diferenciação granulocítica varia de forma dependente de TET2 (Tefferi *et al.*, 2009; Rönnerblad *et al.*, 2014). Quando há diminuição de TET2, as HSC se autorrenovam e expandem, comprometendo com a linhagem monocítica e diminuição da granulopoiese (Ko *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2011; Moran-Crusio *et al.*, 2011). A geração de células granulocíticas ainda pode ser regulada pelos fatores de transcrição C/EBPβ e C/EBPε, que diminuem a expressão de HDAC1, permitindo ativação de genes ligados à diferenciação celular (Wada *et al.*, 2009).

Além da diferenciação celular, estudos têm descrito mecanismos epigenéticos associados à polarização e alterações das funções de macrófagos e linfócitos T CD4+. Em linfócitos T CD4+ *naive*, os genes codificadores de citocinas e fatores de transcrição estão normalmente pouco expressos ou inativos. Porém, durante a diferenciação celular, modificações repressivas podem ser retiradas dos *locus* gênicos, permitindo a transcrição (Bernstein *et al.*, 2006). A ativação da transcrição gênica é associada com modificações epigenéticas permissivas de histonas como H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9me1, H4K20me1, H3K79me3, H3K27me1 e H3K27ac, enquanto que as modificações H3K9me3, H3k27me2 e H3k27me3 estão associadas com repressão (Roh *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2010; Ciofani *et al.*, 2012; Consortium, 2012; Thurman *et al.*, 2012; Vahedi *et al.*, 2012).

Em células Th1, o complexo gênico ligado ao remodelamento da cromatina, BRG1, quando associado ao fator de transcrição STAT4, medeia o remodelamento da cromatina no gene promotor de *IFN-γ*, citocina importante para a ativação de fatores de transcrição como T-bet, e consequentemente HLX e RUNX3. Estes se opõem aos efeitos inibitórios da proteína GATA3 e dão seguimento à diferenciação de células Th1 (Mullen *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2005; Usui *et al.*, 2006; Djuretic *et al.*, 2007; Schoenborn and Wilson, 2007). Recentemente, a metil transferase SUV39H1, mediadora da metilação de H3K9, foi associada com a repressão da *Heterochromatin Protein* 1 (HP1) e manutenção do silenciamento do fator transcricional dos *locus* gênicos relacionados às células Th1, favorecendo a estabilidade de células Th2 (Allan *et al.*, 2012). Em células Th2, com a deleção de MLL (H2K4 histona-metiltransferase) há redução da expressão de citocinas específicas, como IL-4 e IL-13, que estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição como MAF, GATA3 e STAT6 e que regulam a diferenciação celular deste perfil (Ansel *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2006). A enzima Mel18 (H3k27me3 repressora do complexo proteína 1) também pode causar a inibição da transcrição de GATA3 em células Th2 (Kimura *et al.*, 2001).

Quanto às células Th17, estudos têm revelado que os *locus* gênicos de citocinas, como *IL17a* e *IL17f*, estão associados com modificações permissivas de histonas como H3K27ac e H3K4me3 e são regulados pelo fator de transcrição STAT3 (Akimzhanov *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007). A H3K4me3 também potencializa as regiões promotoras de *IL21*, *IL17a*, *IL17f*, *IL1r1*, *IL17re*, assim como a de RORC, enquanto que H3K27me3 possui função repressiva em *IL17*, *IL21* e RORC (Wei *et al.*, 2009).

Assim como observado para linfócitos, os macrófagos apresentam importante regulação funcional. Em estudos *in vitro*, é possível direcionar os dois perfis de polarização de macrófagos (M1 e M2) com o uso de diferentes citocinas. Monócitos M0 *in vitro* podem ser diferenciados em M1 com uso de M-CSF ou GM-CSF quando associados com IFN-γ e um agonista de TLR (toll-like receptors), como o LPS. Para o perfil M2, estimula-se com IL-4 ou IL-13 (Murray, 2017).

A diferenciação de monócitos com IFN-γ induz as vias ERK e MAPK, e há aumento da acetilação da histona H4 na região promotora de TNF-α, levando à ativação do fator de transcrição 2 (TF-2) e à polarização de células para o perfil M1 (Garrett *et al.*, 2008). Macrófagos M1 também apresentam aumento da expressão de uma histona metil-transferase, denominada MLL (do inglês *mixedlineage leucemia)*, que é responsável pela trimetilação da histona 3 na lisina 4 (H3K4me3) (Eissenberg and Shilatifard, 2010), o que leva ao aumento da expressão de CXCL10, quimiocina importante para diferenciação e crescimento celular (Dufour *et al.*, 2002; Aksoy *et al.*, 2006). Após o tratamento das células com LPS e TNF-α, a MLL regula a expressão gênica dependente de NF-κB (Wang *et al.*, 2012). O NF-κB, um importante ativador da transcrição gênica durante a inflamação, ativa a transcrição de CXCL10 induzida por IFN-γ (Yeruva *et al.*, 2008; Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

A histona deacetilase 3 (HDAC3) é descrita como uma enzima reguladora da polarização de células M1 (Mullican *et al.*, 2011). Quando há bloqueio ou diminuição desta enzima, há inibição da ativação de genes inflamatórios dependentes do fator de transcrição STAT1 e favorecimento da polarização de células M2 (Mullican *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Em contraste, o domínio H3K27 demetilase Jumonji 3 (Jmjd3) é conhecido por ser indispensável para polarização de macrófagos M2. Em resposta à IL-4 e quitinina, ou durante infecções causadas por helmintos, o Jmjd3 bloqueia modificações repressivas como H3K27me2 e H3K27me3, induzindo macrófagos a expressarem o fator de transcrição IRF4 e outros genes relacionados às células M2 (Ishii *et al.*, 2009; Satoh *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos têm associado o prognóstico de doenças infecciosas com alterações epigenéticas em genes correlacionados às células do sistema imune (Shell *et al.*, 2013; Maricato

et al., 2015), como mudanças epigenéticas na diferenciação do fenótipo de macrófagos e função de células dendríticas durante a sepse (Wen *et al.*, 2008; Ishii *et al.*, 2009). Em modelo animal, por exemplo, a produção de IL-12 por células dendríticas pode estar diminuída devido a metilação de lisinas da histona 3 (H3K4me3 e H3K27me2), o que favorece a extensão da imunossupressão pós-sepse (Wen *et al.*, 2008).

1.2 Neutrófilos e resposta imune

Os neutrófilos são as células do sistema imune inato mais abundantes do sistema imunológico humano. Nos mamíferos, estas células se desenvolvem na medula óssea e são liberadas na corrente sanguínea com a presença de potentes agentes antimicrobianos em seus grânulos específicos (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Nauseef and Borregaard, 2014). Junto a isto, os neutrófilos possuem mecanismos essenciais no combate aos patógenos como a fagocitose, degranulação dos seus grânulos específicos e liberação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs, ou *Neutrophil Extracellular Traps*) (Ley *et al.*, 2018; Papayannopoulos, 2018). Assim, juntamente com os macrófagos, os neutrófilos são importantes no controle inicial de infecções, liberando potentes mediadores inflamatórios que dão início a resposta imune inata (Borregaard, 2010).

Por exemplo, quando há dano tecidual, os macrófagos, mastócitos e células dendríticas, podem reconhecer moléculas como PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) e DAMPs (do inglês *damage-associated molecular patterns*) através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, ou *pattern recognition receptors*), como receptores do tipo Toll (TLRs, ou *Toll-like receptors*) e inflamassomas (Santoni *et al.*, 2015; Zindel and Kubes, 2020). Ao reconhecer estes sinais, as células secretam mediadores pró-inflamatórios que aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, como selectinas e ligantes de integrinas, juntamente com a externalização de quimiocinas na superfície celular (Ley *et al.*, 2007; Kolaczkowska and Kubes, 2013; Kim and Luster, 2015). Essas alterações ocorrem principalmente nas vênulas endoteliais pós-capilares e são detectadas pelos neutrófilos presentes na circulação (Filippi, 2019). Desta forma, os neutrófilos podem ser recrutados em poucas horas para os locais danificados nos tecidos e formar infiltrados inflamatórios, sendo um processo fundamental da resposta imune inata, sendo estes infiltrados uma das principais características histopatológicas da inflamação e infecção tecidual (Lammermann, 2016). Inclusive, na inflamação e infecção com vários patógenos, foi observado um padrão de agrupamento de neutrófilos chamado "*neutrophil swarming*" (Kienle and Lammermann, 2016).

Durante este processo, os neutrófilos se organizam de uma forma altamente coordenada e ampliam o recrutamento dos mesmos para o sítio inflamatório, tentando manter o equilíbrio entre a proteção do hospedeiro e a destruição do tecido inflamado (Kienle and Lammermann, 2016; Lammermann, 2016).

Após a migração para o sítio inflamatório, como forma de eliminação dos patógenos presentes no hospedeiro, os neutrófilos podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) através do *burs*t oxidativo na membrana plasmática do fagolisossomo (Zhu *et al.*, 2011). Quando os neutrófilos fagocitam os patógenos, esses são envolvidos em pequenas vesículas chamadas de fagossomos, as quais em junção com os grânulos, principalmente os específicos, permitem a formação do complexo NADPH oxidase (NOX2), o que possibilita o transporte de elétrons entre o NADPH no citoplasma para o oxigênio presente no lúmen do fagossomo, reduzindo-o a superóxido de oxigênio (Borregaard, 2010; Nordenfelt and Tapper, 2011). Então, quando o superóxido de oxigênio é formado, a mieloperoxidase (MPO) o utiliza para a formação de EROs. Desta forma, as EROs podem ser liberadas extracelularmente no microambiente infeccioso ou intracelularmente no fagolisossomo após a fagocitose, o que limita o dano tecidual e expõe os patógenos à altas concentrações de EROs, eliminando-os assim do local da infecção (Robinson, 2008; Dupre-Crochet *et al.*, 2013; Nathan and Cunningham-Bussel, 2013).

A MPO pode gerar vários tipos de EROs (Aratani, 2018). Consequentemente, a deficiência desta enzima leva a baixa produção de EROs em humanos, o que resulta em infecções bacterianas recorrentes e graves, enquanto que a liberação descontrolada de EROs leva à inflamação excessiva, o que pode agravar patologias como o lúpus eritrmatoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Wolach *et al.*, 2017). Isso pode depender de alguns estímulos. A ligação de ligantes aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs, ou *G protein-coupled receptor*s), como o n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), um pepitídeo bacteriano quimioatraente de neutrófilos, receptores de citocinas, e a ativação de Fc e integrinas podem ativar uma resposta inflamatória mais robusta pelas células (Lawson *et al.*, 2011; Katritch *et al.*, 2013; El-Benna *et al.*, 2016).

Nos neutrófilos a liberação de EROs também pode ativar proteases fibrilares e assim induzir a formação de NETs (Bjornsdottir *et al.*, 2015). As NETs são estruturas fibrosas contendo DNA, histonas, proteínas citoplasmáticas e granulares (Sollberger *et al.*, 2018). Ainda não estão bem caracterizados todos os processos moleculares que levam à formação e liberação das NETs, mas tem-se conhecimento que alterações morfológicas são induzidas quando a MPO transforma o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso e ativa a elastase neutrofílica (NE,

ou *neutrophil elastase*). A mobilização da NE degrada o citoesqueleto e a membrana nuclear, e possiblita a mistura do conteúdo nuclear com o citoplasma (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Em conjunto a MPO e NE promovem a clivagem proteolítica e desaminação de histonas pela ativação da peptidil arginina deiminase (PAD), que resulta na descondensação da cromatina (Wang, Y. *et al.*, 2009). As fibras da cromatina associam-se as proteínas granulares e citoplasmáticas e então são liberadas extracelularmente. Esse processo de ativação do neutrófilo para a produção de NETs pode ser induzido quando a célula está na presença de patógenos, autoanticorpos, plaquetas ativadas, LPS e PMA (Carestia *et al.*, 2016; Söderberg and Segelmark, 2016; Petretto *et al.*, 2019). Quando liberadas, as NETs são lançadas no ambiente extracelular e aprisionam muitos tipos de microrganismos, o que acaba eliminando-os pela exposição a alta concentração de substâncias microbicidas. Este mecanismo é importante em infecções por patógenos que apresentam mecanismos de escape do fagolisossomo (Brinkmann *et al.*, 2004; Amulic *et al.*, 2012; Pillay *et al.*, 2013).

Os neutrófilos também são capazes de distinguir diferentes tamanhos de patógenos e, consequentemente, montar respostas especializadas. Quando fagocitam patógenos pequenos, liberam EROs, o que induz oxidação e degradação de NF-κB e suprime a expressão de IL-1β, citocina importante para o recrutamento de neutrófilos. Todavia, patógenos que não são fagocitados devido ao tamanho desencadeiam a transposição do NF-κB para o núcleo, culminando com a produção de IL-1β via inflamassomas. O IL-1β recruta novos neutrófilos que formam aglomerados ao redor do patógeno, permitindo eliminá-lo. O reconhecimento do tamanho do patógeno pelos neutrófilos se dá pela interação com o receptor de superfície dectina-1, que após ativação desencadeia a liberação de NETs (Branzk *et al.*, 2014; Warnatsch *et al.*, 2017).

Junto à produção de EROs e NETs, os neutrófilos também produzem pepitídeos antimicrobianos. Os peptídeos de neutrófilos humanos (HNP, *ou human neutrophil peptides*) são proteínas catiônicas armazenadas nos grânulos dos neutrófilos (Harwig *et al.*, 1994). Essas proteínas são principalmente representadas pelas α-defensinas 1, 2, 3 e 4 humanas, que também são denominadas HNP-1, HNP-2, HNP-3 e HNP-4, pois são peptídeos antimicrobianos provenientes exclusivamente desta célula (De Leeuw and Lu, 2007; Grigat *et al.*, 2007). Eles se ligam às moléculas aniônicas das bactérias, incluindo componentes das membranas plasmáticas, interrompendo a integridade da membrana e levando ao extravasamento do conteúdo celular (Fu, 2003). Adicionalmente, essas proteínas podem atuar como moléculas imunomodulatórias, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas, que promovem a ativação de células imunes inflamatórias, ou suprimindo a apoptose dos neutrófilos através da

regulação positiva de proteínas antiapoptóticas (Niyonsaba *et al.*, 2006; Rehaume and Hancock, 2008). Desta maneira, a supressão da apoptose dos neutrófilos resulta no prolongamento da sua vida útil e pode ser benéfico para a defesa do hospedeiro contra infecções.

Em relação à apoptose, quando os neutrófilos são liberados da medula óssea na corrente sanguínea há a ativação de um processo programado de apoptose espontânea, que até 24h após na circulação leva à expressão de sinais pela célula, como a externalização da fosfatidilserina, fragmentação do DNA e *bebbling* da membrana celular para a sua remoção pelos macrófagos no baço e no fígado (Tak *et al.*, 2013; Mccracken and Allen, 2014). Por outro lado, a apoptose dos neutrófilos pode ser induzida após fagocitose de patógenos quando superada a sinalização anti-apoptótica fisiológica da célula (El Kebir and Filep, 2013). Ao entrarem em apoptose, os neutrófilos liberam diversos mediadores como as proteínas lactoferrina e anexina (AnxA1), que inibem o recrutamento de novas células para o foco da inflamação. Paralelamente, sinais liberados atraem fagócitos que irão remover os corpos apoptóticos. Os macrófagos do tipo M2 passam a ser abundantes no ambiente, garantindo a remoção dos restos celulares do sítio infectado, o que ajuda na recuperação da homeostase tecidual (Bogdan *et al.*, 2000; El Kebir and Filep, 2013; Fullerton *et al.*, 2013). A síntese de proteínas, a proliferação celular e o remodelamento da matriz extracelular são garantidas pela produção de citocinas como TGF-β e IL-10 (Borregaard, 2010).

1.2.1 Neutrófilos e Polarização celular

Por muito tempo acreditava-se que os neutrófilos formados na medula óssea eram liberados na corrente sanguínea com funções bem estabelecidas e um estágio de maturidade que apenas permitissem a ativação rápida e eficaz da célula na resposta imune inata. Entretanto, tem sido desmonstrado que além de possuírem funções imunorregulatórias, como a modulação da produção de citocinas e proliferação de células T CD4+ e CD8+, os neutrófilos também apresentam plasticidade fenotípica e funcional (Marini *et al.*, 2017; Lang *et al.*, 2018; Silvestre-Roig *et al.*, 2019). Assim, parâmetros como maturidade, densidade, expressão de marcadores de superfície celular e funções vem sendo utilizados para caracterizar novos grupos celulares de neutrófilos, tanto em condições saudáveis quanto em condições patológicas, como câncer, infecções bacterianas, alterações cardiovasculares e doenças autoimunes (Denny *et al.*, 2010; Peñaloza *et al.*, 2018; García-Culebras *et al.*, 2019; Giese *et al.*, 2019).

Entre estas condições patológicas, foi no câncer onde surgiu uma das primeiras evidências que os neutrófilos poderiam ter plasticidade celular. Em modelos experimentais com

camundongos e em estudos com amostras provenientes de pacientes, evidenciou-se a existência da polarização dos neutrófilos associados a tumores, N1 (antitumoral) e N2 (pró-tumoral), em analogia à polarização que ocorre em macrófagos M1 (clássicos) e M2 (alternativos) (Fridlender *et al.*, 2009; Piccard *et al.*, 2012). Em camundongos, essa categoria de neutrófilos expressam CD11b+ Ly6C ^{int} Ly6G^{high}, sendo os neutrófilos N1 CD11b+ Ly6G+ e os N2 CD11b+ Ly6G(GR1)+ Ly6C^{int}, enquanto que em humanos são identificados como células CD11b+ CD14− CD66b+ CD15^{high} (Gabrilovich, 2017; Lang *et al.*, 2018). Entretanto, os marcadores de superfície celular dos neutrófilos N1 e N2 não estão bem estabelecidos. O que difere estas duas células são suas funções no ambiente tumoral. Os neutrófilos N1 sob influência de IFN-β possuem maior expressão de ICAM-I, TNF-α e CCL3, e inibem o crescimento tumoral através da ativação de células T CD8+ e liberação de TNF-α podendo auxiliar na contenção das células cancerígenas e na rejeição tumoral. Em contrapartida, os neutrófilos N2 sob influência do TGF-β permitem o crescimento tumoral, invasão e metástase através da maior expressão de arginase 1 (ARG1), iNOS, VEGF, MMP-9, CCL2 e CCL5 (Fridlender *et al.*, 2009; Piccard *et al.*, 2012; Shaul *et al.*, 2016).

No câncer também há outra classificação para os neutrófilos na circulação sanguínea, que são os neutrófilos de alta densidade (HDNs, ou *high-density neutrophils*) e baixa densidade (LDNs, ou *low-density neutrophils*) (Sagiv *et al.*, 2016). Os LDNs ainda podem ser divididos em populações maduras e imaturas, sendo estas últimas conhecidas como células granulociticas supressoras (G-MDSCs, ou *granulocyte-myeloid derived suppressor cells*), que possuem uma característica de núcleo em faixas ou em forma de anel e inibem a resposta de células T CD8 citotóxicas (Brandau *et al.*, 2011; Sagiv *et al.*, 2015; Lang *et al.*, 2018). Entre esses subgrupos, os HDNs possuem funções semelhantes aos neutrófilos N1, enquanto que os LDNs se assemelham aos neutrófilos N2. De forma interessante, quando os HDNs são estimulados pelo TGF-β podem ser convertidos em LDNs, sugerindo a possível plasticidade dessas células. No entanto, esse fenômeno foi observado apenas em HDNs de camundongos com tumor (Sagiv *et al.*, 2015).

Os LDNs também estão presentes em doenças inflamatórias graves como o LES e artrite reumatóide, que variam a nomeação entre neutrófilos de baixa densidade (LDNs) ou granulócitos de baixa densidade (LDGs, ou *low-density granulocytes*), mas sempre ambos tratados como o mesmo subtipo celular (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013; Scapini *et al.*, 2016; Carlucci *et al.*, 2018; Ramanathan *et al.*, 2018). Ademais, há indício que os LDGs seriam uma população heterogênea de granulóticos maduros e imaturos. Através da análise da morfologia nuclear e expressão gênica estas células possuem um fenótipo imaturo, enquanto

que a expressão dos marcadores de superfície celular por citometria de fluxo indicam que seriam granulócitos maduros (Denny *et al.*, 2010). Neste sentido, os LDGs são $CD15^{high}$ $CD14^{low}$, e expressam CD31, CD11c, G-CSFR, GM-CSFR, CD10 e CD16, sendo estes dois últimos característicos de granulócitos maduros. Já o CD33, um marcador de granulócitos imaturos ou em desenvolvimento, é pouco expresso (Denny *et al.*, 2010).

De fato, os LDGs encontrados em doenças autoimunes podem apresentar semelhanças morfologicas aos neutrófilos N2 presentes no câncer. Contudo, estes dois subgrupos de neutrófilos são funcionalmente diferentes devido à capacidade dos LDGs, em doenças autoimunes, apresentarem funções pró-inflamatórias (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013; Aratani, 2018; Chatfield *et al.*, 2018; Garley and Jablonska, 2018). Entre essas funções são destacadas a promoção da proliferação e diferenciação de células Th17, aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF-α, IL-6, IL-8, IL-17 e IFN-γ) e indução da toxicidade de células endoteliais quando comparadas com os HDNs autólogos (Denny *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016). Neste caso, os LDNs/LDGs podem contribuir fortemente para o agravamento das doenças autoimunes devido à alta liberação de NETs (Barrera-Vargas *et al.*, 2018). Isso ocorre porque as NETs liberadas pelos LDGs/LDNs provocam lesões vasculares com a morte direta de células endoteliais. Junto a isso, essas NETs podem conter grandes quantidades de auto-antígenos imunogênicos e citrulinados, que ativam macrófagos e células dendríticas plasmocitóides e desencadeam o aumento da inflamação sistêmica (Villanueva *et al.*, 2011; Smith and Kaplan, 2015; Lood *et al.*, 2016; Carmona-Rivera *et al.*, 2017; Barrera-Vargas *et al.*, 2018).

No caso de infecções, ainda são incipientes as discussões quanto à plasticidade celular dos neutrófilos. Entre os estudos, é relatada a existência de neutrófilos do tipo N1 e N2 nos pulmões de camundongos infectados por *S. pneumoniae*. Nesta condição, após 48h de infecção os neutrófilos N2 são mais abundantes que os N1 e diferem no perfil de ativação em resposta ao *S. Pneumoniae*, pela maior expressão de marcadores de ativação e maturação celular (CD11b e Ly6G) em comparação com os neutrófilos N1. Adicionalmente, é sugerido que os neutrófilos N2 são os que respondem ao *S. Pneumoniae*, enquanto que os neutrófilos N1 por possuírem tamanho, granulosidade, estágio de ativação e maturação inferiores poderiam ser neutrófilos imaturos não responsivos (Peñaloza *et al.*, 2018). Em outro estudo, na infecção causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, os pacientes com tuberculose ativa possuíam maior porcentagem de LDNs do que de neutrófilos de densidade normal (NDNs, ou *normal-density neutrophils*). Fenotipicamente, os LDNs apresentaram maior expressão de CD66b, CD33, CD15 e CD16 em comparação com os NDNs. Já transcricionalmente, os LDNs tem os genes de *CCL5*, *CCR5*,

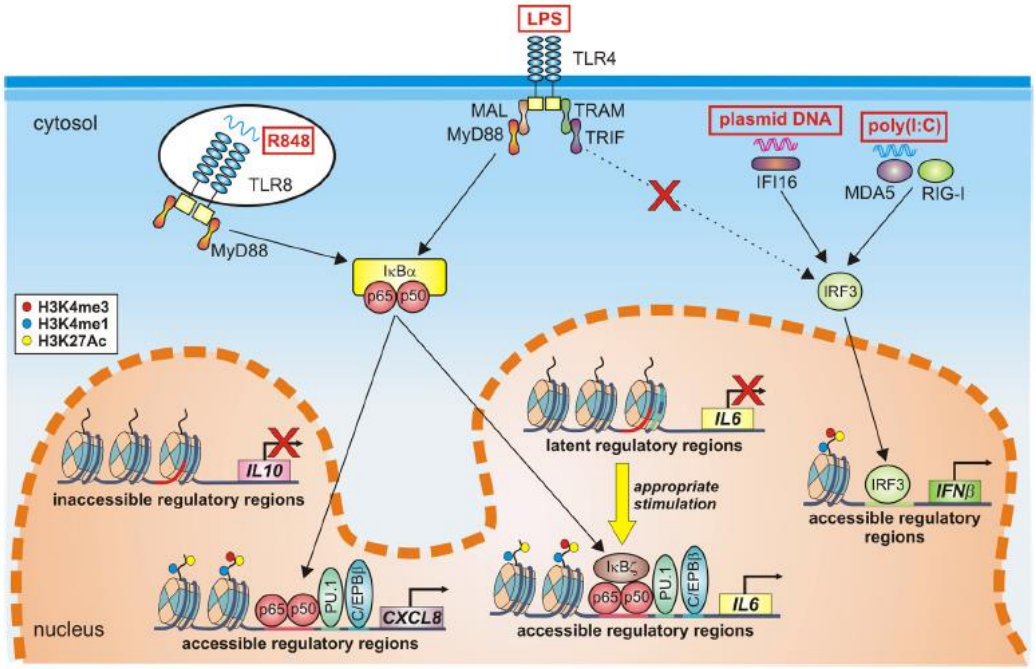
CD4, *IL10*, *LYZ* e *STAT4* up-regulados enquanto que os genes de *CXCL8*, *IFNAR1*, *NFKB1A*, *STAT1*, *ICAM1* e *TNF* são down-regulados quando comparados com os NDNs. Contudo, diferentemente dos NDNs, os LDNs demosntraram ser ineficientes na fagocitose do *M.tuberculosis*, produção de EROs e NETs. Além disso, os LDNs estavam envolvidos na supressão da proliferação de células T, sendo esta mediada parcialmente por IL-10 (La Manna *et al.*, 2019).

Em trabalho anterior do nosso laboratório, sugerimos que é possível direcionar o perfil de ativação dos neutrófilos de acordo com as citocinas presentes no meio, similar ao que acontece aos macrófagos. Neste trabalho foi observado que determinadas alterações podem estar relacionadas ao melhor controle da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, mas não foram esclarecidos mecanismos ou definidos os fenótipos observados (Cardoso-Silva, 2017). Desta forma, é perceptível que a polarização dos neutrófilos no microambiente infeccioso poderia influenciar o curso de doenças infecciosas.

1.2.2 Neutrófilos e Epigenética

Evidências indicam que as respostas efetoras dos neutrófilos podem ser moduladas por alterações epigenéticas induzidas por diferentes estímulos. Por exemplo, as modificações na cromatina poderiam alterar a expressão de citocinas ligadas à resposta imunológica da célula (Ostuni *et al.*, 2016) (Figura 2).

Figura 2 – Exemplos de citocinas que possuem a expressão gênica regulada por mecanismos epigenéticos em neutrófilos humanos.



Modificações epigenéticas podem favorecer a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias pelos neutrófilos. Por exemplo, as regiões promotoras do gene *IL10* possuem regiões regulatórias inacessíveis em homeostase, pois a conformação da cromatina previne a ligação de fatores de transcrição, impossibilitando sua leitura. Em contraste, a região promotora do gene *CXCL8* possui uma conformação mais acessível que é reconhecida por NF-κB ativo quando há ligação prévia do agonista de TLR4 (LPS), alterando o grau de acetilação e metilação de histonas e promovendo a transcrição do mRNA de CXCL8. A figura também mostra que a região promotora do gene *IL6* não é acessível em condições basais. Entretanto, esta se torna permissiva à leitura do gene com a estimulação apropriada. Por sua vez, a região promotora de IFN-β é acessível ao fator de transcrição IRF-3, mas não se liga ao NF-κB. O IRF-3 é ativado após reconhecimento dos ligantes de IFI-16, MDA-5 e RIG-1, mas não pela via TRAM/TRIF do TLR4. *Fonte: Epigenetic regulation of neutrophil development and function. Seminars in Immunology, 2016 (Ostuni et al., 2016). Reprodução permitida de acordo com a licença de número 4596880562737 fornecida por Elsevier and Copyright Clearance Center.*

Trabalhos anteriores demonstraram que a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, pode ser expressa em neutrófilos após modificações na cromatina, pois estes possuem regiões promotoras no gene *IL10*. Porém, foi descoberto que na homeostasia, os neutrófilos não possuem as modificações de histonas associadas à transcrição ativa de IL-10, como H3K4me3, H3K27Ac/H4Ac e H3K4me1, que estão presentes em monócitos. Assim, a cromatina seria mais compactada em neutrófilos, reduzindo a capacidade de ligação a fatores de transcrição ativados via TLRs ou outros PAMPs e regulando a expressão de IL-10 (Ostuni *et al.*, 2013; Tamassia and Cassatella, 2013). Entretanto, diante à ação de determinados estímulos, como o LPS, os neutrófilos seriam capazes de expressar IL-10 (De Santo *et al.*, 2010; Glowacka *et al.*, 2010). Considerando a dificuldade de atingir um grau de pureza elevado no processo de separação de

neutrófilos para cultura, a possível contaminação de outros subtipos celulares poderia interferir no real aferimento da produção/expressão de IL-10 (Davey *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2015).

Por sua vez, é conhecido que a síntese de CXCL8 e IL-6 depende dos fatores de transcrição PU.1 e C/EBPβ. Estes fatores asseguram que o *locus* gênico destas citocinas tenham uma conformação acessível ao NF-κB após ativação dos neutrófilos, permitindo a transcrição gênica (Cloutier *et al.*, 2009; Wang, D. *et al.*, 2009). Em relação à IL-6, o recrutamento adicional de IκBζ é fundamental para sua expressão (Ghisletti *et al.*, 2010; Heinz *et al.*, 2010). Em condições basais, os neutrófilos não permitem acessibilidade às regiões promotoras do gene destas citocinas, mas quando a célula recebe determinados estímulos, como o LPS e R848 (imidazoquinolona sintética agonista de TLR8 e TLR7), desencadeiam-se as alterações H3K4me3, H3K27Ac, H4Ac e H3K4me1. Estas promovem a reorganização da cromatina e favorecem a ligação dos fatores de transcrição, levando à ativação da expressão gênica (Tamassia and Cassatella, 2013; Zimmermann *et al.*, 2015).

De forma interessante, a regulação da expressão de *IFNB1* em neutrófilos possui um mecanismo distinto. Na presença do LPS há a indução da associação do TLR4 aos correceptores CD14 e MD-2, desencadeando reações bioquímicas acopladas às proteínas adaptadoras MyD88 e TRIF (domínio TIR indutor de IFN-β) (Kawai and Akira, 2011). Este conjunto de reações ativam os fatores de transcrição NF-kB e IRF-3, respectivamente, induzindo a transcrição de Interferons do tipo I, como IFN-α/β (Panne *et al.*, 2007; Ramirez-Carrozzi *et al.*, 2009; Ivashkiv and Donlin, 2014). Entretanto, apesar da via MyD88 ser ativa em neutrófilos estimulados por sinais dependentes de TLR e do *locus* gênico do IFN-β estar acessível, o LPS é incapaz de induzir ativação de TRIF, impossibilitando a transcrição gênica dos IFNs do tipo I (Tamassia *et al.*, 2007; Van Bruggen *et al.*, 2010). Alternativamente, outros mediadores como o poly (I:C) intracelular e o DNA plasmidial podem induzir a expressão gênica de *IFNB1* via MDA5, RIG-I, ou pela proteína induzível por IFN 16 (IFI16). Estes genes conseguem ativar o fator IRF-3 e induzem a expressão de IFN-β (Tamassia *et al.*, 2008; Tamassia *et al.*, 2012).

A regulação de citocinas pró-inflamatórias também acontece pela interação da HDAC1 e o NF-κB (Bode *et al.*, 2007; Roger *et al.*, 2011). Essa interação acontece entre a HDAC1 e a subunidade p50 na região C-terminal nuclear do NF-κB, em células primárias e transformadas. Quando há mutação deste sítio de ligação, há perda da interação p50:HDAC1, levando à acetilação de histonas e aumento da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelos neutrófilos (Cartwright *et al.*, 2018).

Além da expressão de diferentes citocinas, as modificações epigenéticas parecem estar envolvidas em outras funções da célula (Chatterjee *et al.*, 2015). Durante a maturação dos neutrófilos, os genes ligados a formação de proteínas dos grânulos primários como a mieloperoxidase (MPO), elastase (ELA2) e proteinase 3 (PR3) estão mais metilados em células mais diferenciadas do que em células mais imaturas como promielócitos e mielócitos (Rönnerblad *et al.*, 2014), ocorrendo o mesmo com fatores de transcrição ligados a granulopoiese como PU.1, GATA2, GFI1 e ETS1 (Rönnerblad *et al.*, 2014). Também é descrito que durante a ativação dos neutrófilos, modificações como a AcH4 favorecem a descondensação da cromatina e induzem a maior produção de NETs (Hamam *et al.*, 2019). Este processo pode ocorrer através das vias dependente ou independente de NOX. A via dependente de NOX pode ser ativada na presença de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) ou LPS, dependentemente de EROs sem a presença de CitH3, enquanto que a via independente de NOX pode ser induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 ou ionomicina, dependentemente de EROs mitocondrial e CitH3 (Douda *et al.*, 2015; Khan and Palaniyar, 2017). Quando ocorre a AcH4, os neutrófilos produzem mais NETs, principalmente pela via independente de NOX, porque a CitH3 ocorre preferencialmente nas regiões promotoras e favorece a descondensação mais rápida da cromatina (Li, P. *et al.*, 2010; Hamam *et al.*, 2019).

Para entender como as células do sistema imune inato podem ser importantes nas patologias, é necessário o entendimento de sua biologia independente da infecção. Fisiologicamente, a diferenciação celular é controlada por silenciamento e ativação gênica relacionados com alterações epigenéticas.

Sendo assim, é importante entender quais mudanças epigenéticas estão envolvidas na polarização de neutrófilos nos perfis anti e pró-inflamatórios e neste caso, definir qual é a assinatura epigenética que se relaciona aos fenótipos de ambos os perfis.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar quais mudanças epigenéticas estão relacionadas à plasticidade de neutrófilos na presença de citocinas polarizantes dos perfis inflamatório e anti-inflamatório.

2.2 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo

Neutrófilos foram isolados a partir do sangue periférico de indivíduos hígidos e cultivados na presença de meios condicionantes para polarização nos perfis inflamatório (NI, GM-CSF e IFN-γ) e anti-inflamatório (NonI, TGF-β, IL-4 e IL-13). Após a polarização, foram analisados: a morfologia, produção de citocinas e expressão de marcadores de superfície e liberação de EROs para confirmação do fenótipo de ambas as populações.

Para descrição das mudanças epigenéticas de cada população, foram avaliados:

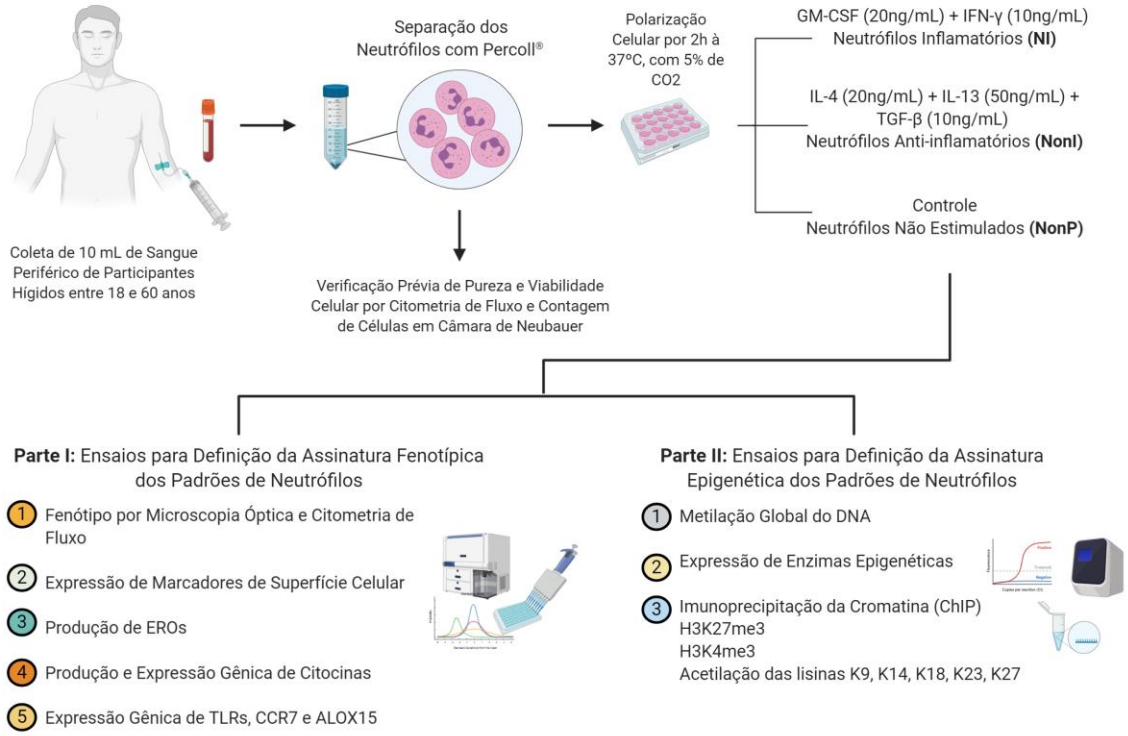
a) O padrão de metilação global do DNA;

b) A expressão de RNAm para as enzimas relacionadas às modificações epigenéticas no DNA e em histonas;

c) A acetilação e metilação de histonas em promotores gênicos relacionados aos perfis dos neutrófilos polarizados, por imunoprecipitação de cromatina.

3. Delineamento Experimental

Figura 3 - Esquema das etapas seguidas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.



Foram coletados 10 mL de sangue periférico de doadores hígidos. As amostras passaram por separação celular em que os neutrófilos foram isolados através do gradiente de densidade de Percoll. As células polimorfonucleares obtidas nesta fase forma avaliadas em citômetro de fluxo para confirmação de grau de enriquecimento e pureza celular. As células isoladas foram então incubadas por 2 horas na presença de citocinas polarizantes inflamatórias (NI, GM-CSF e IFN-γ) e anti-inflamatórias (NonI, IL-4, IL-13 e TGF-β). Para a definição da assinatura fenotípica, o sobrenadante foi coletado para análise de produção de citocinas, as células separadas para detecção de EROs por citometria de fluxo e coradas (Panótico Rápido) para serem analisadas em microscópio ótico quanto a morfologia. Uma vez definida a assinatura fenotípica, a assinatura epigenética foi associada a cada perfil celular. Os neutrófilos polarizados tiveram o RNA extraído para os ensaios de qPCR quanto a expressão de enzimas epigenéticas; o DNA foi analisado quanto ao perfil de metilação global e específica, assim como foi avaliada a metilação e acetilação de histonas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Casuística

Foram recrutados 20 indivíduos hígidos para a realização das duas etapas do projeto, que consistiu na caracterização fenotípica (Capítulo 1) e epigenética (Capítulo 2) dos neutrófilos estimulados *in vitro*.

Para a experimentação, foram selecionadas amostras de sangue periférico (10 mL) de participantes com faixa etária de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, independentemente da etnia. Não foram incluídos como voluntários, mulheres grávidas ou indivíduos com doenças crônicas. A coleta do sangue foi feita por punção venosa no antebraço do doador, empregando-se todas as práticas de biossegurança. O sangue foi coletado em tubos com heparina sódica (Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company) e empregado na separação de leucócitos. Os indivíduos hígidos foram recrutados no campus da USP de Ribeirão Preto. Os indivíduos abordados no momento da coleta foram convidados a participar voluntariamente do estudo, mediante autorização que foi registrada através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FCFRP - USP, com protocolo CEP/FCFRP nº 2.919.226 – CAAE 95004418.7.0000.5403 (Anexos I e II, respectivamente). Importante ressaltar que as avaliações funcionais realizadas com os neutrófilos não puderam ser realizadas com todos os indivíduos do estudo, em razão do rendimento celular e do baixo rendimento do material gênico de mRNA. Assim, o número de indivíduos variou entre os experimentos realizados, sendo descrito o número na legenda de cada figura.

4.2 Obtenção dos neutrófilos do sangue periférico

A partir dos 10mL de sangue, foi realizada a separação e armazenamento do plasma após centrifugação à 400 x *g* por 10 min à 20 °C. O sangue sem o plasma foi homogeneizado e diluído em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 na proporção de 1:2. Após a diluição as amostras foram aplicadas cuidadosamente sobre o reagente Percoll (GE Healthcare) para a separação das células polimorfonucleares através do gradiente de densidade.

O Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) foi formado por duas concentrações (1,080 e 1,095 g/mL^{-1}) e após adição do sangue, foi centrifugado por 30 minutos à 600 x *g* à temperatura ambiente. As células polimorfonucleares (PMN) foram coletadas na interface dos gradientes e incubadas, para lise de hemácias, com tampão cloreto de amônio (NH_4Cl concentração 8,56 mol/L), aquecidas à 37 ºC por 5 min e centrifugadas à 400 x *g* por 10 min à 20 ºC. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão fosfato salina 1X (PBS). A

viabilidade e o número de células foram obtidos através de contagem em Câmara de Neubauer pela coloração com Trypan Blue 0,4% (Gibco, Grand Island, USA).

4.3 Polarização dos neutrófilos para os perfis inflamatório e ant-inflamatório

Para a polarização dos neutrófilos as células foram cultivadas por 2 horas, à 37 ºC, com 5% de CO_2 em meio RMPI 1640 (Gibco, Grand Island, USA) suplementado com diferentes citocinas. Para o perfil inflamatório foram utilizados GM-CSF (20 ng/mL) e IFN-γ (10 ng/mL), e para o perfil anti-inflamatório foram utilizados IL-4 (20 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) e TGF-β (10 ng/mL). O controle foi composto por neutrófilos não polarizados (NonP). As escolhas das citocinas foram baseadas em trabalhos já publicados (Mantovani *et al.*, 2004; Fridlender *et al.*, 2009).

4.4 Ensaios para definição da assinatura fenotípica dos perfis de neutrófilos

4.4.1 Análise morfológica

Após a polarização dos neutrófilos, 50 µL das amostras foi utilizada na confecção de lâminas que foram centrifugadas em Cytospin a 500 rpm por 3 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico (Laborclin, Paraná, Brazil) e a observação da morfologia celular foi realizada através do microscópio óptico (Leica CTR 5000, DM 5000B, Germany) no aumento de 400 x e as lâminas foram fotografadas e analisadas por meio do software LAS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os neutrófilos foram analisados por citometria para detecção da produção de EROs. Para isto, foram utilizadas a sonda DCFDA (diacetato de 2′,7′-diclorofluorescina) (Abcam, Cambridge, UK) e o PMA 10^{-7} mol/L (forbol 12-miristato 13-acetato) (PMA-Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA). As células ($1x10^6$) foram polarizadas por 2h junto com 20 µM de DCFDA por poço. Após a polarização, as células foram transferidas para tubos de fundo cônico apropriados para citometria, lavadas com 2 mL de PBS 2% SBF e centrifugadas à 400 x *g* por 10 min à 4 ºC. Depois, as células foram ressuspendidas em 200 µL de PBS com 1% de formoaldeído e o PMA 10^{-7} mol/L foi adicionado as amostras para analisar a quantidade de EROs utilizando-se o citômetro FACS Canto II (BD, Biosciences, San Diego, USA) (Laboratório Multi-usuários da FCFRP/USP). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo.

4.4.3 Avaliação imunofenotípica de marcadores de superfície celular

Os PMN foram analisados por citometria de fluxo para confirmação quanto ao fenótipo da população isolada por gradiente de densidade. Foram utilizados os anticorpos anti-CD86 PE-Cy5 (Clone ICRF44) e anti-MHCII-PE (Clone CLB-gran 11.5) (todos os anticorpos da *BD Biosciences, San Diego, CA*). As células ($5x10^5$) foram incubadas por 25 min à 4 ºC com 1 μL de cada anticorpo no escuro. Após a incubação, 2 mL de PBS 2% SFB foram adicionados e os tubos foram centrifugados à 400 x *g* por 10 min à 4 ºC. As células foram ressuspendidas em 200 μL de PBS com 1% de formoaldeído e analisadas utilizando-se o citômetro FACS Canto II (*BD, Biosciences, San Diego, USA*) (Laboratório Multi-usuários da FCFRP/USP). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo.

4.4.4 Quantificação de citocinas por ELISA

O sobrenadante das células polarizadas foi removido e armazenado para quantificação de IL-1β e IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) por ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Nesta metodologia, 100 μL de anticorpo de captura para cada amostra foi adicionado às placas de 96 poços para sensibilização das mesmas, sendo estas incubadas *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão PBS 1X contendo 0,05% de *Tween20*, a solução de bloqueio foi adicionada em todos os poços e foram incubadas por 1h. Após a incubação, foi realizada nova lavagem e adicionados 50 μL de cada amostra diluída e a curva padrão, composta pelas citocinas recombinantes, passando assim para uma nova incubação de 2h à temperatura ambiente. As placas em seguida foram lavadas e a solução contendo anticorpos de detecção foi adicionada a cada placa, passando para uma nova incubação de 2h. Depois da incubação, as placas foram lavadas e 100 μL da enzima estreptoavidina-HRP foram adicionados em cada poço. Por fim, a reação foi revelada com a adição do substrato TMB (*BD, Biosciences, San Diego, USA*) e com interrupção usando ácido sulfúrico (H_2SO_4) (2N). A absorbância das amostras e da curva padrão foram detectadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm (μQuant, Biotek Instruments Inc).

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

Para avaliação da expressão gênica, primeiramente foi realizada a extração do RNA total através da metodologia empregando o reagente Trizol (ThermoFísher Scientific, Waltham, EUA). De acordo com o protocolo, após o período de incubação das células (2h), as células

foram ressuspendidas e transferidas para tubos eppendorf. As células foram centrifugadas à 400 x *g* por 10 min à 4 ºC. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 750 µL de Trizol para promover a lise celular. As amostras foram agitadas em vórtex, e em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio à temperatura ambiente e 10 µL de glicogênio gelado (5 mg/mL) (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As amostras foram agitadas em vórtex, seguido de um intervalo de 5 min à temperatura ambiente, para que fosse realizada centrifugação à 14000 rpm por 15 min à 4 ºC. Após centrifugação, foram formadas três camadas, sendo o sobrenadante incolor do topo do tubo eppendorf (cerca de 400 µL) recuperado para um novo tubo para dar continuidade à extração do RNA. No novo tubo, foram adicionados 400 µL de isopraponol 100%, gelado, e as amostras foram homogeneizadas por inversão. Em seguida, as amostras foram armazenadas *overnight* em freezer -80 ºC. No dia seguinte, as amostras foram descongeladas no gelo e centrifugadas à 14000 rpm por 15 min à 4 ºC. Após centrifugação, todo o isopraponol foi retirado e ao pellet foi adicionado 1 mL de álcool etílico 70% gelado. Novamente, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 15 min à 4 ºC e em seguida todo o álcool foi retirado dos tubos, permitindo que os *pellets* secassem. Aos *pellets* secos, foram adicionados 15 µL de água livre de nucleases e as amostras foram incubadas em banho seco por 10 min à 55 ºC, para facilitar a diluição do RNA. Após incubação, as amostras foram homogeneizadas, colocadas no gelo e quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop®2000, no Laboratório da Profa. Dra. Juliana Pfizer Falcão, na FCFRP-USP, com razão 260/280 próximas de 1,80 e então, as amostras foram armazenadas em freezer -80 ºC.

Para realização da PCR em tempo real, as amostras de RNA foram convertidas em cDNA utilizando-se o "*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As amostras foram incubadas com 2 µL de tampão RT 10X, 0,8 µL de dNTPs mix, 2 µL de random primers e 1 µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), fornecidos pelo fabricante e acrescidos de água livre de nucleases para o volume final da reação (20 µL). A reação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Após a síntese de cDNA, a expressão dos genes alvo das amostras foi analisada, sendo todos sondas TaqMan, por PCR em tempo real através do mRNA para: citocinas relacionadas à polarização celular, TGF-β, IFN-γ, IL-10, TNF-α, IL-6 e IL-17A; receptores de superfície celular TLR2, TLR4 e CCR7; da enzima ALOX15. A reação foi realizada com a adição de 10 µL de *GoTaq® Probe qPCR Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 1 µL do primer de cada alvo específico, 9 µL de cDNA (100 ng) e água livre de nucleases para o volume final

da reação (20 μL). As amostras foram avaliadas pelo sistema "*TaqMan® Array 96-WellFast Plate StepOnePlusTM* (Applied Biosystems, Foster City, EUA)" seguindo as recomendações do fabricante. Para cálculo da expressão gênica, foram empregados os seguintes genes constitutivos: GAPDH e ACTB. A partir dos resultados de Ct (*cycletreshold*) obtidos acima, foram calculados os níveis de expressão relativa utilizando-se o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [80].

4.5 Ensaios para avaliação das mudanças epigenéticas nos neutrófilos

4.5.1 Extração e análise da metilação global do DNA

Previamente, para análise do perfil de metilação global do DNA, o material genômico foi extraído das células isoladas utilizando-se o "*PureLink® Genomic DNA Minikit*" (Life Technologies, New York, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As células de cada amostra foram ressuspendidas em um mix contendo: 200 μL de PBS 1X, 20 μL de Proteinase K e 20 μL RNase A (ambas enzimas fornecidas pelo kit). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 μL do PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer foram adicionados e as amostras foram homogeneizadas com o vórtex, sendo transferidas em seguida para um banho seco para uma incubação de 10 min à 55 ºC. Após incubação, 200 μL de etanol 100% foram adicionados ao lisado celular e homogeneizados em vórtex. As soluções homogêneas (640 μL) foram transferidas para colunas de purificação presentes no kit. Assim, as amostras foram centrifugadas por 1 min à 10000 x *g* à temperatura ambiente. As colunas foram transferidas para novos tubos de coleta e 500 μL do Wash Buffer 1 contendo etanol 100% (fornecido pelo kit) foram adicionados. Uma nova centrifugação de 1 min a 10000 x g à temperatura ambiente foi realizada e logo após, as colunas foram transferidas para novos tubos de coleta e 500 μL do Wash Buffer 2 (fornecido pelo kit) contendo etanol 100% foram adicionados às colunas. As amostras foram centrifugadas por 3 min à 14000 x *g* à temperatura ambiente e as colunas foram transferidas para novos tubos de coleta. Por fim, 50 μL do PureLink® Genomic Elution Buffer (fornecido pelo kit) foram adicionados às colunas e estas foram centrifugadas por 1 min à 14000 x *g* à temperatura ambiente. As colunas foram descartadas e o DNA presente nos tubos foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop®2000, no Laboratório da Profa. Dra. Juliana Pfizer Falcão, na FCFRP-USP, com razão 260/280 próximas de 1,80. Após quantificação, as amostras foram armazenadas em freezer -20 ºC.

Em seguida, para a análise do perfil de metilação global do DNA foi utilizado o kit "*MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit*" (Epigentek Group Inc., Farmingdale,

NY, EUA). Utilizando uma placa de 96 poços, proveniente do kit, foram adicionados 100 µL da solução de ligação (fornecida pelo kit) em cada poço, sendo 2 poços reservados para os controles negativos e 12 poços para a curva de calibração. Aos demais poços de análise foram adicionados 100 ng de DNA de cada amostra diluídos em 5 µL do tampão de eluição do "*PureLink® Genomic DNA Minikit*" (Life Technologies, New York, EUA). Após homogeneizar as amostras, a placa foi incubada por 1h à 37 ºC. Depois do período de incubação, o sobrenadante foi retirado e a placa foi lavada três vezes com o tampão de lavagem fornecido pelo kit. Após lavagem, 50 µL do complexo contendo o anticorpo de detecção 5-mC foram adicionados em cada poço, a placa coberta e incubada por 50 min à temperatura ambiente. O complexo de detecção foi removido, e a placa novamente foi lavada por cinco vezes e 150 µL da solução reveladora foram adicionados aos poços. A reação foi paralisada com 100 µL da solução de parada (fornecida pelo kit). A absorbância das amostras e da curva padrão foram detectadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm (µQuant, Biotek Instruments Inc). O percentual de DNA metilado foi calculado com base na curva de calibração por regressão linear.

4.5.2 Expressão de enzimas epigenéticas

Para análise da expressão de enzimas epigenéticas, previamente foram realizadas a extração do RNA total e conversão em cDNA conforme descrito no item 5.4.5. A partir de 100 ng de cDNA foi realizada a análise da expressão, utilizando sondas TaqMan, de enzimas epigenéticas envolvidas na metilação do DNA: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. Para cálculo da expressão gênica, foram empregados os seguintes genes constitutivos: GAPDH e ACTB. A partir dos resultados de Ct (*cycletreshold*) obtidos acima, foram calculados os níveis de expressão relativa utilizando-se o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [80].

4.5.3 Imunopreciptação da cromatina (ChiP)

A partir de $1x10^7$ células purificadas, foi realizada a fixação da estrutura DNA-proteína com 55 µL de paraformaldeído a 18,5% em 1 mL de PBS, durante 10 minutos à 37 °C. Em seguida, foram adicionados 100 µL por tubo da solução de glicina concentrada 10X ([Glicina] = 125mM) e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas à 3400 x *g* por 5 minutos à 4 ºC e o sobrenadante foi descartado. Foram realizadas quatro lavagens seguidas do precipitado celular com 1 mL de PBS acrescido da solução de inibidores de proteases (Sigma) diluída 1:100 e foram centrifugadas à 3400 x *g* por 5 minutos

à 4 ºC. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular armazenado a -80 ºC. A lise das células foi realizada pela adição de 200 µL de tampão de lise SDS e 500 µL de tampão de diluição acrescidos dos inibidores de protease (5:500). As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma seringa com agulha de calibre de 0,4 mm e incubadas no gelo por 10 minutos. Cada amostra foi dividida em dois tubos contendo 100 µL em cada, para ser realizada a etapa de sonicação por 10 min utilizando-se o *Bioruptor Pico Sonication System* (Diagenode). Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12000 x *g* por 20 minutos à 4 ºC e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Após a centrifugação, o sobrenadante contendo a cromatina foi diluído com o tampão de diluição (500 µL para cada anticorpo), e uma alíquota (10% em volume) foi reservada para indicar a quantidade de DNA de cada amostra (*input*). As frações de cromatina restantes foram submetidas à imunoprecipitação e incubadas com os anticorpos específicos, *overnight* a 4 °C, com suave rotação. Foram utilizados os seguintes anticorpos: normal mouse IgG (1 µg, Millipore), anti-histone H3K27me3 (4 µg, Abcam), anti-histone H3K4me3 (4 µg, Abcam) e anti-acetyl K9 + K14 + K18 + K23 + K27 (4 µg, Abcam).

Após incubação com os anticorpos específicos, foram adicionados 50 µL da solução de esferas de agarose com DNA de esperma de salmão por tubo (solução de DNA heterólogo em agarose que remove as proteínas inespecíficas à reação), que foram incubados por 1 hora à 4 °C sob rotação. As lavagens do precipitado foram realizadas com diferentes tampões (*low-salt*, *high-salt*, LiCl e TE 2x) por 5 minutos à 4 °C, sob agitação, seguida de centrifugação à 1000 x *g* por 1 minuto. Os complexos imunes foram eluídos pela adição de tampão de eluição e a ligação DNA-proteína foi revertida após incubação a 65 °C por 2 horas com proteinase K. O DNA livre foi purificado pelo protocolo padrão de precipitação por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop®2000, no Laboratório da Profa. Dra. Juliana Pfizer Falcão.

O DNA obtido após imunoprecipitação da cromatina foi utilizado como amostra na PCR em Tempo Real para quantificação de regiões promotoras dos genes *IL-1β*, *IL-6*, *IFN-γ* e *TNF-α* como alvo de modificações de histona. Foram utilizados 3 µL da amostra de DNA imunoprecipitado em cada reação, empregando-se o reagente *SYBR Green Master Mix* (Life Technologies), segundo instruções do fabricante. A reação foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Life Technologies) conforme as seguintes configurações: 95 °C por 10 minutos, 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguida da curva de dissociação ao final. A análise foi realizada segundo a fórmula: 100*2^(*input* ajustado

– Ct(IP)), onde o *input* ajustado refere-se ao valor de *input* corrigido pela diluição inicial e o IP, à amostra de cada anticorpo empregado.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SAS (SAS – *Statistical Analysis System*, 2003) e GraphPad Prism (GraphPad *Software* Inc., La Jolla; EUA). O Teste One-Way ANOVA (*two tails*, $p < 0,05$ significativo) foi utilizado para observar variações entre os grupos estudados. O teste de comparação de médias (Teste de Tukey com $p<0,05$ significativo) foi utilizado para comparar a média dos valores obtidos utilizando-se o *software* SAS.

5. Resultados

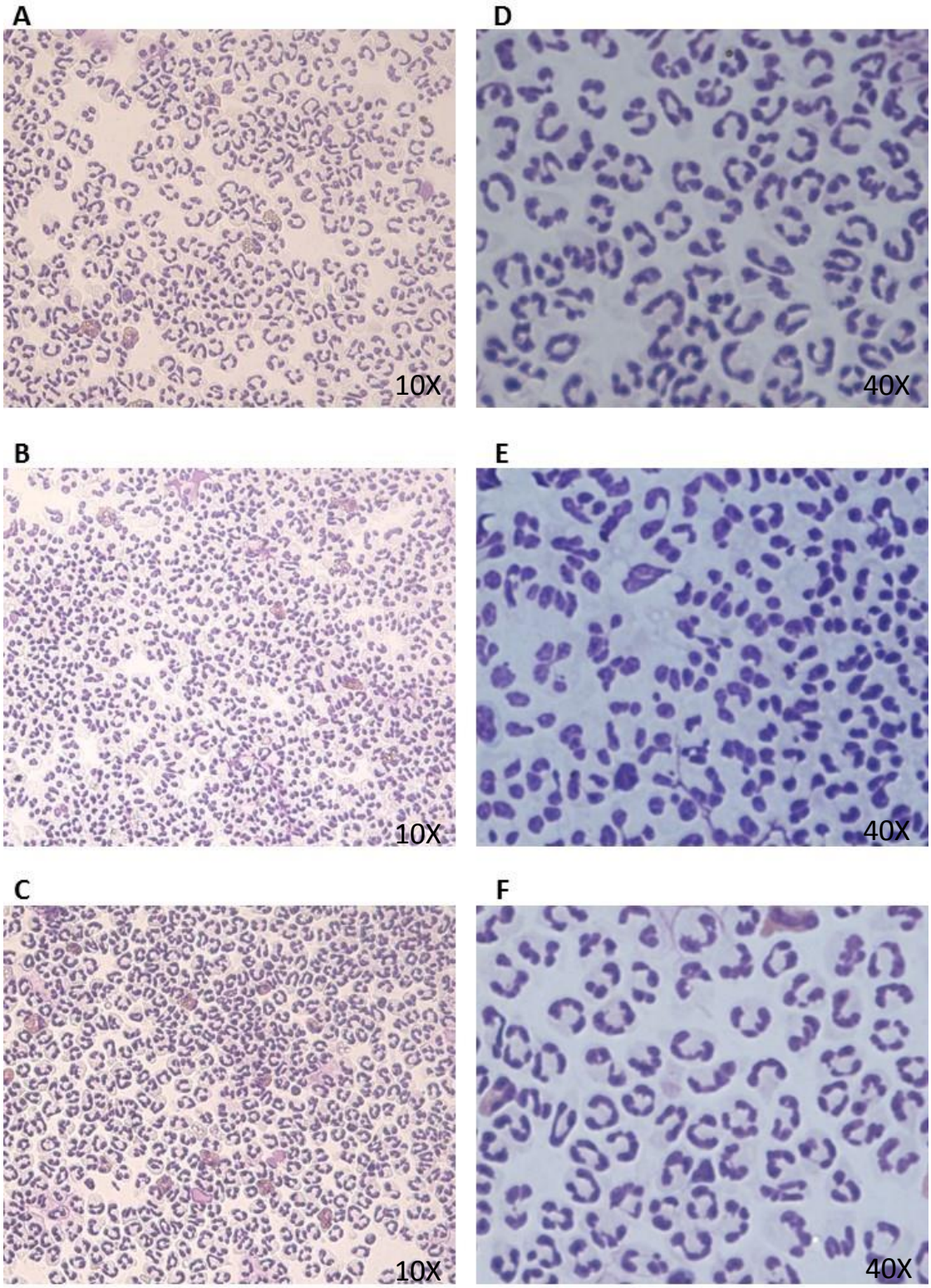
Parte I - Ensaios para definição da assinatura fenotípica dos neutrófilos polarizados

5.1 A polarização de neutrófilos induz modificações morfológicas

Para analisar se os neutrófilos estimulados com diferentes citocinas poderiam possuir modificações morfológicas, foi realizada a análise de microscopia óptica. Após 2 horas de incubação com os meios contendo citocinas condicionantes, é possível observar que os neutrófilos estimulados com citocinas de diferentes perfis inflamatórios apresentaram modificações quanto à disposição dos núcleos, onde os neutrófilos inflamatórios, possuem modificações como maior grau de segmentação (Figura 4B e Figura 4E). Na Figura 4A e Figura 4D é evidenciado que os neutrófilos não polarizados, que não possuem nenhum tipo de estímulo, apresentam o mesmo grau de segmentação quando comparados aos neutrófilos polarizados com citocinas anti-inflamatórias.

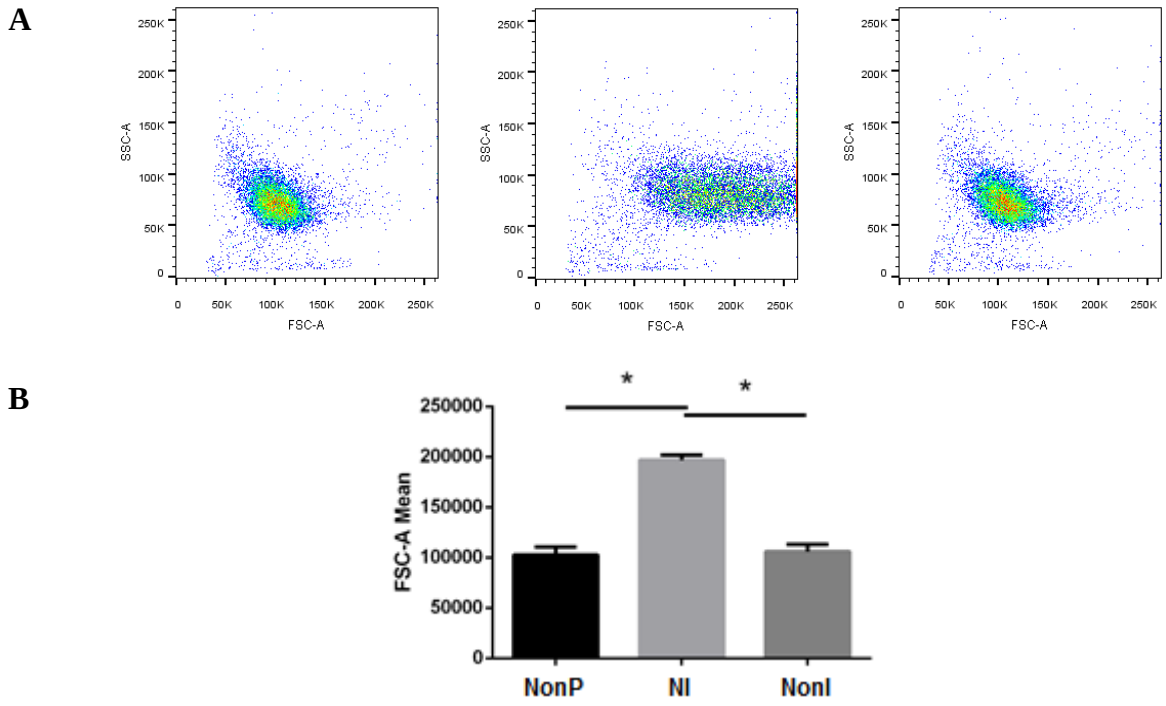
Além da microscopia óptica, realizamos análises de citometria de fluxo para averiguar o grau de variação de tamanho entre os subtipos celulares. Na Figura 5A, com as estratégias de *gate* utilizadas, é possível observar que há diferenças quanto ao tamanho e complexidade dos neutrófilos diferenciados. Estas mudanças ficam mais expressivas ao analisar o gráfico da Figura 5B, onde é demonstrado que os neutrófilos inflamatórios (NI), após 2 horas de diferenciação, apresentam maior tamanho e complexidade, quando comparados aos neutrófilos não polarizados (NonP) ou polarizados em condições anti-inflamatórias (NonI).

Figura 4 - Morfologia dos neutrófilos



A figura de microscopia óptica mostra os neutrófilos A-NonP, B-NI e C-NonI. Estas células foram submetidas a 2 horas de estimulação, e após esse tempo, 50 µl das amostras foram transferidas para lâminas de vidro, que por sua vez foram centrifugadas em Cytospin a 500 rpm durante 3 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil) e a morfologia das células foi observada através do microscópio óptico (Leica CTR 5000, DM 5000B, Alemanha) com aumento de 40x e fotografada usando o software LAS. Ampliação original, 40 ×. As imagens D, E e F correspondem, respectivamente, aos grupos NonP, NI e NonI e estas foram obtidas com ampliação de 100x. *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

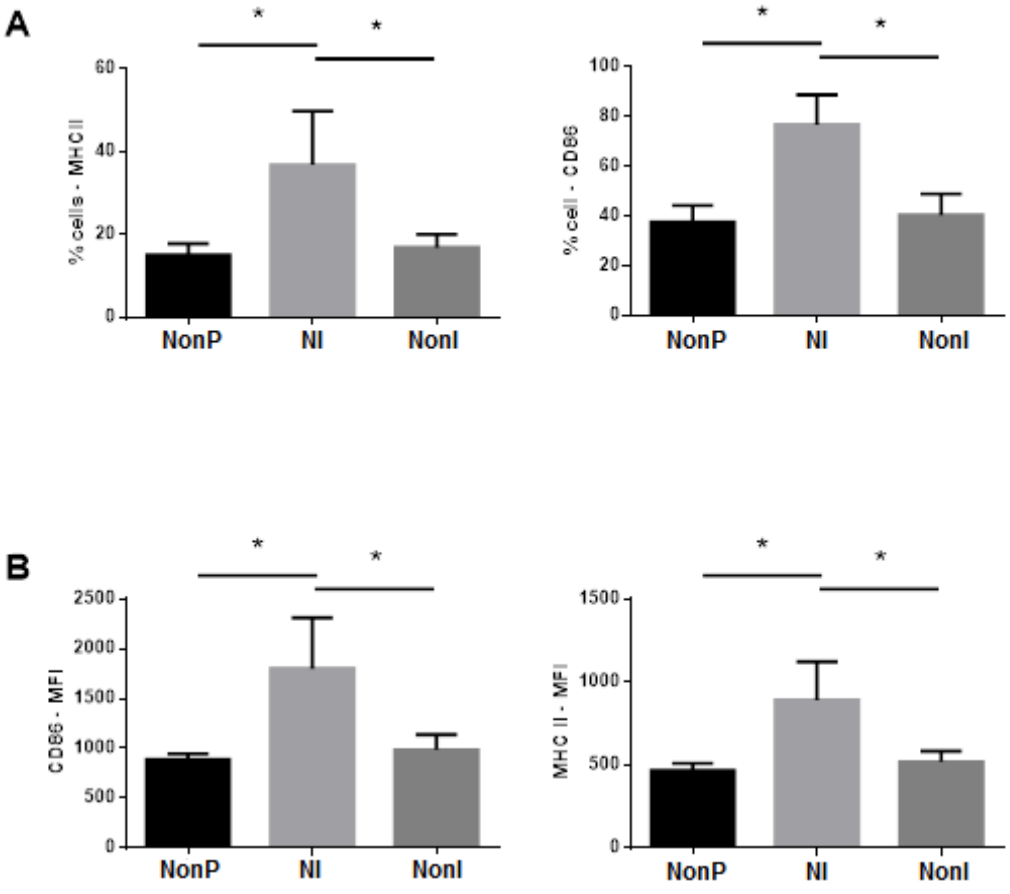
Figura 5 - Após 2h de polarização os neutrófilos possuem tamanhos diferentes.



(A) Neutrófilos isolados do sangue periférico foram diferenciados com citocinas por 2 horas e os fenótipos foram avaliados por citometria de fluxo. **(B)** Frontal Scatter Mean de cada subtipo de neutrófilo. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 4 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

Para investigar as diferenças fenotípicas entre os perfis de neutrófilos, analisamos a expressão de marcadores de superfície celular por imunomarcação e citometria de fluxo. Foram propostos dois marcadores ligados à resposta imune dos neutrófilos quando ativados, CD86 e HLA-DR (MHC II) (Gosselin *et al.*, 1993). Como observado na Figura 6, neutrófilos polarizados para o perfil inflamatório (NI) demonstraram aumento na expressão de CD86 e MHC II, quando comparado aos neutrófilos não-polarizados e não-inflamatórios (NonP e NonI), tanto na frequência de células (Figura 6A), como na intensidade média de fluorescência (Figura 6B).

Figura 6 - A polarização celular induz a diferente expressão de marcadores de superfície nos neutrófilos.

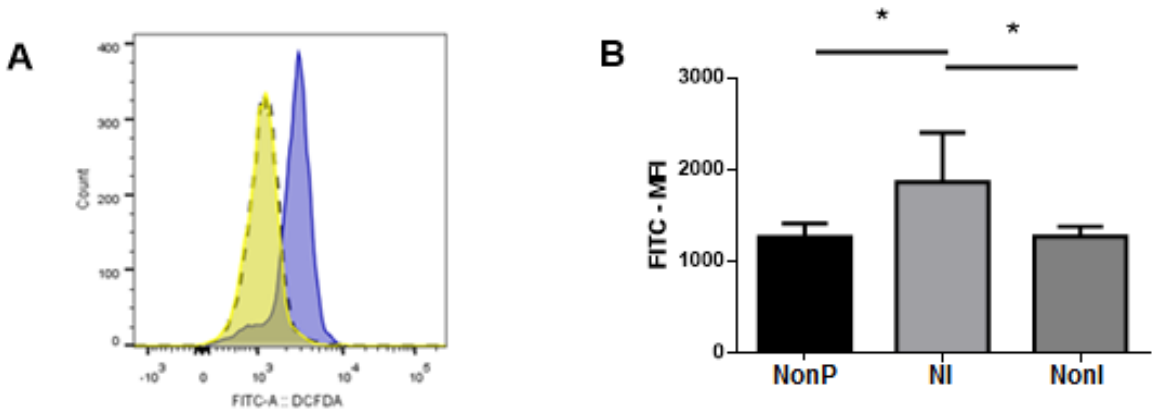


Os neutrófilos foram isolados do sangue periférico e diferenciados com condições pró e anti-inflamatórias por 2 horas e foram caracterizados por **(A)** Frequência (%) de células CD86 e MHC II positivas e **(B)** expressão (Intensidade Média de Fluorescência – IMF) de CD86 e MHC II de neutrófilos. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 4 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

5.2 Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos

Além das alterações fenotípicas, buscou-se compreender também as alterações funcionais nos neutrófilos decorrentes da polarização para os perfis inflamatório e não-inflamatório. Para tal, foi realizada a análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Na figura 7 é possível observar que após o estimulo com PMA, os neutrófilos NI, que estavam na presença de um meio condicionante com citocinas pró-inflamatórias, elevaram a produção de EROs quando comparados aos neutrófilos NonI (*p<0,05), os quais estavam presentes no meio condicionante com citocinas anti-inflamatórias, e os neutrófilos NonP, que não possuem estímulo. Os neutrófilos NonP possuem produção semelhante de EROs em relação aos neutrófilos NonI.

Figura 7 - Os neutrófilos possuem diferenças na atividade metabólica.



A medição do burst oxidativo foi realizada com uso da sonda DCFDA (1 mM). Os neutrófilos foram isolados do sangue periférico e diferenciados com condições pró e anti-inflamatórias por 2 horas e em seguida foram incubados com a sonda DCFDA. **A)** A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi induzida com PMA a 10^{-7} M e avaliada por citometria de fluxo para os neutrófilos NonP (pontilhado), NI (azul) e NonI (verde). **(B)** Expressão (Intensidade Média de Fluorescência – IMF) de EROs. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 4 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

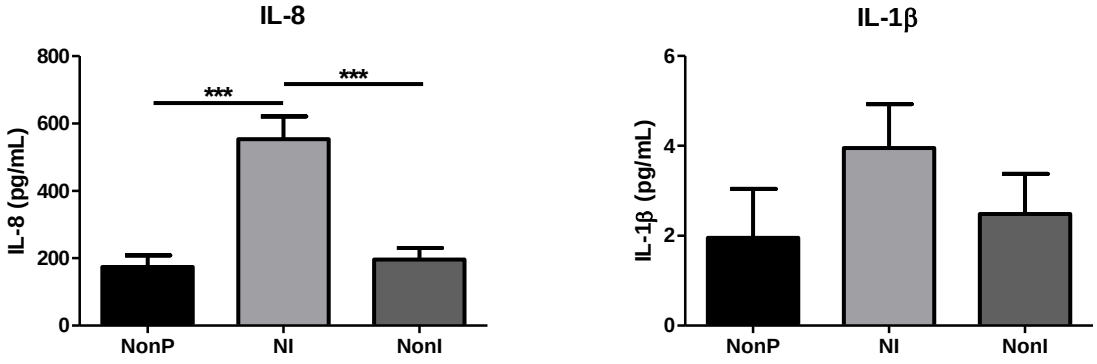
5.3 ELISA e quantificação do mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias expressas pelos neutrófilos

Os neutrófilos foram caracterizados quanto à produção e expressão gênica de citocinas associadas à resposta imune. Desta forma, avaliamos a produção das citocinas IL-8 e IL-1β por ELISA e a expressão dos genes TNFα, IL-17A, IFN-γ, IL-6, IL-10 e TGF-β por qPCR pelos neutrófilos polarizados *in vitro*.

Na Figura 8A é possível perceber que os neutrófilos NI possuem maior produção de IL-8 quando comparados aos neutrófilos NonP e NonI. Também é possível notar que os três perfis de neutrófilos possuem baixa produção de IL-1β, não sendo possível constatar diferenças estatísticas de produção entre as células, como mostra a Figura 8B.

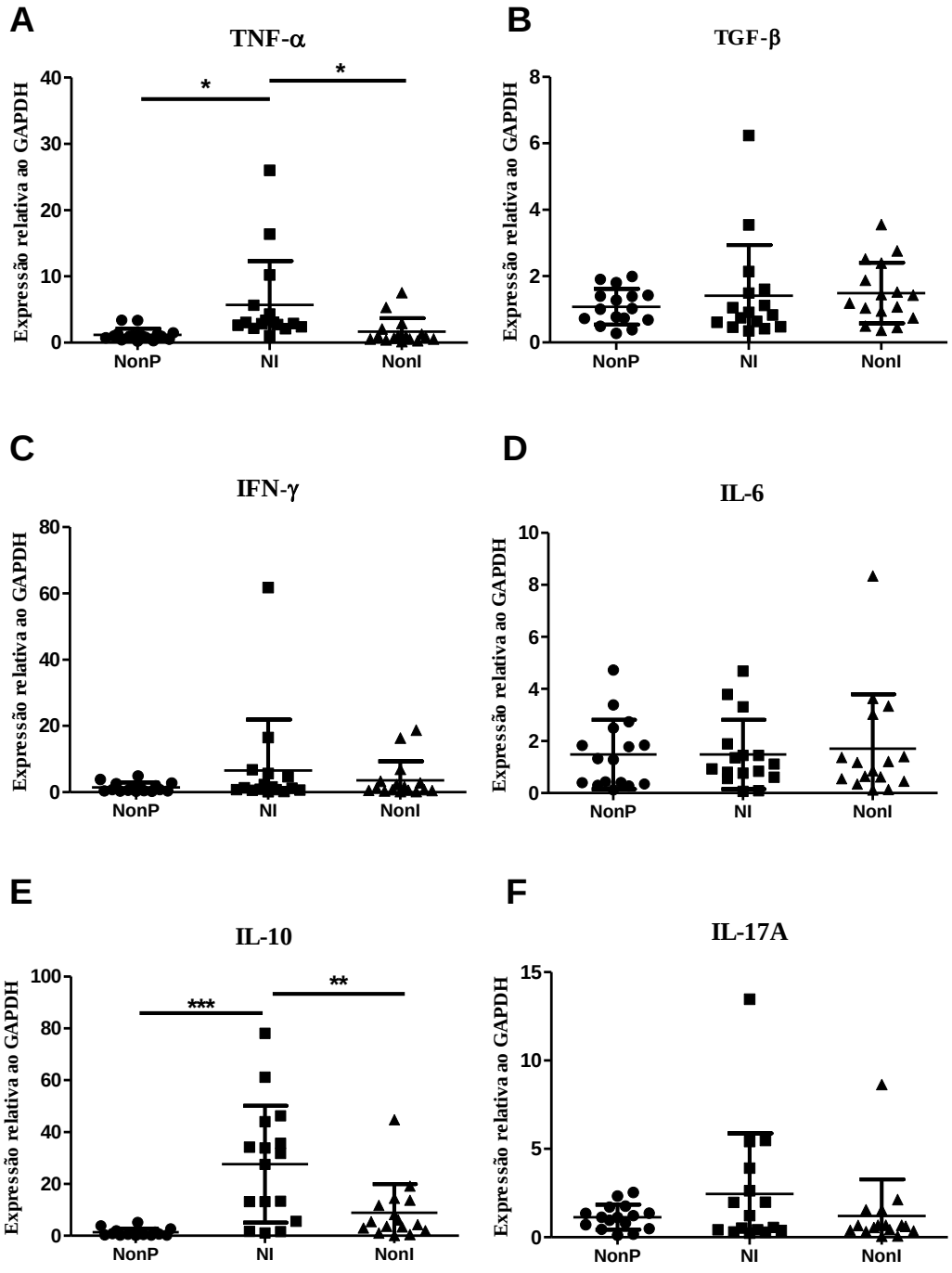
Na Figura 9 observa-se o quadro geral de expressão de mRNA de citocinas pelos neutrófilos. Nas Figuras 9A e 9E é evidenciado que os neutrófilos NI expressam mais TNF-α e IL-10 quando comparados aos neutrófilos NonP e NonI (*p<0,05). Entretanto, os neutrófilos não possuem diferença quanto à expressão de IL-17A, IFN-γ, IL-6 e TGF-β, expressando pouca quantidade de ambos os genes (Figuras B, C, D e F).

Figura 8 - Liberação de citocinas no sobrenadante após 2h de diferenciação celular.



Quantificação das citocinas IL-8 e IL-1β solúveis no sobrenadante dos neutrófilos obtidos do sangue periférico e diferenciados por 2h in vitro na presença de meio condicionantes contendo citocinas pró e anti-inflamatórias. A análise quantitativa foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. *** p <0,001. n = 20 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

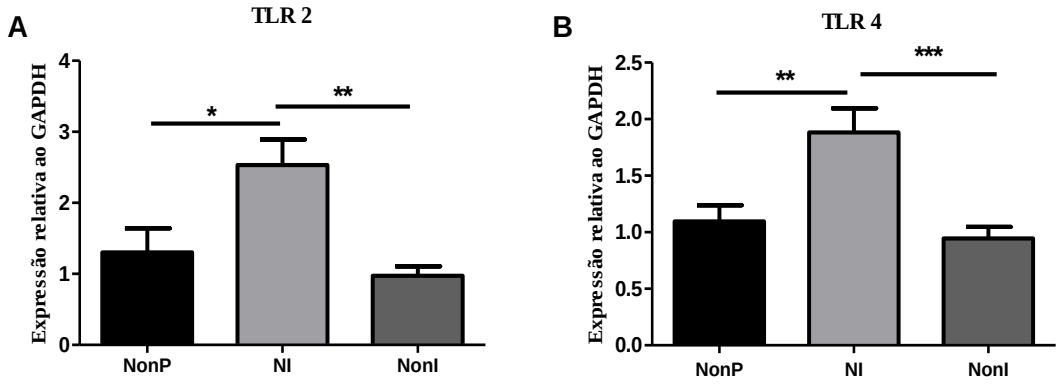
Figura 9 - Expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em neutrófilos após 2h de polarização *in vitro.*



Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de diferenciação, o mRNA foi extraído através de metodologia de Trizol para determinação da expressão gênica. **A-D)** Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TFN-α, IL-17A, IFN-γ, e IL-6). **E e F)** Expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-β). Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 15 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

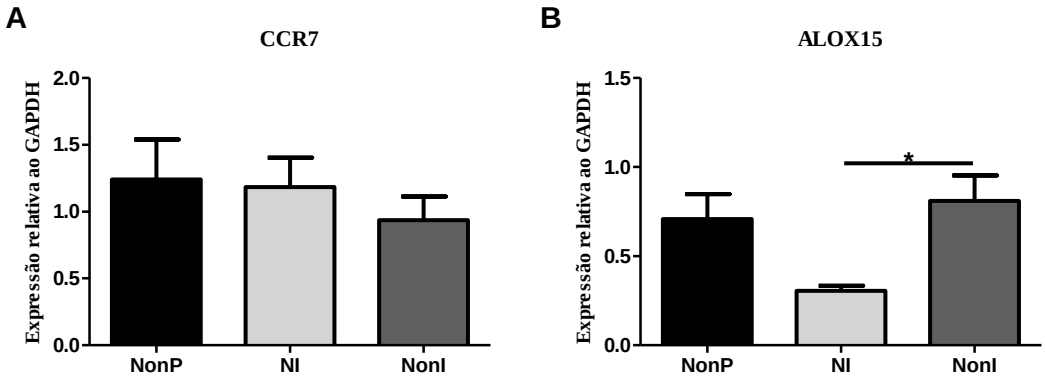
Após 2h de polarização, os neutrófilos pró-inflamatórios possuem uma maior expressão de TLR2 e TLR4 quando comparados aos neutrófilos anti-inflamatórios e os neutrófilos não polarizados (Figura 10). Diferentemente, ao analisar a expressão de CCR7 e ALOX15, é possível observar que após 2h de polarização, os neutrófilos anti-inflamatórios possuem uma maior expressão de ALOX15 quando comparados aos neutrófilos anti-inflamatórios e os neutrófilos não estimulados (Figura 11B). Não foram observadas diferenças entre os três perfis celulares para a expressão de CCR7 (Figura 11A).

Figura 10 - Expressão gênica dos receptores de superfície celular TLR2 e TLR4 após 2h de polarização *in vitro.*



Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, o mRNA foi extraído através de metodologia de Trizol para determinação da expressão gênica. **A-B)** Expressão gênica de TLR2 e TLR4, respectivamente. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 15 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

Figura 11 - Expressão gênica do receptor CCR7 e da enzima ALOX15 após 2h de polarização *in vitro*.



Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, o mRNA foi extraído através de metodologia de Trizol para determinação da expressão gênica. **A-B)** Expressão gênica de CCR7 e ALOX15, respectivamente. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 10 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory*

Resultados

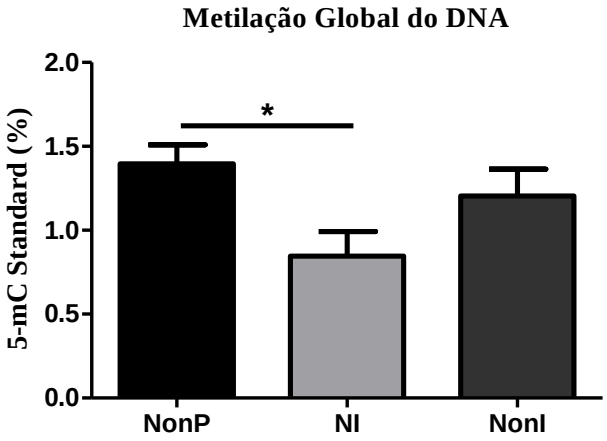
Parte II - Ensaios para avaliação das mudanças epigenéticas nos neutrófilos

5.4 Determinação do padrão de metilação global do DNA

Considerando as alterações fenotípicas e funcionais observadas nos neutrófilos polarizados *in vitro*, demos continuidade à investigação das mudanças epigenéticas que poderiam estar correlacionadas à resposta imune dessas células.

Após 2h de polarização, observa-se que os neutrófilos pró-inflamatórios apresentam redução na metilação global, comparando-se aos neutrófilos não polarizados. Por outro lado, os neutrófilos anti-inflamatórios não apresentam alterações no padrão de metilação em relação aos neutrófilos não estimulados com citocinas.

Figura 12- Perfil de metilação global do DNA dos neutrófilos polarizados por 2h *in vitro*.

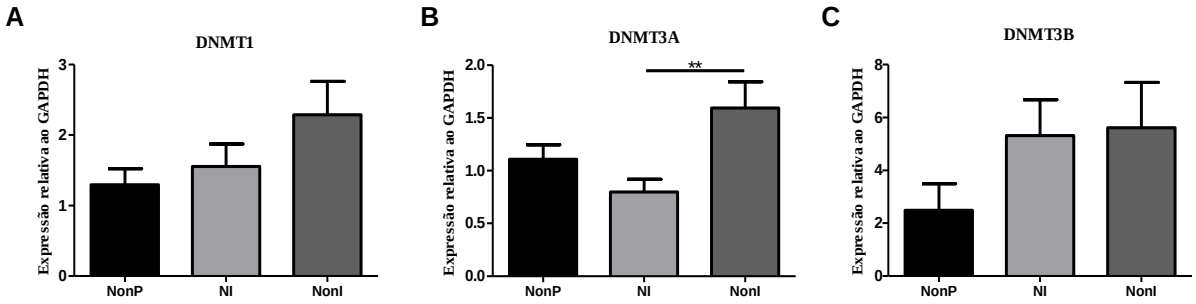


Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, o DNA genômico foi extraído através do "PureLink® Genomic DNA Minikit". Para determinação do perfil de metilação global do DNA foi utilizado o "MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit" (Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, EUA). Os dados estão expressos em porcentagem relativa ao controle positivo (5%) fornecido pelo kit. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 10 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory.*

5.5 Análise da expressão de enzimas epigenéticas modificadoras do DNA

A fim de investigar se os microambientes pró e anti-inflamatório poderiam induzir alterações na expressão de enzimas que promovem alterações epigenéticas, foi analisada a expressão de enzimas relacionadas à metilação do DNA. Após 2h de polarização, os neutrófilos anti-inflamatórios possuem uma maior expressão da DNMT3A quando comparados aos neutrófilos anti-inflamatórios (Figura 13B). Entranto, em relação à expressão das enzimas DNMT1 e DNMT3B não foram observadas diferenças entre os grupos celulares (Figuras 13A e 13C).

Figura 13 - Expressão das enzimas epigenéticas DNMT1, DNMT3A E DNMT3B após 2h de polarização dos neutrófilos *in vitro.*



Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, o mRNA foi extraído através de metodologia de Trizol para determinação da expressão gênica. **A-C)** Expressão gênica de DNMT1, DNMT3A E DNMT3, respectivamente. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e seguidos do teste multi-comparativo de Tukey. * p <0,05. n = 12 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory.*

5.6 - Investigação de modificações epigenéticas associadas às histonas em genes associados a resposta imune dos neutrófilos

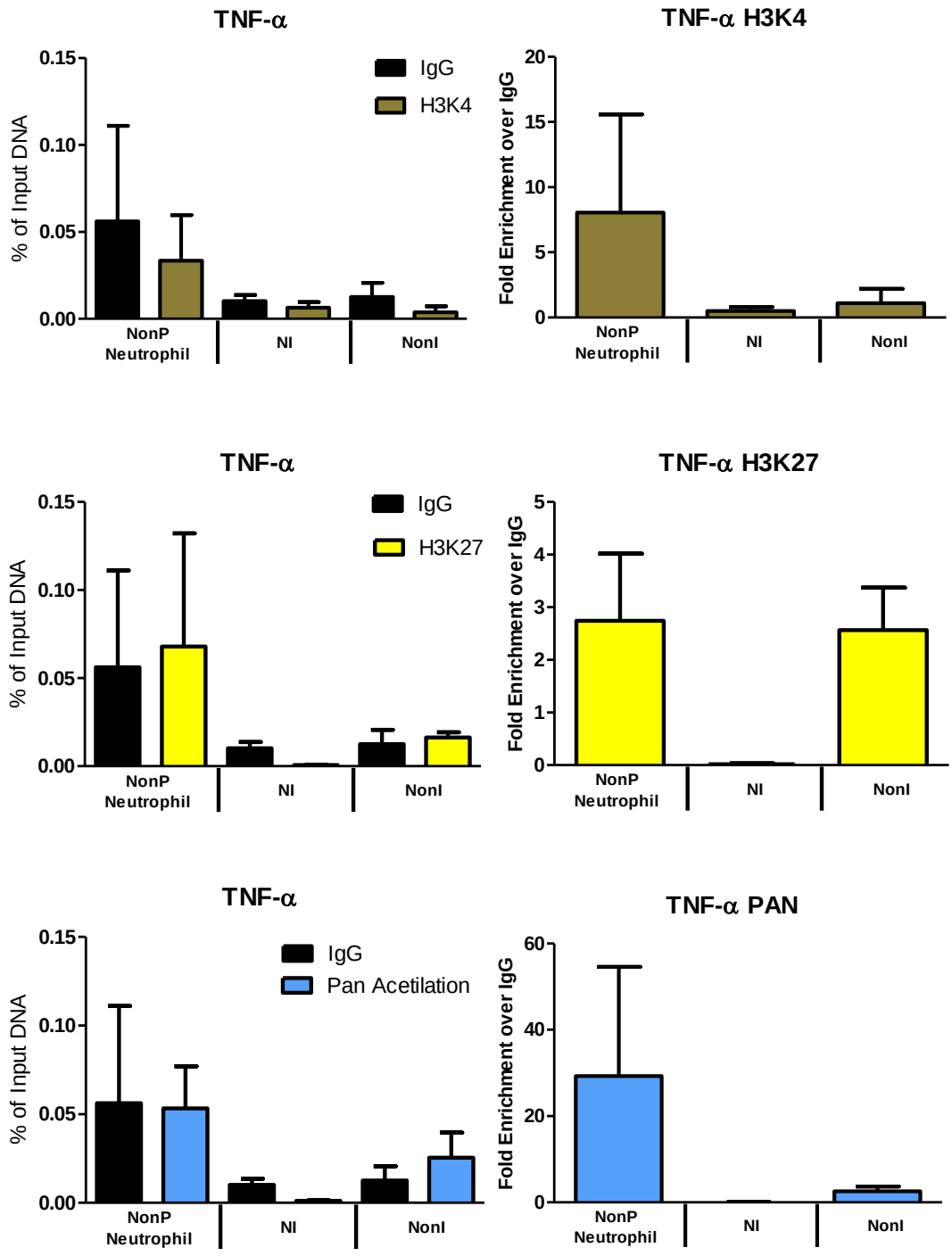
Após os resultados obtidos na caracterização fenotípica e expressão gênica das enzimas envolvidas em modificações epigenéticas, foi investigado se alterações em histonas poderiam ter ocorrido nas regiões promotoras dos genes relativos às citocinas envolvidas na resposta imune dos neutrófilos.

Dentre as modificações de histonas, avaliou-se a trimetilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3) associada à repressão da transcrição gênica, e a trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) e pan-acetilação das lisinas K9 + K14 + K18 + K23 + K27, ambas relacionadas a ativação da transcrição gênica. Assim, realizou-se o ensaio de imunoprecipitação da cromatina utilizando anticorpos específicos para essas modificações, e em seguida a quantificação das regiões imunoprecipitadas por PCR em Tempo Real. As sequências analisadas foram relativas às regiões promotoras das citocinas inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6.

Em relação aos genes que codificam as citocinas avaliadas, observamos um perfil bastante semelhante entre as 3 citocinas avaliadas. Em estado basal (NonP) os neutrófilos apresentam um alto "fold enrichment", tanto na trimetilação da H3K27 quanto na acetilação das lisinas K9, K14, K18, K23, K27, que representam ativação destes genes e na tri-metilação da H3K27, que representa repressão gênica. De forma interessante, os NI apresentam redução no número de cópias de DNA metilados ou acetilados nestas 3 posições. Entretanto, observamos que os neutrófilos ativados na presença de citocinas anti-inflamatórias apresentam a tri-metilação de H3K27, que indica repressão nestes genes sem apresentar aumento do "fold enrichment" das duas mudanças ativadoras.

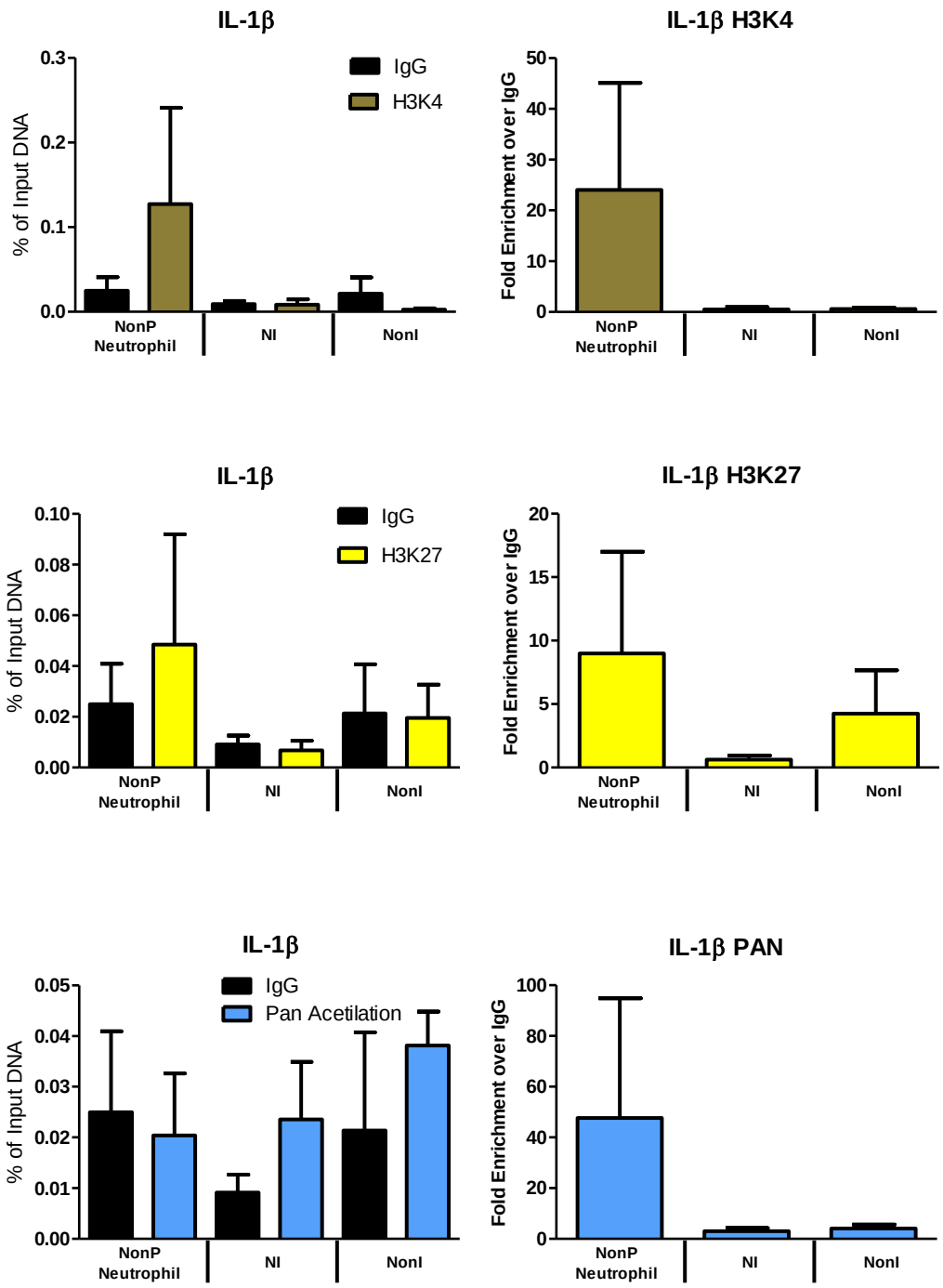
Ao analisar o TNF-α, se compararmos a porcentagem de DNA imunoprecipitado relativo à quantidade de amostra inicial (% input) entre os neutrófilos NI e NonI, constata-se aumento das modificações H3K27me3, relacionada à repressão e pan-acetilação, ativação em detrimento daquela associada à ativação (H3K4me3)(Figuras 14, 15 e 16). O mesmo acontece em relação a citocina IL-1β exceto pelo fato dos neutrófilos NI apresentarem aumento da modificação de histona relacionada a ativação (pan-acetilação), o que não ocorre em TNF-α, que não apresenta ganhos de modificações ativadoras ou repressivas nos neutrófilos NI. Entre os netrófilos NonP e NonI, é possível observar a permanência da marca repressiva (H3K27me3) em relação ao gene da citocina IL-6 nos neutrófilos NonI.

Figura 14 - Modificações epigenéticas de histonas associadas à região promotora de TNF-α.



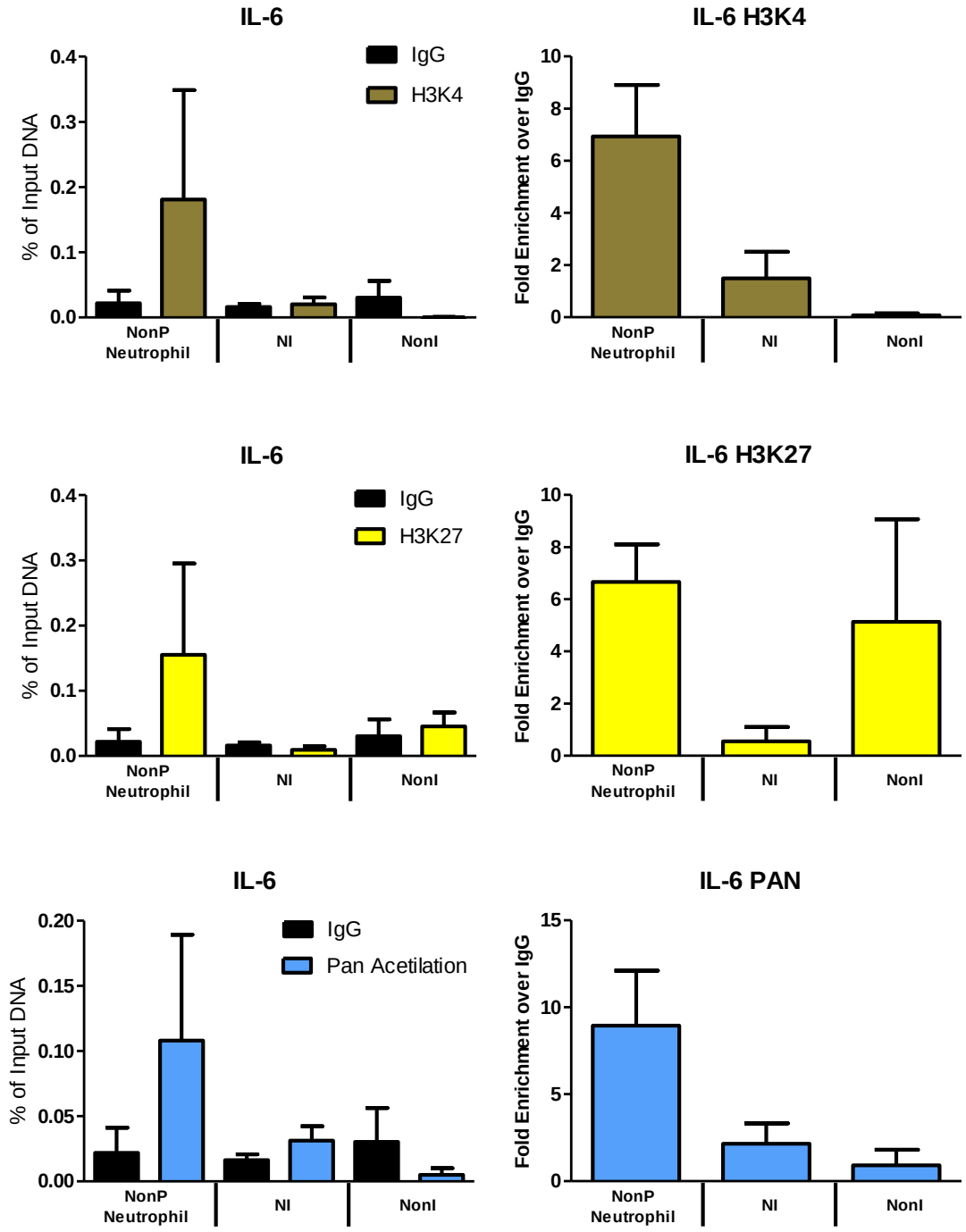
Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, $5x10^6$ células foram empregadas no ensaio de imunoprecipitação da cromatina utilizando anticorpos específicos paras modificações de histonas associadas à repressão (H3K27me3) e transcrição (H3K4me3 e Pan-Acetilação de K9 + K14 + K18 + K23 + K27) gênicas. As regiões imunoprecipitadas foram quantificadas por PCR em Tempo Real utilizando-se primers específicos para as regiões promotoras da citocina. * p <0,05. n = 4 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory.*

Figura 15 - Modificações epigenéticas de histonas associadas à região promotora de IL-1β



Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, $5x10^6$ células foram empregadas no ensaio de imunoprecipitação da cromatina utilizando anticorpos específicos paras modificações de histonas associadas à repressão (H3K27me3) e transcrição (H3K4me3 e Pan-Acetilação de K9 + K14 + K18 + K23 + K27) gênicas. As regiões imunoprecipitadas foram quantificadas por PCR em Tempo Real utilizando-se primers específicos para as regiões promotoras da citocina. * p <0,05. n = 4 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory.*

Figura 16 - Modificações epigenéticas de histonas associadas à região promotora de IL-6



Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico, polarizados *in vitro* e após 2h de polarização, $5x10^6$ células foram empregadas no ensaio de imunoprecipitação da cromatina utilizando anticorpos específicos paras modificações de histonas associadas à repressão (H3K27me3) e transcrição (H3K4me3 e Pan-Acetilação de K9 + K14 + K18 + K23 + K27) gênicas. As regiões imunoprecipitadas foram quantificadas por PCR em Tempo Real utilizando-se primers específicos para as regiões promotoras da citocina. * p <0,05. n = 4 *NonP = non-polarized, NI = Inflammatory e NonI = Non-Inflammatory.*

6. Discussão

Os neutrófilos têm papel importante durante a ativação do sistema imune inato e desenvolvimento da resposta inflamatória, sendo as primeiras células recrutadas para os locais de infecção ou dano tecidual. Entretanto, dependendo do microambiente, tem sido demonstrado que os neutrófilos, até então considerados células com alto grau de diferenciação e maturação, possuem perfis diferentes, ou seja, podem ser modulados para um perfil pró ou anti-inflamatório, semelhante ao que ocorre com macrófagos (Galdiero *et al.*, 2013; Sionov *et al.*, 2015). Este fenômeno foi primeiramente relatado em estudos com tumores humanos, como os cânceres de pulmão e colorretal (Eruslanov *et al.*, 2014; Eruslanov, 2017; Mizuno *et al.*, 2019), e de camundongos, como o carcinoma pulmonar e mesotelioma (Fridlender *et al.*, 2009). Nesse contexto, a polarização modifica o perfil de resposta das células do sistema imune e pode ser exemplificada pela liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios. Porém, há interpretações divergentes quanto aos mecanismos regulatórios da polarização de neutrófilos.

A fim de caracterizar fenotipicamente os neutrófilos polarizados *in vitro*, realizamos ensaios de diferenciação celular e analisamos possíveis modificações morfológicas e funcionais das células. Observamos por microscopia e citometria de fluxo que os neutrófilos NI e NonI apresentaram diferenças quanto à morfologia nuclear e tamanho após 2h de estimulação. Neste sentido, já é relatado que quando ocorre a incubação dos neutrófilos *in vitro* com as citocinas IL-13 e IL-4, há a indução modificações morfológicas das células (Girard *et al.*, 1996; Girard *et al.*, 1997; Junttila, 2018). Contudo, as modificações fenotípicas não foram expressivas nos neutrófilos NonI, os quais também foram incubados com IL-13 e Il-4. Por outro lado, os dados do nosso trabalho demonstraram que a combinação de IFN-γ e GM-CSF induziu modificações características para as células NI, e corroboram com a característica dos neutrófilos adquirirem perfis diferentes dependendo do microambiente em que estão presentes. Por exemplo, como relatado anteriormente, em estudos com neutrófilos isolados de pacientes com câncer, os neutrófilos N1 apresentam núcleos mais segmentados, enquanto que os neutrófilos N2 apresentam núcleos circulares (Piccard *et al.*, 2012). Seguindo uma classificação diferente do nosso estudo, no LES os neutrófilos de baixa densidade (LDNs), que são mais semelhantes ao neutrófilos N2, são constituídos por uma maior porcentagem de neutrófilos imaturos, quando comparado com os LDNs de pacientes com carcinoma de células renais (Rodriguez *et al.*, 2009). De forma diferente, durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos, os neutrófilos N2 possuem maior tamanho e granulosidade em comparação como os neutrófilos N1 (Peñaloza *et al.*, 2018).

Em nosso trabalho, a caracterização fenotípica das células também foi realizada pela expressão de marcadores de superfície. Os neutrófilos NI apresentaram maior expressão de MCH-II e CD86 quando comparados aos neutrófilos NonI e NonP. Os neutrófilos contêm reservas intracelulares de MHC-II e moléculas coestimuladoras, que se translocam para a superfície celular após estimulação apropriada (Lin and Loré, 2017; Rudolf-Oliveira *et al.*, 2018). O aumento da expressão de MHC II torna a resposta imune mais ávida. A expressão de CD86, uma molécula co-estimulatória, é comumente aumentada em células apresentadoras de antígeno (APC, ou *antigen-presenting cell*) sob a influência de patógenos ou pela indução por citocinas (Chen and Flies, 2013). Além disso, evidências sugerem que os neutrófilos fariam parte do grupo das células APCs atípicas, que são aquelas que não conseguem ativar linfócitos T naive. As células APCs clássicas seriam os macrófagos, células B e células dendríticas (Kambayashi and Laufer, 2014; Takashima and Yao, 2015; Vono *et al.*, 2017). Nos tumores, moléculas como GM-CSF e IFN-γ regulam positivamente a expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias como CD86 em TANs, o que permite que as células funcionem como células apresentadoras de antígeno (Eruslanov *et al.*, 2014; Eruslanov, 2017), de forma semelhante ao que ocorre com macrófagos M1 (Mills, 2015). Entretanto, em relação aos neutrófilos NonI, a menor expressão de MHC II ocorre possivelmente pelo caráter anti-inflamatório da célula induzido pelo meio condicionante contendo TGF-β, IL-4 e IL-13. Em alguns subtipos de células anti-inflamatórias, como as subpopulações M2b de macrófagos M2, a expressão de MHC II e CD86 estão correlacionadas com a liberação de altos níveis de IL-10 (Martinez and Gordon, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Nishiguchi *et al.*, 2017).

Além dos marcadores de superfície e modificações morfológicas, também é evidente que os neutrófilos, sob diferentes condições, desenvolvem mudanças em seu perfil de ativação. Em nosso modelo de estudo, os neutrófilos NI, após a estimulação com PMA, apresentaram um estágio de ativação que permite liberação de EROs, quando comparados aos neutrófilos NonI e NonP. Outras células imunológicas, como os macrófagos M1, tendem a desencadear a resposta bactericida no local da lesão/infecção, que envolve a produção de EROs e NO, quando em contato com o patógeno e citocinas pró-inflamatórias (Rybicka *et al.*, 2010; Ghesquière *et al.*, 2014). Em contraste, os macrófagos M2 não produzam EROs, facilitando o reparo tecidual (Balce *et al.*, 2011).

Em outro estudo, quando há o pré-tratamento de neutrófilos com GM-CSF e IL1β, é relatado uma maior produção de EROs em resposta ao PMA (Swain *et al.*, 2018). Diferentemente, quando incubados com IL-27 e ativados por LPS, a IL-27 diminui a produção

de EROs pelos neutrófilos (Li, J. P. *et al.*, 2010), assim como a incubação com IL-10 parece ter um efeito retardante, sendo um contrafator na estimulação de EROs em macrófagos e neutrófilos (Dang, Elbim, *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2017; Peñaloza *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que a presença de GM-CSF e IFN-γ estimula as células NI para a maior produção de EROs. Comumente é relatado que citocinas como o GM-CSF e o TNF-α induzem mudanças conformacionais na membrana dos neutrófilos, o que resulta na maior liberação de EROs (Dang, Stensballe, *et al.*, 2006; El-Benna *et al.*, 2016).

A produção de mediadores inflamatórios é o indicador mais preciso de especialização celular e vários fatores podem influenciar a liberação destes no meio. Os neutrófilos NI apresentam uma maior produção de IL-8 quando comparados aos neutrófilos NonI e NonP. De forma interessante, em um modelo de polarização diferente, foi demonstrando que os neutrófilos N2 podem possuir maior produção de IL-8 e TNF-α quando comparados aos neutrófilos N1 (Ohms *et al.*, 2020) Porém, em nosso modelo de polarização não houve este aumento.

Já foi observado que a incubação com IL-4, GM-CSF e TNF-α para reproduzir um microambiente inflamatório *in vitro*, induz aumento significativo na produção IL-8 e IL-1β pelos neutrófilos (Chakravarti *et al.*, 2009). Contrariamente, em nosso modelo de estudo, os neutrófilos, independente do microambiente de diferenciação, produziram baixas/indetectáveis quantidades de IL-1β. A baixa produção desta citocina pode ser decorrente das avaliações terem sido realizadas sem adição de estímulos específicos, que seriam capazes de induzir maior produção de IL-1β, como já demonstrado em outro trabalho que detectou altas quantidades de IL-1β na presença de DAMPs ou PAMPs (Lopez-Castejon and Brough, 2011). Por exemplo, a co-cultura de bactérias com IL-17A e IFN-γ induz maior atividade microbicida dos neutrófilos e maior liberação de IL-1β (Muntaka *et al.*, 2019). Outro aspecto é a limitação da técnica utilizada. Avaliamos apenas a liberação da forma madura da IL-1β no sobrenadante de cultivo por ELISA, portanto não detectamos a pro-IL1β no interior das células. Assim, para afirmarmos com certeza a diferença na produção desta citocina seria necessária outra técnica complementar, como *western blot*.

Em relação à expressão gênica, após estimulação apropriada *in vitro* ou *in vivo*, os neutrófilos humanos podem expressar mRNA de muitas citocinas pró e anti-inflamatórias (incluindo TNF-α, IL-1β, IL-1ra, IL-6) e quimiocinas (incluindo CXCL1, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 e CCL23) (Cassatella, 1999; Tecchio *et al.*, 2013; Arruda-Silva *et al.*, 2017). Ao analisar o TNF-α, os neutrófilos possuem uma baixa produção deste *in vitro* quando

incubados com agonistas de TLR 2 (Cassatella, 1999). Em nossos experimentos não conseguimos detectar a produção de TNF-α nos grupos estudados. Porém, a nível de expressão gênica, os neutrófilos NI expressam significantemente mais mRNA de TNF-α quando comparados aos neutrófilos NonP e NonI. Em modelo semelhante, quando os neutrófilos N2 são incubados com TGF-β, há redução significativa da expressão de TNF-α (Shaul *et al.*, 2016). Os neutrófilos N1 no câncer possuem uma alta atividade antitumoral principalmente devido a liberação de citocinas próinflamatórias como IL-12 e TNF-α, que facilitam o recrutamento e ativação de células T CD8+ (Fridlender and Albelda, 2012; Coffelt *et al.*, 2016).

Os neutrófilos durante a inflamação podem produzir IL-17 para induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios (como citocinas, quimiocinas e MMPs) por células mesenquimais e mieloides, o que leva ao recrutamento e ativação de neutrófilos para o sítio inflamatório (Cua and Tato, 2010). Com relação a IL-17A, foi demonstrado que os neutrófilos humanos ativados *in vitro* por LPS e/ou IFN-γ não produzem esta citocina (Pelletier *et al.*, 2010). Além disso, a maioria dos estudos que relatam que os neutrófilos humanos representariam fontes potenciais de IL-17 possuem condições específicas, por exemplo: a estimulação com IL-6 e IL-23 induzem eficientemente a expressão de mRNA e secreção de IL-17A, IL-17F e IL-17RC (Taylor *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2016; Halwani *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Porém, ao tentar recriar as mesmas condições deste modelo, Tamassia e colaboradores relataram que não foi possível detectar a expressão de IL-17, e suas classes, pelos neutrófilos *in vitro* (Tamassia *et al.*, 2018). Ao incubar com IFN-α, GM-CSF, fMLF, G-CSF e TNF-α, similarmente falham na expressão de IL-17A, IL-17F, IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17E em neutrófilos. O que constatamos em nosso modelo é que em ambos os microambientes pró e anti-inflamatórios os neutrófilos não expressam, ou expressam quantidades quase indetectáveis de IL-17A, não havendo diferença entre os grupos celulares.

Os neutrófilos respondem ao IFN-γ frequentemente nos estágios iniciais de infecção e isso promove o *link* entra a imunidade inata e a adaptativa por meio da expressão de MHC e desenvolvimento de células T auxiliares (Abi Abdallah *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2011; Sturge *et al.*, 2013). O IFN-γ também é utilizado em estudos que visam alterar a fenótipo dos neutrófilos e seu perfil de ativação, modificando a expressão de diversos genes ligados à resposta imune (Ellison *et al.*, 2017). No lúpus eritrematoso sistêmico (LES) uma subpopulação de neutrófilos pró-inflamatórios produzem uma alta quantidade de IFNs e provocam alto dano celular, possuindo um papel deletério no desenvolvimento da doença (Denny *et al.*, 2010). No sangue periférico dos portadores desta patologia, foi relatada a presença de uma subpopulação

de neutrófilos conhecidos como granulóticos de baixa densidade (LDGs, ou *low density neutrophils*), os quais apresentam atividade pró-inflamatória e alta produção de interferons do tipo I, IFN-α e TNF-α (Kuno *et al.*, 2002; Carmona-Rivera and Kaplan, 2013), em comparação com os granulócitos de alta densidade (HDNs, ou *high density neutrophils*) autólogos. No entanto, a capacidade fagocítica dos LDGs é significativamente reduzida (Denny *et al.*, 2010), o que é semelhante aos LDNs no câncer. Porém, observamos que os neutrófilos NI e NonI não possuem diferenças quanto à expressão gênica desta citocina.

Em relação à produção de IL-6, trabalhos já demonstraram que a citocina pode ser induzida nos neutrófilos expostos ao IFN-γ (Zimmermann *et al.*, 2016). Em outros modelos é descrito que os neutrófilos N2 expressam IL-6, quando há estimulação dos mesmos por IL-35 (Zou *et al.*, 2017). Além disso, estudos relatam notável produção de IL-6 por neutrófilos humanos estimulados com LPS, GM-CSF ou TNF-α (Tamassia *et al.*, 2014). Porém, em nossos experimentos nenhuma alteração foi observada em ambos perfis de neutrófilos quanto à produção e expressão desta citocina. Entretanto, recentemente foi elucidado que os neutrófilos humanos podem certamente produzir IL-6 *in vitro*, mas somente sob condições experimentais capazes de reorganizar a cromatina na região promotora de IL-6 (Zimmermann *et al.*, 2015).

Ao focar nas citocinas anti-inflamatórias, muitos tipos de células expressam o mRNA de IL-10, mas nem todos produzem quantidades detectáveis da proteína. A extensão da expressão da mesma é variável, sendo esta variação explicada por mecanismos pós-transcricionais. A produção desta proteína está relacionada à estabilidade da região 3'-UTR do RNAm IL-10, que geralmente é instável, mas dependendo do estímulo, por exemplo um indutor tumoral, o mRNA é estabilizado, levando à produção da proteína (Powell *et al.*, 2000). Em camundongos a IL-10 é uma citocina chave na regulação da infiltração de neutrófilos N1 e N2 durante a infecção pelo *S. pneumoniae*, permitindo o desenvolvimento de uma resposta inflamatória com danos limitados aos tecidos, evitando a inflamação pulmonar excessiva e morte do hospedeiro (Peñaloza *et al.*, 2015; Peñaloza *et al.*, 2018). Inclusive a IL-10 atua como citocina reguladora do balanço de neutrófilos e inflamação, demonstrando que a célula ativada pode liberar mediadores anti-inflamatórios para balancear o microambiente (Bazzoni *et al.*, 2010). Em nosso estudo, demonstramos que os neutrófilos estimulados com IL-4, IL-13 e TGF-β tiveram baixos níveis de expressão de genes ligados à resposta anti-inflamatória. Em adição, observamos que a expressão de IL-10 é maior em neutrófilos NI, quando comparados aos neutrófilos NonP e NonI, suportando a hipótese que possivelmente os neutrófilos de perfil NI possam estar expressando IL-10 para controlar o microambiente inflamatório.

O TGF-β é normalmente produzido por neutrófilos com a função de suprimir a reposta de células T e a produção de EROs (Pillay *et al.*, 2013), podendo também ser expresso em baixas quantidades em indivíduos saudáveis (Chu *et al.*, 2000). No câncer os neutrófilos N2 associados à tumores (TANs II, ou *tumor-associated neutrophils II*) podem expressar IL-6, IL-23 e TGF-β, principalmente por influência do TGF-β, funcionando como um mecanismo de autorregulação durante a expansão da doença (Bettelli *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Diferentemente dos TANs II, onde o microambiente inflamatório é complexo e amplo, em nosso modelo de indução, os neutrófilos NI e NonI expressaram a mesma quantidade de TGF-β. Então, em nosso modelo de estudo, os estímulos anti-inflamatórios foram insuficientes para ativar o neutrófilo NonI a expressar TGF-β.

Diante do quadro de produção e expressão gênica das citocinas, partimos para a expressão de diferentes receptores de superfície celular, como os receptores do tipo Toll. Os TLRs são importantes no reconhecimento de patógenos pelas células do sistema imune (Nancy Hilda and Das, 2018), e tem sido demonstrado que esses receptores também podem estar envolvidos na inflamação não infecciosa como na artrite reumatoide (Umekita *et al.*, 2019), no câncer (Zhang *et al.*, 2018) e na regeneração de tecidos danificados (Suga *et al.*, 2014).

Entre os principais receptores presentes nos neutrófilos estão os TLR2 e TLR4. O TLR2 é expresso em altas concentrações nos neutrófilos e são essenciais no reconhecimento de bactérias gram-positivas (Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012), na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Hook *et al.*, 2020), na infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Acorci-Valério *et al.*, 2010) e recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório através do reconhecimento de NETs (Wang *et al.*, 2019). Além disso, um polimorfismo do TLR2 humano está potencialmente associado a infecções estafilocócicas e choque séptico (He *et al.*, 2019). Também, presente no microambiente infecioso o GM-CSF aumenta a atividade antimicrobiana dos neutrófilos e induz expressão de TLR2, estando pouco correlacionado com o TLR4 (Kurt-Jones *et al.*, 2002).

Por sua vez, o TLR4 modula várias vias associadas à inflamação induzida por isquemia no acidente vascular cerebral (AVC), contribuindo para a migração de neutrófilos para o parênquima cerebral, sendo estes de perfil N1 (Caso *et al.*, 2007; Aronowski and Roy-O'reilly, 2019). Quando há deficiência deste receptor, há o favorecimento da proliferação de neutrófilos alternativos (N2), que estão associados à neuroproteção e resolução da inflamação após o AVC (Cuartero *et al.*, 2013) (García-Culebras *et al.*, 2019). Diferentemente, na pancreatite aguda em camundongos, os neutrófilos que expressam TLR4 são caracterizados como neutrófilos pró-inflamatórios, em particular neutrófilos N1, favorecendo o aumento da gravidade da doença e

elevando a expressão de TNF-α e IL-1β pela interação entre TLR4 e galectina-3 (Stojanovic *et al.*, 2019). Em nosso estudo, os neutrófilos NI mostraram uma maior expressão de TLR2 e TLR4 quando comparados aos neutrófilos NonI e os neutrófilos não estimulados NonP, suportando possívelmente a correlação direta da ação do TLR4 com as células NI.

Os neutrófilos podem ser polarizados em analogia à polarização dos macrófagos. Por isto, além da expressão de TLR2 e TLR4, investigamos a expressão do mRNA de dois marcadores de macrófagos, o CCR7 (comum em M1) e o ALOX15 (comum em M2) (Kittan *et al.*, 2013). O CCR7 é um receptor de quimiocina também expresso nas superfícies de células T, células B e células dendríticas maduras. Ele controla a migração celular em resposta aos ligantes cognatos CCL19 e CCL21, sob a influência de mediadores como o TNF-α. Os neutrófilos podem expressar CCR7 em sua membrana, o qual também está ligado à migração de neutrófilos, principalmente para os linfonodos durante a inflamação aguda (Beauvillain *et al.*, 2011; Arokiasamy *et al.*, 2017). Porém, pouco se sabe sobre a relação da expressão de CCR7 e ALOX15 com a polarização dos neutrófilos. Em adição, os neutrófilos expressam mRNAs de metabólitos associados à ALOX15 (Levy *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2018), sendo que a deficiência ou aumento expressão desta enzima podem influenciar no controle de infecções (Mishra *et al.*, 2017; Mackel *et al.*, 2020). De forma interessante, foi demonstrado que após o infarto do miocárdio, camundongos *knockout* para ALOX15 tem seus neutrófilos e macrófagos polarizados para os perfis N2 e M2, respectivamente e, desta forma, promovem a resolução da inflamação (Kain *et al.*, 2018).

Frente aos estímulos, observamos que os neutrófilos NonI apresentaram maior expressão de ALOX15 que os neutrófilos NI. Em macrófagos M2, a expressão de ALOX15 dependente da estimulação com IL-4 e IL-13 (Snodgrass and Brüne, 2019). Entretanto, observamos redução da expressão de ALOX15 em neutrófilos NI e semelhança no perfil de expressão em neutrófilos NonP e NonI. Desta forma, pode-se sugerir que a estimulação dos neutrófilos NI com IFN-γ e GM-CSF atenue a expressão desta enzima. Por outro lado, não houve diferençaas mudanças significativas na expressão gênica do receptor CCR7, entre os perfis de neutrófilos, principalmente os neutrófilos NI. Portanto, a expressão gênica deste receptor não é análaga ao que ocorre em macrófagos M1.

Ao analisar o ponto de vista epigenético, diferentes tipos de células exibem padrões distintos de metilação no DNA (Adalsteinsson *et al.*, 2012; Reinius *et al.*, 2012; Jaffe and Irizarry, 2014). Ainda não é bem elucidado como os diversos padrões de metilação no DNA se estabelecem em invivíduos saudáveis, mas há evidências que estes interferem na susceptibilidade a doenças e na resposta a tratamentos medicamentosos (Ivanov *et al.*, 2012;

Mulligan, 2018). Neste contexto, os neutrófilos sofrem a ação de diferentes modificações epigenéticas diante de condições patológicas, e por isto o entendimento dessas variações poderiam ajudar a entender como diferentes fenótipos são mais suceptíveis a determinadas doenças (Tiffon, 2018).

Em nossos experimentos, o perfil NI é o que possui menor percentual de metilação global do DNA total. Possivelmente, a perda de metilação pode ter contribuído para o perfil diferente de ativação desta célula no microambiente inflamatório. Sugerimos também que a demetilação do DNA pode ter contribuído para a maior expressão de gênica de TNF-α, IL-10, TLR2 e TLR4. Contudo, seriam necessários experimentos adicionais para o analisar o percentual de metilação nos *locus* desses genes nos neutrófilos NI.

Em neutrófilos de pacientes com LES, há desmetilação robusta dos genes de interferon do tipo I, característica que já foi encontrada em outras células da imunidade, como as células T, além de ter sido correlacionada à superexpressão de citocinas ligadas a este gene (Absher *et al.*, 2013; Coit *et al.*, 2015)**.** Não apenas as citocinas e receptores, a demetilação do DNA nas células NI pode estar relacionada ao aumento da produção de EROs**.** Além disso, até então não havia sido relatada correlação do padrão de metilação de neutrófilos NI e NonI com a funcionalidade destas células. Portanto, o entendimento do grau de metilação ajudará a elucidar a regulação epigenética em diferentes patologias ou infecções. Como exemplo, analisando a interação entre neutrófilos e patógenos, foi elucidado que o *Anaplasma phagocytophilum* consegue reprogramar a resposta efetora dos neutrófilos, reprimindo muitas funções antimicrobianas enquanto aumenta as funções pró-inflamatórias, induzindo a hipermetilação generalizada do genoma de neutrófilos, o que favorece o crescimento e replicação do patógeno (Sinclair *et al.,* 2015). Semelhantemente, o Mtb consegue modificar a resposta efetora de macrófagos e células NK, ao promover alterações anormais na metilação do receptores TLR2, contribuindo para o grau de patogenicidade da bactéria. Desta forma, reiteramos a importância do entendimento do perfil de metilação global dos neutrófilos pré-expostos a diferentes estímulos (Chen *et al.*, 2014; Behrouzi *et al.*, 2019).

A expressão das enzimas epigenéticas que promovem a metilação direta do DNA como as DNMT1, DNMT3A e DNMT3B também foi alvo do nosso estudo. Na intenção de estudar se os diferentes microambientes alteram o perfil de expressão destas enzimas nos neutrófilos, observamos que a única enzima que apresentou expressão diferencial entre os perfis celulares foi a DNMT3A. A DNMT3A, conhecida enzima como "guardadora do genoma" e que garante a estabilidade do DNA está envolvida negativamente na progressão de neoplasias como a leucemia mielóide aguda (LMA) (Ren *et al.*, 2018). Foi revelado que a DNMT3A possui várias

mutações que induzem alterações sistêmicas e que estão correlacionadas com o mau prognóstico da doença (Chaudry and Chevassut, 2017). Também no mieloma múltiplo foi demonstrando que a enzima HDAC3 regula a expressão de DNMT1 e isto poderia contribuir para a progressão da doença (Harada *et al.*, 2017). Estas evidências indicam que a inibição das DNMTs poderia ser uma estratégia terapêutica no controle destas doenças (Endo *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2019).

Possuindo estrutura e funções semelhantementes à DNMT3A na manutenção da estabilidade do DNA, a geração de poliformorfismos da DNMT3B também aumentam a gravidade de determinadas neoplasisas, como o câncer de próstata (Zelic *et al.*, 2019). Em relação a DNMT1, foi demonstrado que esta enzima é necessária para o desenvolvimento e motilidade das células do trato gastrointestinal, enquanto que a ativação desregulada desta enzima pode levar à formação de lesões pré-cancerosas no intestino (Jorgensen *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019). Olhando para o nosso cenário, os neutrófilos NonI possuem diferencialmente uma maior expressão de DNMT3A quando comparados aos neutrófilos NI. Assim, é possível observar que um microambiente anti-inflamatório pode induzir alterações epigenéticas na célula, que poderiam causar a regulação decrescente de síntese de citocinas e demais respostas efetoras. Por exemplo, a DNMT3A reduz a expressão de IL-10 por macrófagos e células T CD4+ (Hofmann *et al.*, 2012). Curiosamente, na fibrose excessiva que ocorre em pacientes com esclerose sistêmica, o TGF-β induz a maior expressão de DNMT3A e DNMT1 pelos fibroblastos. A DNMT3A, principalmente, poderia contribuir para a metilação genes envolvidos no agravamento do quadro de doenças nos pacientes (Dees *et al.*, 2020). Portanto, mesmo que o grau de metilação dos neutrófilos NonI não seja maior, mas sim semelhante aos neutrófilos NonP, o aumento da atividade desta enzima poderia ser uma das explicações para que os neutrófilos NonI não tenham apresentado diferenças na expressão de genes ligados à resposta inflamatória da célula. Isto abre questões para experimentos futuros, no sentido de avaliar as correlações entre a atividade enzimática e a expressão de genes específicos.

Alterações epigenéticas ativadoras ou repressivas possuem grande correlação com o sistema imune (Van Der Heijden *et al.*, 2018; Barreiro and Quintana-Murci, 2020). Partindo deste ponto, a identificação de modificações de histonas nos neutrófilos em diferentes microantibentes poderia ajudar no entendimento do funcionamento desta célula. Assim, foram feitas análises através da imunopreciptação da cromatina para rastrear a presença ou não destas modificações em genes ligados à resposta imune, visto que ainda são controversos os mecanismos que poderiam induzir a expressão destas citocinas pelos neutrófilos. Além disso, também não há relatos de possíveis marcas de ativação ou repressão nos neutrófilos em

ambientes pró e anti-inflamatório. O que observamos em nossos dados é que após a estimulação em ambos os microambientes pró e anti-inflamatório, os neutrófilos no geral possuem redução das modificações ativadoras e repressivas em suas histonas quando comparados aos neutrófilos não estimulados. Entretanto, nos neutrófilos anti-inflamatórios há a tendência para a permanência da modifcação H3K4me27, que está associada a repressão gênica, e foi observada nos três genes das citocinas analisadas (TNF-α, IL-1β e IL-6). Por outro lado, os neutrófilos pró-inflamatórios mantém, em menor grau, a permanência das modficações ativadoras (H3K4me3 e Pan-acetilação das lisinas K9 + K14 + K18 + K23 + K27) para o gene da citocina IL-6, mas não para os genes de TNF-α e IL-1β, onde para estas duas citocinas é pouco perceptível a presença de marcas ativadoras ou repressivas.

Em um estudo de Zimmermann e colaboradores, é relatado que durante a monopoiese os promotores gênicos de TNF-α e IL-1β possuem um maior grau de acetilação de histonas, quando comparados aos promotores gênicos destas citocinas durante a granulopoise, justificando porquê células mononucleares como macrófagos e monócitos poderiam expressar e produzir em maiores quantidades estas citocinas quando comparadas aos granulócitos (Zimmermann *et al.*, 2015). O que constatamos em nossos resultados é que os neutrófilos maduros da corrente sanguínea possuem modificações ativadoras e repressivas em suas histonas, e estas variam quando as células são expostas a dois microambientes distintos, podendo interferir na expressão das citocinas analisadas. Nossos dados poderiam ajudar a elucidar a maior expressão de TNF-α nos neutrófilos pró-inflamatórios pela falta de modifcações repressivas, mas abrem perguntas para a expressão de IL-6, visto que apesar de possuírem graus distintos de modificaçãos repressivas e ativadoras entre os três tipos de neutrófilos estudados, o nível de expressão do gene desta citocina nas células estudadas não é diferencial. Também nossos dados geram questionamentos em relação à produção de IL-1β pelas células, pois mesmo que os neutrófilos pró-inflamatórios possuam a tendência para manter um maior percentual de modifcações ativadoras quando comparados aos neutrófilos anti-inflmatórios, a produção desta citocina entre estas células não é diferente. Ao contrário da produção de IL-1β e TNF-α, existem controvérsias quanto à capacidade destas células produzirem IL-6. É descrito que os neutrófilos possuem o locus gênico de IL-6 inativo, e que este pode ser ativado quando estimulado com ligantes de TLR8 ou TLR4 (Wessels *et al.*, 2013). Estes ligantes promovem alterações epigenéticas ativadoras como H3K27Ac, H3K4me3 e H4Ac. Além disso, a indução de IL-6 pode ser potencializada nos neutrófilos pelo TNF-α endógeno, induzindo a modificação de histonas nas regiões promotoras de IL-6, principalmente o aumento da modificação H3K4me1, levando a expressão e produção da citocina (Wessels *et*

al., 2013). Em nossos resultados os neutrófilos pró-inflamatórios possuem um pequeno percentual da modificação H3K4me3 para o gene de IL-6, mas esta não está relacionada à maior expressão do mRNA desta citocina, nem mesmo a sua produção em relação aos outros grupos celulares**.** Os dados não mostram, mas analisamos também a produção de IL-6 e TNF-α, porém não detectamos a produção destas citocinas, apenas a expressão gênica.

Uma importante limitação de nosso estudo é que não temos por enquanto dados de alterações epigenéticas em genes de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 por exemplo, e dos demais genes observados neste trabalho. Também, seria importante avaliarmos os fatores de transcrição envolvidos na polarização destas células. Ademais, analisamos apenas três modificações epigenéticas relacionadas a ativação e repressão gênica, sendo possivelmente necessária a avaliação de outras modificações que poderiam estar ligadas a regulação da expressão dos genes estudados.

Desta forma, devido à variação entre as células, não foi possível o estabelecimento definitivo de um padrão entre os perfis analisados e a consequente correlação com os níveis de produção e expressão dessas citocinas pelos neutrófilos. Porém, estes dados podem ser o princípio da caracterização da polarização dos neutrófilos humanos através de modificações epigenéticas. Assim, mais estudos seriam necessários para avaliar outros alvos relacionados às modificações de histonas, diferentes das que analisamos, nestes genes ligados à resposta imune, contribuindo para futuros delineamentos experimentais e perspectivas de projetos.

7. Resumo dos Resultados e Conclusão

Concluímos que os neutrófilos podem ser polarizados na presença de meios condicionantes *in vitro* para os perfis pró e anti-inflamatório, o que é visualizado por modificações morfológicas e funcionais.

Mostramos que após 2 horas de polarização, os neutrófilos NI aumentaram de tamanho, expressam maiores quantidades de MHC II, CD86 e mRNA de TLR2 e TLR4, produziram mais espécies reativas de oxigênio e IL-8. Além disto, os neutrófilos NI expressaram, significantemente, mais TNF-α e IL-10, quando comparados aos outros perfis celulares. Em contraste, os neutrófilos NonI apresentaram menor tamanho, expressão de marcadores de superfície de ativação e maturação celular, não produziram EROs. Particularmente, os neutrófilos NI tiveram redução na expressão gênica de ALOX15 quando comparados aos neutrófilos NonP e NonI.

Os neutrófilos do perfil NI apresentaram perda de metilação global do DNA, quando comparado aos neutrófilos NonP e NonI. Além disso, os neutrófilos NonI tiveram maior expressão de DNMT3A quando comparados aos neutrófilos NonP e NI. Em relação as alterações de histonas, os neutrófilos NI tiveram diminuição das modificações ativadoras e reprevissas nos promotores gênicos de TNF-α, IL-1β e IL-6 quando comparados aos neutrófilos NonP e NonI. Por outro lado, os neutrófilos NonI mantiveram a presença da modificação repressiva H3K27me3 para os promotores genicos de TNF-α e IL-6 quando comparados aos neutrófilos NonP.

Assim, concluímos que diferentes microambientes, pró e anti-inflamatórios, induzem perfis distintos de neutrófilos e estes demonstraram modificações morfológicas, funcionais e epigenéticas distintas.

8. Referências Bibliográficas

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

ABI ABDALLAH, D. S. et al. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. **Int Immunol,** v. 23, n. 5, p. 317-26, May 2011. ISSN 1460-2377. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422151 >.

ABSHER, D. M. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. **PLoS Genet,** v. 9, n. 8, p. e1003678, 2013. ISSN 1553-7404. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950730 >.

ACCOMANDO, W. P. et al. Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation. **Genome Biol,** v. 15, n. 3, p. R50, Mar 2014. ISSN 1474-760X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598480 >.

ACORCI-VALÉRIO, M. J. et al. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against Paracoccidioides brasiliensis. **Scand J Immunol,** v. 71, n. 2, p. 99-108, Feb 2010. ISSN 1365-3083. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384861 >.

ADALSTEINSSON, B. T. et al. Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. **PLoS One,** v. 7, n. 10, p. e46705, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071618 >.

AKIMZHANOV, A. M.; YANG, X. O.; DONG, C. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. **J Biol Chem,** v. 282, n. 9, p. 5969-72, Mar 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218320 >.

AKSOY, M. O. et al. CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,** v. 290, n. 5, p. L909-18, May 2006. ISSN 1040-0605. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339779 >.

ALLAN, R. S. et al. An epigenetic silencing pathway controlling T helper 2 cell lineage commitment. **Nature,** v. 487, n. 7406, p. 249-53, Jul 2012. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763435 >.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol,** v. 30, p. 459-89, 2012. ISSN 1545-3278. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224774 >.

ANSEL, K. M. et al. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. **Annu Rev Immunol,** v. 24, p. 607-56, 2006. ISSN 0732-0582. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551261 >.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Arch Biochem Biophys,** v. 640, p. 47-52, Feb 15 2018. ISSN 0003-9861. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004 >.

ARCHAMBAULT, A. S. et al. Comparison of eight 15-lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils. **PLoS One,** v. 13, n. 8, p. e0202424, 2018. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30118527 >.

AROKIASAMY, S. et al. Endogenous TNFα orchestrates the trafficking of neutrophils into and within lymphatic vessels during acute inflammation. **Sci Rep,** v. 7, p. 44189, 03 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28287124 >.

ARONOWSKI, J.; ROY-O'REILLY, M. A. Neutrophils, the Felons of the Brain. **Stroke,** v. 50, n. 3, p. e42-e43, 03 2019. ISSN 1524-4628. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30674235 >.

ARRUDA-SILVA, F. et al. Human Neutrophils Produce CCL23 in Response to Various TLR-Agonists and TNFα. **Front Cell Infect Microbiol,** v. 7, p. 176, 2017. ISSN 2235-2988. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28553619 >.

BALCE, D. R. et al. Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the proteolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms. **Blood,** v. 118, n. 15, p. 4199-208, Oct 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846901 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321607 >.

BARREIRO, L. B.; QUINTANA-MURCI, L. Evolutionary and population (epi)genetics of immunity to infection. **Hum Genet**, Apr 2020. ISSN 1432-1203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32285198 >.

BARRERA-VARGAS, A. et al. Differential ubiquitination in NETs regulates macrophage responses in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis,** v. 77, n. 6, p. 944-950, Jun 2018. ISSN 0003-4967. Available at: < http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212617 >.

BAZZONI, F. et al. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. **Eur J Immunol,** v. 40, n. 9, p. 2360-8, Sep 2010. ISSN 1521-4141. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549669 >.

BEAUVILLAIN, C. et al. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. **Blood,** v. 117, n. 4, p. 1196-204, Jan 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051556 >.

BEHROUZI, A. et al. Aberrant methylation of host macrophages induced by tuberculosis infection. **World J Microbiol Biotechnol,** v. 35, n. 11, p. 168, Oct 2019. ISSN 1573-0972. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31654206 >.

BERNSTEIN, B. E. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. **Cell,** v. 125, n. 2, p. 315-26, Apr 2006. ISSN 0092-8674. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630819 >.

BERNSTEIN, E.; ALLIS, C. D. RNA meets chromatin. **Genes Dev,** v. 19, n. 14, p. 1635-55, Jul 2005. ISSN 0890-9369. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024654 >.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature,** v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 2006. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648838 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15898057 >.

BJORNSDOTTIR, H. et al. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med,** v. 89, p. 1024-35, Dec 2015. ISSN 0891-5849. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398 >.

BODE, K. A. et al. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. **Immunology,** v. 122, n. 4, p. 596-606, Dec 2007. ISSN 1365-2567. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635610 >.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol,** v. 12, n. 1, p. 64-76, Feb 2000. ISSN 0952-7915. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679404 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989490 >.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity,** v. 33, n. 5, p. 657-70, Nov 2010. ISSN 1097-4180. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004419 >.

BRANDAU, S. et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. **J Leukoc Biol,** v. 89, n. 2, p. 311-7, Feb 2011. ISSN 0741-5400. Available at: < http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0310162 >.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat Immunol,** v. 15, n. 11, p. 1017-25, Nov 2014. ISSN 1529-2916. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217981 >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science,** v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782 >.

CAO, R. et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. **Science,** v. 298, n. 5595, p. 1039-43, Nov 2002. ISSN 1095-9203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351676 >.

CARDOSO-SILVA, P. M. **Plasticidade de neutrófilos durante a infecção por Mycobacterium tuberculosis está relacionada a progressão da doença humana**. 2017. 99 f (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

CARESTIA, A. et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. **J Leukoc Biol,** v. 99, n. 1, p. 153-62, Jan 2016. ISSN 1938-3673. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320263 >.

CARLUCCI, P. M. et al. Neutrophil subsets and their gene signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus. **JCI Insight,** v. 3, n. 8, Apr 19 2018. ISSN 2379-3708. Available at: < http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.99276 >.

CARMONA-RIVERA, C. et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. **Sci Immunol,** v. 2, n. 10, Apr 2017. ISSN 2470-9468. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649674 >.

CARMONA-RIVERA, C.; KAPLAN, M. J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. **Semin Immunopathol,** v. 35, n. 4, p. 455-63, Jul 2013. ISSN 1863-2300. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553215 >.

CARTWRIGHT, T. N. et al. HDAC1 interacts with the p50 NF-?B subunit via its nuclear localization sequence to constrain inflammatory gene expression. **Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech,** v. 1861, n. 10, p. 962-970, Oct 2018. ISSN 1876-4320. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30496041 >.

CASO, J. R. et al. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. **Circulation,** v. 115, n. 12, p. 1599-608, Mar 2007. ISSN 1524-4539. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372179 >.

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol,** v. 73, p. 369-509, 1999. ISSN 0065-2776. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399011 >.

CHAKRAVARTI, A. et al. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. **Lab Invest,** v. 89, n. 10, p. 1084-99, Oct 2009. ISSN 1530-0307. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19636293 >.

CHALLEN, G. A. et al. Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell,** v. 15, n. 3, p. 350-364, Sep 2014. ISSN 1875-9777. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130491 >.

CHATFIELD, S. M.; THIEBLEMONT, N.; WITKO-SARSAT, V. Expanding Neutrophil Horizons: New Concepts in Inflammation. **J Innate Immun,** v. 10, n. 5-6, p. 422-431, 2018. ISSN 1662-811x. Available at: < http://dx.doi.org/10.1159/000493101 >.

CHATTERJEE, A. et al. Genome-wide DNA methylation map of human neutrophils reveals widespread inter-individual epigenetic variation. **Sci Rep,** v. 5, p. 17328, Nov 2015. ISSN 2045-2322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612583 >.

CHAUDRY, S. F.; CHEVASSUT, T. J. Epigenetic Guardian: A Review of the DNA Methyltransferase DNMT3A in Acute Myeloid Leukaemia and Clonal Haematopoiesis. **Biomed Res Int,** v. 2017, p. 5473197, 2017. ISSN 2314-6141. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28286768 >.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nat Rev Immunol,** v. 13, n. 4, p. 227-42, Apr 2013. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470321 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802645 >.

CHEN, Y. C. et al. Aberrant Toll-like receptor 2 promoter methylation in blood cells from patients with pulmonary tuberculosis. **J Infect,** v. 69, n. 6, p. 546-57, Dec 2014. ISSN 1532-2742. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218055 >.

CHU, H. W. et al. Peripheral blood and airway tissue expression of transforming growth factor beta by neutrophils in asthmatic subjects and normal control subjects. **J Allergy Clin Immunol,** v. 106, n. 6, p. 1115-23, Dec 2000. ISSN 0091-6749. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11112895 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25030429 >.

CIOFANI, M. et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. **Cell,** v. 151, n. 2, p. 289-303, Oct 2012. ISSN 1097-4172. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021777 >.

CLOUTIER, A. et al. Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. **J Immunol,** v. 182, n. 1, p. 563-71, Jan 2009. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109189 >.

COFFELT, S. B.; WELLENSTEIN, M. D.; DE VISSER, K. E. Neutrophils in cancer: neutral no more. **Nat Rev Cancer,** v. 16, n. 7, p. 431-46, 07 2016. ISSN 1474-1768. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282249 >.

COIT, P. et al. Epigenome profiling reveals significant DNA demethylation of interferon signature genes in lupus neutrophils. **J Autoimmun,** v. 58, p. 59-66, Apr 2015. ISSN 1095-9157. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25638528 >.

CONSORTIUM, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature,** v. 489, n. 7414, p. 57-74, Sep 2012. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955616 >.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol,** v. 10, n. 7, p. 479-89, Jul 2010. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559326 >.

CUARTERO, M. I. et al. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPARγ agonist rosiglitazone. **Stroke,** v. 44, n. 12, p. 3498-508, Dec 2013. ISSN 1524-4628. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135932 >.

DANG, P. M. et al. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. **FASEB J,** v. 20, n. 9, p. 1504-6, Jul 2006. ISSN 1530-6860. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720733 >.

_____. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. **J Clin Invest,** v. 116, n. 7, p. 2033-43, Jul 2006. ISSN 0021-9738. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778989 >.

DAVEY, M. S. et al. Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. **Nat Immunol,** v. 12, n. 11, p. 1017-8; author reply 1018-20, Oct 2011. ISSN 1529-2916. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012430 >.

DE LEEUW, E.; LU, W. Human defensins: turning defense into offense? **Infect Disord Drug Targets,** v. 7, n. 1, p. 67-70, Mar 2007. ISSN 1871-5265. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346213 >.

DE SANTO, C. et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. **Nat Immunol,** v. 11, n. 11, p. 1039-46, Nov 2010. ISSN 1529-2916. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890286 >.

DEES, C. et al. TGFβ-induced epigenetic deregulation of SOCS3 facilitates STAT3-signaling to promote fibrosis. **J Clin Invest**, Jan 2020. ISSN 1558-8238. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31990678 >.

DENISET, J. F.; KUBES, P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? **J Leukoc Biol,** v. 103, n. 5, p. 829-838, 05 2018. ISSN 1938-3673. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29462505 >.

DENNY, M. F. et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. **J Immunol,** v. 184, n. 6, p. 3284-97, Mar 2010. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164424 >.

DJURETIC, I. M. et al. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. **Nat Immunol,** v. 8, n. 2, p. 145-53, Feb 2007. ISSN 1529-2908. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195845 >.

DOUDA, D. N. et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 112, n. 9, p. 2817-22, Mar 2015. ISSN 1091-6490. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25730848 >.

DUFOUR, J. H. et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **J Immunol,** v. 168, n. 7, p. 3195-204, Apr 2002. ISSN 0022-1767. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907072 >.

DUPRE-CROCHET, S.; ERARD, M.; NUBETAE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **J Leukoc Biol,** v. 94, n. 4, p. 657-70, Oct 2013. ISSN 0741-5400. Available at: < http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1012544 >.

EISSENBERG, J. C.; SHILATIFARD, A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. **Dev Biol,** v. 339, n. 2, p. 240-9, Mar 2010. ISSN 1095-564X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703438 >.

EL KEBIR, D.; FILEP, J. G. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β2 Integrins. **Front Immunol,** v. 4, p. 60, 2013. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508943 >.

EL-BENNA, J. et al. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunol Rev,** v. 273, n. 1, p. 180-93, 09 2016. ISSN 1600-065X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558335 >.

ELLISON, M. A. et al. IFN-γ alters the expression of diverse immunity related genes in a cell culture model designed to represent maturing neutrophils. **PLoS One,** v. 12, n. 10, p. e0185956, 2017. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28982143 >.

ENDO, S. et al. Immunomodulatory drugs act as inhibitors of DNA methyltransferases and induce PU.1 up-regulation in myeloma cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 469, n. 2, p. 236-42, Jan 2016. ISSN 1090-2104. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657848 >.

ERUSLANOV, E. B. Phenotype and function of tumor-associated neutrophils and their subsets in early-stage human lung cancer. **Cancer Immunol Immunother,** v. 66, n. 8, p. 997-1006, Aug 2017. ISSN 1432-0851. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283697 >.

ERUSLANOV, E. B. et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. **J Clin Invest,** v. 124, n. 12, p. 5466-80, Dec 2014. ISSN 1558-8238. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384214 >.

FAN, H. et al. Overexpression of DNA methyltransferase 1 and its biological significance in primary hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol,** v. 15, n. 16, p. 2020-6, Apr 2009. ISSN 2219-2840. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19399937 >.

FILIPPI, M. D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. **Blood,** v. 133, n. 20, p. 2149-2158, 05 2019. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30898863 >.

FRIDLENDER, Z. G.; ALBELDA, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? **Carcinogenesis,** v. 33, n. 5, p. 949-55, May 2012. ISSN 1460-2180. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425643 >.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell,** v. 16, n. 3, p. 183-94, Sep 2009. ISSN 1878-3686. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732719 >.

FU, L. M. The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy. **Int J Tuberc Lung Dis,** v. 7, n. 11, p. 1027-32, Nov 2003. ISSN 1027-3719. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14598960 >.

FULLERTON, J. N.; O'BRIEN, A. J.; GILROY, D. W. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. **J Pathol,** v. 231, n. 1, p. 8-20, Sep 2013. ISSN 1096-9896. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794437 >.

GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Immunol Res,** v. 5, n. 1, p. 3-8, Jan 2017. ISSN 2326-6066 (Print)2326-6074 (Electronic). Available at: < http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0297 >.

GALDIERO, M. R. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. **J Cell Physiol,** v. 228, n. 7, p. 1404-12, Jul 2013. ISSN 1097-4652. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065796 >.

GARCÍA-CULEBRAS, A. et al. Role of TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 Neutrophil Programming After Stroke. **Stroke,** v. 50, n. 10, p. 2922-2932, Oct 2019. ISSN 1524-4628. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31451099 >.

GARLEY, M.; JABLONSKA, E. Heterogeneity Among Neutrophils. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz),** v. 66, n. 1, p. 21-30, Feb 2018. ISSN 0004-069x. Available at: < http://dx.doi.org/10.1007/s00005-017-0476-4 >.

GARRETT, S. et al. Polarization of primary human monocytes by IFN-gamma induces chromatin changes and recruits RNA Pol II to the TNF-alpha promoter. **J Immunol,** v. 180, n.

8, p. 5257-66, Apr 2008. ISSN 0022-1767. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390706 >.

GHESQUIÈRE, B. et al. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. **Nature,** v. 511, n. 7508, p. 167-76, Jul 2014. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25008522 >.

GHISLETTI, S. et al. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. **Immunity,** v. 32, n. 3, p. 317-28, Mar 2010. ISSN 1097-4180. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206554 >.

GIESE, M. A.; HIND, L. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. **Blood,** v. 133, n. 20, p. 2159-2167, 05 2019. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30898857 >.

GIRARD, D.; PAQUIN, R.; BEAULIEU, A. D. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. **Biochem J,** v. 325 (Pt 1), p. 147-53, Jul 1997. ISSN 0264-6021. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224640 >.

GIRARD, D. et al. Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. **J Leukoc Biol,** v. 59, n. 3, p. 412-9, Mar 1996. ISSN 0741-5400. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604021 >.

GLOWACKA, E. et al. IL-8, IL-12 and IL-10 cytokines generation by neutrophils, fibroblasts and neutrophils- fibroblasts interaction in psoriasis. **Adv Med Sci,** v. 55, n. 2, p. 254-60, 2010. ISSN 1898-4002. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20934961 >.

GOSSELIN, E. J. et al. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. **J Immunol,** v. 151, n. 3, p. 1482-90, Aug 1993. ISSN 0022-1767. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335942 >.

GRIGAT, J. et al. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. **J Immunol,** v. 179, n. 6, p. 3958-65, Sep 2007. ISSN 0022-1767. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785833 >.

HALWANI, R. et al. Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma. **J Asthma,** v. 54, n. 9, p. 893-904, Nov 2017. ISSN 1532-4303. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28635548 >.

HAMAM, H. J.; KHAN, M. A.; PALANIYAR, N. Histone Acetylation Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Biomolecules,** v. 9, n. 1, 01 2019. ISSN 2218-273X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30669408 >.

HARADA, T. et al. HDAC3 regulates DNMT1 expression in multiple myeloma: therapeutic implications. **Leukemia,** v. 31, n. 12, p. 2670-2677, 12 2017. ISSN 1476-5551. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490812 >.

HARWIG, S. S.; GANZ, T.; LEHRER, R. I. Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing. **Methods Enzymol,** v. 236, p. 160-72, 1994. ISSN 0076-6879. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968608 >.

HE, C. et al. [Identification of differentially expressed genes and pathways changing in neutrophils of patients with sepsis by bioinformatics analysis]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi,** v. 35, n. 6, p. 481-490, Jun 2019. ISSN 1007-8738. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31292051 >.

HEINZ, S. et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. **Mol Cell,** v. 38, n. 4, p. 576-89, May 2010. ISSN 1097-4164. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513432 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774669 >.

HOFMANN, S. R. et al. Dynamic CpG-DNA methylation of Il10 and Il19 in CD4+ T lymphocytes and macrophages: effects on tissue-specific gene expression. **Klin Padiatr,** v. 224, n. 2, p. 53-60, Mar 2012. ISSN 1439-3824. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187331 >.

HOOK, J. S. et al. Lipoarabinomannan Activates Human Neutrophils via a TLR2/1 Mechanism Distinct from Pam. **J Immunol,** v. 204, n. 3, p. 671-681, Feb 2020. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31871022 >.

HU, S. et al. IL-17 Production of Neutrophils Enhances Antibacteria Ability but Promotes Arthritis Development During Mycobacterium tuberculosis Infection. **EBioMedicine,** v. 23, p. 88-99, Sep 2017. ISSN 2352-3964. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28821374 >.

HWANG, E. S. et al. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. **Science,** v. 307, n. 5708, p. 430-3, Jan 2005. ISSN 1095-9203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15662016 >.

IP, W. K. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science,** v. 356, n. 6337, p. 513-519, 05 2017. ISSN 1095-9203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473584 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567879 >.

IVANOV, M.; KACEVSKA, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Epigenomics and interindividual differences in drug response. **Clin Pharmacol Ther,** v. 92, n. 6, p. 727-36, Dec 2012. ISSN 1532-6535. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093317 >.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nat Rev Immunol,** v. 14, n. 1, p. 36-49, Jan 2014. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362405 >.

JAFFE, A. E.; IRIZARRY, R. A. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. **Genome Biol,** v. 15, n. 2, p. R31, Feb 2014. ISSN 1474-760X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495553 >.

JANN, N. J. et al. TLR2 enhances NADPH oxidase activity and killing of Staphylococcus aureus by PMN. **Immunol Lett,** v. 135, n. 1-2, p. 17-23, Mar 2011. ISSN 1879-0542. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875459 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965604 >.

JIANG, Y. L. et al. DNMT3B mutations and DNA methylation defect define two types of ICF syndrome. **Hum Mutat,** v. 25, n. 1, p. 56-63, Jan 2005. ISSN 1098-1004. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580563 >.

JORGENSEN, B. G. et al. DNA methylation, through DNMT1, has an essential role in the development of gastrointestinal smooth muscle cells and disease. **Cell Death Dis,** v. 9, n. 5, p. 474, 05 2018. ISSN 2041-4889. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29700293 >.

JUNTTILA, I. S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. **Front Immunol,** v. 9, p. 888, 2018. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29930549 >.

KAIN, V. et al. Genetic deletion of 12/15 lipoxygenase promotes effective resolution of inflammation following myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol,** v. 118, p. 70-80, 05 2018. ISSN 1095-8584. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29526491 >.

KAMBAYASHI, T.; LAUFER, T. M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? **Nat Rev Immunol,** v. 14, n. 11, p. 719-30, Nov 2014. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324123 >.

KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 53, p. 531-56, 2013. ISSN 1545-4304. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23140243 >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity,** v. 34, n. 5, p. 637-50, May 2011. ISSN 1097-4180. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21616434 >.

KHAN, M. A.; PALANIYAR, N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. **Sci Rep,** v. 7, p. 41749, 02 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28176807 >.

KIENLE, K.; LAMMERMANN, T. Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. **Immunol Rev,** v. 273, n. 1, p. 76-93, Sep 2016. ISSN 0105-2896. Available at: < http://dx.doi.org/10.1111/imr.12458 >.

KIM, N. D.; LUSTER, A. D. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. **Trends Immunol,** v. 36, n. 9, p. 547-55, Sep 2015. ISSN 1471-4906. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.07.007 >.

KIMURA, M. et al. Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene. **Immunity,** v. 15, n. 2, p. 275-87, Aug 2001. ISSN 1074-7613. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520462 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205083 >.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci,** v. 31, n. 2, p. 89-97, Feb 2006. ISSN 0968-0004. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403636 >.

KLUG, M. et al. Active DNA demethylation in human postmitotic cells correlates with activating histone modifications, but not transcription levels. **Genome Biol,** v. 11, n. 6, p. R63, 2010. ISSN 1474-760X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565882 >.

KO, M. et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108, n. 35, p. 14566-71, Aug 2011. ISSN 1091-6490. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873190 >.

_____. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. **Nature,** v. 468, n. 7325, p. 839-43, Dec 2010. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057493 >.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol,** v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013. ISSN 1474-1733. Available at: < http://dx.doi.org/10.1038/nri3399 >.

KUNO, Y. et al. Possible involvement of neutrophil elastase in impaired mucosal repair in patients with ulcerative colitis. **J Gastroenterol,** v. 37 Suppl 14, p. 22-32, Nov 2002. ISSN 0944-1174. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12572862 >.

KURT-JONES, E. A. et al. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. **Blood,** v. 100, n. 5, p. 1860-8, Sep 2002. ISSN 0006-4971. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176910 >.

LA MANNA, M. P. et al. Drives Expansion of Low-Density Neutrophils Equipped With Regulatory Activities. **Front Immunol,** v. 10, p. 2761, 2019. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31849955 >.

LAMMERMANN, T. In the eye of the neutrophil swarm-navigation signals that bring neutrophils together in inflamed and infected tissues. **J Leukoc Biol,** v. 100, n. 1, p. 55-63, Jul 2016. ISSN 0741-5400. Available at: < http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1MR0915-403 >.

LANG, S. et al. Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. **Clin Cancer Res,** v. 24, n. 19, p. 4834-4844, Oct 1 2018. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Available at: < http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-3726 >.

LAWSON, C. D. et al. P-Rex1 and Vav1 cooperate in the regulation of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-dependent neutrophil responses. **J Immunol,** v. 186, n. 3, p. 1467-76, Feb 2011. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178006 >.

LEVY, B. D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat Immunol,** v. 2, n. 7, p. 612-9, Jul 2001. ISSN 1529-2908. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429545 >.

LEY, K. et al. Neutrophils: New insights and open questions. **Sci Immunol,** v. 3, n. 30, Dec 7 2018. ISSN 2470-9468. Available at: < http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579 >.

_____. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 9, p. 678-89, Sep 2007. ISSN 1474-1733. Available at: < http://dx.doi.org/10.1038/nri2156 >.

LI, J. P. et al. Interleukin-27 as a negative regulator of human neutrophil function. **Scand J Immunol,** v. 72, n. 4, p. 284-92, Oct 2010. ISSN 1365-3083. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883313 >.

LI, P. et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **J Exp Med,** v. 207, n. 9, p. 1853-62, Aug 2010. ISSN 1540-9538. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20733033 >.

LI, T. J. et al. Interleukin-17-Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer. **Clin Cancer Res,** v. 23, n. 6, p. 1575-1585, Mar 2017. ISSN 1078-0432. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620275 >.

LIN, A.; LORÉ, K. Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. **Front Immunol,** v. 8, p. 1781, 2017. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29321780 >.

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

LOOD, C. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. **Nat Med,** v. 22, n. 2, p. 146-53, Feb 2016. ISSN 1546-170X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779811 >.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 22, n. 4, p. 189-95, Aug 2011. ISSN 1879-0305. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019906 >.

MA, T. M. et al. Protein expression trends of DNMT1 in gastrointestinal diseases: From benign to precancerous lesions to cancer. **World J Gastrointest Oncol,** v. 11, n. 12, p. 1141-1150, Dec 2019. ISSN 1948-5204. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31908719 >.

MACKEL, J. J. et al. 12/15-Lipoxygenase Deficiency Impairs Neutrophil Granulopoiesis and Lung Proinflammatory Responses to. **J Immunol**, Feb 2020. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32102903 >.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol,** v. 11, n. 8, p. 519-31, Jul 2011. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785456 >.

_____. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol,** v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004. ISSN 1471-4906. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839 >.

MARICATO, J. T. et al. Epigenetic modulations in activated cells early after HIV-1 infection and their possible functional consequences. **PLoS One,** v. 10, n. 4, p. e0119234, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875202 >.

MARINI, O. et al. Mature CD10(+) and immature CD10(-) neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. **Blood,** v. 129, n. 10, p. 1343-1356, Mar 9 2017. ISSN 0006-4971. Available at: < http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-04-713206 >.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep,** v. 6, p. 13, 2014. ISSN 2051-7599. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669294 >.

MCCRACKEN, J. M.; ALLEN, L. A. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. **J Cell Death,** v. 7, p. 15-23, 2014. ISSN 1179-0660. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278783 >.

MERSFELDER, E. L.; PARTHUN, M. R. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. **Nucleic Acids Res,** v. 34, n. 9, p. 2653-62, 2006. ISSN 1362-4962. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714444 >.

MILLS, C. D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. **Front Immunol,** v. 6, p. 212, 2015. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999950 >.

MISHRA, B. B. et al. Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. **Nat Microbiol,** v. 2, p. 17072, May 2017. ISSN 2058-5276. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28504669 >.

MIZUNO, R. et al. The Role of Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci,** v. 20, n. 3, Jan 2019. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30691207 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781841 >.

MORAN-CRUSIO, K. et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. **Cancer Cell,** v. 20, n. 1, p. 11-24, Jul 2011. ISSN 1878-3686. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723200 >.

MOSS, T. J.; WALLRATH, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutat Res,** v. 618, n. 1-2, p. 163-74, May 2007. ISSN 0027-5107. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306846 >.

MOUTINHO, C.; ESTELLER, M. MicroRNAs and Epigenetics. **Adv Cancer Res,** v. 135, p. 189-220, 2017. ISSN 2162-5557. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882223 >.

MULLEN, A. C. et al. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. **Nat Immunol,** v. 3, n. 7, p. 652-8, Jul 2002. ISSN 1529-2908. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055627 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156208 >.

MULLIGAN, C. J. Insights from epigenetic studies on human health and evolution. **Curr Opin Genet Dev,** v. 53, p. 36-42, 12 2018. ISSN 1879-0380. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30015224 >.

MUNTAKA, S. et al. Gamma Interferon and Interleukin-17A Differentially Influence the Response of Human Macrophages and Neutrophils to Pseudomonas aeruginosa Infection. **Infect Immun,** v. 87, n. 2, Feb 2019. ISSN 1098-5522. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30455194 >.

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

NANCY HILDA, J.; DAS, S. Neutrophil CD64, TLR2 and TLR4 expression increases but phagocytic potential decreases during tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb),** v. 111, p. 135-142, 07 2018. ISSN 1873-281X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30029898 >.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nat Rev Immunol,** v. 13, n. 5, p. 349-61, May 2013. ISSN 1474-1733. Available at: < http://dx.doi.org/10.1038/nri3423 >.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nat Immunol,** v. 15, n. 7, p. 602-11, Jul 2014. ISSN 1529-2908. Available at: < http://dx.doi.org/10.1038/ni.2921 >.

NISHIGUCHI, T. et al. Macrophage polarization and MRSA infection in burned mice. **Immunol Cell Biol,** v. 95, n. 2, p. 198-206, 02 2017. ISSN 1440-1711. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596946 >.

NIYONSABA, F.; NAGAOKA, I.; OGAWA, H. Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. **Crit Rev Immunol,** v. 26, n. 6, p. 545-76, 2006. ISSN 1040-8401. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341194 >.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **J Leukoc Biol,** v. 90, n. 2, p. 271-84, Aug 2011. ISSN 1938-3673. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504950 >.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol,** v. 1, n. 4, p. a000034, Oct 2009. ISSN 1943-0264. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066092 >.

OHMS, M.; MÖLLER, S.; LASKAY, T. An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes. **Front Immunol,** v. 11, p. 532, 2020. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32411122 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141 >.

OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; MASSARI, P.; WETZLER, L. M. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. **Front Immunol,** v. 3, p. 79, 2012. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566960 >.

OSTUNI, R. et al. Epigenetic regulation of neutrophil development and function. **Semin Immunol,** v. 28, n. 2, p. 83-93, 04 2016. ISSN 1096-3618. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084194 >.

_____. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. **Cell,** v. 152, n. 1-2, p. 157-71, Jan 2013. ISSN 1097-4172. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23332752 >.

PANNE, D.; MANIATIS, T.; HARRISON, S. C. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. **Cell,** v. 129, n. 6, p. 1111-23, Jun 2007. ISSN 0092-8674. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574024 >.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nat Rev Immunol,** v. 18, n. 2, p. 134-147, 02 2018. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28990587 >.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol,** v. 191, n. 3, p. 677-91, Nov 2010. ISSN 1540-8140. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974816 >.

PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood,** v. 115, n. 2, p. 335-43, Jan 2010. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890092 >.

PETRETTO, A. et al. Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. **PLoS One,** v. 14, n. 7, p. e0218946, 2019. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31283757 >.

PEÑALOZA, H. F. et al. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumoniae. **Immunology,** v. 146, n. 1, p. 100-12, Sep 2015. ISSN 1365-2567. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26032199 >.

PEÑALOZA, H. F.; SALAZAR-ECHEGARAI, F. J.; BUENO, S. M. Interleukin 10 modulation of neutrophil subsets infiltrating lungs during. **Biochem Biophys Rep,** v. 13, p. 12-16, Mar 2018. ISSN 2405-5808. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29226257 >.

PICCARD, H.; MUSCHEL, R. J.; OPDENAKKER, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. **Crit Rev Oncol Hematol,** v. 82, n. 3, p. 296-309, Jun 2012. ISSN 1879-0461. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798756 >.

PILLAY, J. et al. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. **Cell Mol Life Sci,** v. 70, n. 20, p. 3813-27, Oct 2013. ISSN 1420-9071. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423530 >.

POWELL, M. J. et al. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. **J Immunol,** v. 165, n. 1, p. 292-6, Jul 2000. ISSN 0022-1767. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861064 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261112 >.

RAMANATHAN, K. et al. Neutrophil activation signature in juvenile idiopathic arthritis indicates the presence of low-density granulocytes. **Rheumatology (Oxford),** v. 57, n. 3, p. 488-498, Mar 1 2018. ISSN 1462-0324. Available at: < http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kex441 >.

RAMIREZ-CARROZZI, V. R. et al. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. **Cell,** v. 138, n. 1, p. 114-28, Jul 2009. ISSN 1097-4172. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596239 >.

REHAUME, L. M.; HANCOCK, R. E. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function. **Crit Rev Immunol,** v. 28, n. 3, p. 185-200, 2008. ISSN 1040-8401. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19024344 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522676 >.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science,** v. 293, n. 5532, p. 1089-93, Aug 2001. ISSN 0036-8075. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498579 >.

REINIUS, L. E. et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. **PLoS One,** v. 7, n. 7, p. e41361, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848472 >.

REN, W.; GAO, L.; SONG, J. Structural Basis of DNMT1 and DNMT3A-Mediated DNA Methylation. **Genes (Basel),** v. 9, n. 12, Dec 2018. ISSN 2073-4425. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30544982 >.

ROBINSON, J. M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. In: (Ed.). **Histochem Cell Biol**, v.130, 2008. p.281-97. ISBN 0948-6143 (Print)1432-119X (Electronic).

RODRIGUEZ, P. C. et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. **Cancer Res,** v. 69, n. 4, p. 1553-60, Feb 2009. ISSN 1538-7445. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201693 >.

ROGER, T. et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. **Blood,** v. 117, n. 4, p. 1205-17, Jan 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956800 >.

ROH, T. Y. et al. Genome-wide prediction of conserved and nonconserved enhancers by histone acetylation patterns. **Genome Res,** v. 17, n. 1, p. 74-81, Jan 2007. ISSN 1088-9051. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135569 >.

RUDOLF-OLIVEIRA, R. C. M. et al. Determination of normal expression patterns of CD86, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358, and CD361 in peripheral blood and bone marrow cells by flow cytometry. **Immunol Lett,** v. 194, p. 44-55, 02 2018. ISSN 1879-0542. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29274771 >.

RYBICKA, J. M. et al. NADPH oxidase activity controls phagosomal proteolysis in macrophages through modulation of the lumenal redox environment of phagosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 23, p. 10496-501, Jun 2010. ISSN 1091-6490. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498052 >.

RÖNNERBLAD, M. et al. Analysis of the DNA methylome and transcriptome in granulopoiesis reveals timed changes and dynamic enhancer methylation. **Blood,** v. 123, n. 17, p. e79-89, Apr 2014. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671952 >.

SAGIV, J. Y. et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. **Cell Rep,** v. 10, n. 4, p. 562-73, Feb 2015. ISSN 2211-1247. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620698 >.

SAGIV, J. Y.; VOELS, S.; GRANOT, Z. Isolation and Characterization of Low- vs. High-Density Neutrophils in Cancer. **Methods Mol Biol,** v. 1458, p. 179-93, 2016. ISSN 1940-6029. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581022 >.

SANTONI, G. et al. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. In: (Ed.). **J Neuroinflammation**, v.12, 2015. ISBN 1742-2094 (Electronic).

SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics. **FEBS J,** v. 278, n. 10, p. 1598-609, May 2011. ISSN 1742-4658. Available at: < 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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729857 >.

SCAPINI, P. et al. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. **Immunol Rev,** v. 273, n. 1, p. 48-60, Sep 2016. ISSN 0105-2896. Available at: < http://dx.doi.org/10.1111/imr.12448 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661024 >.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv Immunol,** v. 96, p. 41-101, 2007. ISSN 0065-2776. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981204 >.

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

SHAUL, M. E. et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFβ modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. **Oncoimmunology,** v. 5, n. 11, p. e1232221, 2016. ISSN 2162-4011. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999744 >.

SHELL, S. S. et al. DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog,** v. 9, n. 7, p. e1003419, 2013. ISSN 1553-7374. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853579 >.

SILVESTRE-ROIG, C. et al. Neutrophil Diversity in Health and Disease. **Trends Immunol,** v. 40, n. 7, p. 565-583, Jul 2019. ISSN 1471-4981. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31160207 >.

SINCLAIR, S. H.; YEGNASUBRAMANIAN, S.; DUMLER, J. S. Global DNA methylation changes and differential gene expression in Anaplasma phagocytophilum-infected human neutrophils. **Clin Epigenetics,** v. 7, p. 77, 2015. ISSN 1868-7075. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225157 >.

SIONOV, R. V.; FRIDLENDER, Z. G.; GRANOT, Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenviron,** v. 8, n. 3, p. 125-58, Dec 2015. ISSN 1875-2292. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895166 >.

SMITH, C. K.; KAPLAN, M. J. The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Curr Opin Rheumatol,** v. 27, n. 5, p. 448-53, Sep 2015. ISSN 1531-6963. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125102 >.

SNODGRASS, R. G.; BRÜNE, B. Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages. **Front Pharmacol,** v. 10, p. 719, 2019. ISSN 1663-9812. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31333453 >.

SNOWDEN, A. W. et al. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. **Curr Biol,** v. 12, n. 24, p. 2159-66, Dec 2002. ISSN 0960-9822. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498693 >.

SOLLBERGER, G.; TILLEY, D. O.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. **Dev Cell,** v. 44, n. 5, p. 542-553, 03 2018. ISSN 1878-1551. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29533770 >.

STOJANOVIC, B. et al. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. **Eur J Immunol,** v. 49, n. 6, p. 940-946, Jun 2019. ISSN 1521-4141. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30892686 >.

STURGE, C. R. et al. TLR-independent neutrophil-derived IFN-γ is important for host resistance to intracellular pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 110, n. 26, p. 10711-6, Jun 2013. ISSN 1091-6490. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23754402 >.

SUGA, H. et al. TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF-β and CCL5 expression. **J Dermatol Sci,** v. 73, n. 2, p. 117-24, Feb 2014. ISSN 1873-569X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252748 >.

SWAIN, P.; ROMERO, N.; DRANKA, B. P. Modulation of oxidative burst with exposure to cytokines in neutrophil cell activation. **The Journal of Immunology,** v. 200, n. 1 Supplement, p. 49.26--49.26, 2018. ISSN 0022-1767. Available at: < http://www.jimmunol.org/content/200/1_Supplement/49.26 >.

SÖDERBERG, D.; SEGELMARK, M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. **Front Immunol,** v. 7, p. 256, 2016. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27446086 >.

TAK, T. et al. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. **J Leukoc Biol,** v. 94, n. 4, p. 595-601, Oct 2013. ISSN 1938-3673. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625199 >.

TAKASHIMA, A.; YAO, Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. **J Leukoc Biol,** v. 98, n. 4, p. 489-96, Oct 2015. ISSN 1938-3673. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632045 >.

TAMASSIA, N. et al. A Reappraisal on the Potential Ability of Human Neutrophils to Express and Produce IL-17 Family Members. **Front Immunol,** v. 9, p. 795, 2018. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29719541 >.

_____. IFN-β expression is directly activated in human neutrophils transfected with plasmid DNA and is further increased via TLR-4-mediated signaling. **J Immunol,** v. 189, n. 3, p. 1500-9, Aug 2012. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730532 >.

_____. Molecular mechanisms underlying the synergistic induction of CXCL10 by LPS and IFN-gamma in human neutrophils. **Eur J Immunol,** v. 37, n. 9, p. 2627-34, Sep 2007. ISSN 0014-2980. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668902 >.

TAMASSIA, N.; CASSATELLA, M. A. Cytoplasmic receptors recognizing nucleic acids and mediating immune functions in neutrophils. **Curr Opin Pharmacol,** v. 13, n. 4, p. 547-54, Aug 2013. ISSN 1471-4973. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725881 >.

TAMASSIA, N.; CASSATELLA, M. A.; BAZZONI, F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. **Methods Mol Biol,** v. 1124, p. 451-67, 2014. ISSN 1940-6029. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504968 >.

TAMASSIA, N. et al. Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. **J Immunol,** v. 181, n. 9, p. 6563-73, Nov 2008. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941247 >.

TAYLOR, P. R. et al. Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, RORγt and dectin-2. **Nat Immunol,** v. 15, n. 2, p. 143-51, Feb 2014. ISSN 1529-2916. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362892 >.

_____. JAK/STAT regulation of Aspergillus fumigatus corneal infections and IL-6/23-stimulated neutrophil, IL-17, elastase, and MMP9 activity. **J Leukoc Biol,** v. 100, n. 1, p. 213-22, 07 2016. ISSN 1938-3673. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27034404 >.

TECCHIO, C. et al. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. **Semin Cancer Biol,** v. 23, n. 3, p. 159-70, Jun 2013. ISSN 1096-3650. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410636 >.

TEFFERI, A.; LIM, K. H.; LEVINE, R. Mutation in TET2 in myeloid cancers. **N Engl J Med,** v. 361, n. 11, p. 1117; author reply 1117-8, Sep 2009. ISSN 1533-4406. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741235 >.

THOMAS, H. B. et al. Whose Gene Is It Anyway? The Effect of Preparation Purity on Neutrophil Transcriptome Studies. **PLoS One,** v. 10, n. 9, p. e0138982, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401909 >.

THURMAN, R. E. et al. The accessible chromatin landscape of the human genome. **Nature,** v. 489, n. 7414, p. 75-82, Sep 2012. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955617 >.

TIAN, Y.; MENG, L.; ZHANG, Y. Epigenetic Regulation of Dendritic Cell Development and Function. **Cancer J,** v. 23, n. 5, p. 302-307, 2017 Sep/Oct 2017. ISSN 1540-336X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28926431 >.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **Int J Mol Sci,** v. 19, n. 11, Nov 2018. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388784 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28148257 >.

TROWBRIDGE, J. J. et al. DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Stem Cell,** v. 5, n. 4, p. 442-9, Oct 2009. ISSN 1875-9777. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796624 >.

UMEKITA, K. et al. Neutrophil-derived lactoferrin induces the inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 4. **Clin Exp Rheumatol,** v. 37, n. 5, p. 834-841, 2019 Sep-Oct 2019. ISSN 0392-856X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30767875 >.

USUI, T. et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. **J Exp Med,** v. 203, n. 3, p. 755-66, Mar 2006. ISSN 0022-1007. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520391 >.

VAHEDI, G. et al. STATs shape the active enhancer landscape of T cell populations. **Cell,** v. 151, n. 5, p. 981-93, Nov 2012. ISSN 1097-4172. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178119 >.

VAN BRUGGEN, R. et al. Toll-like receptor responses in IRAK-4-deficient neutrophils. **J Innate Immun,** v. 2, n. 3, p. 280-7, 2010. ISSN 1662-8128. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375545 >.

VAN DER HEIJDEN, C. D. C. C. et al. Epigenetics and Trained Immunity. **Antioxid Redox Signal,** v. 29, n. 11, p. 1023-1040, 10 2018. ISSN 1557-7716. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978221 >.

VILLANUEVA, E. et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. **J Immunol,** v. 187, n. 1, p. 538-52, Jul 2011. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613614 >.

VONO, M. et al. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4. **Blood,** v. 129, n. 14, p. 1991-2001, 04 2017. ISSN 1528-0020. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143882 >.

WADA, T. et al. Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. **J Biol Chem,** v. 284, n. 44, p. 30673-83, Oct 2009. ISSN 1083-351X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736310 >.

WANG, D.; PAZ-PRIEL, I.; FRIEDMAN, A. D. NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production. **J Immunol,** v. 182, n. 9, p. 5757-62, May 2009. ISSN 1550-6606. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380823 >.

WANG, J.; QIU, Z.; WU, Y. Ubiquitin Regulation: The Histone Modifying Enzyme's Story. **Cells,** v. 7, n. 9, Aug 2018. ISSN 2073-4409. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150556 >.

WANG, X. et al. MLL1, a H3K4 methyltransferase, regulates the TNFα-stimulated activation of genes downstream of NF-κB. **J Cell Sci,** v. 125, n. Pt 17, p. 4058-66, Sep 2012. ISSN 1477-9137. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623725 >.

WANG, Y. et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes trigger neutrophil recruitment via high-mobility group protein 1 (HMGB1)-toll-like receptors(TLR2)/TLR4 signalling. **Br J Pharmacol,** v. 176, n. 17, p. 3350-3363, Sep 2019. ISSN 1476-5381. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31206609 >.

_____. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **J Cell Biol,** v. 184, n. 2, p. 205-13, Jan 2009. ISSN 1540-8140. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153223 >.

WANG, Z. et al. 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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552846 >.

WARNATSCH, A. et al. Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. **Immunity,** v. 46, n. 3, p. 421-432, 03 2017. ISSN 1097-4180. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28314592 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144320 >.

WEI, L. et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **J Biol Chem,** v. 282, n. 48, p. 34605-10, Nov 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884812 >.

_____. Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. **Immunity,** v. 32, n. 6, p. 840-51, Jun 2010. ISSN 1097-4180. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620946 >.

WEN, H. et al. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. **Blood,** v. 111, n. 4, p. 1797-804, Feb 2008. ISSN 0006-4971. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055863 >.

WESSELS, I. et al. Activation of IL-1β and TNFα genes is mediated by the establishment of permissive chromatin structures during monopoiesis. **Immunobiology,** v. 218, n. 6, p. 860-8, Jun 2013. ISSN 1878-3279. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195574 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151746 >.

WOLACH, B. et al. Chronic granulomatous disease: Clinical, functional, molecular, and genetic studies. The Israeli experience with 84 patients. **Am J Hematol,** v. 92, n. 1, p. 28-36, Jan 2017. ISSN 0361-8609. Available at: < http://dx.doi.org/10.1002/ajh.24573 >.

WONG, K. K.; LAWRIE, C. H.; GREEN, T. M. Oncogenic Roles and Inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in Acute Myeloid Leukaemia. **Biomark Insights,** v. 14, p. 1177271919846454, 2019. ISSN 1177-2719. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31105426 >.

WU, H. et al. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. **Sci Transl Med,** v. 8, n. 331, p. 331ra40, Mar 23 2016. ISSN 1946-6234. Available at: < http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aae0482 >.

YAMASHITA, M. et al. Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. **Immunity,** v. 24, n. 5, p. 611-22, May 2006. ISSN 1074-7613. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713978 >.

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. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25593324 >.

YERUVA, S.; RAMADORI, G.; RADDATZ, D. NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines. **Int J Colorectal Dis,** v. 23, n. 3, p. 305-17, Mar 2008. ISSN 0179-1958. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046562 >.

ZELIC, R. et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNMT3B gene and DNMT3B mRNA expression in association with prostate cancer mortality. **Prostate Cancer Prostatic Dis,** v. 22, n. 2, p. 284-291, 05 2019. ISSN 1476-5608. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30341411 >.

ZHANG, B. et al. Age decreases macrophage IL-10 expression: Implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury. **Exp Neurol,** v. 273, p. 83-91, Nov 2015. ISSN 1090-2430. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26263843 >.

ZHANG, X. et al. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration. **Mol Cancer,** v. 17, n. 1, p. 146, 10 2018. ISSN 1476-4598. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30292233 >.

ZHOU, D. et al. Promising landscape for regulating macrophage polarization: epigenetic viewpoint. **Oncotarget,** v. 8, n. 34, p. 57693-57706, Aug 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28915705 >.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol,** v. 8, n. 9, p. 967-74, Sep 2007. ISSN 1529-2908. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581537 >.

ZHU, L. M. et al. Multidrug-resistant tuberculosis is associated with low plasma concentrations of human neutrophil peptides 1-3. **Int J Tuberc Lung Dis,** v. 15, n. 3, p. 369-74, Mar 2011. ISSN 1815-7920. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333105 >.

ZIMMERMANN, M. et al. Chromatin remodelling and autocrine TNFα are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. **Nat Commun,** v. 6, p. 6061, Jan 2015. ISSN 2041-1723. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616107 >.

_____. IFNα enhances the production of IL-6 by human neutrophils activated via TLR8. **Sci Rep,** v. 6, p. 19674, Jan 2016. ISSN 2045-2322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26790609 >.

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annu Rev Pathol,** v. 15, p. 493-518, 01 2020. ISSN 1553-4014. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31675482 >.

ZOU, J. M. et al. IL-35 induces N2 phenotype of neutrophils to promote tumor growth. **Oncotarget,** v. 8, n. 20, p. 33501-33514, May 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28432279 >.

ÁLVAREZ-ERRICO, D. et al. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. **Nat Rev Immunol,** v. 15, n. 1, p. 7-17, Jan 2015. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534619 >.

9. Anexos

9.1 ANEXO 1: Parecer Consubstanciado do Conselho de Ética e Pesquisa (CEP)

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

Of. CEP/FCFRP nº. 009/2019
kms

Ribeirão Preto, 28 de maio de 2019.

Ao pós-graduando
Cicero Jose Luiz dos Ramos Almeida
Orientadora: Profª. Drª. Fabiani Gai Frantz
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**DETERMINAÇÃO DA ASSINATURA EPIGENÉTICA RELACIONADA À POLARIZAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS DE PERFIS N1 E N2**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 480 – CAAE: 95004418.7.0000.5403,** foi aprovado "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em 26/09/2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 2.919.226 e referendado na 181ª reunião, de 01/10/2018.

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

Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP
Avenida do Café s/nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 - cep@fcfrp.usp.br

9.2 ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: " **Determinação da assinatura epigenética relacionada à polarização de neutrófilos humanos de perfis N1 e N2** ".

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Cícero José Luíz dos Ramos Almeida

Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa que é desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Este trabalho tem como objetivo avaliar a como se comportam diferentes tipos de neutrófilos, que são as células do sangue essenciais para a defesa do corpo durante a infecção por micróbios. A sua participação é **voluntária** e não obrigatória. Para participar, é necessário ler com atenção este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para você e outra para nós pesquisadores.

O que são neutrófilos?

Os neutrófilos são células presentes no sangue, que fazem parte do sistema imunológico e atuam na defesa contra micróbios invasores. O estudo da função do neutrófilo é importante porque essas células ajudam na defesa do organismo contra vários microrganismos, além de diversas doenças em estágios iniciais.

Como iremos avaliar suas células?

Esta pesquisa trará benefícios para entender como as células podem assumir funções e formas diferentes na corrente sanguínea, de acordo com mudanças nos genes que interferem na progressão ou não de diversas doenças.

Como você, doador, vai participar da pesquisa?

Utilizaremos as células do seu sangue para estudar apenas os neutrófilos. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 10 mL de sangue, que corresponde a 1 colher de sopa. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde, será utilizada somente para esta pesquisa e em caso de sobra, o sangue será jogado fora. A coleta de sangue será realizada em sala apropriada no Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, apenas uma vez no braço, com seringas e agulhas descartáveis. A pesquisa não acarreta nenhum prejuízo a você participante, sendo os riscos apenas aqueles

ligados à coleta de sangue, tais como, dor da picada, formação de manchas roxas, mas que serão evitados com técnicos de biossegurança e profissional biomédico capacitado.

O teste será realizado em laboratório com os neutrófilos separados do sangue dos participantes. Sendo assim, os participantes desta pesquisa não sofrerão nenhum procedimento que não seja a coleta de sangue. A coleta de sangue deverá ser feita em **participantes de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 60 anos.**

Sua participação será muito importante para a realização do estudo, não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de forma secreta e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Caso você tenha interesse os resultados da pesquisa obtidos com suas células poderão lhe ser informados. Esta pesquisa não lhe trará benefícios diretos, contudo nos auxiliará na melhor compreensão da forma como os neutrófilos alteram sua função no sangue de pacientes doentes. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, ou nos procurar para tirar qualquer dúvida, basta avisar os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones ou contatos que aparecem no final deste documento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Cícero José Luiz dos Ramos Almeida (cjlive@usp.br), Dra. Fabiani Gai Frantz (frantz@fcfrp.usp.br) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP/ cep@fcfrp.usp.br). Por telefone: (16) 3315-0241 (laboratório USP), (87) 99664-0285 (celular Cícero), (16) 3315-4213 (Comitê de Ética em Pesquisa).

_____ Data:_____

Cícero José Luiz dos Ramos Almeida (Pesquisadores Responsáveis)

_____ Data:_____

Prof. Dra. Fabiani G. Frantz (Pesquisadores Responsáveis)

Eu, _____RG nº: _____, autorizo a retirada de 10 mL do meu sangue da veia do braço para a realização de pesquisa. Fui informado sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado também que a finalidade dessa pesquisa é entender como os neutrófilos, célula de defesa do corpo, funcionam, de acordo com a assinatura epigenética que é conferida às células.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20___.

Assinatura:_____ Data:_____