



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO DA METILAÇÃO DE  
DNA EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM *L.(L.)AMAZONENSIS* E  
*L.(L.)INFANTUM*.

TATIANA GUERRERO MARÇOLA

TESE EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA / 2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO DA METILAÇÃO DE  
DNA EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM *L.(L.)AMAZONENSIS* E  
*L.(L.)INFANTUM*.

TATIANA GUERRERO MARCOLA

ORIENTADOR: MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO

CO-ORIENTADOR: RINALDO WELLERSON PEREIRA

ORIENTADOR NO EXTERIOR: JÖRN WALTER

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

NÚMERO: 004/ 2016

BRASÍLIA / 2016

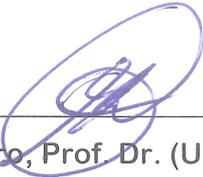
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO DA METILAÇÃO DE DNA EM MACRÓFAGOS DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM L. (L.) AMAZONENSIS E L. (L.) INFANTUM

TATIANA GUERRERO MARÇOLA

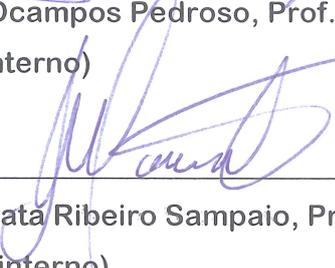
TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROMAGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM SAÚDE ANIMAL

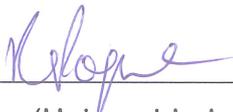
APROVADA POR:

  
\_\_\_\_\_  
Márcio Botelho de Castro, Prof. Dr. (Universidade de Brasília)  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Angela Patrícia Santana, Profa. Dra. (Universidade de Brasília)  
(Examinadora interna)

  
\_\_\_\_\_  
Pedro Miguel Ocampos Pedroso, Prof. Dr. (Universidade de Brasília)  
(Examinador interno)

  
\_\_\_\_\_  
Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, Profa. Dra. (Universidade de Brasília)  
(Examinadora interno)

  
\_\_\_\_\_  
Robert Pogue, Prof. Dr. (Universidade Católica de Brasília)  
(Examinador externo)

Brasília – DF, 26 de fevereiro de 2016

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MARÇOLA, T. G. Investigação da variação da metilação de DNA em macrófagos de camundongo infectados com *L.(L.)amazonensis* e *L.(L.)infantum*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 102 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Marcola, Tatiana Guerrero

Investigação da variação da metilação de DNA em macrófagos de camundongos infectados com *L.(L.)amazonensis* e *L.(L.)infantum*. /Tatiana Guerrero Marçola orientação de Márcio Botelho de Castro – Brasília , 2016. 102p. il.

Tese de Doutorado (D) - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

1. RRBS. 2. Metilação de DNA. 3. Interação parasita-hospedeiro. 4 Leishmania. I. Castro, M.B. II. Pereira, R.W. III. Título.

CDU

Agris/FAO

## Dedicatória

As pessoas que amo e me apoiam, minha família e amigos, em especial a minha mãe e irmã, desculpe a ausência, infelizmente não se pode ter tudo, o mundo é muito grande e a saudade também... Dedico também aos camundongos que me ajudaram (com suas vidas) e a todos os seres acometidos por Leishmaniose.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus (a vida, Davi, a “energia”, Javé, El Shadday, etc) o qual aposto que é algo maior do que nossa consciência, o qual não temos explicação. Agradeço a minha mãe por ter me dado asas, e peço desculpa por ter voado tão longe, mas se continuo a voar é por você. Ao meu pai que onde estiver também olha por mim. A minha irmã Jordis, meu oposto tão amado, “Because maybe, you're gonna be the one that saves me, and after all, you're my wonderwall (Oasis)”. A minha família: Tia Marina; Vani, Ian e Dean (obrigado pela visita, amei); Juan, Ana, Amanda e Rick; Tia Marcia e Dressa.

Amigos são a família que nos permitem escolher: Anahi, pela força e palavras extremamente sensatas, sempre presente (junto com Jorge e Pedro) e sua família que me adotou: Tia Rosário (pelas rezas), Tio Laerte, Léo (obrigado pela ajuda técnica e apoio) e Co. Ao Elton, obrigado por toda ajuda - financeira e moral, foi essencial. Larissa, pelas longas conversas (profissionais e pessoais) e ajuda técnica. Fernanda e Karla, pelas conversas, conselhos e troca de ideias. Mirna, Vanessa, Marta e Bibiola, pela companhia (mesmo distante) e pelo apoio moral e risadas em horas difíceis. Loiane, pela companhia e por compartilhar momentos mágicos. A Clarissa, que sempre me apoiou e ajudou como amiga e colaboradora. Ao Rômulo (inferno) pelas força e pelos conselhos. Rodrigo (Ro e Giu) pela amizade paterna. A Lora pelas conversas divertidas e pelo fofo do Gregório. Aos amigos queridos da UCB: Dianny, Getúlio, Túlio, Breno, Karina, Felipe, Tainá e Mara, obrigados por toda ajuda, e também aos outros tantos colegas que me ajudaram. Aos colegas dos Lab de Pato clínica e de patologia – UnB-FAV, e outros tantos que se espalharam pela UnB.

A meus orientadores: Márcio e Rinaldo, obrigado por acreditarem em mim, me deixando livre para correr por mundos desconhecidos, dando apoio as minhas ideias e entrando em confusões comigo. A Dra Celeste da Fiocruz- RJ, obrigado por todo trabalho que lhe dei, sem a sua colaboração este estudo não teria sido realizado. Ao Dr. Jörn Walter que me deu um enorme voto de confiança e foi essencial para que este trabalho fosse realizado e também a toda sua equipe do laboratório de genética da Universität des Saarlandes. A Capes e ciências sem fronteira, que foram as agencias financiadoras da minha bolsa nestes 4 anos.

## EPÍGRAFE

*“Bem-aventurados os mansos, porque eles herdarão a terra”. (Mateus 5:5)*

*“Um dos pontos que fazem a ciência tão especial:  
a ciência adora mistérios, ela adora não  
saber nada!” (Lawrence Krauss)*

*“A ciência? Ao fim do cabo, o que é ela senão uma longa e sistemática  
curiosidade?” (André Maurois)*

## RESUMO

Leishmaniose é uma doença complexa que envolve diversas sinalizações principalmente via resposta imune inata através dos macrófagos. O estudo da doença é normalmente realizado *in vitro*, entretanto há uma grande variedade de macrófagos usados, formas do parasita, espécies do parasita e linhagens de animais. Sabe-se que o parasita *Leishmania spp.* de alguma forma consegue subverter o tipo de polarização de macrófagos, desta forma manipula etapas imunes essenciais do hospedeiro, permanecendo e proliferando dentro do seu organismo. O padrão de citocinas produzido por macrófagos tem retroalimentação com linfócitos T, citocinas como IL-12, INF- $\gamma$  e IL-6 que possuem perfil pró-inflamatório e estimulam linfócitos Th1, os quais estão associados com animais de linhagens resistentes como C3H/he. Por outro lado o perfil de citocinas anti-inflamatório tende a estimular linfócitos Th2, que estão bem associados a animais susceptíveis como Balb/c. Trabalhos mostram que diversos patógenos são capazes de manipular diferentes etapas da resposta imune inata, autores já descrevem que parasitas, vírus e bactérias são capazes de modificar etapas epigenéticas do hospedeiro. Epigenética envolve mecanismo capazes de alterar e coordenar a expressão dos genes, um deste mecanismos é a metilação de DNA. Metilação de DNA é uma modificação química no carbono 5 de citosinas, tal modificação é encontrada normalmente em vertebrados e invertebrados, em situações fisiológicas e patológicas. Existem diversas metodologias para verificação dos níveis de metilação de DNA, a técnica de RRBS (Reduced representation bisulfite sequencing) é uma técnica barata, acessível e comparável as demais metodologias. O presente trabalho investigou os sítios de metilação de DNA em macrófagos peritoneais de duas diferentes linhagens (Balb/c e C3H/he), recuperados com lavagem ou estímulo por Tioglicolato de sódio. As células de ambas linhagens sem estímulo foram infectadas com *L. infantum* e *L. amazonenses*; as células com estímulo foram infectadas apenas com *L. amazonenses*. Após o período de 72 horas o DNA das células foi extraído e purificado para a preparação de bibliotecas de RRBS e sequenciamento em Hi-seq 2500. A análise das sequências foi feita pela ferramenta Rnbeads, que realizou as comparações – infecção x controle; linhagem resistente x susceptível; e macrófagos estímulo x sem estímulo. Através da distribuição beta e redução dimensional geradas pela ferramenta sugere-se que há diferenças consistente entre células recuperadas por Tioglicolato e células recuperadas com lavagem. As células estimuladas apresentam menor concentração de sítios metilados em regiões como promotores, genes e *tiling*. Entre animais resistentes (C3H/he) e susceptíveis (Balb/c) também foi observado que animais Balb/c tendem a ter menor concentração de metilação de DNA quando comparados a C3H/he, tal perfil não é devido a infecção. Apesar da sutil diferença na metilação de DNA entre infecção e controle, as linhagens demonstraram padrões opostos de metilação de DNA. Não foi possível distinguir mudanças nos sítios de metilação entre Leishmaniose cutânea e visceral. O presente trabalho sugere que há diferenças na metilação de DNA, sendo sutil no status de infecção e controle, moderado em animais resistentes e susceptíveis, e intenso entre células estimuladas e não estimuladas, e tais modificações são vistas em regiões importantes do genoma como promotores.

Palavras-chave: Parasita, hospedeiro, Leishmaniose, metilação de DNA, macrófagos.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex disease involving many signals pathways in innate immune response mainly by macrophages. The study of the disease is usually *in vitro*, however, there are many of macrophages types, parasite form, parasite species and animals strains. It is known that the parasite *Leishmania spp.* can subvert the macrophages polarization, handles essential immune steps of the host, to live and spread within the host body. The cytokines pattern produced by macrophages has T lymphocytes feedback, cytokines such as IL-12, INF- $\gamma$  and IL-6 which have a pro-inflammatory profile stimulate Th1 lymphocytes, which are associated with animal resistant strains as C3H / He. Furthermore, the anti-inflammatory cytokine profile stimulates Th2 lymphocytes which are associated with susceptible animals as Balb / c. Many pathogens are able to handle different stages of the innate immune response, the authors have described that parasites, virus and bacterias are able to modify the host epigenetic steps. Epigenetic are mechanism able to change and coordinate the gene expression, as DNA methylation. DNA methylation is a chemical modification of 5 carbon in cytosines, such modification is usually found in vertebrates and invertebrates, in physiological and pathological situations. There are several methodologies to investigate DNA methylation levels, RRBS technique (Reduced representation bisulfite sequencing) is an inexpensive and accessible technique, comparable to other methodologies. This study investigated the DNA methylation sites on peritoneal macrophages of two different strains (BALB/c and C3H/he), recovered by washing or stimulation by sodium thioglycolate. The cells of both strains without stimulation were infected with *L. infantum* and *L. amazonensis*; the cells with stimulus were just infected with *L. amazonensis*. After 72 hours the cell DNA was extracted and purified to the RRBS libraries preparation and sequencing by Hi-seq 2500. Sequence analysis was done by Rnbeads tool wich compared: infection x control; resistant x susceptible mice strain; and macrophages stimulated x without a stimulus. Through beta distribution and dimensionality reduction generated by the Rnbeads it is suggested that there are consistent differences between stimulated cells with thioglycollate and cells recovered by washing. Stimulated cells have a lower concentration of methylated sites in regions such as promoters, genes and tiling. Between resistant (C3H/He) and susceptible (BALB/c) animals was also observed that Balb/c animals have a lower concentration of DNA methylation than C3H/He, which is not due the infection. Although subtle differences in DNA methylation between infection and control, the strains response to infection showed opposite patterns of DNA methylation. It was not possible to distinguish changes in DNA methylation sites between cutaneous and visceral leishmaniasis. This study suggests that there are differences in DNA methylation in host-parasite interaction, which are subtle in infection and control status, moderate in resistant and susceptible animals, and intense between stimulated and unstimulated cells, such modifications can be seen in important regions of the genome as promoters.

Keywords: parasite, host, leishmaniasis, DNA methylation, macrophages.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura - 1: Ciclo da <i>Leishmania spp.</i> .....	4
Figura - 2: Citocinas e estímulos para polarização de macrófagos .....	10
Figura - 3: Citocinas e efeito sobre o parasita .....	12
Figura - 4: Conversão por bisulfito .....	18
Figura - 5: Número de publicações relacionadas e relacionadas a parasitas .....	19
Figura - 6: Desenho experimental .....	30
Figura - 7: Qualidades de biblioteca por eletrofosere microdiluida Bioanalyzer .....	35
Figura - 8: Visualização geral dos sítios de metilação de DNA e cobertura .....	39
Figura - 9: Distribuição $\beta$ dos sítios de removidos e mantidos .....	40
Figura - 10: Análise dos principais componentes em sítios de metilação de DNA .....	42
Figura - 11: Análise dos componente principais em regiões anotadas .....	44
Figura - 12: Análise dos componente principais em genes .....	45
Figura - 13: Distribuição $\beta$ dos sítios de metilação de DNA em status .....	47
Figura - 14: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em status na região de promotores .....	49
Figura - 15: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em status na região de genes .....	51
Figura - 16: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em status na região de tiling .....	53
Figura - 17: Perfil de metilação regional na região de promotores – <i>L. amazonensis</i> .....	54
Figura - 18: Perfil de metilação regional na região de promotores – <i>L. infantum</i> .....	55
Figura - 19: Perfil de metilação regional na região de genes – <i>L. amazonensis</i> .....	56

Figura - 20: Perfil de metilação regional na região de genes – <i>L. infantum</i> .....	57
Figura - 21: Correlação em status – doença x controle .....	59
Figura - 22: Distribuição $\beta$ dos sítios de metilação de DNA nas linhagens .....	60
Figura - 23: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em linhagens na região de promotores .....	62
Figura - 24: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em linhagens na região de genes .....	62
Figura - 25: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em linhagens na região de <i>tiling</i> .....	63
Figura - 26: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em controles -linhagens .....	64
Figura - 27: Correlação em linhagem – Balb x C3H .....	66
Figura - 28: Distribuição $\beta$ dos sítios de metilação de DNA em relação a estímulo .....	67
Figura - 29: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em relação a estímulo na região de promotores .....	69
Figura - 30: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em relação a estímulo na região de genes .....	70
Figura - 31: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em relação a estímulo na região de <i>tiling</i> .....	71
Figura - 32: Distribuição $\beta$ da metilação de DNA em controles – estímulo .....	73
Figura - 33: Clustering para regiões de anotação .....	75

## LISTA DE TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

Tabela 1: Lista completa de ensaios e triplicatas.....	28
Tabela 2: Quantificação da concentração inicial de DNA por fluorometria.....	31
Tabela 3: Quantificação das amostras de DNA purificado pela segunda vez por fluorometria .....	32
Tabela 4: Quantificação de bibliotecas por fluorometria.....	33
Tabela 5: Quantificação de sequências brutas após sequenciamento em Hiseq 2500. ....	36
Tabela 6: Cobertura das amostras.....	37
Tabela 7: Número total de anotações nas regiões avaliadas.....	41
Tabela 8: Número de anotações das regiões por amostra.....	41
Quadro 1: Quantificação e pureza do DNA inicial por espectrofotometria.....	32
Quadro 2: Quantificação e pureza do DNA purificado pela segunda vez por espectrofotometria.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

5caC - 5 carboxicitosina  
5fC - 5 formilcitosina  
5hmC - 5 hidroximetilcitosina  
5mC - 5metilcitosina  
Arg1 - arginase 1  
CGI - ilha CpG  
CpG - dinucleotídeos CpG  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DNMT - DNA metiltransferases  
FcγR - receptores de fibronectina  
GM-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos  
GP63 - glicoproteína de superfície 63kDa  
IL-1R - receptor de interleucina 1  
INFγ - interferon gama  
iNOS - óxido nítrico sintase induzível  
Jak - Janus quinase  
LPG - lipofosfoglicano  
M1- macrófagos polarizados de forma clássica  
M2- macrófagos polarizados de forma alternativa  
MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno  
MHCII - Complexo maior de histocompatibilidade II  
MyD88 - adaptador fator 88 de diferenciação mielóide  
NF-κB - fator nuclear kappa B  
NO - óxido nítrico  
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos  
PCA – Análise de componentes principais  
PRRs - receptores de reconhecimento padrão  
RNA – ácido ribonucleico  
RNAi – RNA interferente  
ROIs - reativos intermediários de oxigênio  
RRBS - *reduced representation bisulfite sequencing*

STAT - transdutores de sinais e ativação de transcrição

TDG - proteína Timina DNA glicosilase

TET - *tem eleven translocation*

TGF $\beta$  - fator de crescimento tumoral beta

Th1 – células T helper 1

Th2 – células T helper 2

TLRs - receptores Toll-like

TNF $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

WHO - *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. A LEISHMANIOSE.....	3
2.2. RESPOSTA IMUNE A LEISHMANIA SPP .....	6
2.3. MACRÓFAGOS E POLARIZAÇÃO.....	7
2.4. IL-12/IL-10 x TH1/TH2 x RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE .....	11
2.7. EPIGENÉTICA – METILAÇÃO DE DNA E RRBS.....	15
2.7.1. Métodos de estudo de metilação de DNA .....	17
2.7.2. Epigenética e parasitas.....	19
<b>3. HIPÓTESE .....</b>	<b>21</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVO.....</b>	<b>23</b>
5.1. GERAL .....	23
5.2. ESPECÍFICO.....	23
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
6.1. ANIMAIS E CÉLULAS .....	24
6.2. ENSAIOS - INFECÇÃO DAS CÉLULAS E TAXA DE INFECÇÃO .....	24
6.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	25
6.4. QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DE DNA.....	25
6.5. PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS PARA RRBS .....	26
6.6. QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO.....	26
6.7. ANÁLISE DE RRBS – BIOINFORMÁTICA .....	27
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
7.1. ENSAIOS .....	28
7.2. QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO DNA .....	31
7.3. QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DE BIBLIOTECAS.....	33
7.4. ANÁLISE DAS SEQUENCIAS .....	35
7.4.1. Qualidade de sequencias.....	35
7.4.2. Estatística descritiva .....	36
7.4.3. Qualidade de bases na sequencia.....	37
7.5. COBERTURA (COVERAGE).....	37
7.6. ANÁLISE POR RNBEADS .....	40
7.6.1 Remoção de sítios.....	40
7.6.2 - Análises exploratórias - Regiões de anotação .....	40
7.6.3. Redução dimensional.....	42
7.6.4. Distribuição de metilação .....	45
7.6.4. Comparações primárias - Infecção x controle .....	46
7.6.5. Comparações secundárias linhagens– Balb x C3H .....	59
7.6.6. Comparações secundárias estímulo – Tioglicolato X lavagem.....	66

7.6.7. Agrupamento .....	74
<b>8 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>83</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>84</b>
ANEXO A.....	94
ANEXO B.....	96
ANEXO C.....	97
ANEXO D.....	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A interação parasita - hospedeiro é um mecanismo refinado moldado durante milhares de anos durante a evolução, sendo um eterno cabo de guerra entre dois organismos com intuito de sobreviver e proliferar. Leishmaniose é uma doença causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, o qual necessita de um vetor, normalmente um flebótomo e um hospedeiro vertebrado para completar o ciclo. A doença é classificada como não controlada pela WHO (*World Health Organization*). *Leishmania spp.* é capaz de modular padrões metabólicos e de sinalização em seus hospedeiros no intuito de sobreviver e ter acessos a nutrientes essenciais. A vacinação efetiva ainda é uma questão discutida e nem todo tratamento é capaz de eliminar o agente do organismo, entretanto existem descrições de hospedeiros capazes de debelar o agente.

Após a infecção dos neutrófilos ocorre a quimiotaxia e ativação de macrófagos, a *Leishmania spp.* influencia a ativação do fenótipo de macrófagos sendo capaz de alterar suas funções. A questão é: como parasitas intra-fagossomais afetam padrões de sinalização citosólicos de seus hospedeiros? Atualmente os macrófagos tem seu fenótipo caracterizado por dois tipos de ativação: M1 e M2. Macrófagos tipo M1, são induzidos por Interferon  $\gamma$ , citocinas e GM-CSF (Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos), tendo fenótipo de IL-12 (interleucina 12), IL-23 (interleucina 23) e IL-6 (interleucina 6) são produtores de moléculas efetoras e tem atividade pró-inflamatória. Porém, estudos demonstram a preferência de *Leishmania spp.* por outro tipo de macrófago, macrófagos polarizados tipo M2, que são ativados de forma “não clássica”, expressando IL-4 (interleucina 4), IL-13 (interleucina 13), IL-10 (interleucina 10), com atividade anti-inflamatória.

Estudos com modelos susceptíveis e resistentes têm mostrado que a resposta via células Th1 (sinalização via IL-12) e a ativação de macrófagos estão associadas à morte do parasita, enquanto resposta via células Th2 (sinalização via IL-10) estão associadas à persistência e progressão da doença em humanos e modelos. O fato é que o direcionamento da polarização de Th1 ou Th2 está associado ao ambiente e estímulos, via citocinas e células apresentadoras de antígenos, mecanismos epigenéticos parecem ter papel essencial no

processo de modulação do sistema imune. A interação parasita-hospedeiro é um sistema plástico e dinâmico, modificações epigenéticas fornecem uma ferramenta rápida e reversível para os parasitas sobreviverem no hospedeiro.

Mecanismos epigenéticos englobam alterações bioquímicas e conformacionais de cromatina, bem como atuação de RNAi (RNA interferente). Metilação de DNA é uma alteração epigenética que ocorre nas células por adição de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição 5' de resíduos de citidinas em dinucleotídeos CpG de todo o genoma. Adição ou perda de metilação em regiões específicas está associada ao silenciamento ou expressão de genes. Novas tecnologias permitem determinar o perfil de metilação do DNA de células hospedeiras infectadas e correlacionar com as alterações de transcrição. Uma das técnicas para análise de metilação de DNA é RRBS (*reduced representation bisulfite sequencing*) que permite a análise e comparação da metilação global de diversas amostras, com baixo custo, podendo ser comparadas às demais técnicas existentes.

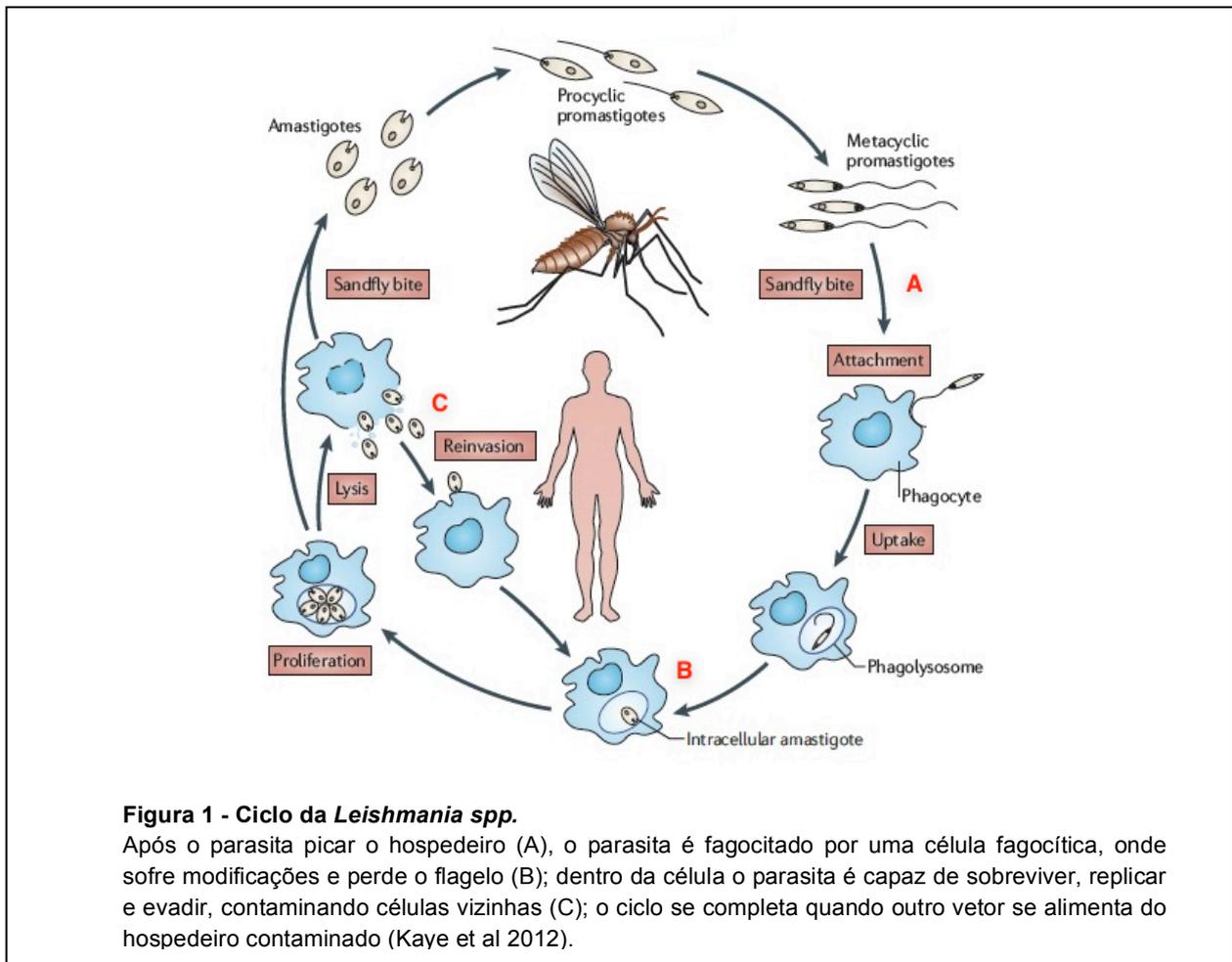
O presente trabalho tem como intuito melhorar o entendimento sobre epigenética e as influências dos vieses do estudo *in vitro*, como estímulo e célula utilizada, espécie do parasita, infecção e controle e resistência e susceptibilidade, através da triagem de sítios metilados por ferramentas de análise em longa escala de metilação de DNA na interação parasita-hospedeiro na infecção por Leishmaniose.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença causada por um parasita protozoário da família Trypanosomidae do gênero *Leishmania*. Existem mais de 20 espécies de parasitas que causam doenças (Sharma e Singh 2008; Romano et al. 2014), sendo que 7 ocorrem no Brasil. Normalmente a doença ocorre em países tropicais, onde o clima contribui para o desenvolvimento do ciclo. Diversas espécies de *Leishmania spp.* levam a diferentes respostas no hospedeiro, durante o ciclo de vida a *Leishmania spp.* passa por vários estágios, que ocorrem devido a diferentes mudanças de ambientes (flebótomo-mamífero), como forma de adaptação (Morales et al. 2008). Em geral, seus hospedeiros são mamíferos, mas outros vertebrados são susceptíveis. Os cães domésticos são reservatórios urbanos, enquanto que carnívoros silvestres e roedores são reservatórios silvestres (Gavvani et al. 2002; Sharma e Singh 2008).

Para o ciclo completo do parasita é necessário um vetor, normalmente do gênero *Phlebotomus spp.* ou *Lutzomia spp.* e um hospedeiro vertebrado, dentro do vetor o parasita se encontra na forma promastigotas e ao se alimentar o flebótomo elimina a forma infectante (Kaye e Scott 2011). A saliva do flebótomo contém promastigotas vivas, mortas ou em apoptose, além de componentes salivares que atuam com papel crítico na modulação da resposta imune do hospedeiro (Okwor et al. 2012). As promastigotas podem ser fagocitadas por diversas células fagocíticas como neutrófilos, monócitos e macrófagos, onde ocorre formação do fagossoma. Dentro da células o parasita perde o flagelo e se transforma em amastigota, esta forma é capaz de se replicar e sobreviver dentro do fagossoma, até o ponto de romper a célula e infectar células vizinhas, o ciclo se completa quando outro flebótomo se alimenta do hospedeiro (Fig. 1) (Matlashewski 2001; Kaye e Scott 2011).



Devido as adversidades no ambiente, o parasita para sobreviver é capaz de se diferenciar e se tornar mais virulento. Alterações de temperatura, ph, atividades citotóxicas e enzimáticas atuam como fatores de estresse para a adaptação do estágio parasitário dentro das células, sendo este capaz de sobreviver a um ambiente inóspito como o fagossoma (Späth, Drini, e Rachidi 2015). Os protozoários têm a capacidade de produzir e secretar várias moléculas de superfície envolvidas em processos de sinalização celular que levam a modulação do sistema imune (de Moraes et al. 2014). O papel de moléculas como GP63 (glicoproteína de superfície 63kDa), LPG (Lipofosfoglicano), proteases de cisteínas e outras proteínas diferencialmente expressas durante as fases promastigotas e amastigotas, tem sido estudado devido ao envolvimento na adaptação do parasita em ambientes diversos (vetor e hospedeiro) e ao aumento da virulência do parasita (Puri et al. 2011; Podinovskaia e Descoteaux 2015).

O parasita pode causar três diferentes formas clínicas para a doença: visceral, cutânea e muco-cutânea, normalmente cada forma da doença tem uma espécie característica, porém algumas vezes o mesmo parasita pode levar a duas formas da doença (Romano et al. 2014; McCall et al. 2015), a WHO (*World Health Organization*) ainda acrescenta a forma cutânea

difusa. As formas da doença têm alta morbidade e mortalidade, sendo classificada como doença emergente não controlada pela WHO. No mundo ocorrem mais de 1 milhão de novos casos por ano, e cerca de 20 mil pessoas vem a óbito, mais de 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO).

As principais espécies denominadas *Leishmania* do novo mundo (encontradas nas Américas) são: *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* que provocam a forma cutânea; *L. brasiliensis* que provoca a forma mucocutânea e *L. chagasi* causadora da forma visceral (Fiocruz), esta última também é considerada sinônimo da *L. infantum* do velho mundo (Mauricio et al. 1999). No velho mundo (Norte da África, Mediterrâneo, Índia, Oriente Médio e Ásia Central) as espécies são: *L. donovani* além da *L. (chagasi) infantum* já citada, que causam a forma visceral; *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica* que causam a forma cutânea (WHO).

Diversos organismos hospedeiros podem combater diferentemente o parasita, isso se deve a fatores como idade, estado nutricional, individualidade imune e doenças concomitantes, principalmente HIV (vírus da imunodeficiência humana), além do mais, diferentes espécies e cepas do parasita levam a diferentes manifestações clínicas (Gradoni e Gramiccia 1994; Costa et al. 2000). Na Leishmaniose cutânea, hospedeiros imunocompetentes combatem sozinhos o parasita, sendo que o parasita persiste no organismo levando a certa imunidade. O mesmo pode ocorrer com a Leishmaniose mucocutânea onde há o acometimento de regiões naso-faríngea, apesar da aparente cura sequelas como deformação facial e cegueira podem ocorrer (Faria, Reis, e Lima 2012). A *Leishmania* visceral é caracterizada por esplenomegalia e hepatomegalia, e algumas vezes linfadenopatia. Alguns hospedeiros podem combater o parasita, entretanto a permanência do parasita no organismo pode desencadear o calazar dermal (pós calazar), contudo também existem os indivíduos assintomáticos (Murphy et al. 2001; Schwarz et al. 2013; Singh 2014).

O processo de transformação do parasita dentro do organismo do hospedeiro, passando de uma promastigota extracelular para amastigota intracelular é complexo e varia conforme a espécie do parasita. Evidências levam a crer que o parasita consegue escapar do sistema imune do hospedeiro por suprimir atividades críticas dos macrófagos (Lambertz et al. 2012). A adaptação de parasitas intracelulares com seus hospedeiros se deu através de uma coadaptação durante a evolução, se tornando especialistas capazes de alterar processos celulares como: indução de apoptose, autofagia, produção de reativos de oxigênio, degradação

lisossomal, das células do hospedeiro, caso o parasita tenha êxito estará num ambiente protegido e nutrido (David Sibley 2011).

## 2.2. Resposta Imune a *Leishmania spp*

O processo básico de resposta do hospedeiro consiste como primeira linha de defesa os neutrófilos, que não conseguem limitar a ação da *Leishmania spp.* na pele, onde após fagocitarem os parasitas acabam por sofrer apoptose, sendo que estes corpos apoptóticos atuam como sinalizadores para os macrófagos (Kaye e Scott 2011). Os macrófagos atuam logo em seguida ou em conjunto, sendo suas funções a de morte de patógenos e iniciação de resposta imune adaptativa. Durante uma resposta imune correta, os macrófagos identificam moléculas que se ligam a PRRs (receptores de reconhecimento padrão) e produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias tais como: TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IL-1 $\beta$  (interleucina 1 beta), IL-6 e outras, as quais tem retroalimentação com iniciação da resposta antimicrobiana, o que leva a fagocitose e internalização do agente no fagossoma. Assim, ocorre o desencadeamento de ROIs (reativos intermediários de oxigênio) e nitrogênio, proteases, hidrolases lisossomais e outras proteínas e peptídeos antimicrobianos encontrados em lisossomas que se fundem ao fagossoma. Enfim, o fagossoma será digerido e liberará antígenos que se apresentarão às células T, desencadeando a resposta imune adaptativa (McGuinness, Dehal, e Pleass 2003; Kima 2007; Lambertz et al. 2012).

O sistema imune é dividido em inato e adaptativo, a fronteira entre as duas respostas não é muito clara. A resposta imune inata tem papel central na defesa contra parasitas intracelulares. Através de sinalização por receptores pode ativar duas vias divergentes de sinalização: uma promotora de sobrevivência celular e outra ativadora de mediadores pró-inflamatórios. A resposta inata é executada por PRRs através de PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos), inicializando uma cascata de sinais que induz citocinas, interleucinas, quimiocinas e proteínas antimicrobianas (Körner et al. 2010; Wen, Sakamoto, e Miller 2010; Sellers et al. 2012; Kondo, Kawai, e Akira 2012).

Fagocitose é um processo complexo envolvendo muitas etapas: ativação de receptores, desencadeamento de muitas sinalizações celulares, consequente adaptação de citoesqueleto e

internalização de partículas. Após o englobamento do patógeno, o mesmo necessita manter o ambiente suportável e adquirir nutrientes, muitos parasitas secretam moléculas que são capazes de penetrar na célula permitindo a sua invasão (de Celis et al. 2015; Liehl, Zuzarte-Luis, e Mota 2015). A habilidade de modular o fagossoma se dá através de fatores de virulência. As alterações na biogênese de fagossomas provocadas por proteínas secretadas pela *Leishmania spp.* ainda não são bem entendidas, entretanto através da aplicação de técnicas para o estudo global de proteínas, diversas moléculas proteicas envolvidas no processo tem sido identificadas. Dentre as principais proteínas estão: LPG e GP63, porém existem diversas outras: quitinase, aldolase, SAcP, EF-1 $\alpha$ , ISP (inibidor de serina peptidase), proibitina, PKC-like (Proteína quinase C-like), ISCL, entre outras. Sabe-se também que o parasita é capaz de produzir exossomas com cerca de 300 proteínas, capazes de modular diversas funções de macrófagos (David Sibley 2011; Moradin e Descoteaux 2012; Lambertz et al. 2012; Podinovskaia e Descoteaux 2015).

Já é descrito em diversos parasitas inclusive na *Leishmania spp.*, que a secreção destas moléculas no hospedeiro leva a alteração de sinais que promovem a resposta pró-inflamatória, ou ativa reguladores negativos que desencadeiam a resposta anti-inflamatória. Uma destas etapas significantes se dá através da polarização de macrófagos, que tem papel importante na imunidade inata, os quais produzem muitas citocinas que estimulam resposta de células CD4+. A resposta via células T é essencial para garantir a morte ou perpetuação do parasita, resposta Th1 normalmente está associada ao aumento de NO (óxido nítrico) e atuação pró-inflamatória, já resposta Th2 leva a produção de Arg1 (Arginase 1) e tem atividade anti-inflamatória (Kima 2007; Canton 2014).

### 2.3. Macrófagos e polarização

Macrófagos estão presentes praticamente em todos os tecidos, atuam na homeostase retirando debris e evitando inflamação excessiva, e também atuam como células de defesa com atividade microbicida (Duque e Descoteaux 2014; Ivashkiv 2013). O macrófago é uma das principais células fagocíticas do sistema imune, e é o foco de investigação da relação parasita – hospedeiro, já que é o ambiente de proliferação e sobrevivência da *Leishmania spp.*. A fagocitose é a principal função de macrófagos, podendo ser exercida em processos

patológicos ou não, e a ausência ou incapacidade da atuação destas células pode levar a danos sérios no hospedeiro. Viver dentro de macrófagos é uma ótima forma de escape do sistema imune e alguns parasitas desenvolveram esta habilidade. A interação entre célula e parasita permite comunicação, sendo o parasita capaz de adquirir nutrientes, alterar etapas antimicrobianas e se multiplicar, isso tudo ocorre principalmente através da manipulação de sinalizações metabólicas da célula (Kima 2007; David Sibley 2011; Liehl, Zuzarte-Luis, e Mota 2015).

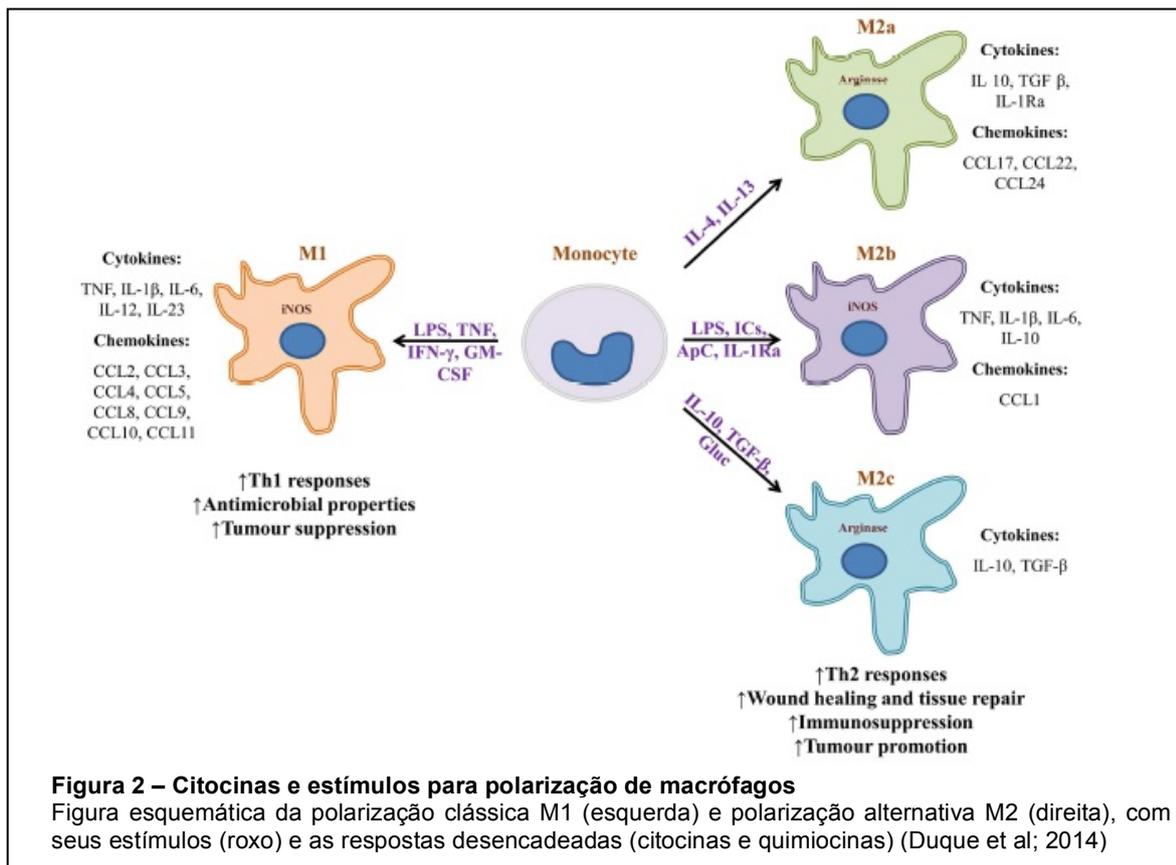
O sistema mononuclear fagocítico compreende um grupo de células responsáveis pela fagocitose, produção de citocinas e apresentação de antígenos. Fazem parte do sistema mononuclear: os monócitos, os macrófagos teciduais e as células dendríticas. Os macrófagos têm ao longo dos últimos anos deixados de serem considerados uma população homogênea e demonstram diferenças funcionais e morfológicas, decorrentes de distintos fenótipos. Os macrófagos eram descritos como originados essencialmente de células sanguíneas – os monócitos, entretanto trabalhos científicos têm demonstrado que alguns macrófagos, como os residentes teciduais, tem origem de progenitores hematopoiéticos da embriogênese e perpetuam até a fase adulta, tendo diferente origem dos monócitos sanguíneos. Macrófagos são células altamente especializadas de acordo com o tecido onde se encontram, sendo descritos como: osteoclastos, histiócitos, micróglias, células de Kupffer, macrófagos alveolares, macrófagos peritoneais entre outros (J Ghosh et al. 2011; Gautier et al. 2012; Epelman, Lavine, e Randolph 2014; Juhas et al. 2015).

Cada tecido tem seu grupo de macrófagos específicos originários de células tronco e derivados de células adultas (monócitos), tendo controle sobre a proporção e tipo destas células. Os macrófagos durante a fase embrionária e neonatal têm papéis importantes no remodelamento tecidual, tecido-específico e reduzida capacidade imune. Os macrófagos residentes têm transcritos distintos de monócitos circulantes, sugerindo certa diferenciação, entretanto macrófagos residentes podem ser uma população heterogênea de macrófagos embrionários e derivados de monócitos (Gautier et al. 2012; Epelman, Lavine, e Randolph 2014). A ativação ou polarização de macrófagos é o ponto chave de muitos processos, principalmente na patogênese e direcionamento da inflamação, podendo ser alterada por diferentes estímulos como: citocinas, moléculas de micróbios, glicocorticoides, alteração de ambiente e etc (P. J. Murray et al. 2014). Apesar de não ser totalmente esclarecido ou aceito, muitos autores dividem os macrófagos em dois grupos: M1 e M2, sendo que M2 pode ser

classificado em diferentes subtipos dependente do contexto - M2a, M2b, M2c e M2d (Canton 2014; Muraille, Leo, e Moser 2014; Zanluqui, Wowk, e Pinge-Filho 2015).

O conceito de M1 e M2 foi introduzindo em 1992 por Steim e colaboradores, quando descobriram que IL4 inibia o estresse oxidativo. A partir deste trabalho muito se tem discutido sobre a nomenclatura relacionada aos fenótipos polarizados de forma clássica e alternativa. A descrição de macrófagos ativados de forma clássica e não clássica viria da ativação por  $INF\gamma$  (interferon gama) e IL4 respectivamente, já a descrição de polarização M1 e M2 tem correlação com o tipo de resposta por células Th1 e Th2 (P. J. Murray et al. 2014; Muraille, Leo, e Moser 2014; Zanluqui, Wowk, e Pinge-Filho 2015). Macrófagos podem ser polarizados em populações heterogêneas com diferentes fenótipos, sendo que modificam seus perfis de acordo com estímulos, e tem sua cinética correlacionada às células T (Fig. 2) (Juhás et al. 2015).

Macrófagos polarizados tipo M1 ou ativados de forma clássica são estimulados por moléculas de patógenos ou citocinas pró inflamatórias como  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , TLRs, GM-CSF, são caracterizados pela alta capacidade de apresentação de antígenos, atividade pró inflamatória, tumoricida, microbicida, tem potencial tóxico e dano tecidual, alta produção de NO e reativos intermediários de oxigênio. Os macrófagos polarizados tipo M2 ou de forma não clássica podem ser observados em situações fisiológicas e estão envolvidos na estagnação microbicida, remodelamento tecidual, funções imunoreguladoras, angiogênese, cicatrizante e progressão tumoral. Os macrófagos M2 são estimulados por  $TGF\beta$  (fator de crescimento tumoral beta), IL-4, IL-10 e IL-13, citocinas que tem retroalimentação com Th2 (Fig. 2) (Guiducci et al. 2005; Díaz-Gandarilla et al. 2013; N. Wang, Liang, e Zen 2014; Muraille, Leo, e Moser 2014; Zanluqui, Wowk, e Pinge-Filho 2015).



Do aspecto funcional, a produção de NO por M1 está envolvida com a destruição (incluindo células e patógenos), já produção de ornitina por M2 está envolvida com o reparo tecidual. O NO pode inibir a replicação celular, enquanto a ornitina pode estimular a divisão celular, levando a resposta imune em direções opostas, sendo que os fenótipos M1/M2 são reversíveis até certo ponto *in vitro* e *in vivo* (Mills et al. 2000; Sica e Mantovani 2012). Guiducci e colaboradores em 2005 foram um dos primeiros grupos a demonstraram a transição *in vivo* de M2 para M1 em animais modelos de tumores. Os fenótipos podem ser revertidos em processos fisiológicos e patológicos, entretanto os mecanismos que levam a configurar o fenótipo não são claros (N. Wang, Liang, e Zen 2014).

A nomenclatura M1/M2 ainda não está totalmente estabelecida, o que pode levar a confusão e também conclusões errôneas, até por que somente com marcadores de superfície não é possível diferenciar os macrófagos, mais pesquisas para caracterizar a diferenciação de macrófagos se faz necessário, até por que há uma grande diversidade entre macrófagos, o que ocorre também entre as espécies (P. J. Murray et al. 2014). O paradigma entre M1 e M2, tem sido estudado *in vitro*, e esta ativação em comparação a humanos e murinos ainda não é clara. Reynolds e colaboradores 2015 descreveram que o mapeamento de transcritos tem perfis de expressão gênica bem conservada entre macrófagos de humanos e murinos, aproximadamente

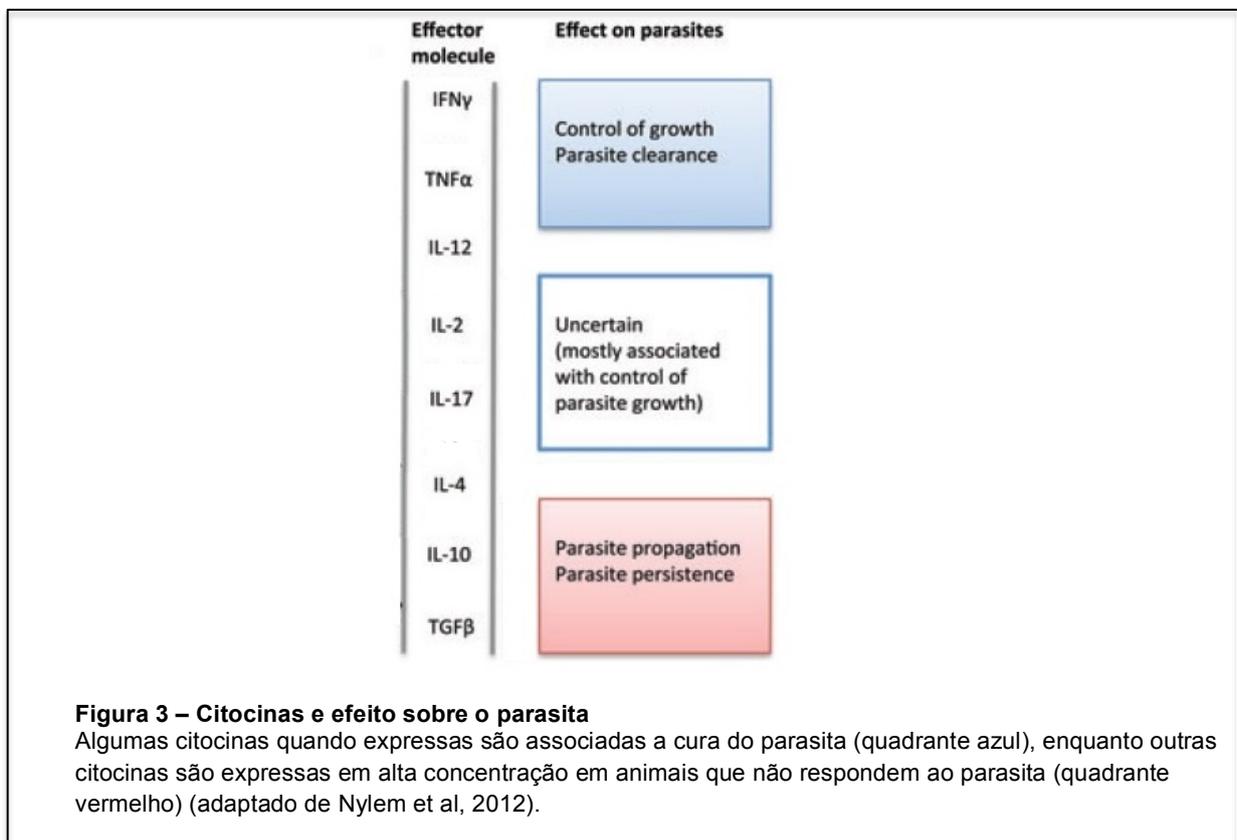
99% dos genes humanos e murinos são análogos e 96% são sintênicos, apesar das espécies terem uma divergência de 80 milhões de anos de evolução.

As principais características que afetam a resolução/cura da infecção por *Leishmania spp.* na polarização de macrófagos são as alterações de padrões de sinalização e metabolismo de aminoácidos, os quais sempre se direcionam para M2. Alteração na sinalização de vias para obtenção de nutrientes, retardar maturação de macrófagos, produzir de citocinas ou até mesmo ativar reguladores negativos são descritos em diversos parasitas como *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis*, HIV, *Leishmania spp.* entre outros, estas diferenças podem ser notadas quando avaliado os mRNA em hospedeiros infectados e não infectados. O metabolismo de L-arginina e atuação de enzimas NOS/Arg1 são também fatores ambíguos que podem levar a perpetuação de *Leishmania spp.*, L-arginina pode ser metabolizada em duas vias resultando em NO ou ornitina (poliamina e prolina), sendo que NO leva a morte do parasita, o que não ocorre na via das ornitinas, o que seria uma ótima estratégia para o escape do parasita (Harris et al. 2010; O'Shea e Murray 2008; El Kasmi et al. 2008; Lawrence e Natoli 2011; Braun et al. 2013; Muraille, Leo, e Moser 2014; de Monerri e Kim 2014).

#### 2.4. IL-12/IL-10 x Th1/Th2 x Resistência/susceptibilidade

Muitas citocinas participam da resposta imune inata, a qual possui duas respostas distintas e opostas: resposta pró e anti-inflamatória. A resposta pró-inflamatória é o principal meio de combate a parasitas, as principais citocinas envolvidas neste processo são IL-1, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . A atividade pró-inflamatória tem intuito a adesão endotelial, quimiotaxia, inflamação e produção de enzimas que levam a destruição de moléculas patogênicas. Uma outra citocina importante na resposta pró-inflamatória é a IL-12 a qual faz link entre resposta imune inata e adquirida. Por outro lado, é necessário manter a homeostase do sistema imune, pois do contrário ocorre a exacerbação da produção de proteínas que podem levar a danos teciduais, resultando em doenças. Citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$  atuam na delimitação da resposta pró-inflamatória e são essenciais para a manutenção do organismo (Dinarello 2000; Dent 2002; O'Garra e Murphy 2009; P. J. Murray e Smale 2012; Muraille, Leo, e Moser 2014).

Tanto em organismos modelos como em humanos, já é bem estabelecido que no combate da *Leishmania spp.* e diversos outros parasitas faz-se necessário o estímulo da resposta que polariza Th1. A resposta por Th1 é elicitada via citocinas produzidas por células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos. As citocinas IL-12 e IFN $\gamma$  são as principais relacionadas com polarização de Th1, sendo que progressão da Leishmaniose está associada a supressão da resposta Th1, pouca expressão de IL-12 e consequente sobreposição de resposta Th2. IL-10 é a principal citocina envolvida na retroalimentação de células Th2, esta citocina é produzida durante a ativação alterativa de macrófagos, o que limita a apresentação de antígenos, suprime a produção de citocinas inflamatórias e impede a proliferação de células Th1 (Fig. 3) (Vouldoukis et al. 1997; Couper, Blount, e Riley 2008; Chandra e Naik 2008; Cope et al. 2011; P. J. Murray e Smale 2012).



Os camundongos de linhagem Balb/c são bem estabelecidos como modelos geneticamente susceptíveis a *Leishmania spp.*, estes animais são incapazes de controlar o parasita, demonstrando sinais clínicos graves, podendo ser fatais. Os camundongos de linhagem C3H/HeN e C57BL.6 são geneticamente resistentes a maioria das espécies de *Leishmania spp.*, e muitas vezes são capazes de desenvolver a cura. Esta dualidade está estritamente relacionada ao tipo de resposta na polarização de células CD4<sup>+</sup> (Lang et al.

2003; Faria, Reis, e Lima 2012). A resposta via células T se apresenta semelhante na forma visceral e cutânea da doença, onde a polarização de Th1 está associado a cura e Th2 a persistência, entretanto o padrão de citocinas se apresenta um pouco diferente, na doença visceral é observado a produção de ambas citocinas IL-10 e IL-12 (pró e anti-inflamatórias) logo no início da infecção em baço e fígado, entretanto logo após ocorre acentuada concentração de IL-10. Já na doença cutânea a atuação de IL-10 está em alta concentração nas lesões desde o aparecimento das mesmas (Bacellar et al. 2000; H. W. Murray et al. 2002).

A família IL-12 é composta por quatro membros: IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35. IL-12 é uma citocina pró-inflamatória formada por duas subunidades (p35 e p40), as quais para a ativação correta da proteína tem que ter as subunidades expressas conjuntamente. IL-12 é expressa por diversas células incluindo macrófagos, tem sua função associada a polarização de Th1, sua cascata de sinalização está associada a Jak/STAT (Janus quinase e transdutor de sinais e ativador de transcrição), a também via MyD88 (adaptador fator 88 de diferenciação mielóide) e MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno) (Jacobson et al. 1995; Trinchieri 2003; Chandra e Naik 2008; Vignali e Kuchroo 2012). A expressão de IL-12 se dá pela colaboração entre os receptores TLRs (receptores toll-like), receptores de IFN $\gamma$  e co-estimulação de CD40 (Trinchieri 2003). Animais com nocaute em CD40 e CD40L são mais susceptíveis a *L. major*, entretanto o tratamento destes com IL-12 leva a cura das lesões e redução do número de parasitas (Okwor, Jia, e Uzonna 2015).

A transcrição de IL-12 é complexa e envolve a atuação de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (fator nuclear kapa B), ELK1/2 e AP.1, além da ativação de *enhancers* através de C/EBP, sendo que modificações epigenéticas com o posicionamento de nucleossoma e remodelamento de cromatina também são necessárias. IL-12 é extremamente necessária para o combate a infecções parasitárias e IL-10 é a principal reguladora negativa (Trinchieri 2003; Chandra e Naik 2008; Vignali e Kuchroo 2012). *L. donovani* suprime IL-12p40 através da modulação de TLR2 e TLR4, aumentando a produção de IL-10, isso ocorre devido a suprimir a atividade de p38MAPK e fosforilar ERK1/2 (Chandra e Naik 2008). IL-12 apresentou correlação inversa em relação ao número de parasitas em animais infectados com *L. major*, sendo que quanto maior o número de parasita menor a concentração de IL-12 e maior concentração de IL-10. A neutralização de IL-10 restaura a indução de IL-12 e iNOS em macrófagos de Balb/c infectados com *L. major* (Mathur et al. 2004).

A homeostase do sistema imune é essencial para a vida, IL-10 é uma citocina que tem papel central neste balanço, evitando que ocorra exacerbação, levando a ativação de moléculas anti-inflamatórias e inibição de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1, TNF $\alpha$  e IL-12. A anulação da atividade de IL-10 em animais sadios pode acarretar enfermidades como doença inflamatória intestinal a qual pode ser fatal. IL-10 é expressa em diversas células imunes, como linfócitos Th2 e também macrófagos, mastócitos, células dendríticas e outras, a produção de IL-10 por macrófagos pode inibir a resposta tipo Th1 (Dinarello 2000; Saraiva e O'Garra 2010; Vazquez, Catalan-Dibene, e Zlotnik 2015). O estímulo para a produção de IL-10 pode ser através de vários receptores como TLRs, Fc $\gamma$ Rs (receptore Fc gama) e também por CD40. A sinalização via TLRs esta associada a atividade MyD88, a qual ativa a cascata de sinalização de MAPKs e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. CREB parece ter um papel importante na modulação desta citocina em infecções por parasitas (Saraiva e O'Garra 2010; Wen, Sakamoto, e Miller 2010).

IL-10 tem sido amplamente estudada em diversos parasitas, esta citocina está associada a inabilidade dos hospedeiros em combater doenças parasitárias. Um dos pontos chaves da apresentação de sinais na doença é o desequilíbrio entre a produção de citocinas IL-4, IL-10 (aumentadas) e IL-12 e INF $\gamma$  (reduzidas), contudo a alteração de citocinas pode estar associada ao tempo de infecção e espécie do parasita (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998; Couper, Blount, e Riley 2008). O uso de IL-10 recombinante em culturas de macrófagos infectados com *L. major* e *L. infantum* levou a incapacidade da célula em combater o agente através da inativação de etapas essenciais em macrófagos, como a produção de NO (Vouldoukis et al. 1997). Do contrário, quando animais Balb/c infectados com *L. donovani* são tratados com anti-IL-10, estes eram capazes de responder a infecção (Murphy et al. 2001).

Animais Balb são susceptíveis a infecção por *Leishmania spp.*, apresentando lesões com alta concentração de IL-10 e suprimindo a atividade de IL-12p40. *L. major* estimula a produção de IL-10 através da ligação por Fc $\gamma$ R, sendo que nesta ligação o parasita se encontra opsonizado (Noben-Trauth et al. 2003; Couper, Blount, e Riley 2008). Animais Balb/c com nocaute IL-10<sup>-/-</sup> são capazes de responder a infecção por *L. major*, apresentando menor lesão e menor número de parasitas (Kane e Mosser 2001). Animais nocaute IL-10<sup>-/-</sup> susceptíveis, infectados com *L. amazonenses*, apresentam aumento de expressão de IL-12, INF $\gamma$  e IL1 $\beta$  em linfonodos, apesar do animal desenvolver a doença este apresentava menor presença do parasita (Ji, Sun, e Soong 2003). Animais resistentes C57BL/6 nocaute IL-10<sup>-/-</sup> conseguem

debelar totalmente o parasita (Belkaid et al. 2001). Em humanos a Leishmaniose cutânea, visceral e pós calazar tem sido associadas a IL10 (Ismail et al. 1999; Murphy et al. 2001; Schwarz et al. 2013).

## 2.7. Epigenética – metilação de DNA e RRBS

O termo epigenética surgiu na metade do século XX após estudos realizados correlacionando bases genéticas e embriológicas. O prefixo *epi*, do grego - por cima, apresenta uma forma de herança que se sobrepõe a herança genética com base no DNA (Waddington 2012; Muñoz-Cánoves e Di Croce 2015). Epigenética é o estudo de mecanismos que levam a modificações bioquímicas e conformacionais reversíveis e herdáveis na cromatina, podendo alterar a função do genoma. Metilação de DNA, modificação de histonas, posicionamento de nucleossoma e RNAi (RNA interferente) são exemplos de mecanismos epigenéticos, os quais são necessários para proporcionar o balanço entre transcrição e repressão, através do empacotamento do DNA, certificando a correta replicação, expressão e silenciamento gênico. Metilação de DNA é uma alteração epigenética que ocorre por adição de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição 5' de resíduos de citidinas nas sequências de dinucleotídeos CpG, descritos como 5metilcitosina (5mC) (Jones 2012; Cedar e Bergman 2012; Cedar e Bergman 2012; Stevens et al. 2013; Baubec e Schübeler 2014; Tran et al. 2014).

O genoma de mamíferos não possui distribuição homogênea de sítios CpG, existindo regiões com maior ou menor concentração. Sequências genômicas de até 2000pb com alta concentração de sítios CpG são descritos como ilhas CpG (CGI), normalmente não se encontrando metiladas homogeneamente (Jones 2012; Smith e Meissner 2013). O genoma humano contém aproximadamente 25 milhões de CpG e o genoma de camundongo 23 milhões (Deaton e Bird 2011; Stevens et al. 2013). Metilação de DNA é responsável pela regulação da expressão, silenciamento de genes no cromossomo X inativado, *imprinting* e elementos repetitivos, assim como é essencial para o desenvolvimento embrionário (Baylin e Herman 2000; Kohli e Zhang 2013; Tran et al. 2014). A avaliação da metilação é realizada em diferentes cenários dentro do genoma: promotores, enhancer, gene body e CGI; bem como a identificação de regiões diferentemente metiladas (DMR) entre tecidos, amostras,

tratamentos e até mesmo células, possibilita o melhor entendimento funcional na regulação da transcrição (Bock et al. 2010; Ziller et al. 2013; Baubec e Schübeler 2014; Baubec e Schübeler 2014).

Em animais a variação dos níveis de metilação e padrões são muito amplos, *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* tem baixos níveis de metilação de DNA enquanto que análises computacionais da sequência do genoma humano estimam que aproximadamente 60% dos genes humanos estão associados a sítios CpG, sendo 60-80% metiladas nas células somáticas e os padrões de metilação são mantidos após a mitose através de enzimas. A metilação de DNA é conservada na maioria dos grupos eucariontes, incluindo muitas plantas, animais e fungos (Bird 2002; Feng et al. 2010). Em virtude de tal conservação, é provável que a relação gene - DNA metilado seja um produto muito antigo da evolução, que ocorreu antes da divergência dos reinos, o que é evidência de uma função importante (Shenker e Flanagan 2012).

Promotores contendo dinucleotídeos CpG metilados estão associados com o fechamento das configurações da cromatina, resultando em fatores transcricionais incapazes de acessar o promotor, apesar da correlação inversa entre metilação e expressão já ter sido bem associada, não é uma regra, a correlação entre transcrição e metilação varia com o tipo de célula, local e gene analisado (Dworkin, Huang, e Toland 2009; Laird 2010; Hu et al. 2013; Schultz et al. 2015). Por algum tempo pensou-se que a metilação seria um evento transitório do metabolismo, entretanto hoje já é possível verificar que sítios de metilação são bem estabelecidos ao longo do genoma durante toda a vida do organismo e herdado durante as divisões celulares. DNA metiltransferases (DNMT) representam um grupo importante de classes de enzimas responsáveis pela promoção da metilação. Existem 5 tipos nos mamíferos (DNMT 1, 2, 3a, 3b e 3L), a manutenção da metilação do DNA durante a mitose é exercida pela DNMT1 e metilação *de novo* é realizada por DNMT3a e 3b (Veeck e Esteller 2010; Cedar e Bergman 2012; Moore, Le, e Fan 2013; Wu e Zhang 2014).

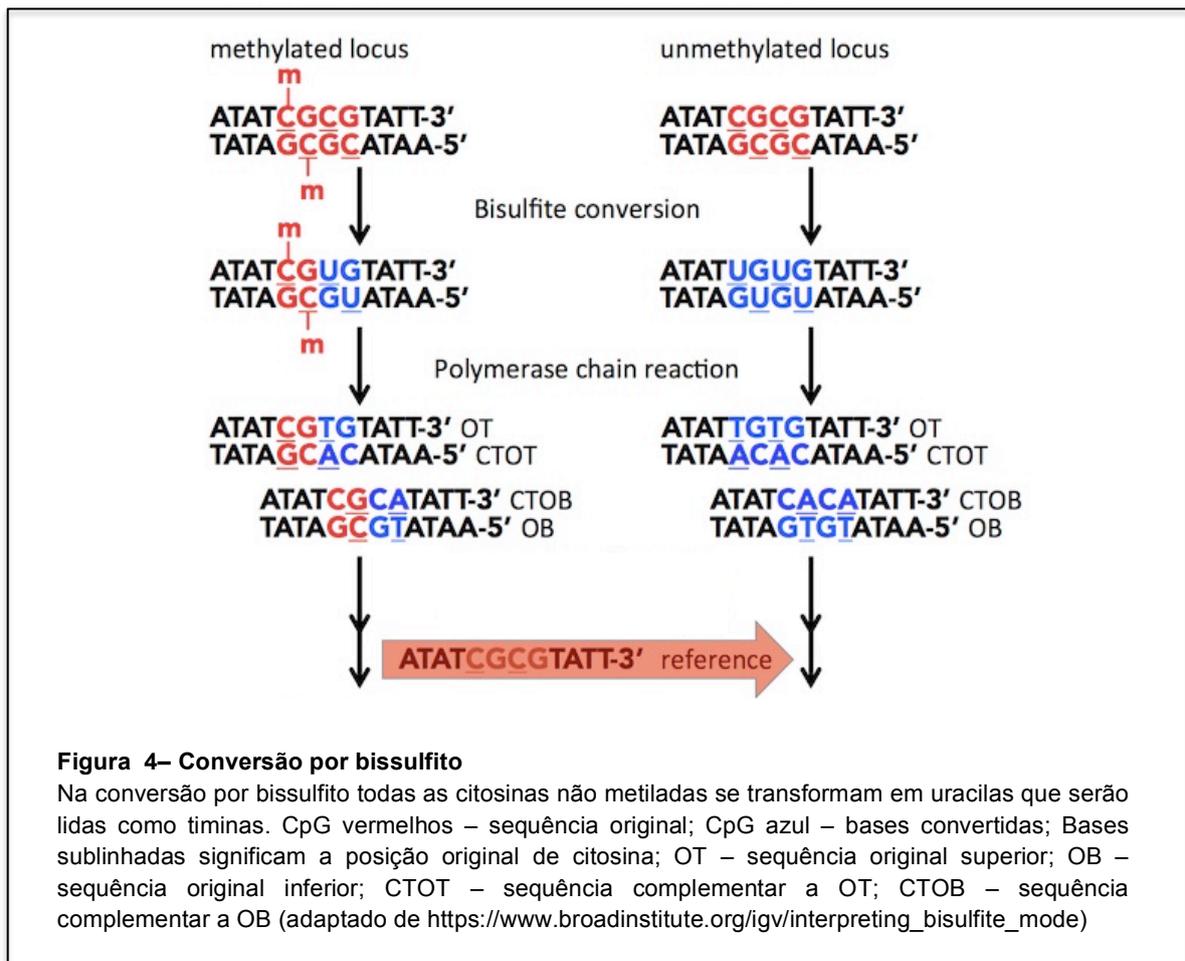
O padrão de metilação é mantido em células somáticas, entretanto a demetilação tem sido observada em estágios pré-implantação e desenvolvimento em linhagens germinativas, isso ocorre para “limpar” origens parentais durante o desenvolvimento celular, evidências sugerem que membros da família TET (enzimas de translocação dez-onze) sejam responsáveis pela demetilação. Proteínas TET são capazes de converter através de oxidação 5mC em 5 hidroximetilcitosina (5hmC), 5 formilcitosina (5fC) e 5 carboxicitosina (5caC). A

proteína Timina DNA glicosilase (TDG) está associada a etapa final de reparação de citosinas, entretanto estes processos ainda não são totalmente claros (Kohli e Zhang 2013; Wu e Zhang 2014).

### 2.7.1. Métodos de estudo de metilação de DNA

Existem muitas ferramentas de análise de metilação de DNA, o chamado metiloma se torna cada vez mais importante na pesquisa em diversas áreas. O estudo da epigenética com diversos tipos de cânceres se destaca como a maior área de interesse, diversos genes já são descritos por terem regiões diferencialmente metiladas (DMR), sendo considerados marcadores epigenéticos. Pesquisa com resistência quimioterápica, prognóstico e metástases também demonstram perfis característicos. A metilação de DNA e outros mecanismos epigenéticos estão envolvidos em praticamente todas as etapas fisiológicas e patológicas, incluindo doenças comportamentais como Autismo, doenças degenerativas como Alzheimer, doenças hormonais como diabetes. A alteração do meio ambiente, estímulos e mudanças tem impacto direto sobre os mecanismos epigenéticos, como por exemplo a poluição ambiental e ciclo cicardiano. Pesquisas recentes demonstram inclusive a influência de alterações do útero materno sobre o feto (Szyf 2012; Heyn e Esteller 2012; Gomes e Pelosi 2013; De Prins et al. 2013; Alvarado et al. 2014; Teh et al. 2014).

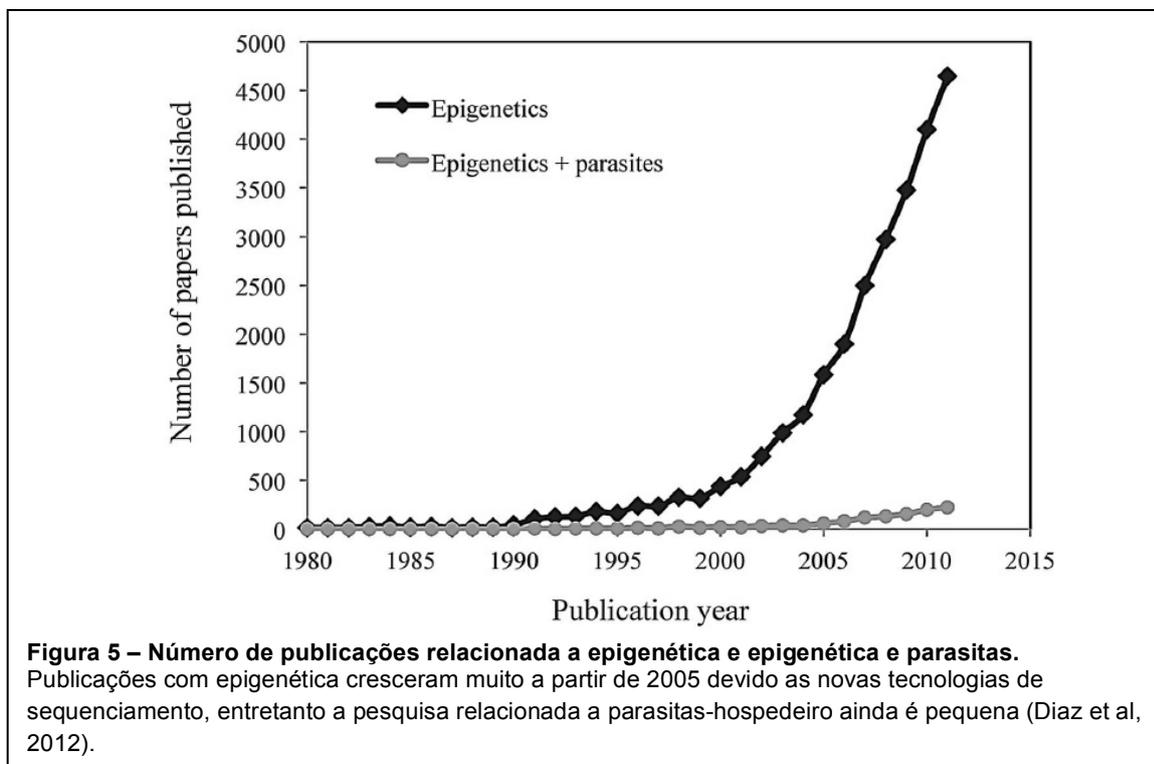
Na análise da metilação o protocolo de conversão de bissulfito é considerado o padrão ouro, onde modificações químicas ocorrem transformando citosinas e uracilas, que serão no final lidas como timinas, estas modificações se dão através de sulfonação, deaminação hidrolítica e desulfonação alcalina. Todas as citocinas metiladas não sofrem este processo permanecendo no final do sequenciamento como citosinas. A análise e alinhamento de sequências de bissulfito se mostram complexas, devido a conversão seguida de amplificação resultar em quatro diferentes sequências, nenhuma delas pareável com a sequência inicial, entretanto novas ferramentas de bioinformática têm evoluído e demonstrado bastante eficiência (Fig. 4) (Patterson et al. 2011; Xi et al. 2012; Hong et al. 2013; Tran et al. 2014; Assenov et al. 2014).



Devido ao alto custo do sequenciamento de amostras Meissener e colaboradores 2005 elaboraram a técnica RRBS, a qual permite a análise de grande número de amostras e reduzido custo. RRBS utiliza restrição enzimática através de *MspI* (C<sup>^</sup>CGG) o que enriquece o número de dinucleotídeos CpG, sendo que todos fragmentos irão conter dinucleotídeos de interesse, o que não acontece com técnicas de sequenciamento total com WGBS (*Whole genome bisulfite sequencing*), permitindo menor cobertura, conseqüente menor número de *reads* (sequências), menor custo e menor redundância (Laird 2010; Boyle et al. 2012; T. Wang et al. 2013). Comparativos entre diversas técnicas foram realizados e RRBS tem se mostrado uma ótima ferramenta, com boa cobertura, rapidez e baixo custo para o uso em larga escala (Smith et al. 2009; T. Wang et al. 2013; Chatterjee et al. 2012; Bock et al. 2010).

### 2.7.2. Epigenética e parasitas

Diversos parasitas são capazes de modificar fenótipos de seus hospedeiros, no intuito de alterar respostas para poderem sobreviver, muitas destas alterações são herdáveis e em conjunto permitiram que os dois organismos sobrevivessem durante a evolução. Tais alterações fenotípicas não são primariamente via alteração de bases gênicas, mecanismos epigenéticos oferecem ferramentas rápidas, fáceis e acessíveis a parasitas podendo ser inclusive reversíveis, entretanto o número de publicações ainda é pequeno (Fig. 5). Diversos autores já descrevem a capacidade de parasitas “sequestrar” vias metabólicas do organismo hospedeiros, tais alterações a longo prazo podem inclusive levar a consequências extremamente danosas como diferenciação, transformação e oncogênese de células (Gómez-Díaz et al. 2012; Lambertz et al. 2012; Shio et al. 2011; de Monerri e Kim 2014; Weitzman e Weitzman 2014), entretanto a forma com que parasitas “atuam” sobre o genoma ainda não é totalmente esclarecida.



No trabalho de Al-Quraishy et al 2013, foram verificadas alterações nos níveis de metilação em camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi* através de microarray, onde mais de 100 promotores apresentavam aumento ou redução dos níveis de metilação quando comparado a animais não infectados, sendo algumas destas alterações em importantes receptores como TLRs. Alteração na via de sinalização de STAT1 *in vitro* foi observada em infecções por *Toxoplasma gondii*, o que levou ao bloqueio de genes pró-inflamatórios expressos pela via IFN $\gamma$ , sendo que o parasita atua diretamente sobre a fosforilação e translocação de STAT1, ou seja alterando um fator de transcrição, o processo exato como isso ocorre não é claro (Schneider et al. 2013). O vírus da influenza H3N2 que possui uma proteína descrita NS1 (proteína 1 não estrutural), a qual mimetiza sequências de aminoácidos da cauda de histonas, o que suprime atividades gênicas pró-inflamatórias e antivirais (Marazzi et al. 2012)

Um estudo com transcriptoma de biopsias de pele de humanos infectados com *L. amazonenses* verificou mais 2000 genes diferencialmente expressos quando comparados ao tecido saudável (Novais et al. 2014), o que fica claro que ocorrem mudanças na expressão. Tais alterações podem ser devido a resposta imune do hospedeiro, entretanto Leimair et al 2013, demonstraram que o perfil de microRNAs é alterado rapidamente após a infecção *L. major*. Muitos dos microRNAs com perfis alterados participam de vias essenciais como a de receptores como TLRs e via de sinalização MyD88 e NF- $\kappa$ B. MicroRNAs já são bem estabelecidos como mecanismos epigenéticos, capazes de alterar a expressão gênica atuando sobre mRNAs.

Os diversos estudos correlacionando infecção de *Leishmania spp in vitro* se mostram heterogêneos, a utilização de células distintas variando entre macrófagos derivados de monócitos, macrófagos peritoneais até mesmo linhagens celulares como THP-1 podem ter impacto sobre os resultados encontrados, principalmente nos padrões epigenéticos (Abu-Dayyeh et al. 2008; Xin, Li, e Soong 2008; Jaramillo et al. 2011; J Ghosh et al. 2011; Marr et al. 2014). Se já é descrito as mudanças de fenótipos entre dois tipos de macrófagos (M1-M2) e alterações de histonas (Ishii et al. 2009; Juhas et al. 2015), outras alterações provavelmente são encontradas entre distintos grupos celulares. A metilação de DNA esta diretamente associada com as alterações de ambiente e o estímulo de células provavelmente altera padrões epigenéticos que podem estar envolvidos em etapas essenciais da resposta imune.

### 3. HIPÓTESE

O parasita protozoário *Leishmania spp.* é capaz de subverter etapas essenciais da resposta imune inata do hospedeiro, provavelmente devido modificações do padrão de metilação de DNA. Ensaios *in vitro* com diferentes tipos celulares e estímulos alteram o estado da metilação de DNA, levando a resultados equivocados interferindo na real interpretação da patogênese.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma zoonose de caráter emergencial e endêmica no Brasil, o que acarreta morbidade e mortalidade a população. Já é bem descrito que o parasita possui a capacidade de modular a resposta do hospedeiro, atuando sobre diversas etapas de sinalização celular e do sistema imune inato, o que leva a distintos fenótipos como a produção de enzimas e citocinas de extrema importância no combate ao patógeno, entretanto não se sabe exatamente qual o mecanismo envolvido. O estudo da interação parasita-hospedeiro possibilita a compreensão da patogênese molecular e dos mecanismos envolvidos nesta interação, ensaios *in vitro* são essenciais, sendo o principal meio de estudo da patogênese da Leishmaniose e diversas outras doenças.

Os macrófagos possuem divergências na origem, fenótipo e função, além de muitos vieses entre seus padrões de sinalização, configurar padrões em diferentes linhagens de animais, espécies de parasitas e estímulos celulares levariam a possibilidade de padronização no estudo *in vitro*, visando a melhor metodologia para se assemelhar ao *in vivo*. Alterações nos padrões de metilação de DNA podem ocorrer em reação a diversas mudanças de ambientes e estímulos, correlacionar as alterações epigenéticas básicas nos ensaios *in vitro* facilitaria a escolha do tipo celular e esclareceria o processo de manipulação da expressão de genes do hospedeiro. Esta estratégia poderia levar à novos focos sobre a capacidade adaptativa do parasita no sistema imune, sendo o que permite a perpetuação da doença. O esclarecimento deste processo também poderia levar a descoberta de novos alvos terapêuticos já que a metilação de DNA é um processo reversível e há descrições de drogas que atuam sobre esta modificação.

## 5. OBJETIVO

### 5.1. Geral

Investigar o perfil de sítios metilação de DNA em macrófagos de camundongos resistente e susceptíveis, estimulados e não estimulados com tioglicolato de sódio, infectados e controle com espécies de *Leishmania spp.* que levam a doença cutânea e visceral.

### 5.2. Específico

Triagem por RRBS de sítios de metilação de DNA em macrófagos:

- Infectados (*L. amazonenses* e *L. infantum*) e controle;
- Estimulado por Tioglicolato de sódio e sem estímulo recuperados por lavagem;
- Oriundos de camundongos susceptíveis e resistentes;

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. Animais e células

Foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c e C3H/He obtidos do CECAL-FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ LW38/13) foram eutanasiados em câmara com 90% de CO<sub>2</sub> e submetidos a lavado peritoneal e massageados com PBS pH 7.0 (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,88 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4mM; H<sub>2</sub>O q.s.p 1L). O lavado peritoneal era recuperado por aspiração e centrifugado a 1.500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio RPMI - 1640 (Sigma-Aldrich, USA), os macrófagos obtidos foram quantificados em câmara de Neubauer em microscópio de luz com o corante vital azul de trypan 0,4% (Sigma- Aldrich, USA), foram plaqueados em placas de 24 poços em uma concentração de  $2 \times 10^6$  células por poço e mantidos por 12h à 34 °C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo o meio foi retirado e as culturas lavadas com PBS pH 7.0 (o procedimento foi realizado duas vezes). A seguir 1ml de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab-BR), 200mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 10µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA) foi adicionado a cada poço e as placas mantidas à 34 °C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a elicitación com Tioglicolato (estímulo), camundongos das linhagens BALB/c e C3H/He obtidos do CECAL-FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ LW38/13) receberam injeção de 2,5 ml de Tioglicolato de sódio 5% e após cinco dias foram eutanasiados, o mesmo procedimento de recuperação, contagem e incubação utilizado nas células recuperadas por lavagem foi usado para as células elicitadas.

### 6.2. Ensaios - Infecção das células e taxa de infecção

Para a infecção dos macrófagos, culturas axênicas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* em fase estacionária foram centrifugadas a 4000rpm e ressuspendidas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, foram contadas em câmara de Neubauer na proporção de 5 parasitas por células. As promastigotas foram

deixadas em contato com as células por 12h a 34°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, em seguida o sobrenadante foi retirado e desprezado e as culturas lavadas com PBS pH 7.0 para retirada de parasitos não aderidos e acrescentado 1ml de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, BR), 200mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 10µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA). As culturas foram mantidas por mais 60 horas (total 72 horas) em 34°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realizar uma triagem sob diferentes perspectivas voltadas as alterações epigenéticas *in vitro* entre infecção, estímulo e linhagem de animais foram realizados dez ensaios com triplicatas, totalizando 30 amostras, as comparações entre estes ensaios foram definidas conforme o objetivo. Para o cálculo da taxa de infecção, os mesmos procedimentos foram realizados em poços com lamínulas redondas que, ao final de 72h, eram recolhidas, lavadas com PBS pH 7.0 (duas vezes) e fixadas com 2 gotas de BOUIN (solução aquosa saturada de ácido pícrico ~ 1,5 g%, formaldeído 37-40% e ácido acético glacial C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) por 5 min. A seguir as lamínulas foram lavadas com álcool a 70% até ser removido todo o fixador e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, USA). Para estipular a proporção de células infectadas o número de amastigotas interiorizadas em 200 células aleatórias de cada lamínula foi quantificado, em microscópio de luz.

### 6.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA as culturas foram centrifugadas a 4000g por 5 minutos e lavadas com PBS pH 7.0. Foi utilizado o protocolo manual de Fenol-Clorofórmio (Anexo A):

### 6.4. Quantificação e Pureza de DNA

As amostras de DNA foram quantificadas por fluorometria em equipamento Qubit (Qiagen, DE) por meio de Kit comercial DNA HS (Qiagen, DE) e a pureza verificada por

espectrofotometria em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) seguindo protocolo dos fabricantes.

### 6.5. Preparação de bibliotecas para RRBS

O protocolo utilizado foi baseado no descrito por Boyle et al 2012. O DNA genômico (50 a 100ng) de uma amostra de cada ensaio (10 amostras) foi digerido por enzima MspI (50U) *over night* a 37 °C, após foi realizado o reparo das extremidades de DNA e poliadenização das extremidades (*A-tailing*) com Klenow exo (5U - NEB, UK), dATP (10mM) e dCTP/dGTP (1mM- Invitrogen, USA) em termociclador (30 °C -20'; 37 °C - 20'; 75 °C- 20'). Para a ligação com os adaptadores foram usados TruSeq Adapter 1:10 (Illumina, USA), ATP (10mM - NEB, UK), T4 ligase (2.000U - NEB, UK) e tampão (Cutsmart 10x – NEB, UK), a reação foi feita em termociclador por 16 horas a 16 °C e desativação da enzima 65 °C por 20'. A purificação e seleção do tamanho de fragmento foi realizada com AMPure XP beads (Beckman Coulter, DE) seguindo o protocolo do fabricante já descrito, após foi realizado a conversão por bissulfito por Kit comercial ZYMO EZ DNA Methylation Gold (Zymo, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Por último foi realizada a amplificação da biblioteca em termociclador (Anexo B).

As amostras eram novamente purificadas por AMPure XP beads (Beckman Coulter, DE), conforme o protocolo já descrito.

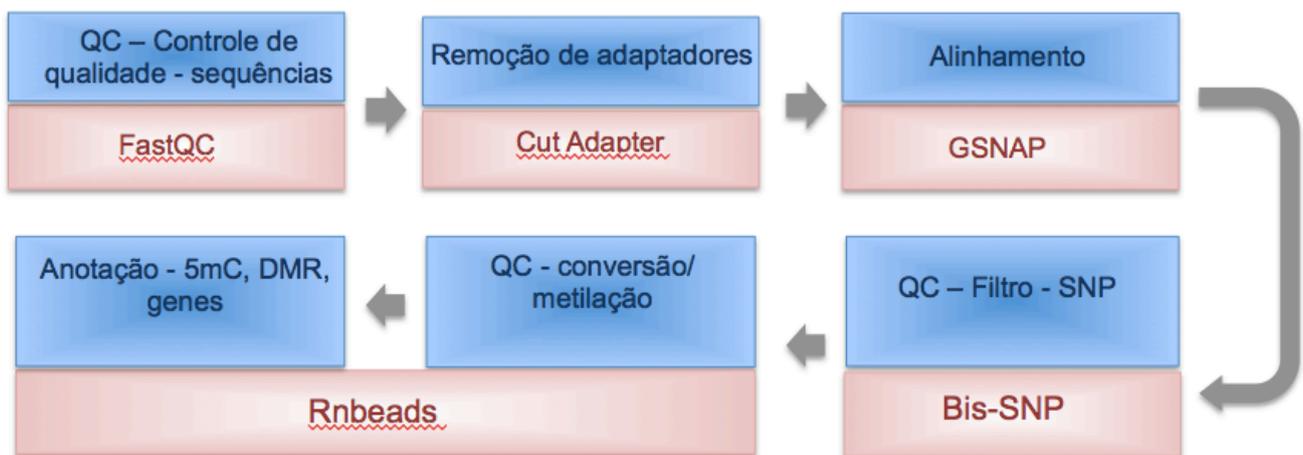
### 6.6. Quantificação e qualidade de bibliotecas e Sequenciamento

Para a quantificação inicial da biblioteca foi utilizado fluorometria em equipamento Qubit (Qiagen, DE) por meio de Kit comercial DNA HS (Qiagen, DE), em seguida análise por eletroforese microdiluída em equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) era realizada para verificar a qualidade e concentração final das bibliotecas, bem como PCR em tempo real. As amostras foram sequenciadas no equipamento

HiSeq 2500 Sequencing System (Illumina, USA) em pool, em dois canais na célula de fluxo (*flow cell*) na Universidade do Sarre (Alemanha).

### 6.7. Análise de RRBS – Bioinformática

Os dados gerados pelo de sequenciamento *single-end* de bibliotecas na concentração de 4-10pmol utilizando o equipamento HiSeq 2500, foram analisados no centro de bioinformática de genética da Universidade do Sarre (Alemanha). A análise das sequencias (*reads*) obtidas pelo equipamento eram realizadas seguindo o fluxo de trabalho a seguir:



FastQC - <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Cut Adapter - <http://cutadapt.readthedocs.org/en/stable/index.html>

GSNAP - <http://research-pub.gene.com/gmap/>

Bis- SNP - <http://people.csail.mit.edu/dnaase/bissnp2011/>

Rnbeads - <http://rnbeads.mpi-inf.mpg.de/index.php>

A ferramenta Rnbeads é capaz de avaliar 5 diferentes regiões dentro do genoma: RRBS (análise baseada *in silico* de 1kb, usada como certificado), *tiling* (janelas de 5kb), promotores, genes e CpGI.

## 7. RESULTADOS

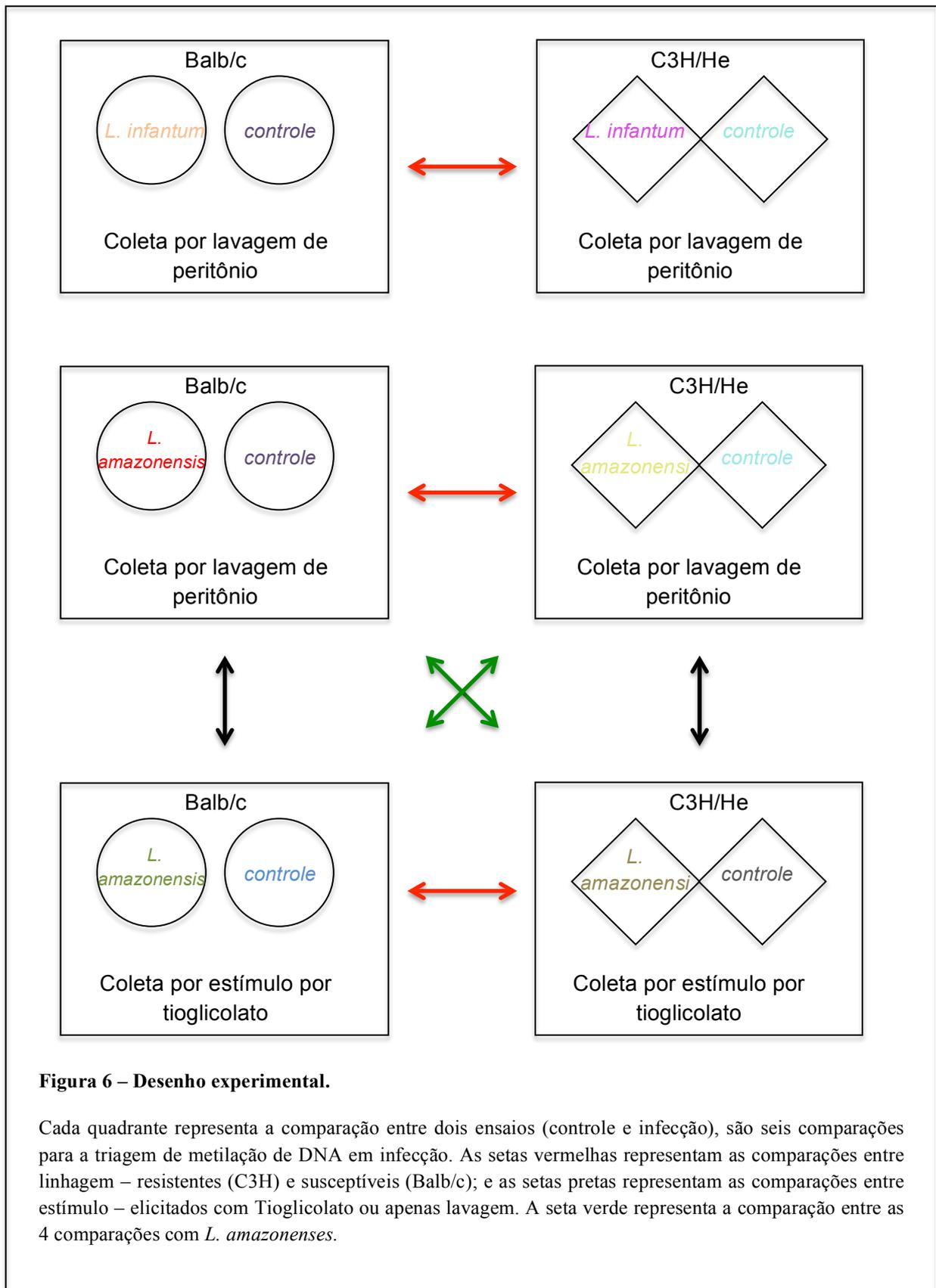
### 7.1. Ensaio

O número dos ensaios finais, total 10 com suas triplicatas é descrito na tabela 1, cada cor significa um ensaio realizado em animais resistentes (C3H/He) e susceptíveis (Balb/c). A média da taxa de infecção ficou entre 75% nas triplicatas de Balb/c e 70% para C3H/He. As comparações entre estes ensaios foram definidas conforme o objetivo e são demonstradas no desenho experimental (figura 6), relacionando os ensaios e comparações. A amostra 26 foi perdida durante o envio.

Tabela 1 – Lista completa de ensaios e triplicatas

Nº	Ensaio
1	DNA Macrófagos c/Tioglicolato – BALB/c – Sem infecção
2	DNA Macrófagos – c/Tioglicolato – BALB/c - <i>L. amazonensis</i>
3	DNA Macrófagos – BALB/c – Sem infecção
4	DNA Macrófagos – BALB/c – <i>L. infantum</i>
5	DNA Macrófagos – BALB/c – Sem infecção
6	DNA Macrófagos – c/Tioglicolato – BALB/c - <i>L. amazonensis</i>
7	DNA Macrófagos – c/Tioglicolato – BALB/c - <i>L. amazonensis</i>
8	DNA Macrófagos – BALB/c – <i>L. amazonensis</i>
9	DNA Macrófagos – BALB/c – <i>L. infantum</i>
10	DNA Macrófagos – BALB/c – <i>L. amazonensis</i>
11	DNA Macrófagos – BALB/c – Sem infecção
12	DNA Macrófagos – BALB/c – <i>L. amazonensis</i>
13	DNA Macrófagos c/Tioglicolato – BALB/c – Sem infecção
14	DNA Macrófagos c/Tioglicolato – BALB/c – Sem infecção

- 15 DNA Macrófagos – BALB/c – *L. infantum*
- 16 DNA Macrófagos c/Tioglicolato – C3H/He – Sem infecção
- 17 DNA Macrófagos C/Tioglicolato– C3H/He – *L. amazonensis*
- 18 DNA Macrófagos – C3H/He *L. infantum*
- 19 DNA Macrófagos c/Tioglicolato – C3H/He – Sem infecção
- 20 DNA Macrófagos – C3H/He *L. infantum*
- 21 DNA Macrófagos c/Tioglicolato – C3H/He – Sem infecção
- 22 DNA Macrófagos C/Tioglicolato– C3H/He – *L. amazonensis*
- 23 DNA Macrófagos – C3H/He *L. infantum*
- 24 DNA Macrófagos – C3H/He sem infecção
- 25 DNA Macrófagos C/Tioglicolato– C3H/He – *L. amazonensis*
- 26 DNA Macrófagos – C3H/He – *L. amazonensis*
- 27 DNA Macrófagos – C3H/He sem infecção
- 28 DNA Macrófagos – C3H/He – *L. amazonensis*
- 29 DNA Macrófagos – C3H/He sem infecção
- 30 DNA Macrófagos – C3H/He – *L. amazonensis*
-



**Figura 6 – Desenho experimental.**

Cada quadrante representa a comparação entre dois ensaios (controle e infecção), são seis comparações para a triagem de metilação de DNA em infecção. As setas vermelhas representam as comparações entre linhagem – resistentes (C3H) e susceptíveis (Balb/c); e as setas pretas representam as comparações entre estímulo – elicitados com Tioglicolato ou apenas lavagem. A seta verde representa a comparação entre as 4 comparações com *L. amazonenses*.

## 7.2. Quantificação e Pureza do DNA

A tabela 2 apresenta a quantificação das amostras por fluorometria, enquanto que o quadro 1 apresenta a concentração e a pureza segundo espectrofotometria. No quadro 1 na absorvância de 260/270 o ideal esperado é acima de 2, demonstrando não ter resquícios de fenol.

Tabela 2 - Quantificação da concentração inicial de DNA por fluorometria – Qubit (Qiagen DE):

<b>Amostra</b>	<b>Concentração ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>Amostra</b>	<b>Concentração ng/<math>\mu</math>l</b>
1	53,3	16	41,4
2	66,7	17	53,2
3	19,4	18	1,63
4	36,4	19	25,4
5	18,6	20	0,428
6	58,7	21	28,3
7	63,4	22	80,3
8	37	23	1,34
9	19	24	1,82
10	41,2	25	66,8
11	12,2	27	1,32
12	33,6	28	0,562
13	25,2	29	1,82
14	32,8	30	1,7
15	11,7		

Quadro 1 - Quantificação e pureza do DNA inicial por espectrofotometria – NanoDrop (Thermo Scientific, USA):

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	1	AK Walter	01.09.2015 14:23:50	98,4	ng/µl	1,968	1,017	1,93	2,14	DNA	50,00
2	2	AK Walter	01.09.2015 14:24:35	191,1	ng/µl	3,823	1,905	2,01	2,22	DNA	50,00
3	3	AK Walter	01.09.2015 14:25:10	38,0	ng/µl	0,759	0,397	1,91	2,14	DNA	50,00
4	4	AK Walter	01.09.2015 14:25:55	64,3	ng/µl	1,287	0,666	1,93	2,11	DNA	50,00
5	5	AK Walter	01.09.2015 14:26:35	29,7	ng/µl	0,595	0,306	1,95	2,23	DNA	50,00
6	6	AK Walter	01.09.2015 14:27:29	161,0	ng/µl	3,220	1,604	2,01	2,20	DNA	50,00
7	7	AK Walter	01.09.2015 14:28:16	198,1	ng/µl	3,963	1,961	2,02	2,22	DNA	50,00
8	8	AK Walter	01.09.2015 14:28:47	85,3	ng/µl	1,706	0,844	2,02	2,27	DNA	50,00
9	9	AK Walter	01.09.2015 14:29:31	31,0	ng/µl	0,621	0,330	1,88	2,11	DNA	50,00
10	10	AK Walter	01.09.2015 14:30:06	100,7	ng/µl	2,014	1,007	2,00	2,24	DNA	50,00
11	11	AK Walter	01.09.2015 14:30:35	17,4	ng/µl	0,348	0,200	1,74	2,10	DNA	50,00
12	12	AK Walter	01.09.2015 14:31:20	74,6	ng/µl	1,492	0,755	1,98	2,27	DNA	50,00
13	13	AK Walter	01.09.2015 14:31:51	97,3	ng/µl	1,945	0,972	2,00	2,19	DNA	50,00
14	14	AK Walter	01.09.2015 14:32:23	92,9	ng/µl	1,857	0,933	1,99	2,22	DNA	50,00
15	15	AK Walter	01.09.2015 14:32:51	19,5	ng/µl	0,391	0,218	1,79	2,12	DNA	50,00
16	16	AK Walter	01.09.2015 14:33:25	168,0	ng/µl	3,361	1,662	2,02	2,19	DNA	50,00
17	17	AK Walter	01.09.2015 14:33:59	155,2	ng/µl	3,104	1,551	2,00	2,20	DNA	50,00
18	18	AK Walter	01.09.2015 14:34:28	6,0	ng/µl	0,119	0,062	1,91	2,35	DNA	50,00
19	19	AK Walter	01.09.2015 14:35:18	160,2	ng/µl	3,204	1,556	2,06	2,21	DNA	50,00
20	20	AK Walter	01.09.2015 14:35:49	3,1	ng/µl	0,063	0,050	1,25	1,56	DNA	50,00
21	21	AK Walter	01.09.2015 14:36:46	137,8	ng/µl	2,755	1,361	2,02	2,15	DNA	50,00
22	22	AK Walter	01.09.2015 14:37:23	201,6	ng/µl	4,031	2,018	2,00	2,19	DNA	50,00
23	23	AK Walter	01.09.2015 14:37:52	6,7	ng/µl	0,135	0,090	1,50	2,26	DNA	50,00
24	24	AK Walter	01.09.2015 14:38:32	6,2	ng/µl	0,125	0,081	1,54	2,11	DNA	50,00
25	25	AK Walter	01.09.2015 14:39:04	216,2	ng/µl	4,323	2,151	2,01	2,19	DNA	50,00
26	27	AK Walter	01.09.2015 14:39:34	7,9	ng/µl	0,158	0,092	1,73	2,75	DNA	50,00
27	28	AK Walter	01.09.2015 14:40:08	2,8	ng/µl	0,055	0,023	2,36	1,65	DNA	50,00
28	29	AK Walter	01.09.2015 14:40:46	2,8	ng/µl	0,055	0,032	1,74	2,30	DNA	50,00
29	30	AK Walter	01.09.2015 14:41:19	8,7	ng/µl	0,175	0,085	2,05	2,42	DNA	50,00

Devido a baixa concentração das amostras 18, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30 foi realizada novamente o procedimento de purificação do DNA por AMPure XP beads com o volume inicial de 30µl de DNA.

Tabela 3 - Quantificação das amostras de DNA purificado pela segunda vez por fluorometria – Qubit (Qiagen, DE):

Amostra	Concentração ng/µl	Amostra	Concentração ng/µl
18	6,8	27	3,25
20	1,27	28	1,31
23	3,38	29	4,25
24	4,83	30	4,93

Quadro 2 - Quantificação e pureza do DNA purificado pela segunda vez por espectrofotometria – NanoDrop (Thermo Scientific, USA):

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	20	AK Walter	02.09.2015 18:45:22	7,0	ng/µl	0,140	0,076	1,84	1,71	DNA	50,00
2	18	AK Walter	02.09.2015 18:45:57	19,9	ng/µl	0,397	0,189	2,10	2,15	DNA	50,00
3	23	AK Walter	02.09.2015 18:46:31	13,6	ng/µl	0,272	0,126	2,16	2,70	DNA	50,00
4	24	AK Walter	02.09.2015 18:47:03	14,4	ng/µl	0,287	0,136	2,11	2,25	DNA	50,00
5	27	AK Walter	02.09.2015 18:47:32	7,8	ng/µl	0,157	0,086	1,82	1,92	DNA	50,00
6	28	AK Walter	02.09.2015 18:48:01	5,9	ng/µl	0,117	0,058	2,02	1,68	DNA	50,00
7	29	AK Walter	02.09.2015 18:48:29	8,8	ng/µl	0,175	0,085	2,06	2,02	DNA	50,00
8	30	AK Walter	02.09.2015 18:49:03	29,4	ng/µl	0,588	0,282	2,08	2,21	DNA	50,00

### 7.3. Quantificação e Qualidade de Bibliotecas

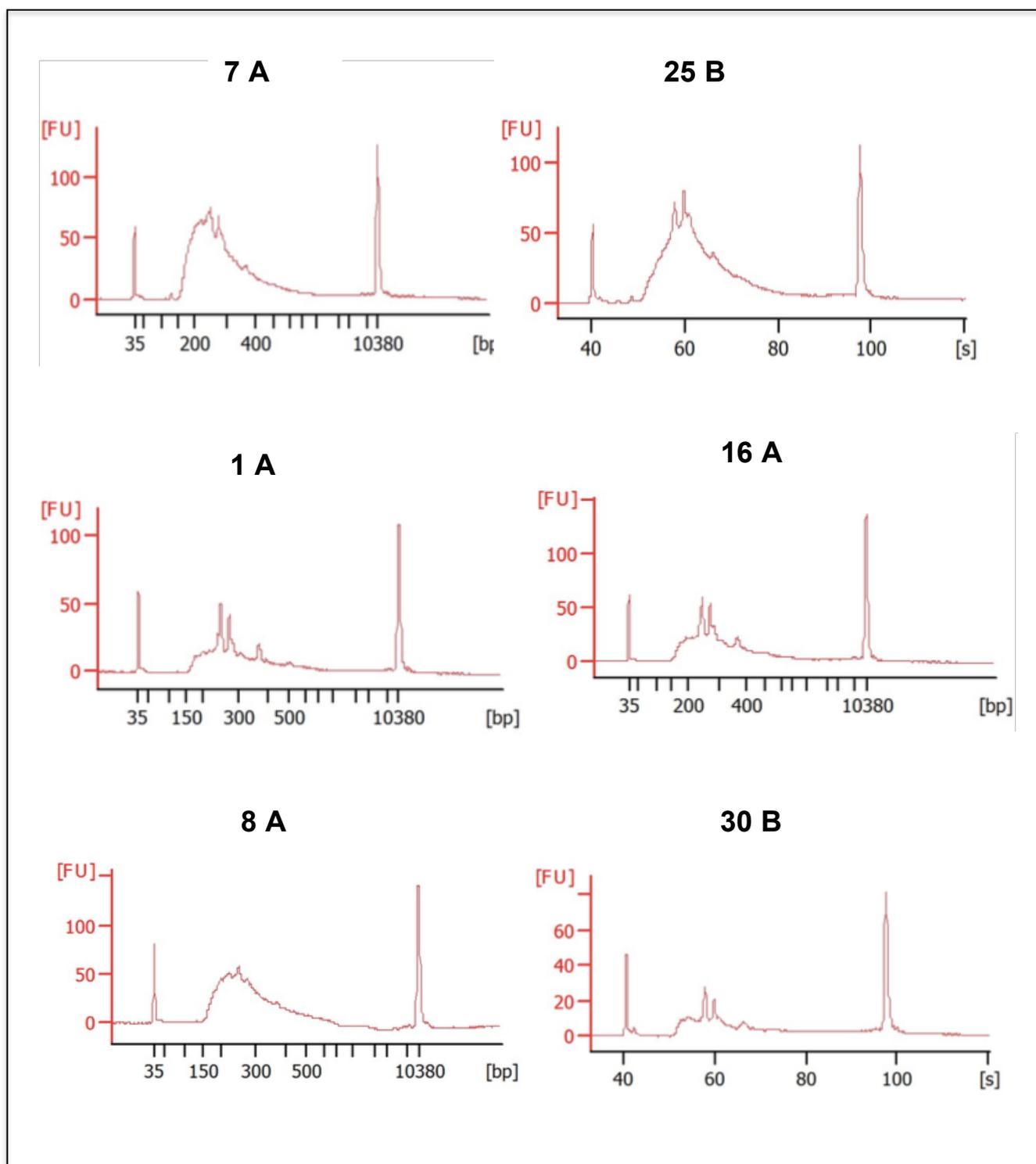
O resumo da descrição das bibliotecas com o a descrição da amostra, número da amostra, a concentração final através de fluorometria, adaptadores utilizados, infecção, linhagem e estímulo são apresentados na Tabela 4, sendo o total de 10 bibliotecas, um representante de cada ensaio. A figura 7 apresenta os gráficos das 10 bibliotecas obtidos em equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) para se certificar da concentração e o tamanhos dos fragmentos amplificados. A maior concentração de fragmentos se encontra entre aproximadamente 150 e 400bp, como já esperado devido a atividade da enzima MspI levar a fragmentos de 40 a 220pb.

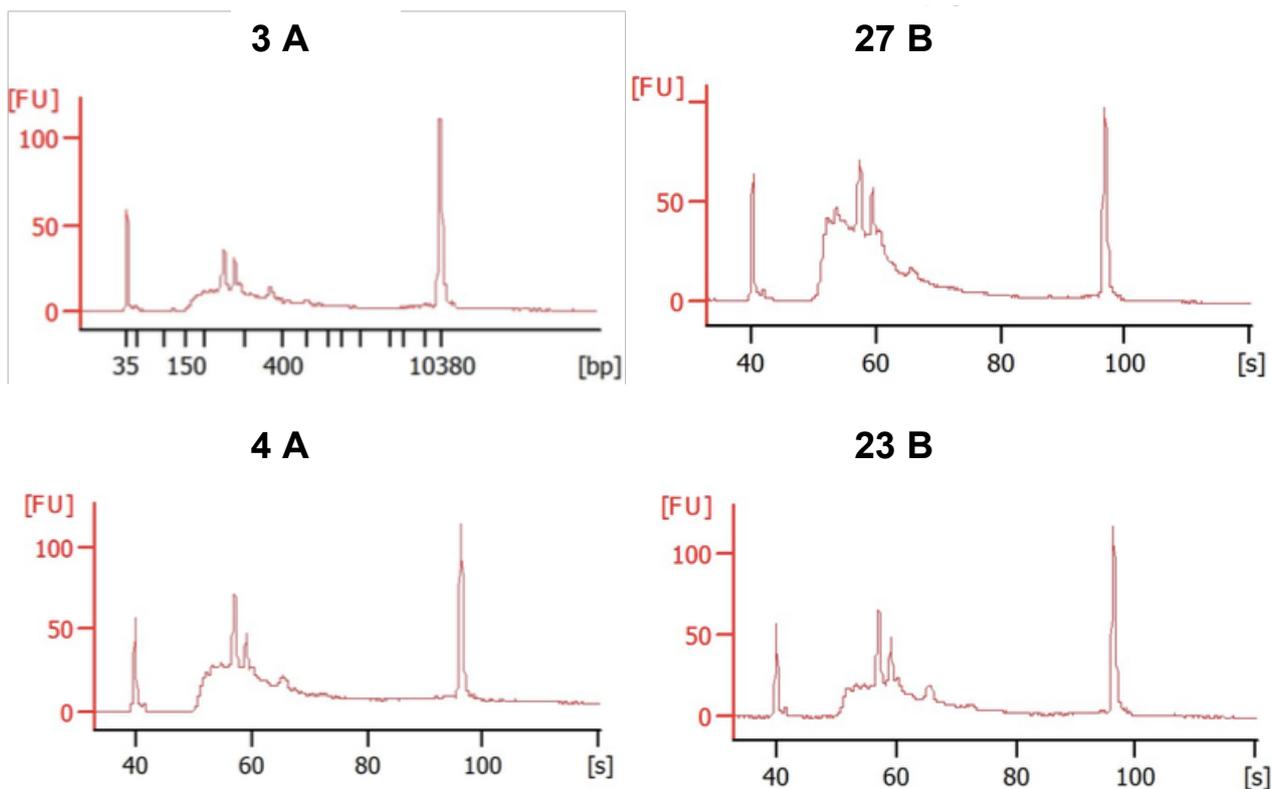
Tabela 4 - Quantificação de bibliotecas por fluorometria – Qubit (Qiagen, DE), identificação, número do ensaio, concentração, número do adaptador, infecção, linhagem e estímulo usado:

Descrição	N.	Concentração (ng/ml)	Adaptador	Infecção	Estímulo	Linhagem
Balb/c - TIO - <i>L. amazonensis</i>	7A	2.6	#15	Sim	sim	Balb
Balb /c- TIO - s/infec	1A	0.9	#6	Não	sim	Balb
Balb/c – <i>L. amazonensis</i>	8A	1.4	#16	Sim	não	Balb
Balb/c - s/infecção	3A	0.8	#2	Não	não	Balb
Balb/c – <i>L. infantum</i>	4A	1.0	#5	Sim	não	Balb
C3H/He - TIO - <i>L. amazonensis</i>	25A	1.5	#16	Sim	sim	C3H
C3H/He - TIO - s/infec	16A	1.0	#12	Não	sim	C3H

C3H/He – <i>L.amazonensis</i>	30B	0.46	#19	Sim	não	C3H
C3H/He - s/infecção	27B	1.0	#13	Não	não	C3H
C3H/He <i>L. infantum</i>	23B	0.84	#2	Sim	não	C3H

A – biblioteca realizada a partir de 100 ng; B – Biblioteca realizada a partir de 50ng.





**Figura 7 - Qualidade de biblioteca por eletroforese microdiluída Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA).**

Os gráficos gerados dos 10 ensaios - 7A, 25A, 1A, 16A, 8A, 30B, 3A, 27B, 4A e 23B demonstram que os fragmentos se encontram dentro do tamanho de 150 a 400bp, os marcadores podem ser visualizados com pico em 35bp e 10380bp.

## 7.4. Análise das sequencias

### 7.4.1. Qualidade de sequencias

O software FastQC foi utilizado para a primeira análise das sequências brutas, este programas analisa diversos parâmetros, sendo que para a continuação da análise por RRBS os dois primeiros parâmetros (estatística descritiva e qualidade de bases) são de extrema

importância, casos estes estejam dentro do esperado, os outros parâmetros podem ser filtrados para adequar a qualidade das amostras.

#### 7.4.2. Estatística descritiva

Nesta análise inicial são quantificados os números de sequências (*reads*) e os erros. O número total de sequências dos 10 ensaios se encontra na tabela 5. Nenhum erro ou sequências degradadas foram relatados.

Tabela 5 –Número de sequências brutas (*reads*) após sequenciamento em Hiseq 2500.

<b>Amostra</b>	<b>N.</b>	<b>Sequenciamento I</b>	<b>Sequenciamento II</b>	<b>Total</b>
<b>Balb - TIO - Ama</b>	<b>7A</b>	33746157	33540474	67286631
<b>Balb - TIO - s/infec</b>	<b>1A</b>	28678961	28046537	56725498
<b>Balb - Ama</b>	<b>8A</b>	22485216	22330438	44815654
<b>Balb - s/infec</b>	<b>3A</b>	23215222	22227608	45442830
<b>Balb - Infantum</b>	<b>4A</b>	41570137	70836294	112406431
<b>C3H - TIO - Ama</b>	<b>25A</b>	22997970	26598098	49596068
<b>C3H - TIO - s/infec</b>	<b>16A</b>	27352087	22238298	49590385
<b>C3H - Ama</b>	<b>30B</b>	33834260	32348523	66182783
<b>C3H - s/infec</b>	<b>27B</b>	42725388	34516331	77241719
<b>C3H infantum</b>	<b>23B</b>	39583588	25023349	64606937

O número de sequências está separado em dois grupos (I e II) devido a quantidade de sequências na primeira célula não atingir o valor necessário para as análises (40 – 50 milhões de *reads*).

### 7.4.3. Qualidade de bases na sequencia

A qualidade das sequências brutas (sem filtro) são demonstradas no anexo C. Esta análise tem como resultado um gráfico box plots que demonstra a qualidade das bases ao longo da sequência. No eixo *y* pode ser visto o score de qualidade baseado em Phread (Ewing e Green 1998), onde o ideal é que as amostras estejam dentro do quadrante verde, o score de 30 representa 1 erro em 1000 e o score de 40 representa 1 erro em 10000, e no eixo *x* as bases dentro da sequência. É normal que a qualidade das bases caia conforme o final da sequência.

### 7.5. Cobertura (*coverage*)

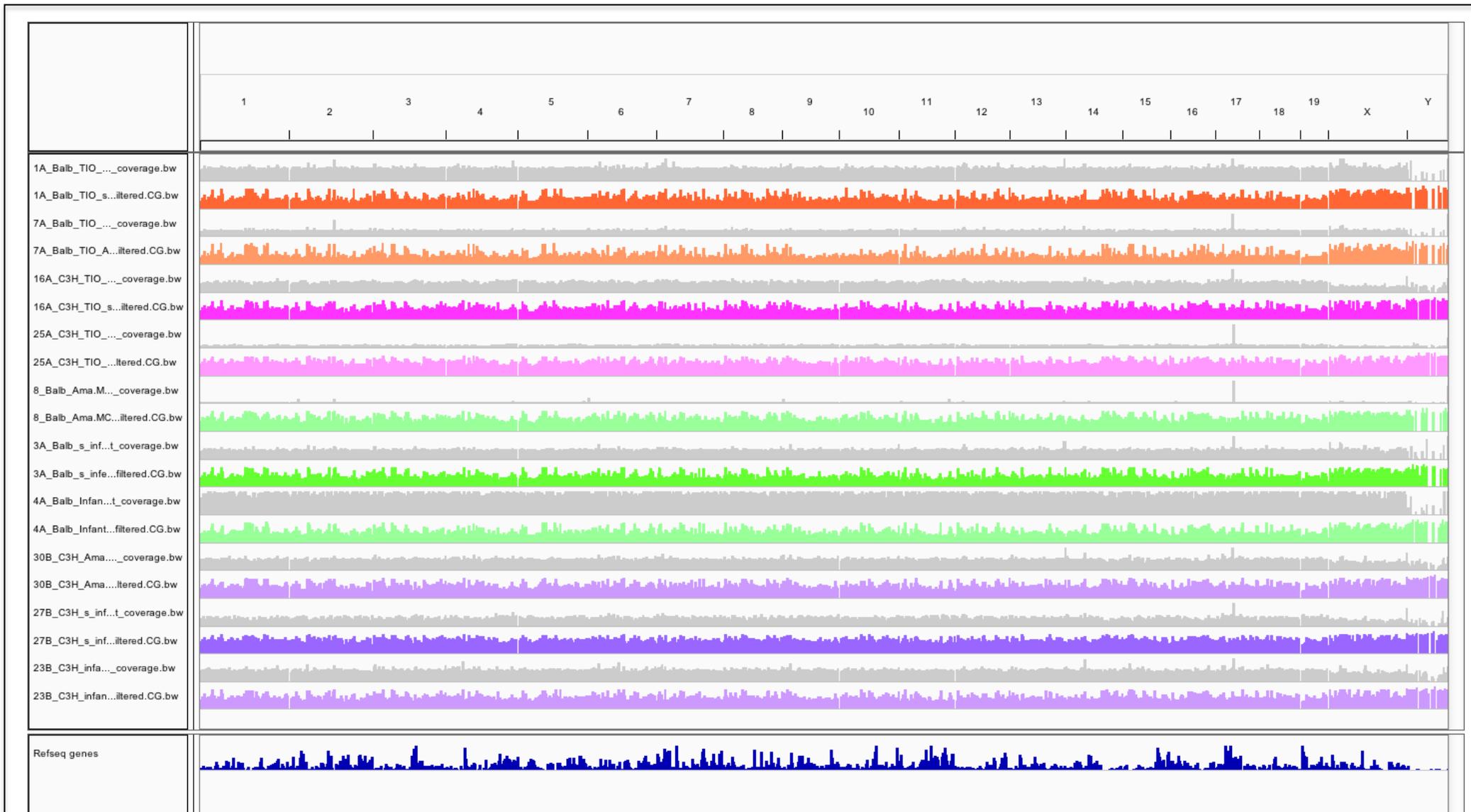
Após as sequências serem filtradas para remoção dos adaptadores, alinhadas e descartados os SNP (*single nucleotide polymorphism*), as amostras foram submetidas ao controle de qualidade de cobertura. O nível de cobertura é o número médio de sequências alinhadas em um determinado seguimento, o que permite um grau de confiança para a base referida (<http://www.illumina.com/science/education/sequencing-coverage.html>). A tabela 6 apresenta os dados obtidos da análise de cobertura incluindo: média da cobertura dos sítios CpG, número total de sítios CpG e mediana da cobertura dos sítios CpG. A figura 8 representa a visualização através de IGV (Integrative genomics viewer) (Thorvaldsdottir, Robinson, e Mesirov 2013) da cobertura total do genoma das dez amostras analisadas e seus sítios, o que se espera para uma possível comparação é que as amostras tenham a média da cobertura semelhante para que possa ser realizada as comparações, algumas amostras apresentaram cobertura excelente descrita como cobertura profunda “*deph*” (50x), contudo o número de cobertura utilizado para as análises foi estipulado em 5X o mínimo.

Tabela 6 – Cobertura das amostras

<b>Amostra</b>	<b>Total sites</b>	<b>Média (cobertura)</b>	<b>Mediana (cobertura)</b>
<b>8A_Balb_Ama</b>	1802128	4,266189194	2

<b>3A_Balb_s_infec</b>	2090098	29,66706394	9
<b>4A_Balb_Infantum</b>	1977075	64,14751388	16
<b>30B_C3H_Ama</b>	2472888	32,92308305	6
<b>27B_C3H_s_infec</b>	4053686	26,92694057	3
<b>23B_C3H_infantum</b>	2356453	33,37454471	6
<b>7A_Balb_TIO_Ama</b>	1566012	20,04327234	12
<b>1A_Balb_TIO_s_infec</b>	1946184	40,74306592	15
<b>25A_C3H_TIO_Ama</b>	2945336	8,944355415	2
<b>16A_C3H_TIO_s_infec</b>	2328073	31,51667796	7

---



**Figura 8- Visualização geral dos sítios de metilação de DNA e cobertura**

Os picos cinzas representam a média de cobertura nas diferentes amostras, as cores laranja representam macrófagos de Balb/c estimulados por Tioglicolato (1A controle, 7A *L. amazonensis*); as cores rosa representam macrófagos de C3H/he com estímulo por Tioglicolato (16A controle, 25A *L. amazonensis*); as cores verde representam macrófagos de Balb/c (8A *L. amazonensis*, 3A controle, 4A *L. infantum*); as cores roxa representam macrófagos de C3H/he (30B *L. amazonensis*, 27B controle, 23B *L. infantum*). Os números no topo se referem aos cromossomos, abaixo o gene de referência (azul) e a esquerda a identificação das amostras.

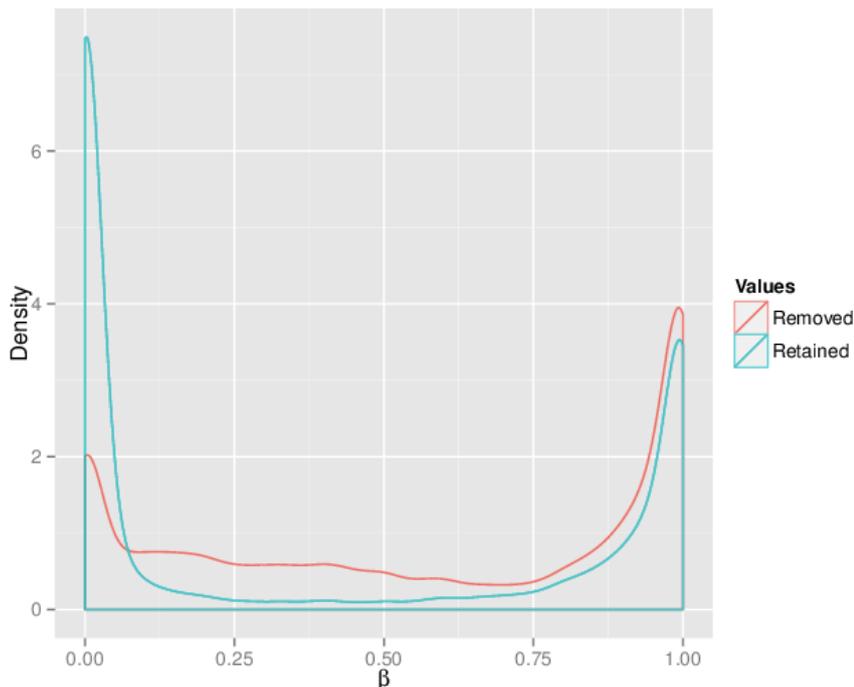
## 7.6. Análise por Rnbeads

Rnbeads é um pacote baseado em R para a análise de metilação de DNA, possuindo uma vasta gama de ferramenta para análise de RRBS, WGBS e 450 array. A tabela com a tabulação da anotação para *input* em Rnbeads, para as comparações entre as amostras se encontra no anexo I.

### 7.6.1 Remoção de sítios

Para a melhor qualidade das análises um total de 11461324 sítios com cobertura abaixo de 5x e 229919 sítios do cromossomo X (o cromossomo X inativado apresenta alta concentração de metilação de DNA, o que poderia influenciar na análise) foram removidos, a figura 9 representa a distribuição  $\beta$  da metilação de DNA dos valores retirados e preservados.

### 7.6.2 - Análises exploratórias - Regiões de anotação



**Figura 9 - Distribuição  $\beta$  dos sítios de removidos e mantidos**

Os sítios removidos com baixa cobertura ou pertencentes ao cromossoma X. Valores removidos se encontram em laranja e os mantidos em turquesa

O número total de anotações destas regiões dentre todas as amostras se encontra na tabela 7, a tabela 8 demonstra o número das regiões nas amostras individuais.

Tabela 7 – Número total de anotações nas regiões avaliadas

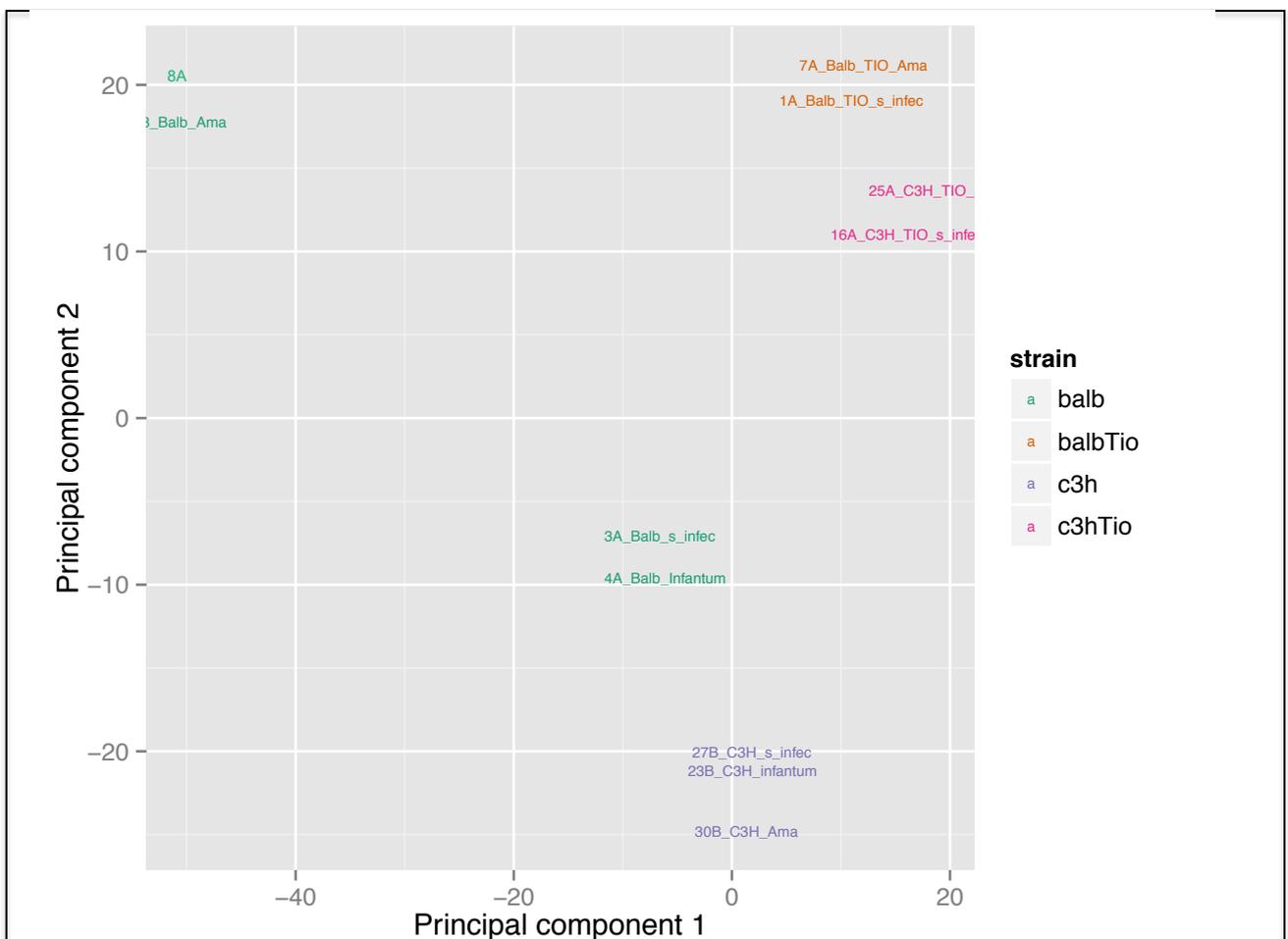
<b>Região</b>	<b>Total</b>
RRBS	207981
<i>Tiling</i>	467975
Genes	29289
Promoters	32984
CpGI	15328

Tabela 8 – Número de anotações das regiões por amostra

<b>Amostra</b>	<b>RRBS</b>	<b><i>Tiling</i></b>	<b>Genes</b>	<b>Promotores</b>	<b>CpGI</b>
8A_Balb_Ama	80519	84838	18315	15377	12455
3A_Balb_s_infec	131373	128684	20546	18401	14240
4A_Balb_Infantum	146179	155576	21252	19165	14317
30B_C3H_Ama	151686	184685	21773	19875	14269
27B_C3H_s_infec	170478	222849	22707	21468	14567
23B_C3H_infantum	143572	158238	21268	19212	14287
7A_Balb_TIO_Ama	116130	114080	20044	17711	14066
1A_Balb_TIO_s_infec	134511	130011	20594	18472	14266
25A_C3H_TIO_Ama	119608	119023	20181	17878	14017
16A_C3H_TIO_s_infec	134889	130699	20588	18484	14263

### 7.6.3. Redução dimensional

A análise de componentes principais (PCA) é um método de redução dimensional que permite a comparação entre um conjunto de dados onde é possível estabelecer modelos preditivos de padrão/aproximação entre variáveis (Wold et al. 1990). A figura 10 apresenta a distribuição de sítios de metilação de DNA através de PCA dentre todos os ensaios .

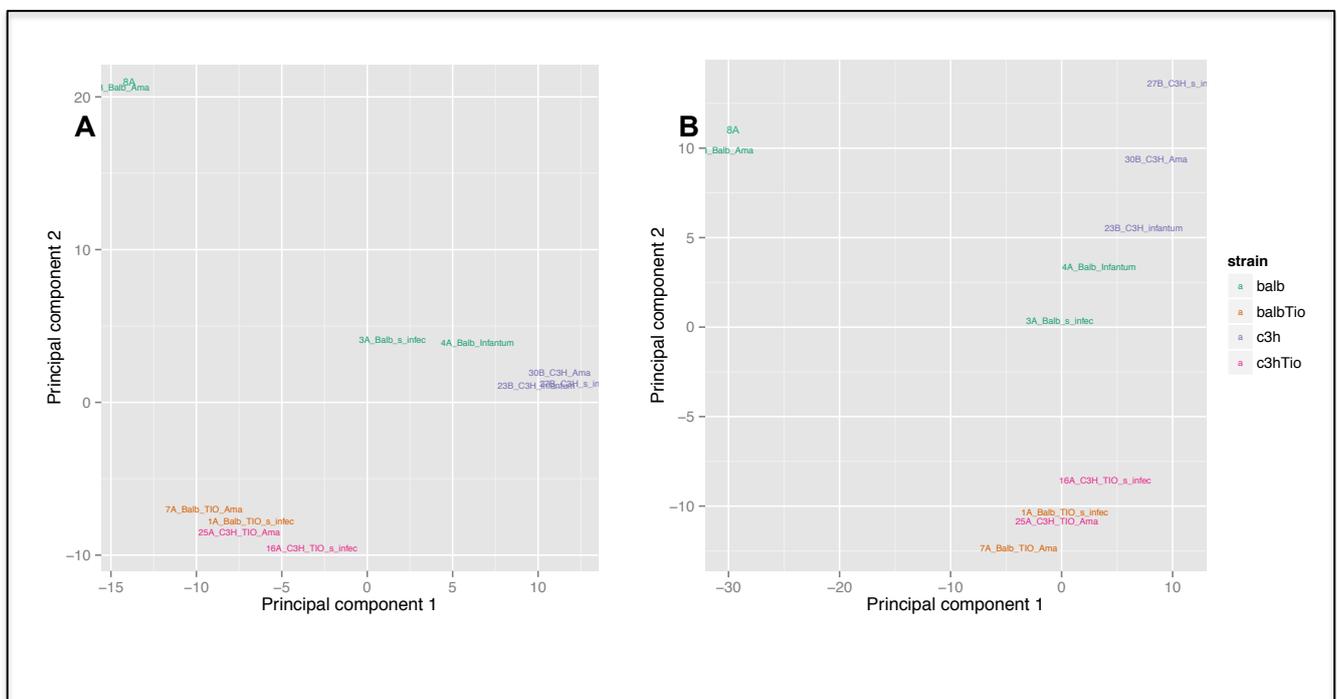


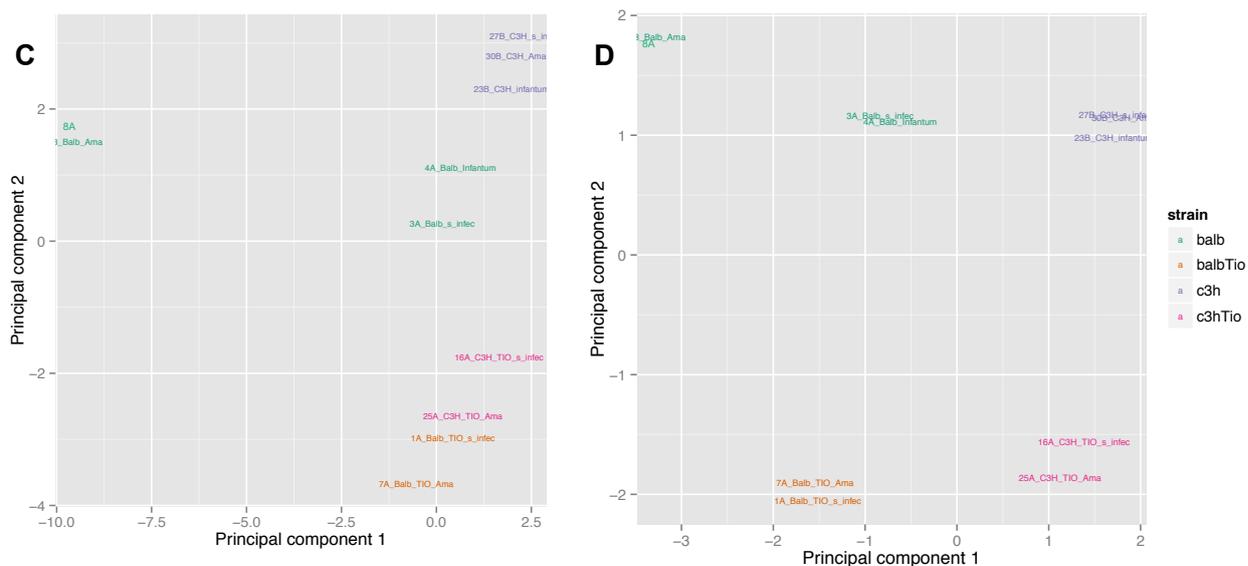
**Figura 10 – Análise de componentes principais em sítios de metilação de DNA**

Scatter plot das amostras com suas descrições, as cores se referem a as linhagem /estímulos. Laranja representa macrófagos de Balb/c estimulados por Tioglicolato (1A controle, 7A *L. amazonensis*); Rosa representa macrófagos de C3H/he com estímulo por Tioglicolato (16A controle, 25A *L. amazonensis*); Verde representam macrófagos de Balb/c (8A *L. amazonensis* , 3A controle, 4A *L. infantum*); Roxa representam macrófagos de C3H/he (30B *L. amazonensis*, 27B controle, 23B *L. infantum*)

É possível visualizar que no status - infecção e controle, não há grande distância entre os ensaios, contudo entre as linhagens animais (representada por cores) e principalmente entre células com e sem estímulo por Tioglicolato para a recuperação das mesmas há grande distância. Ensaios realizados com células não estimuladas por Tioglicolato de sódio nas linhagens Balb/c e C3H/He se apresentam próximos, entretanto se apresentam em direção oposta das mesmas linhagens com estímulo. Verifica-se que amostra 8A se encontra *outlier*, provavelmente devido ao fato desta amostra apresentar a menor cobertura dentre as demais.

O padrão de distanciamento através de PCA se repete nas análises das regiões anotadas de RRBS, *tiling*, promotores e Ilhas, como é demonstrado na figura 11.

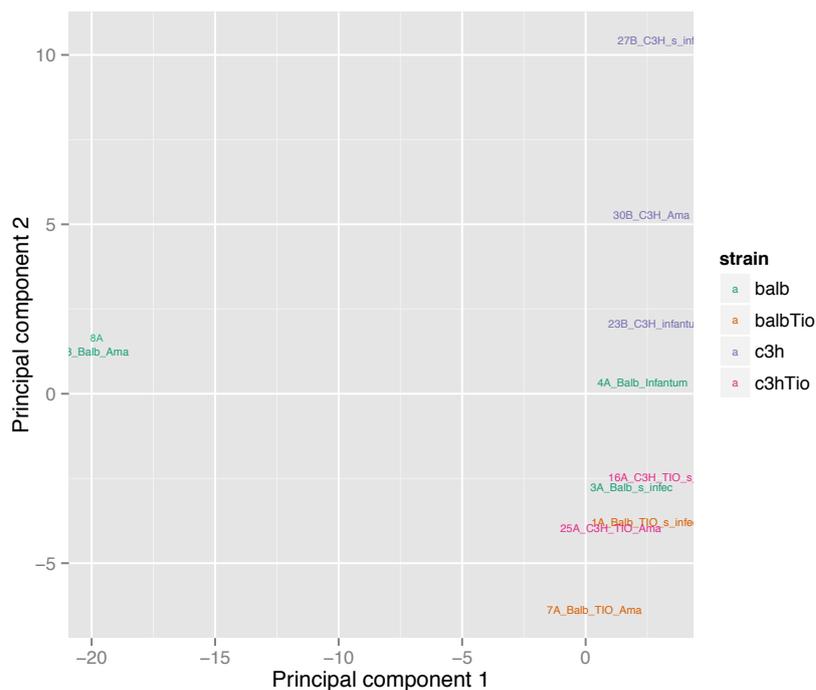




**Figura 11 – Análise de componentes principais nas regiões anotadas**

A – PCA da região RRBS; B – PCA da região de *tiling*; C – PCA da região de promotores; D – PCA da região de CpGI. Laranja representa macrófagos de Balb/c estimulados por Tioglicolato (1A controle, 7A *L. amazonensis*); Rosa representa macrófagos de C3H/he com estímulo por Tioglicolato (16A controle, 25A *L. amazonensis*); Verde representam macrófagos de Balb/c (8A *L. amazonensis*, 3A controle, 4A *L. infantum*); Roxa representam macrófagos de C3H/he (30B *L. amazonensis*, 27B controle, 23B *L. infantum*)

Somente na análise de componentes principais em genes é que a distribuição da metilação de DNA se torna mais sobreposta, como demonstrado na figura 12.



**Figura 12 – Análise de componentes principais da região de genes.**

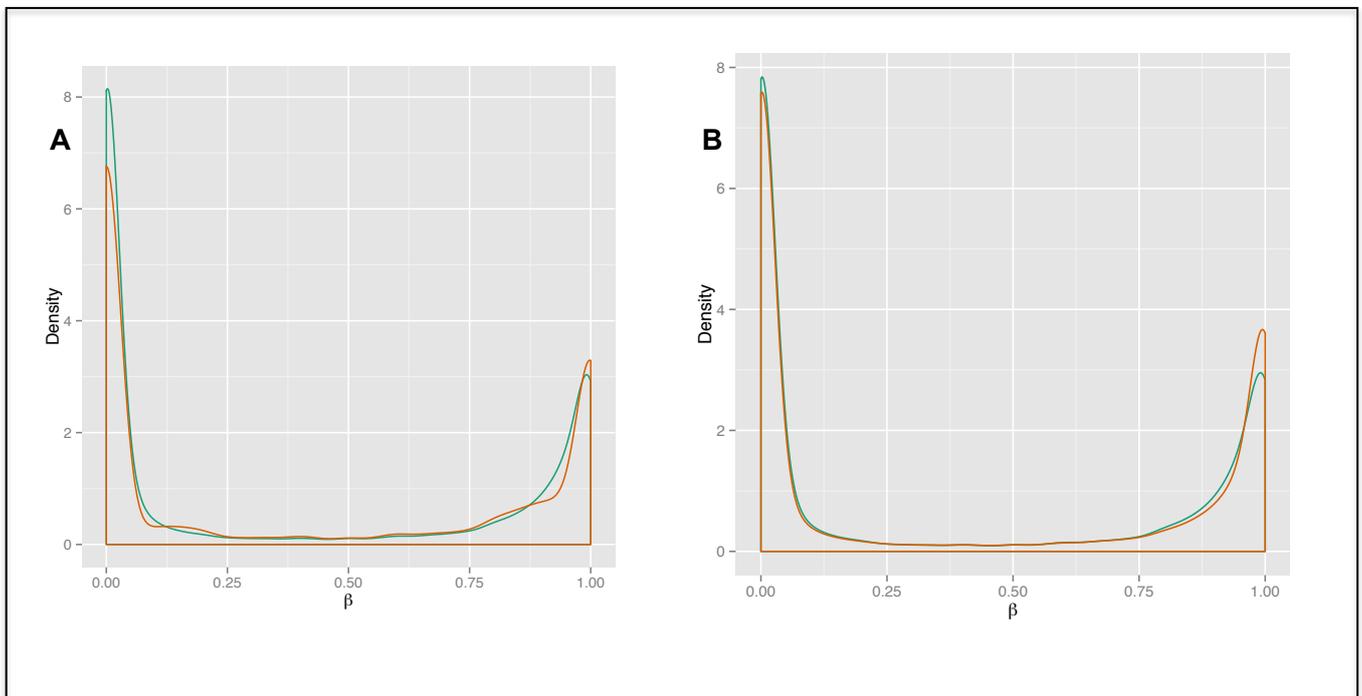
Scatter plot das amostras com suas descrições, as cores se referem a as linhagem /estímulos. Laranja representa macrófagos de Balb/c estimulados por Tioglicolato (1A controle, 7A *L. amazonensis*); Rosa representa macrófagos de C3H/he com estímulo por Tioglicolato (16A controle, 25A *L. amazonensis*); Verde representam macrófagos de Balb/c (8A *L. amazonensis* , 3A controle, 4A *L. infantum*); Roxa representam macrófagos de C3H/he (30B *L. amazonensis*, 27B controle, 23B *L. infantum*)

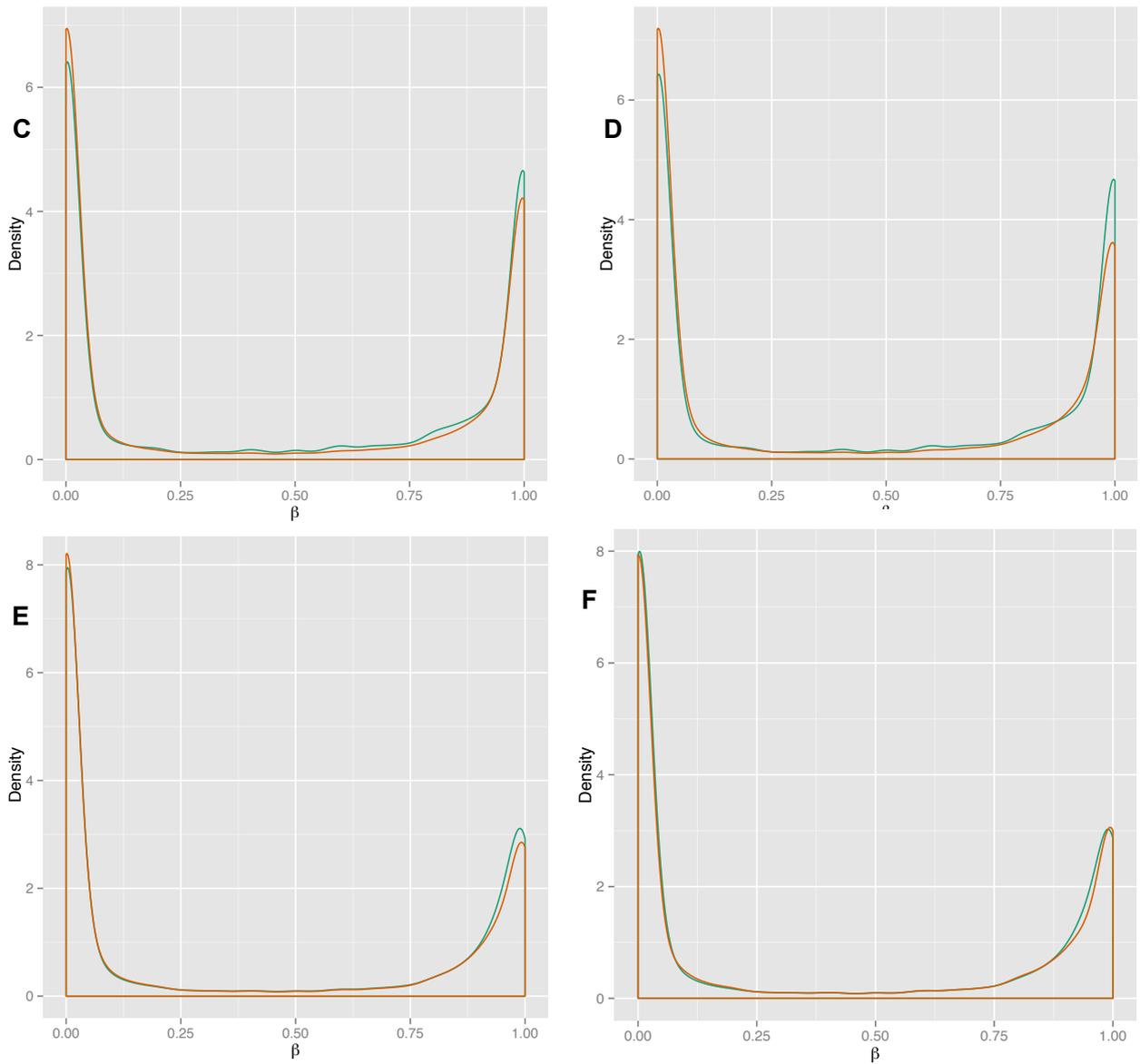
#### 7.6.4. Distribuição de metilação

As análises exploratórias na distribuição de metilação incluem distribuição  $\beta$ , perfil de metilação regional, correlação e agrupamento. Para o melhor entendimento as análises serão apresentadas em relação ao desenho experimental – comparações primárias (infecção x controle), comparações secundárias - linhagem (Balb x C3H) e comparações secundárias – estímulo (Tioglicolato x lavagem).

#### 7.6.4. Comparações primárias - Infecção x controle

A fim de verificar a distribuição da frequência de metilação de DNA a nível de sítios e regiões anotadas, a análise baseada na distribuição  $\beta$  (beta) foi realizada. A figura 13 apresenta a distribuição  $\beta$  de sítios de metilação de DNA nas comparações primárias entre infecção e controle.





**Figura 13 – Distribuição  $\beta$  dos sítios de metilação de DNA em status**

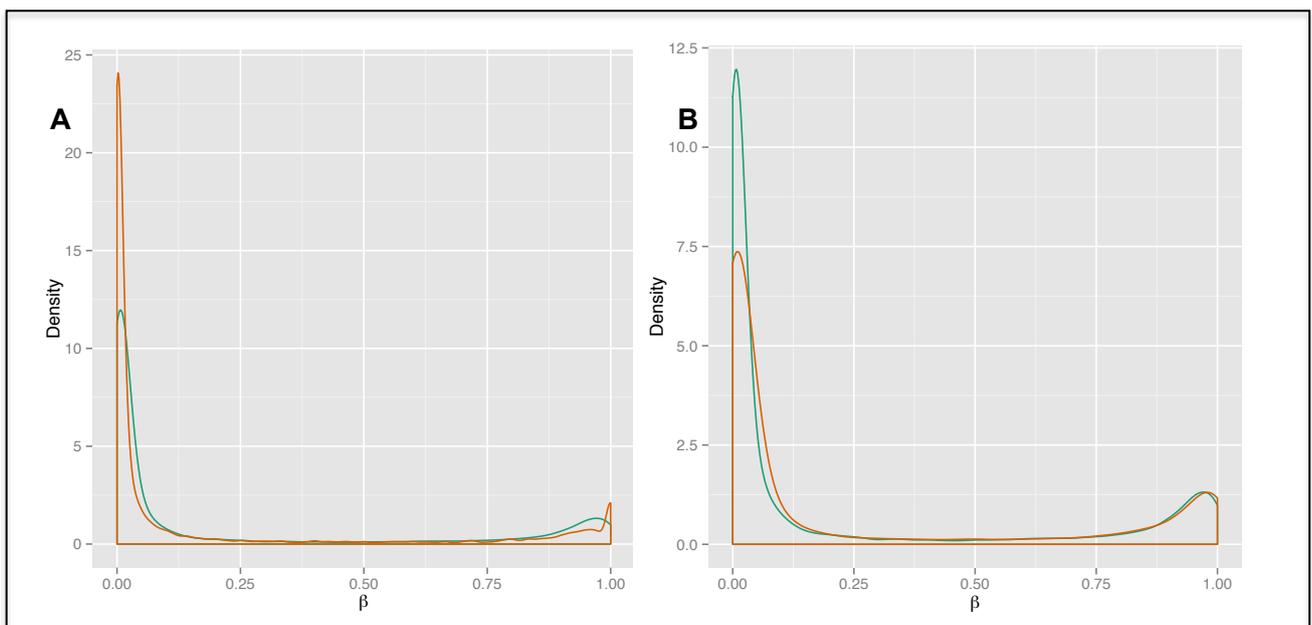
A- Distribuição  $\beta$  da comparação 1 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 2 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem Balb); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 3 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H); D - Distribuição  $\beta$  da comparação 4 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem C3H); E - Distribuição  $\beta$  da comparação 5 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb + Tioglicolato); F- Distribuição  $\beta$  da comparação 6 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H + Tioglicolato); Laranja – doença; Verde – controle.

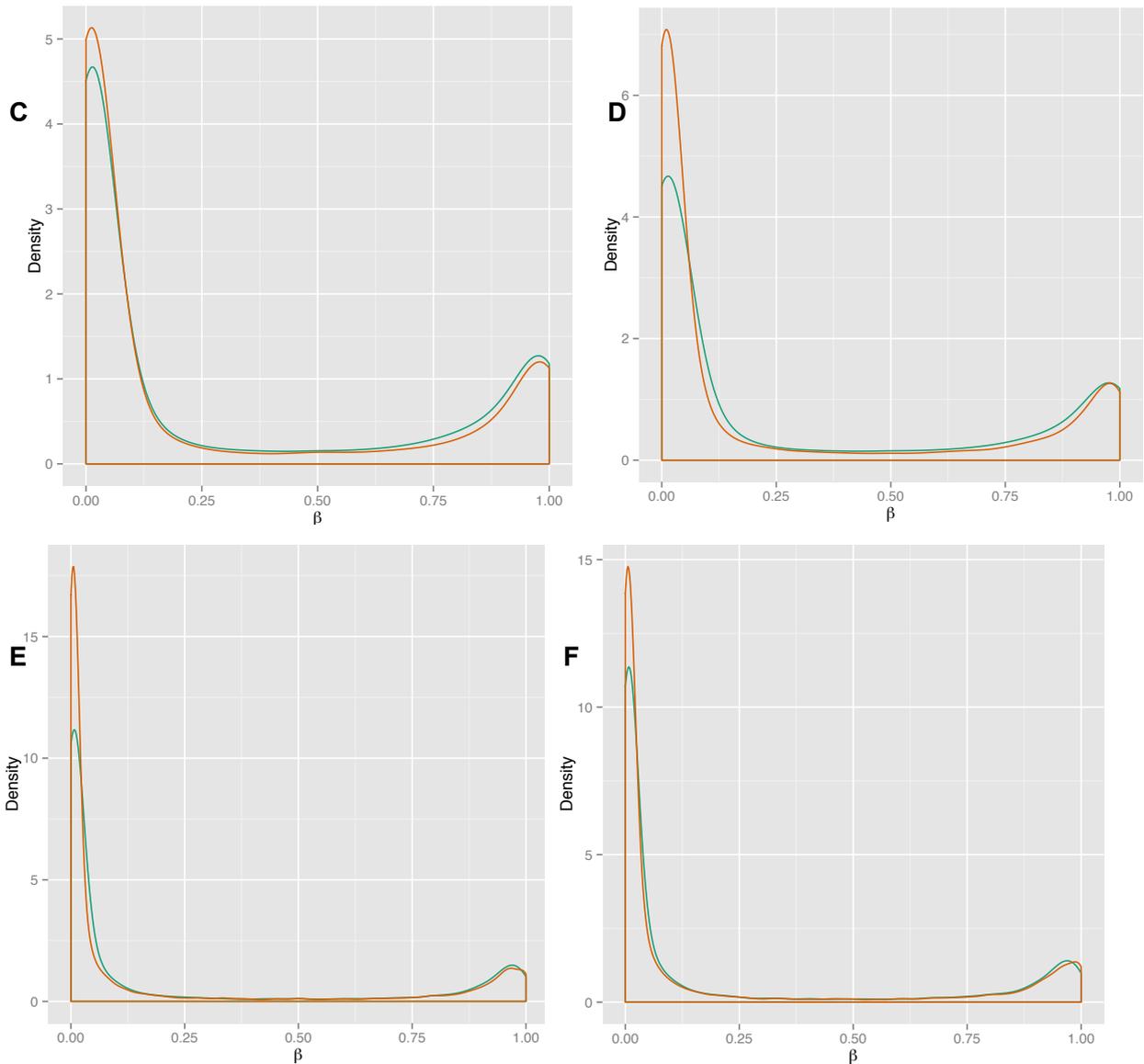
A apresentação da distribuição da metilação de DNA em sítios ocorre de forma bimodal, devido a metilação de DNA se encontrar de uma maneira geral hipometilada ou hipermetilada. É possível verificar alguns padrões na distribuição de sítios de metilação de

DNA. Em Balb o status de infecção tende a deslocar sutilmente a direita, o que sugere discreto ganho de metilação (Figura 13 – A e B, linhas laranjas), quando comparado ao controle (Figura 13 – A e B, linha verde) enquanto em C3H apresenta redução no pico a direita e sutil desvio para esquerda o que sugere uma ligeira perda na metilação (Figura 13 – C e D, linha laranjas) quando comparado ao controle (Figura 13 – C e D, linha verde). Nesta análise fica sugestivo que a linhagem C3H tem ganho na metilação, apresentando maior densidade (Figura 13 – C e D – linha verde, acima de 4) no controle, quando comparado a linhagem Balb. Interessante observar que a distribuição de metilação entre status (infecção e controle) parece estar invertida nas linhagens.

Não é possível visualizar diferenças grande entre as espécies tanto em Balb como C3H. Apesar da sutil diferença entre controle e infecção nas linhagens Balb e C3H (Figura 13 A, B, C e D) fica sugestivo que a elicitação por Tioglicolato talvez exerça de alguma maneira um fator suavizante sobre a epigenética na resposta imune, principalmente na linhagem C3H, devido não ser possível visualizar praticamente nenhuma alteração entre controle e infecção na distribuição em células estimuladas (Figura 13 - F).

A mesma análise foi realizada para as seguintes regiões de anotação: promotores, genes e *tiling*. A figura 14 mostra a distribuição  $\beta$  para a região de promotores.





**Figura 14 – Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA em status na região de promotores**

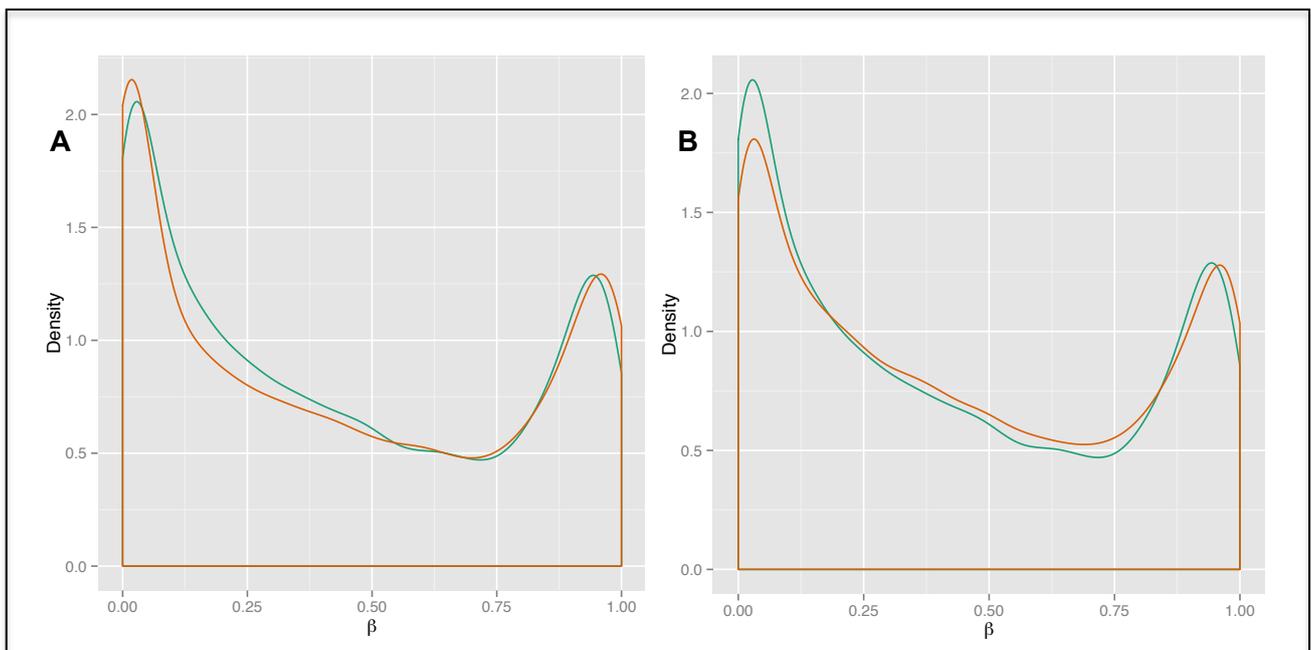
A- Distribuição  $\beta$  da comparação 1 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 2 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem Balb); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 3 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H); D - Distribuição  $\beta$  da comparação 4 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem C3H); E - Distribuição  $\beta$  da comparação 5 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb + Tioglicolato); F- Distribuição  $\beta$  da comparação 6 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H + Tioglicolato); Laranja – doença; Verde – controle.

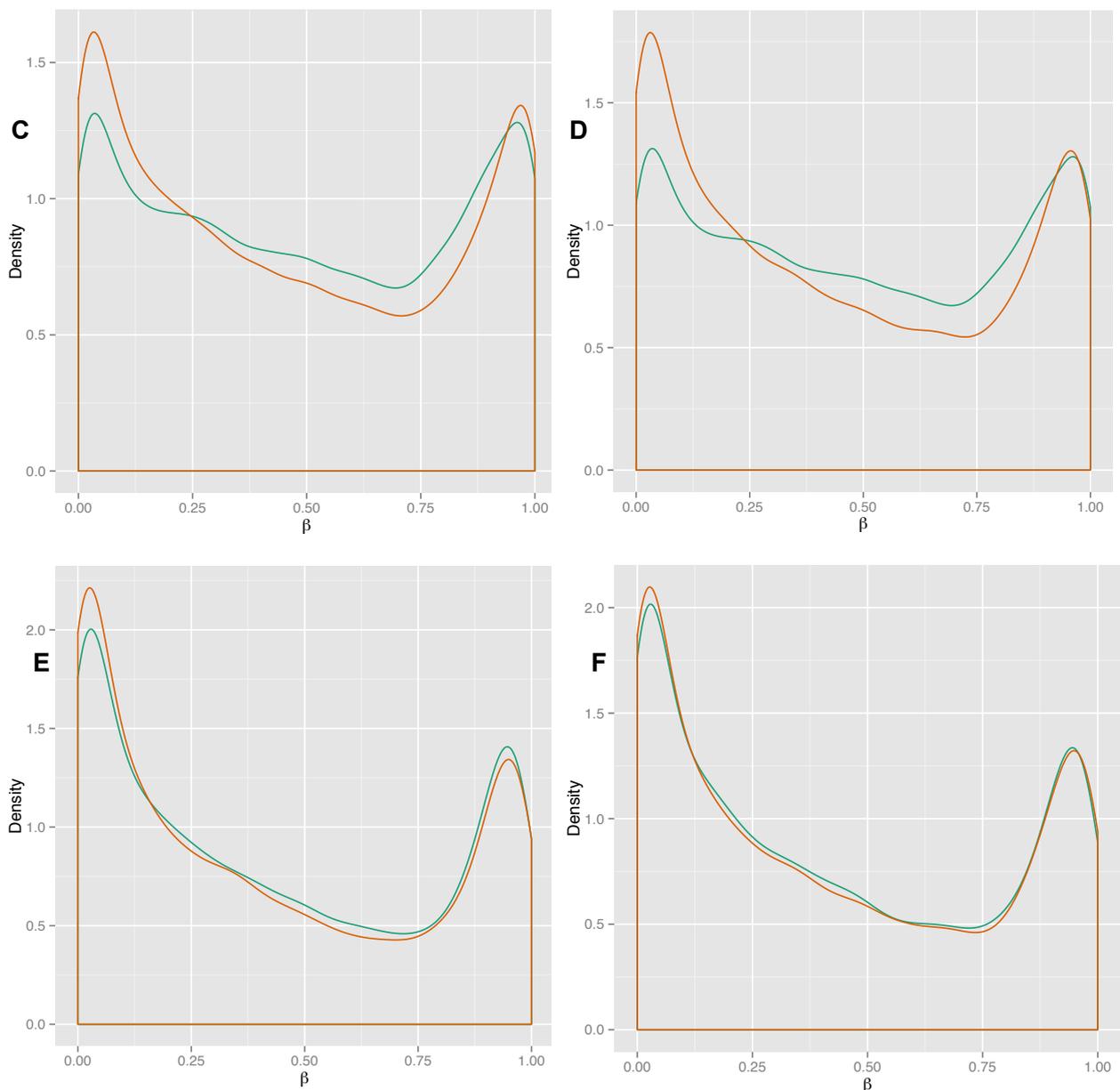
A apresentação da distribuição da metilação de DNA em promotores ocorre também de forma bimodal, entretanto verifica-se desvio do pico a esquerda uma vez que, como já mencionado, estas regiões são menos metiladas. Em Balb (*L. infantum*) o status de infecção tende a perder densidade no pico a esquerda, o que sugere discreto ganho de metilação (Figura 14 – B, linha laranja), quando comparado ao controle (Figura 14 –B, linha verde). Já a

distribuição em C3H no status infecção apresenta aumento no pico a esquerda o que sugere uma ligeira perda na metilação (Figura 14 – C e D, linha laranjas) quando comparado ao controle (Figura 14 – C e D, linha verde). Da mesma forma como nos sítios sugere-se que a linhagem C3H tem ganho na metilação, apresentando menor densidade no controle quando comparado a linhagem Balb (Figura 14 – C e D – linha verde, aproximadamente metade da densidade de A e B). E novamente o fato da distribuição de metilação entre status (infecção e controle) estar invertida nas duas linhagens.

Há uma pequena diferença visualizada entre as espécies em C3H (Figura 14 – C e D), em Balb esta diferença pode ser devido ao fato da baixa cobertura da amostra 8 (Figura 14 – A e B), entretanto quando comparadas células estimuladas com Tioglicolato na linhagem Balb, a diferença na distribuição fica bem visível. Animas Balb com estímulo (Figura 14 – E – linha laranja) tem acentuado aumento a esquerda do pico de infecção, o que sugere redução na metilação de DNA, o mesmo é visto em animais C3H (Figura 14 – E e F – linha laranja). Quando comparada a distribuição entre células estimuladas (Figura 14 – F) e células não estimuladas (Figura 14 – C) em C3H, verifica-se que o pico de infecção de infecção (laranja) é quase três vezes maior nas células estimuladas.

A Figura 15 apresenta a distribuição  $\beta$  para a região anotada de genes.





**Figura 15 – Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA em status na região de genes**

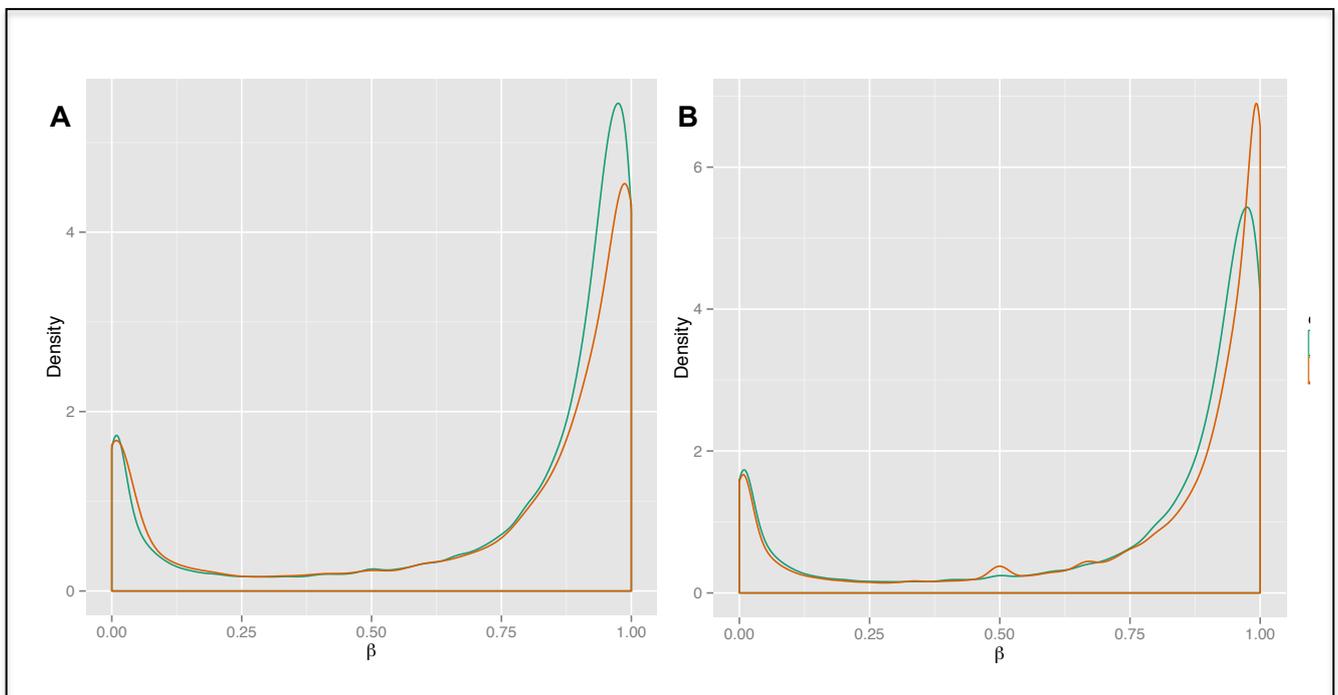
A- Distribuição  $\beta$  da comparação 1 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 2 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem Balb); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 3 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H); D - Distribuição  $\beta$  da comparação 4 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem C3H); E - Distribuição  $\beta$  da comparação 5 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb + Tioglicolato); F- Distribuição  $\beta$  da comparação 6 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H + Tioglicolato); Laranja – infecção; Verde – controle.

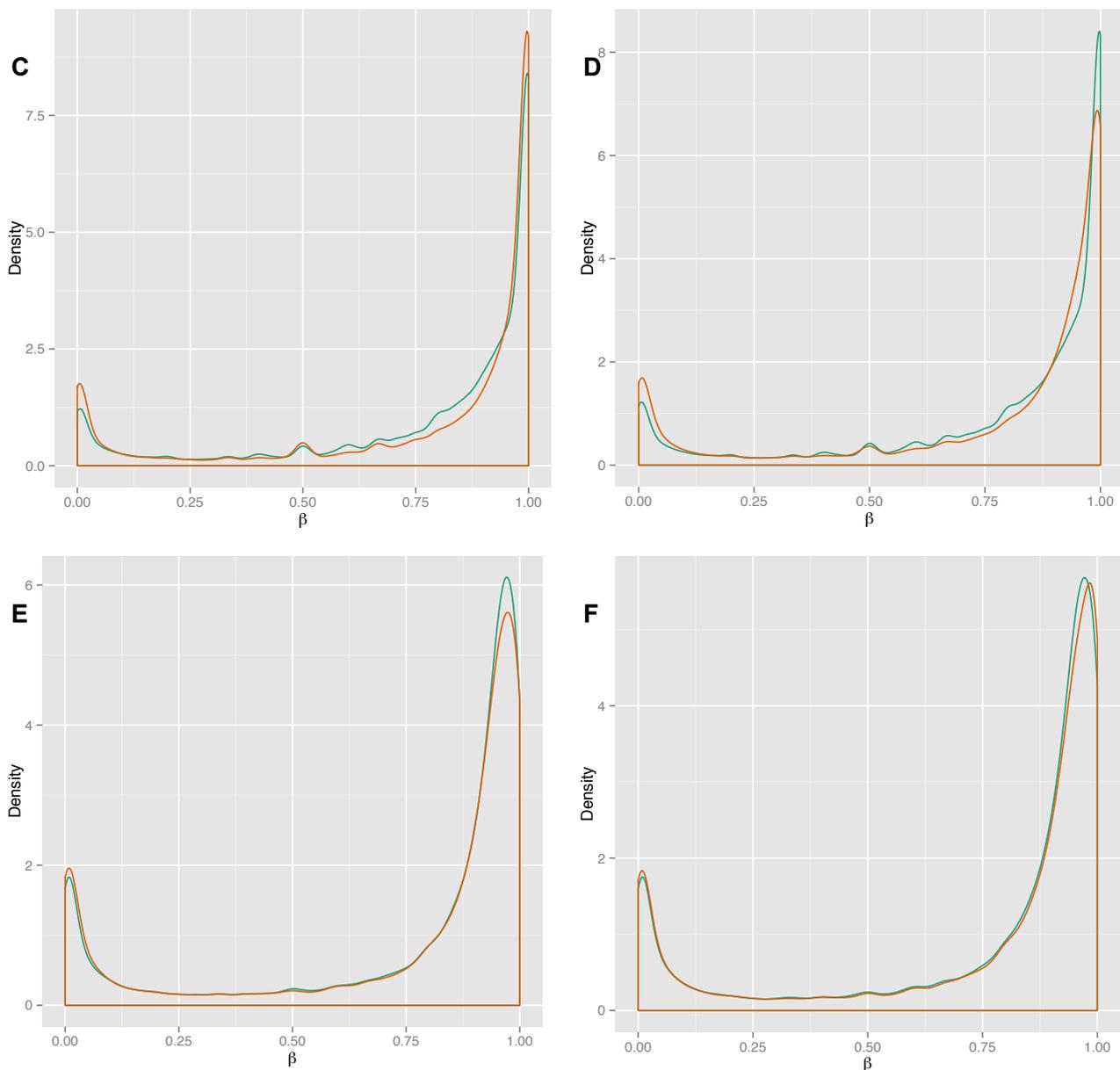
A região de genes assim como as anteriores também apresenta distribuição da metilação bimodal. Em Balb (*L. infantum*) o status de infecção tende a apresentar ligeira perda na densidade no pico a esquerda, o que sugere discreto ganho de metilação (Figura 15 – B, linha laranja), quando comparado ao controle (Figura 15 –B, linha verde). Já em C3H a distribuição no status infecção apresenta aumento no pico a esquerda o que sugere uma ligeira

perda na metilação (Figura 15 – C e D, linhas laranjas) quando comparado ao controle (Figura 15 – C e D, linhas verdes). Como anteriormente a distribuição de metilação entre status (infecção e controle) está invertida nas duas linhagens.

Não é possível sugerir diferenças na distribuição da metilação de DNA entre espécies. Entre as amostras estimuladas C3H e Balb tendem a apresenta discreto desvio a esquerda no status infecção (Figura 15 – E e F, linhas laranjas).

A distribuição  $\beta$  para a região anotada de *tiling* se encontra na figura 16.





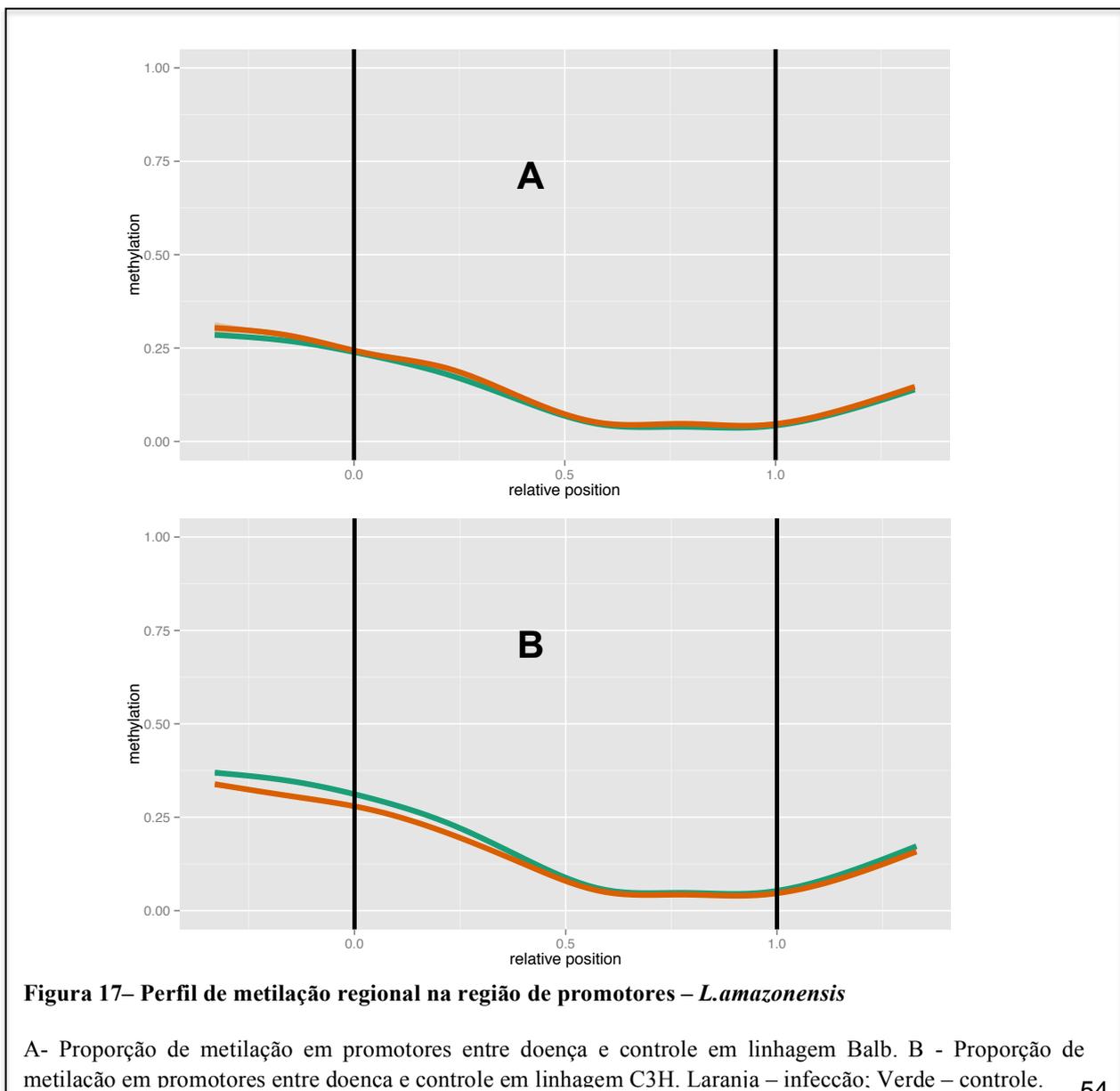
**Figura 16– Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA em status na região de *tiling***

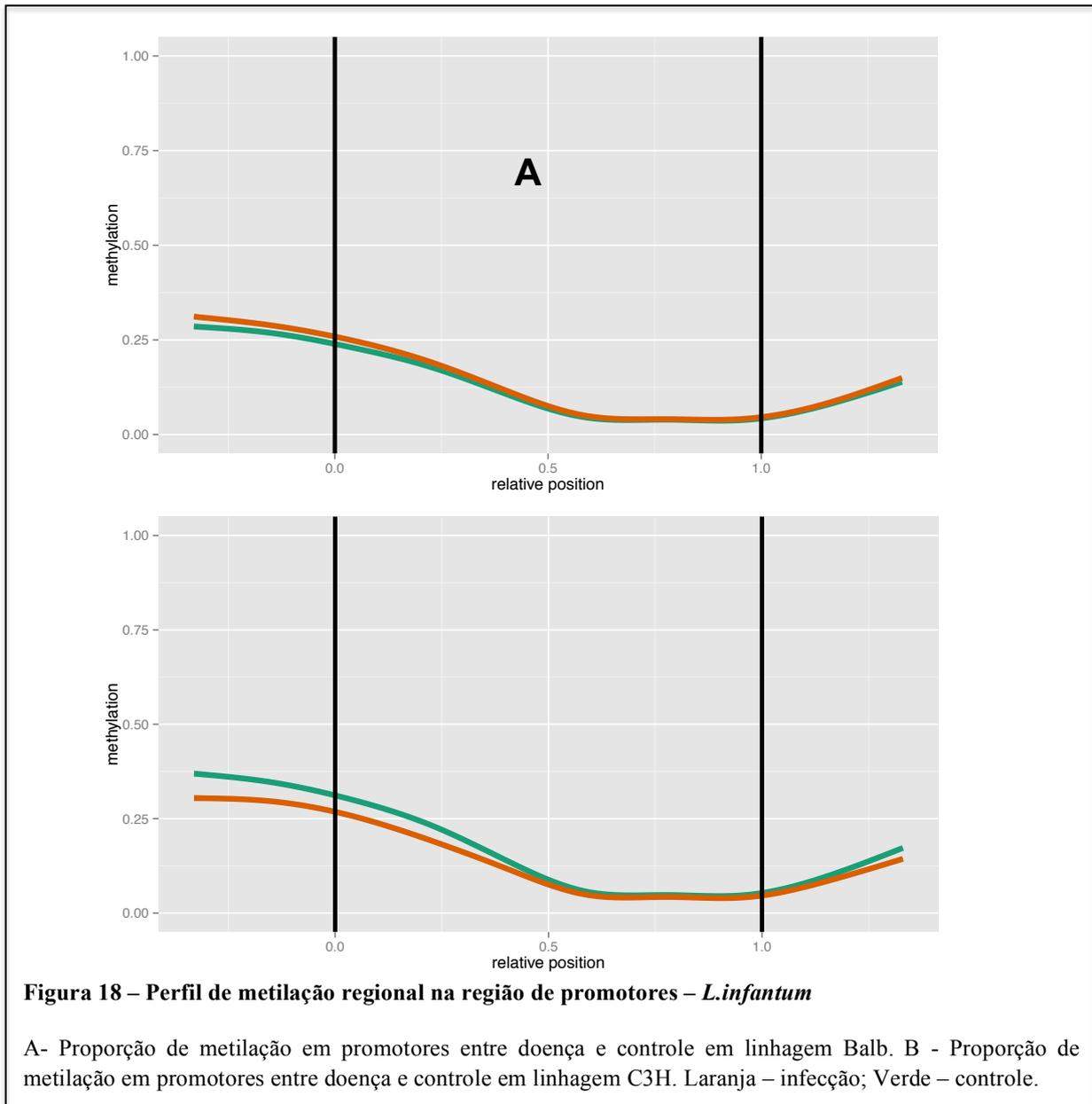
A- Distribuição  $\beta$  da comparação 1 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 2 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem Balb); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 3 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H); D - Distribuição  $\beta$  da comparação 4 (*Leishmania infantum* x controle – Linhagem C3H); E - Distribuição  $\beta$  da comparação 5 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem Balb + Tioglicolato); F- Distribuição  $\beta$  da comparação 6 (*Leishmania amazonensis* x controle – Linhagem C3H + Tioglicolato); Laranja – infecção; Verde – controle.

A região de *tiling* assim como as outras também apresenta distribuição da metilação bimodal. Em Balb (*L. infantum*) o status de infecção apresenta ganho na densidade no pico a direita, o que sugere ganho de metilação (Figura 16 – B, linha laranja), quando comparado ao

controle (Figura 16 –B, linha verde). O status de infecção em C3H - *L. infantum* apresenta discreta redução no pico a direita o que sugere uma ligeira perda na metilação (Figura 16 – D, linha laranja) quando comparado ao controle (Figura 16 – D, linha verde), já em *L. amazonensis* ocorre o inverso, percebe-se um discreto aumento do pico a direita no status infecção, o que sugere aumento da metilação (Figura 16 - C). A distribuição de metilação entre status (infecção e controle) continua invertida nas duas linhagens. Nas células estimuladas não é possível sugerir nenhuma modificação (Figura 16 – E e F).

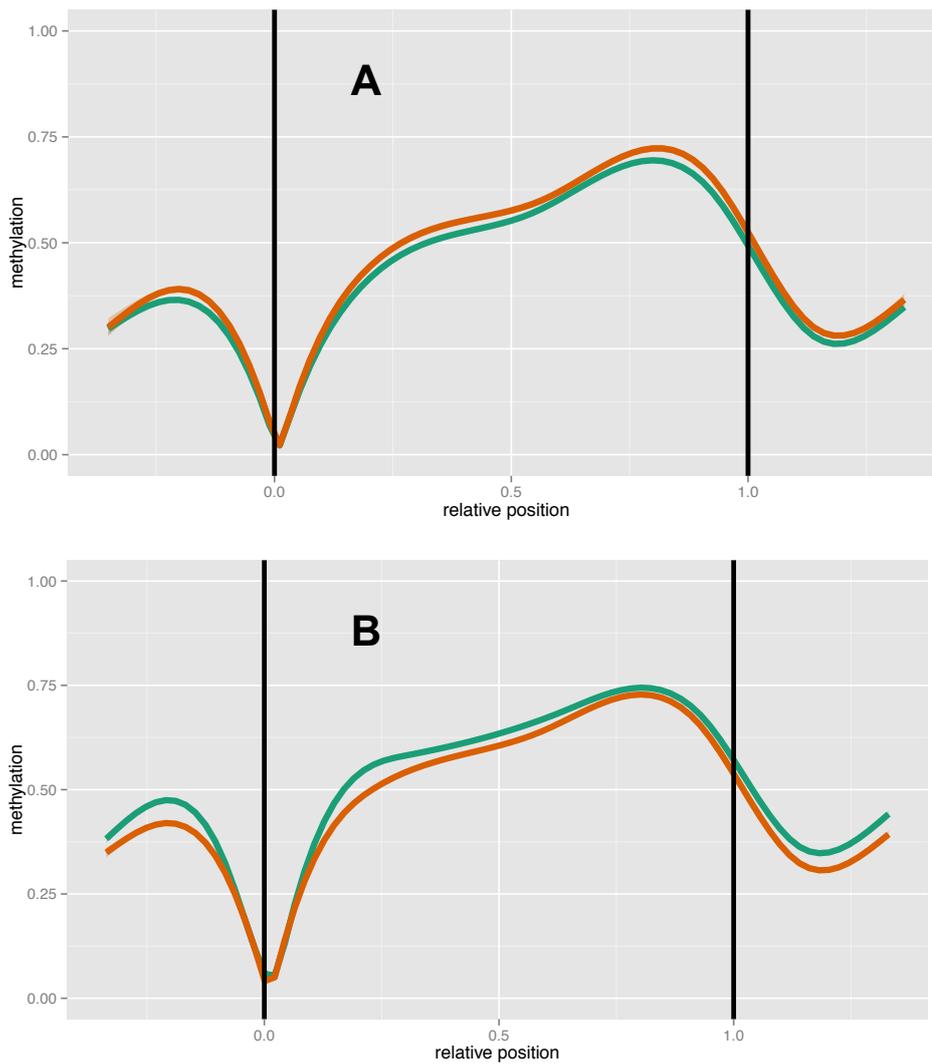
Como observado anteriormente, há a inversão da distribuição da metilação de DNA no status - infecção e controle entre as duas linhagens, o perfil de metilação regional foi realizado nas regiões de genes e promotores para verificar se esta inversão persistia, assim como verificar a proporção de metilação de DNA entre elas. As figuras 17 e 18 apresentam os dados para região de promotores.





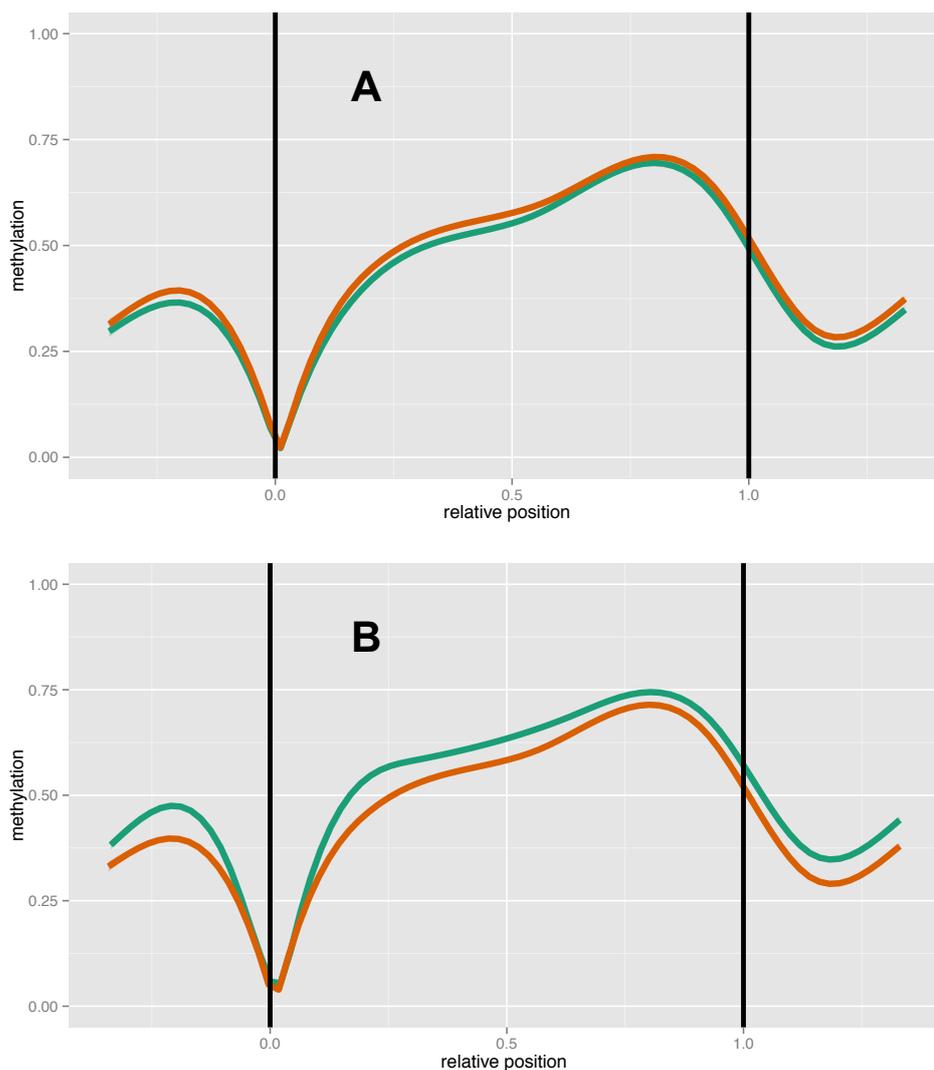
A proporção na diferença da metilação entre infecção e controle não se apresentou grande em nenhuma das análises (não ultrapassando 10%) em ambas espécies (Figura 17 e 18). Contudo como demonstrado pela distribuição  $\beta$ , é possível visualizar que a resposta entre infecção e controle são opostas nas linhagens. Balb tende a apresentar ganho de metilação de DNA na infecção, enquanto C3H tende a apresentar perda na metilação de DNA, na região de promotores.

As figuras 19 e 20 apresentam os dados para região de genes.



**Figura 19– Perfil de metilação regional na região de genes – *L.amazonensis***

A- Proporção de metilação em promotores entre doença e controle em linhagem Balb. B - Proporção de metilação em promotores entre doença e controle em linhagem C3H. Laranja – infecção; Verde – controle.

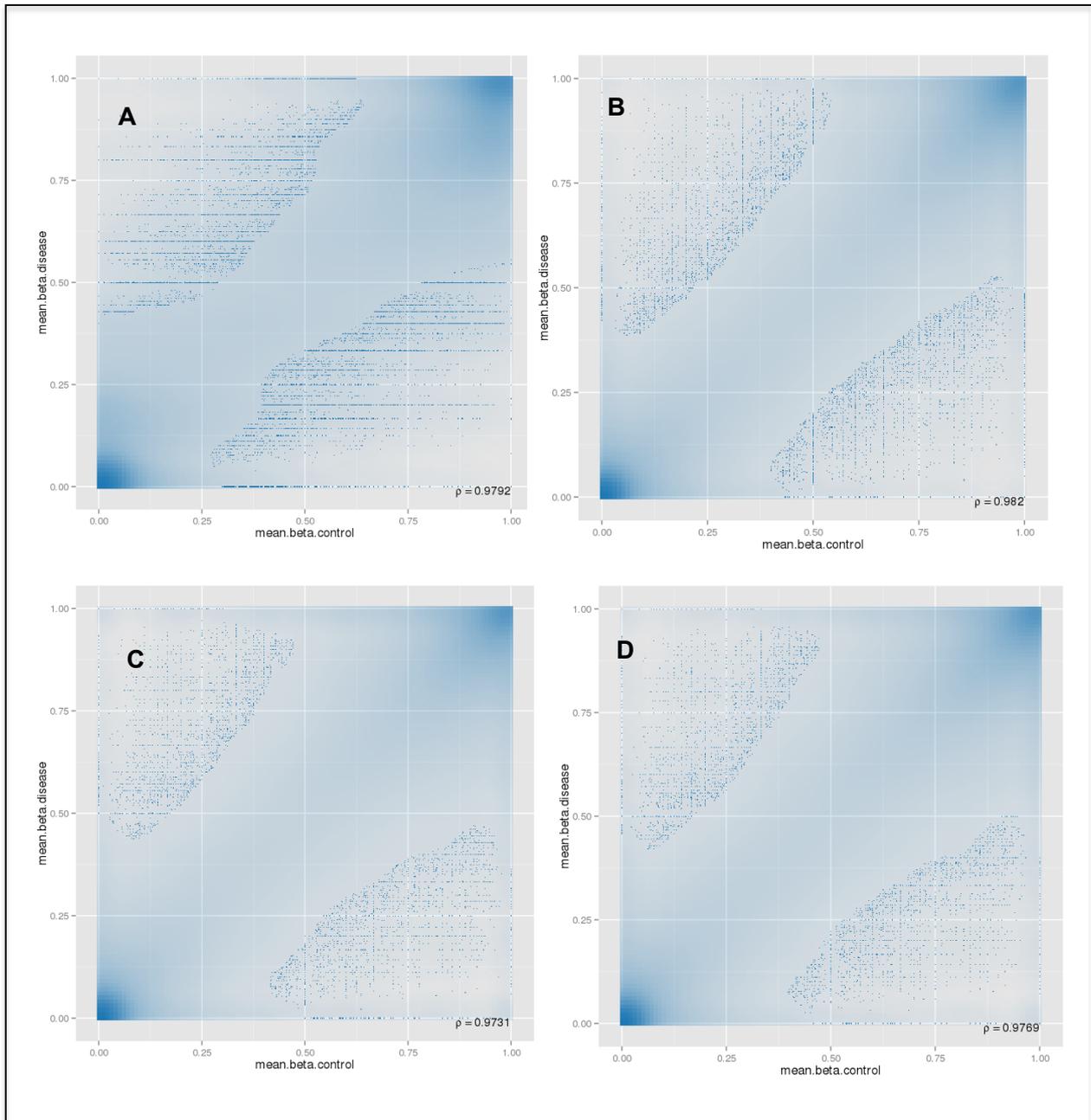


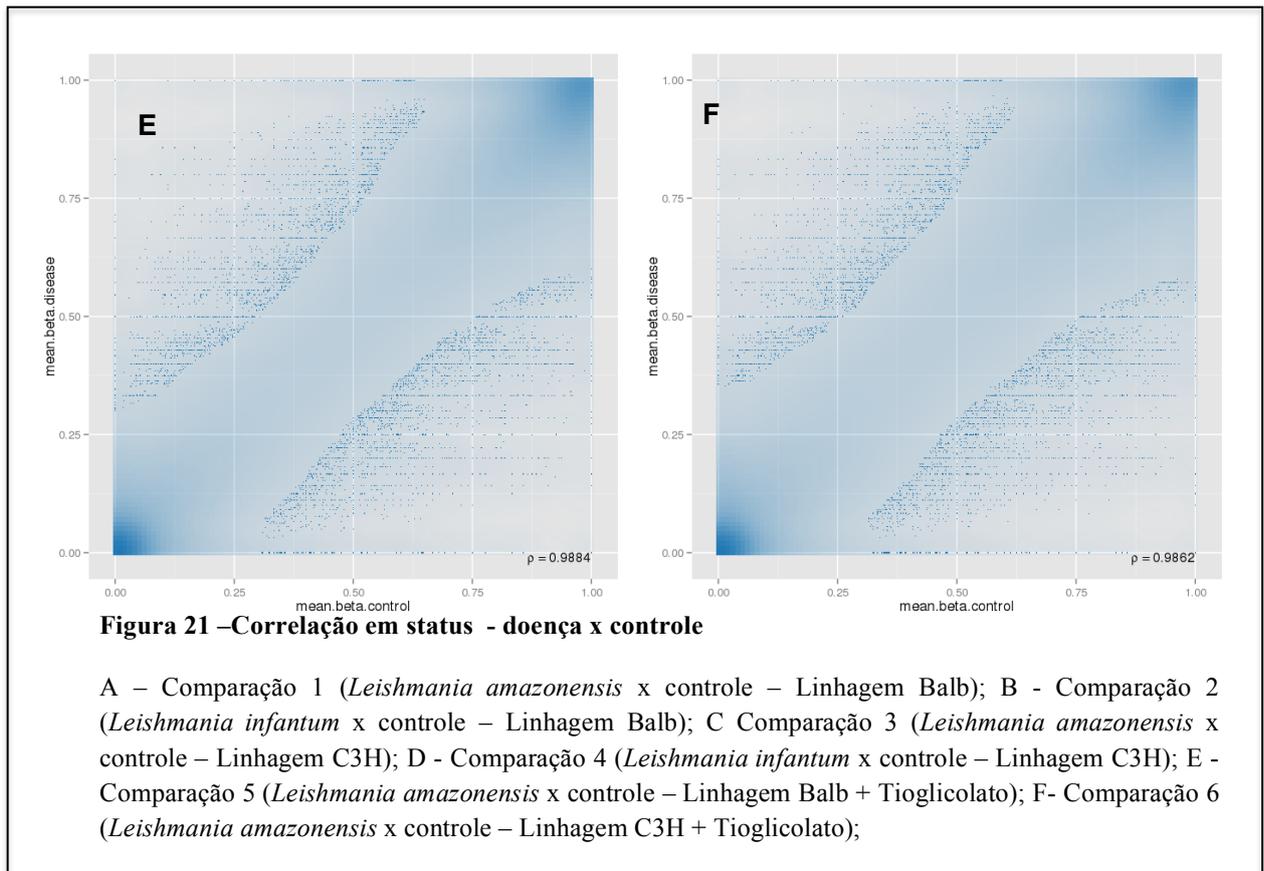
**Figura 20– Perfil de metilação regional na região de genes– *L.infantum***

A- Proporção de metilação em promotores entre infecção e controle em linhagem Balb. B - Proporção de metilação em promotores entre infecção e controle em linhagem C3H. Laranja – infecção; Verde – controle.

O mesmo pode ser visto na região de genes (Figura 19 e 20), que apesar da diferença de metilação entre infecção e controle ser muito pequena em ambas as análises (não ultrapassando 10%), novamente é perceptível que a resposta entre infecção e controle são opostas nas linhagens. Balb no status infecção tende a apresentar ganho de metilação de DNA, enquanto C3H tende a apresentar perda na metilação de DNA, na região de genes.

A fim de verificar se haveria sítios CpG com diferença significativa na metilação dentro das regiões, a correlação entre as comparações de status também foi realizada, a figura 21 demonstra o resultado

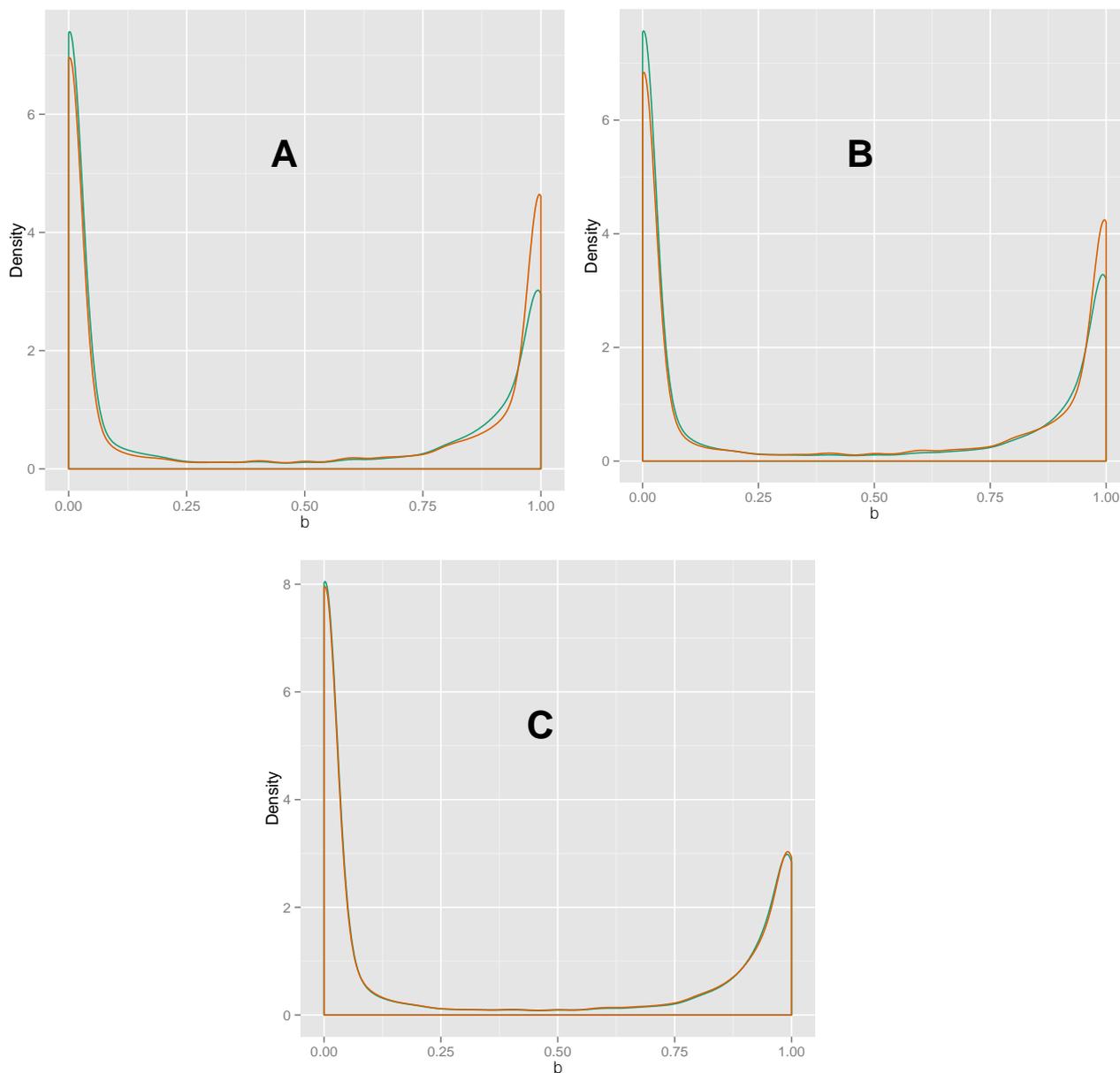




A correlação das amostras entre infecção e controle é bem alta, em nenhuma das regiões foi possível verificar pontos com diferenças estatísticas.

#### 7.6.5. Comparações secundárias linhagens– Balb x C3H

A mesma análise através de distribuição  $\beta$  foi realizada nas comparações secundárias – linhagens, seguindo o desenho experimental (Figura 6). A figura 22 apresenta a comparação pareada de controle e infecção em ambas as linhagens e nas linhagens com estímulo, na região de sítios.

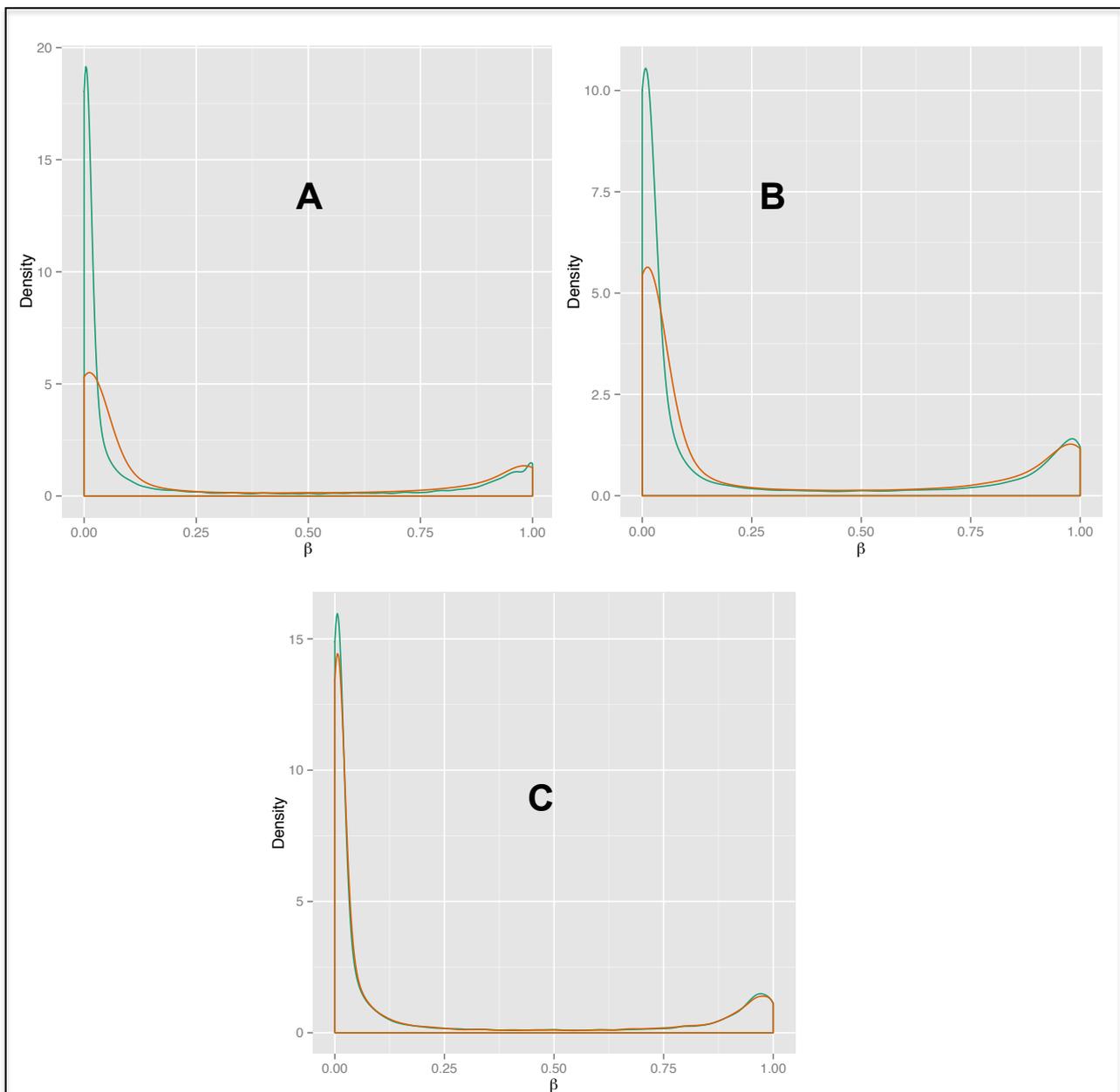


**Figura 22– Distribuição  $\beta$  dos sítios de metilação de DNA nas linhagens**

A- Distribuição  $\beta$  da comparação 7 (linhagem Balb - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H - *Leishmania amazonensis*/controle); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 8 (linhagem Balb - *Leishmania infantum*/controle X linhagem C3H - *Leishmania infantum*/controle); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 9 (linhagem Balb/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle). Balb – verde/ C3H - laranja

A distribuição da metilação de DNA correlacionando as características de resistência e susceptibilidade na região de sítios se mostrou moderadamente alterada em ambas espécies (Figura - 22 A e B), contudo entre células estimuladas não é possível identificar mudança alguma (Figura - 22 C).

A figura 23 apresenta a comparação pareada de controle infecção em ambas as linhagens e nas linhagens com estímulo, na região de promotores.

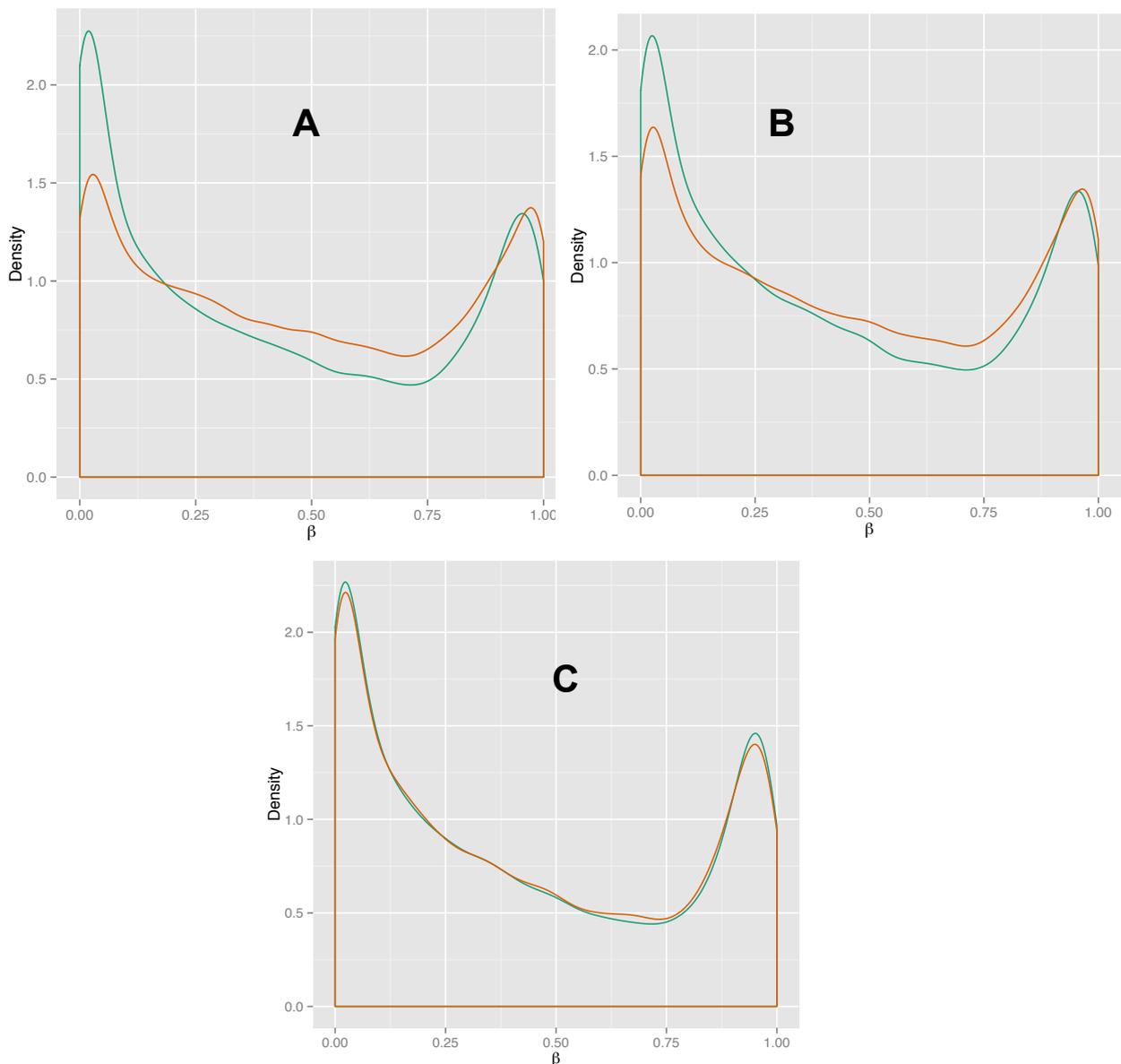


**Figura 23– Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA nas linhagens na região de promotores.**

A- Distribuição  $\beta$  da comparação 7 (linhagem Balb - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H - *Leishmania amazonensis*/controle); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 8 (linhagem Balb - *Leishmania infantum*/controle X linhagem C3H - *Leishmania infantum*/controle); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 9 (linhagem Balb/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle). Balb – verde/ C3H - laranja

Em promotores verifica-se expressiva diferença entre as linhagens. A linhagem Balb tende a apresentar maior pico a esquerda quando comparadas a C3H em todas as três comparações (Figura 23 – A, B e C), o que sugere perda de metilação em sítios CpG.

A figura 24 apresenta a comparação pareada de controle infecção em ambas as linhagens e nas linhagens com estímulo, na região de genes.

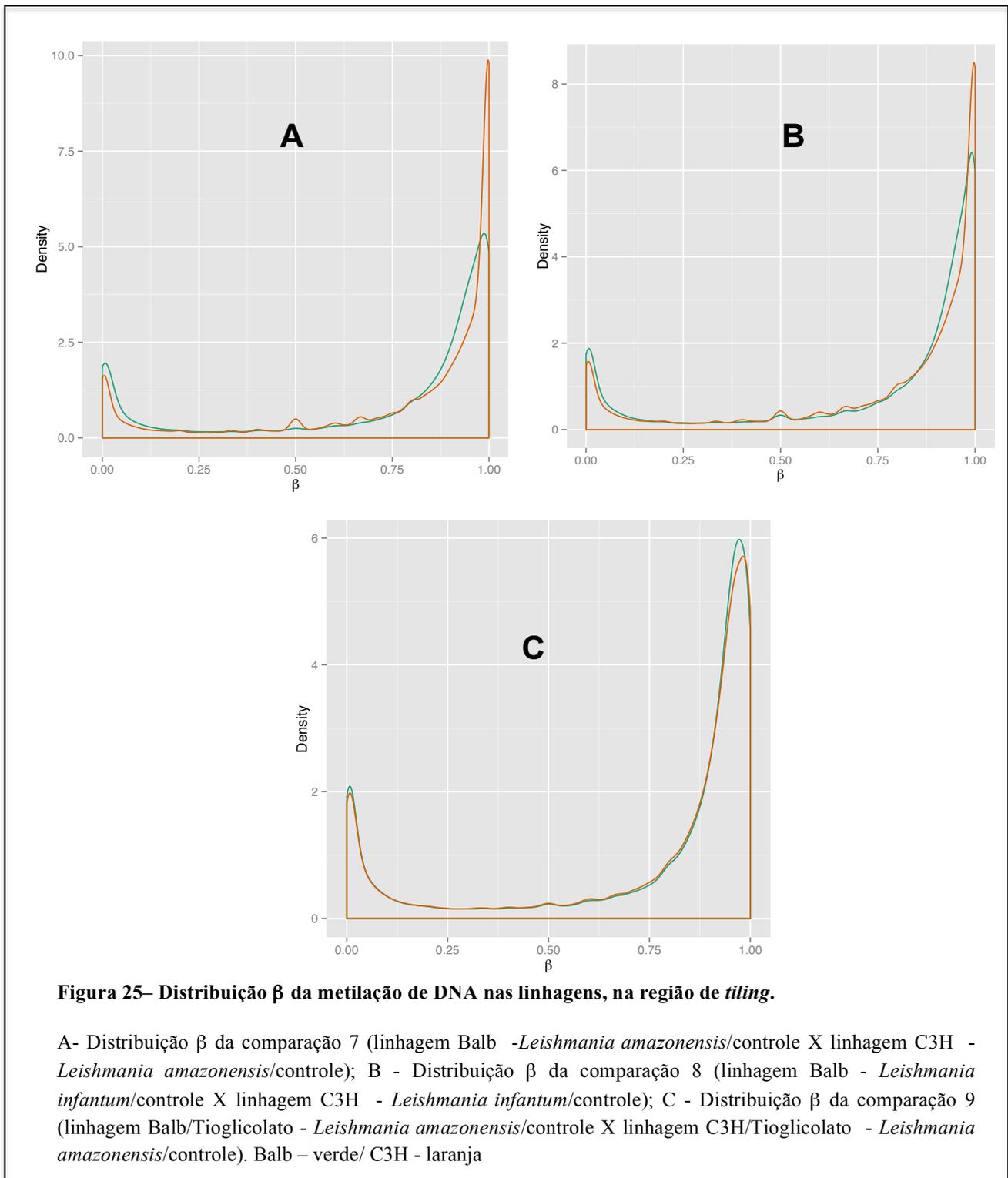


**Figura 24– Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA nas linhagens na região de genes.**

A- Distribuição  $\beta$  da comparação 7 (linhagem Balb - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H - *Leishmania amazonensis*/controle); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 8 (linhagem Balb - *Leishmania infantum*/controle X linhagem C3H - *Leishmania infantum*/controle); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 9 (linhagem Balb/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle). Balb – verde/ C3H - laranja

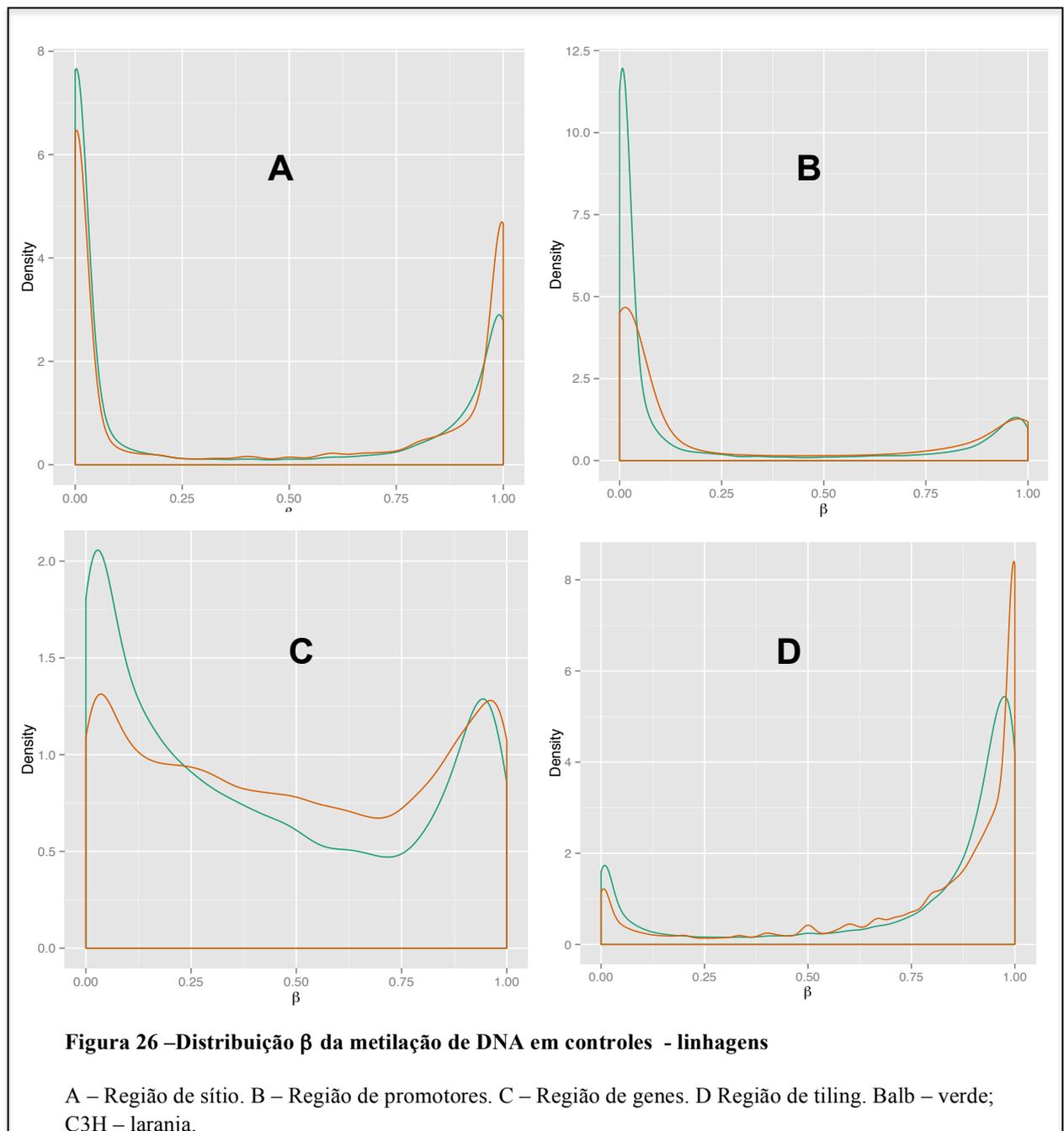
Assim como em promotores, a região de genes também apresenta diferença na distribuição de metilação entre as linhagens (Figura 24 – A e B), entretanto quando as células são estimuladas esta alteração na distribuição não é mais visualizada (Figura 24 – C).

A figura 25 apresenta a comparação pareada de controle infecção em ambas as linhagens e nas linhagens com estímulo, na região de *tiling*.



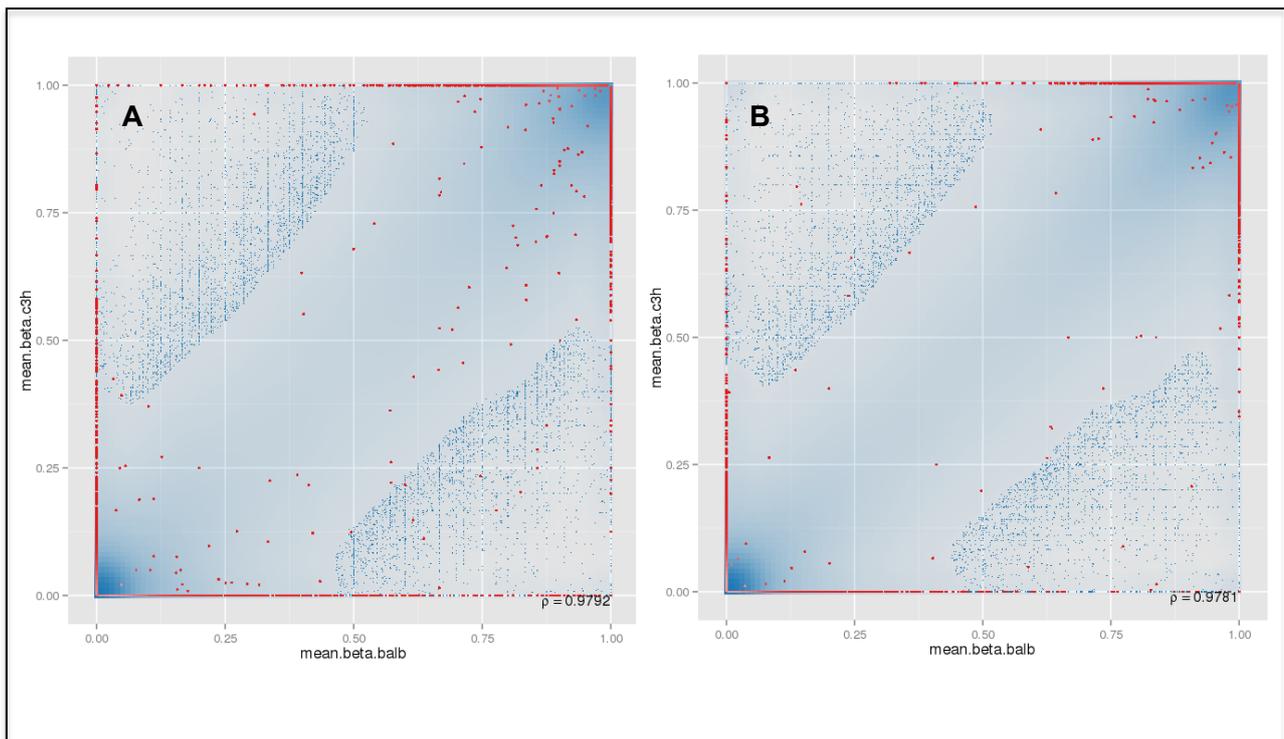
Novamente como nas regiões de promotores e genes, a região de *tiling* também apresenta diferenças na distribuição da metilação entre as linhagens como pode ser visto na figura 25 –A e B, entretanto quando o fator estímulo é agregado esta diferença já não é visível.

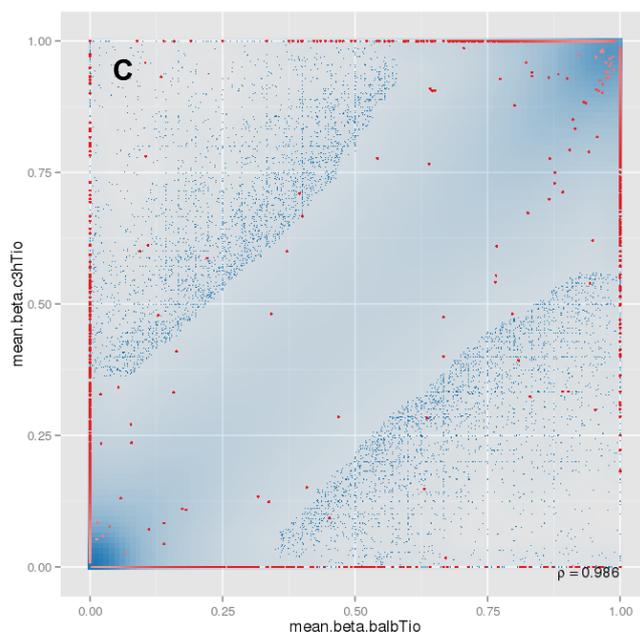
A fim de verificar se tais diferenças visualizadas poderiam ser devido ao fator infecção, ou seja devido alguma atuação do parasita nas células ou simplesmente por características singulares das linhagens, foi realizado a distribuição  $\beta$  da metilação de DNA somente entre os controles de Balb e C3H nas regiões de sítio, promotores, genes e *tiling*. O resultado pode ser visualizado na Figura 26.



Como verificado nas distribuições  $\beta$  na comparação entre linhagens e o que também é possível de ser visualizado nas comparações primárias, a análise da distribuição  $\beta$  entre os controles das linhagens agrega impacto suficiente as análises anteriores, estabelecendo que animais de linhagem Balb apresentam sítios CpG com metilação inferior a de animais da linhagem C3H, não sendo efeito do parasita. Como pode ser visualizado na figura 26 - A, B, C e D, a linha verde que representa a linhagem Balb sempre tem o pico desviado a esquerda, já a linha laranja que representa C3H tende a reduzir o pico da esquerda ou elevar o pico da direita.

A fim de verificar se haveria sítios CpG com diferença significativa na metilação dentro das regiões, a análise da correlação entre as comparações de linhagem foi realizada, a figura 27 demonstra o resultado





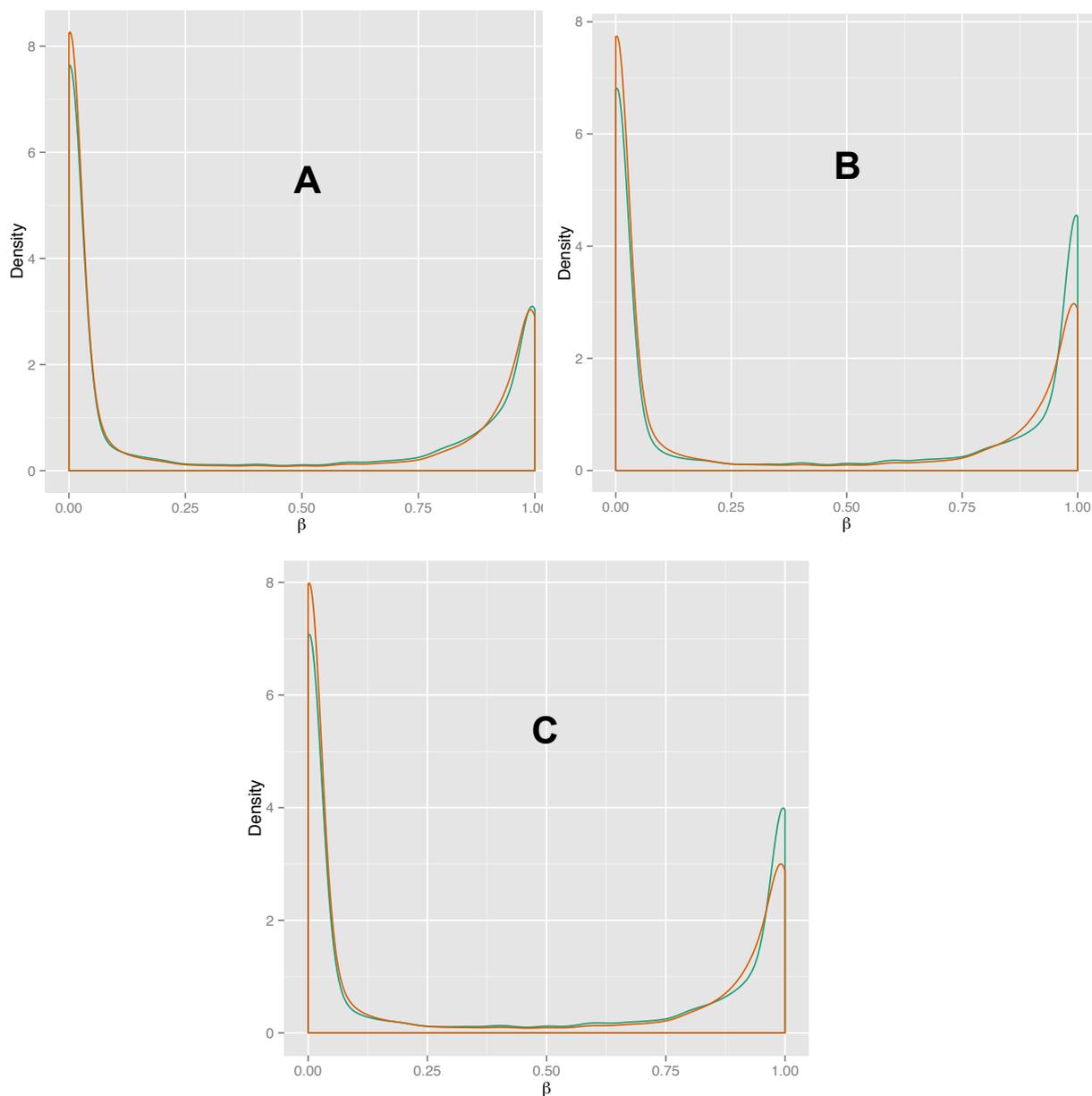
**Figura 27 –Correlação em linhagem – Balb x C3H**

A – Comparação 7 (linhagem Balb -*Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H -*Leishmania amazonensis*/controle); B - Comparação 8 (linhagem Balb - *Leishmania infantum*/controle X linhagem C3H - *Leishmania infantum*/controle); C - Comparação 9 (linhagem Balb/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle). Pontos vermelhos –  $p=0,05$

É possível verificar a existência de sítios CpG diferencialmente metilados entre animais Balb e C3H em todas as regiões.

#### 7.6.6. Comparações secundárias estímulo – Tioglicolato X lavagem

A análise da distribuição  $\beta$  também foi realizada nas comparações secundárias entre células oriundas de animais estimulados com Tioglicolato de sódio e recuperação apenas por lavagem. A figura 28 apresenta a comparação pareada de controle e infecção em ambas as células estimuladas e não estimuladas.



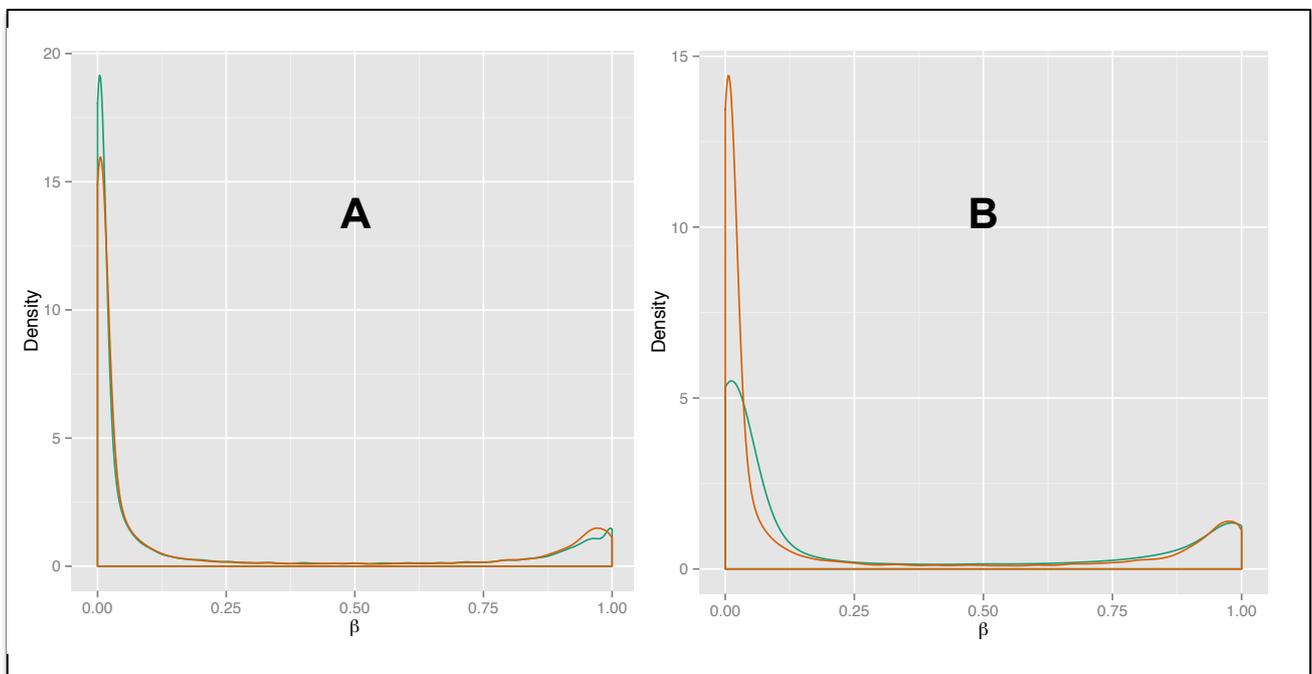
**Figura 28 – Distribuição  $\beta$  dos sítios de metilação de DNA em relação a estímulo**

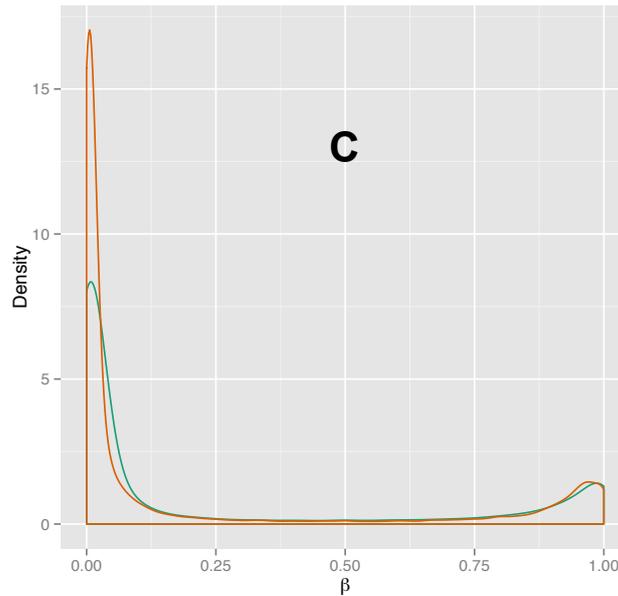
A- Distribuição  $\beta$  da comparação 10 (linhagem Balb - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem Balb/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 11 (linhagem C3H - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 12 (todos ensaios estimulado com Tioglicolato - Balb/C3H, controle e infecção X todos os ensaios sem estímulo - Balb/C3H, controle e infecção). Sem estímulo – verde; Tioglicolato – laranja.

A distribuição  $\beta$  da metilação de DNA em sítios demonstrou diferença entre células oriundas de animais estimulados com Tioglicolato de sódio e sem o estímulo - recuperadas por lavagem. Macrófagos da linhagem C3H (Figura 28 – B) demonstram maior diferença na

distribuição de metilação quando comparados a linhagem Balb (Figura 28 – A), é possível verificar em C3H o desvio do pico a direita na distribuição (Figura 28 – B – linha verde), o que sugere maior densidade de metilação em células sem estímulo. O mesmo pode ser visualizado quando se agrupam todas as células estimuladas e não estimuladas (Figura 28 – C). A linhagem Balb também apresenta maior metilação em células não estimuladas quando comparadas as estimuladas, entretanto o desvio é discreto como verificado na redução do pico a esquerda em células não estimuladas (Figura 28 – A – linha verde).

A análise da distribuição  $\beta$  da metilação também foi realizada nas outras regiões de anotação, a figura 29 demonstra a distribuição na região de promotores.



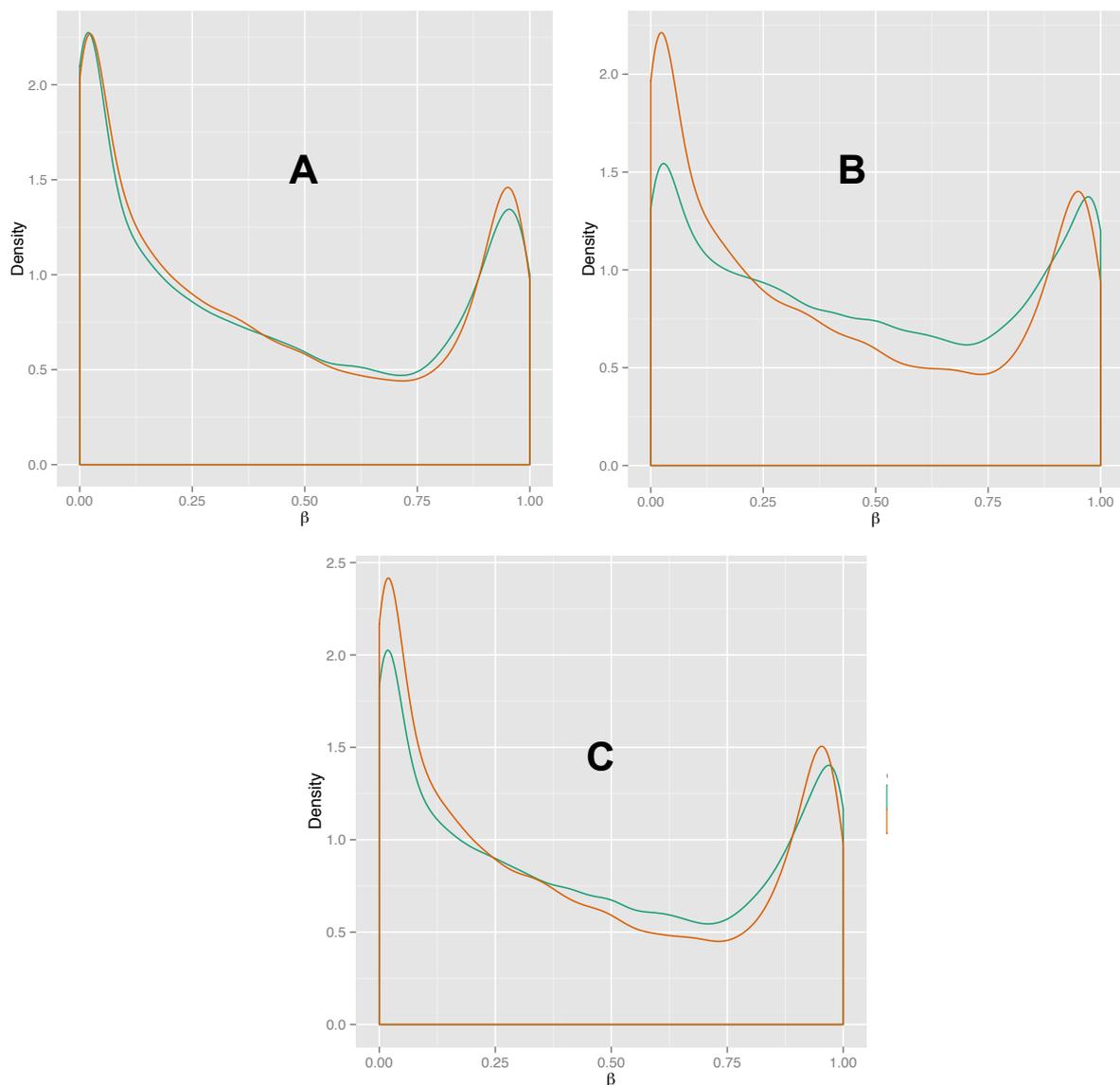


**Figura 29 – Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA em relação a estímulo na região de promotores.**

A- Distribuição  $\beta$  da comparação 10 (linhagem Balb - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem Balb/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 11 (linhagem C3H - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 12 (todos ensaios estimulado com Tioglicolato - Balb/C3H, controle e infecção X todos os ensaios sem estímulo - Balb/C3H, controle e infecção). Sem estímulo – verde; Tioglicolato – laranja.

É possível verificar que a distribuição  $\beta$  da metilação de DNA na região de promotores demonstra diferenças mais expressivas que em sítios e novamente mais acentuado em linhagem C3H que Balb. Verifica-se que o pico a esquerda referente a amostras estimuladas em C3H (Figura 29 – B – linha laranja) tem quase três vezes mais densidade que o não estimuladas (Figura 29 – B – linha verde), sugerindo novamente que o estímulo em linhagem C3H reduz a metilação de DNA. O mesmo pode ser visto quando agrupadas todas as células estimuladas e não estimuladas (Figura 29 – C) . Já a linhagem Balb apresenta redução do pico referente a estímulo (Figura 29 – A– linha laranja) quando comparado ao sem estímulo (Figura 29 – A – linha verde).

A figura 30 demonstra a distribuição  $\beta$  da metilação na região de genes.



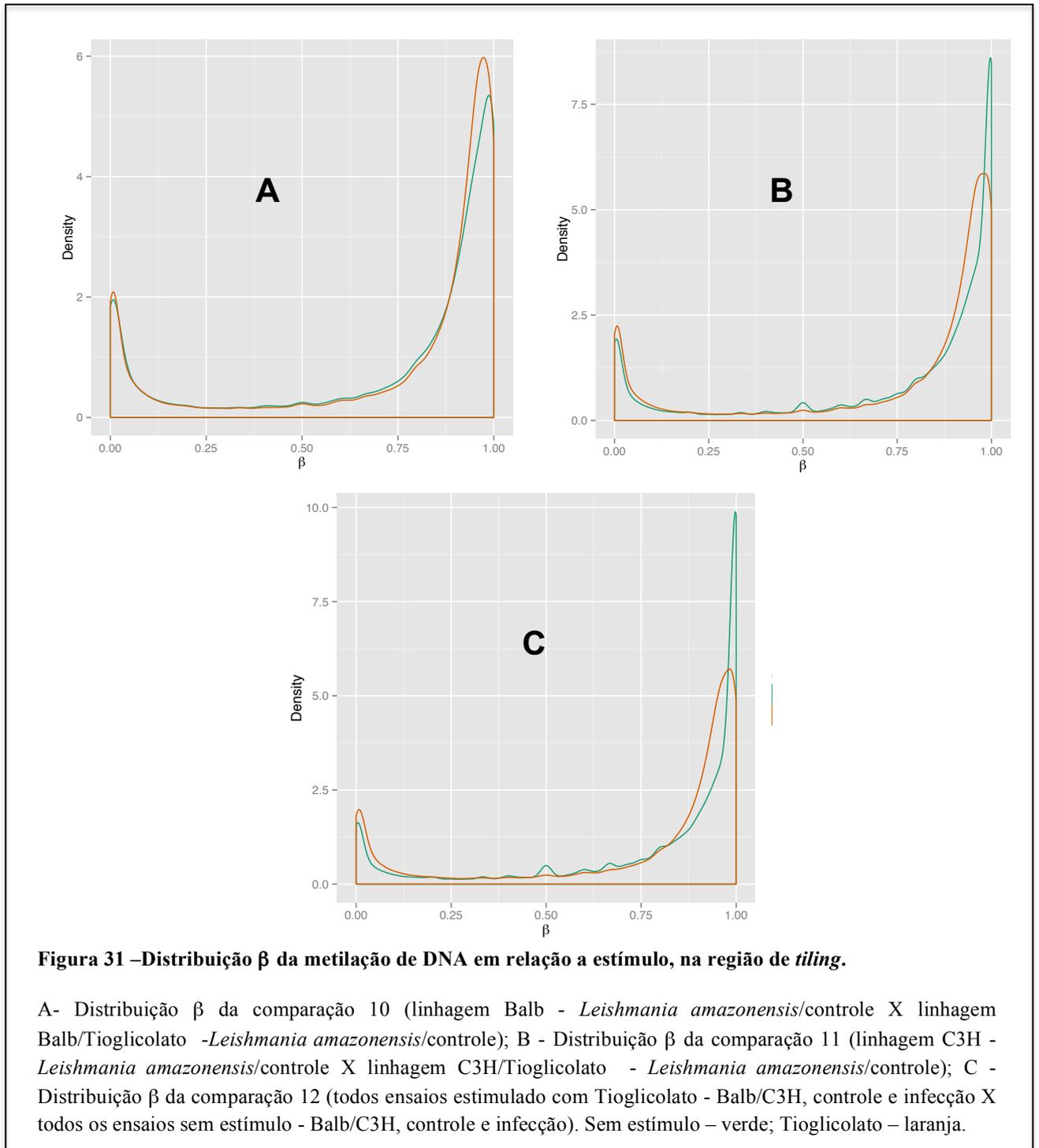
**Figura 30–Distribuição  $\beta$  da metilação de DNA em relação a estímulo, na região de genes.**

A- Distribuição  $\beta$  da comparação 10 (linhagem Balb - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem Balb/Tioglicolato -*Leishmania amazonensis*/controle); B - Distribuição  $\beta$  da comparação 11 (linhagem C3H - *Leishmania amazonensis*/controle X linhagem C3H/Tioglicolato - *Leishmania amazonensis*/controle); C - Distribuição  $\beta$  da comparação 12 (todos ensaios estimulado com Tioglicolato - Balb/C3H, controle e infecção X todos os ensaios sem estímulo - Balb/C3H, controle e infecção). Sem estímulo – verde; Tioglicolato – laranja.

O mesmo padrão de distribuição encontrado nas regiões anteriores pode ser verificado em genes, porém um mais discreto. Novamente C3H apresenta desvio do pico a esquerda na distribuição para estímulo (Figura 30 - B – linha laranja), o que sugere menor metilação ou perda, o mesmo pode ser visto quando agrupadas todas as células estimuladas e não

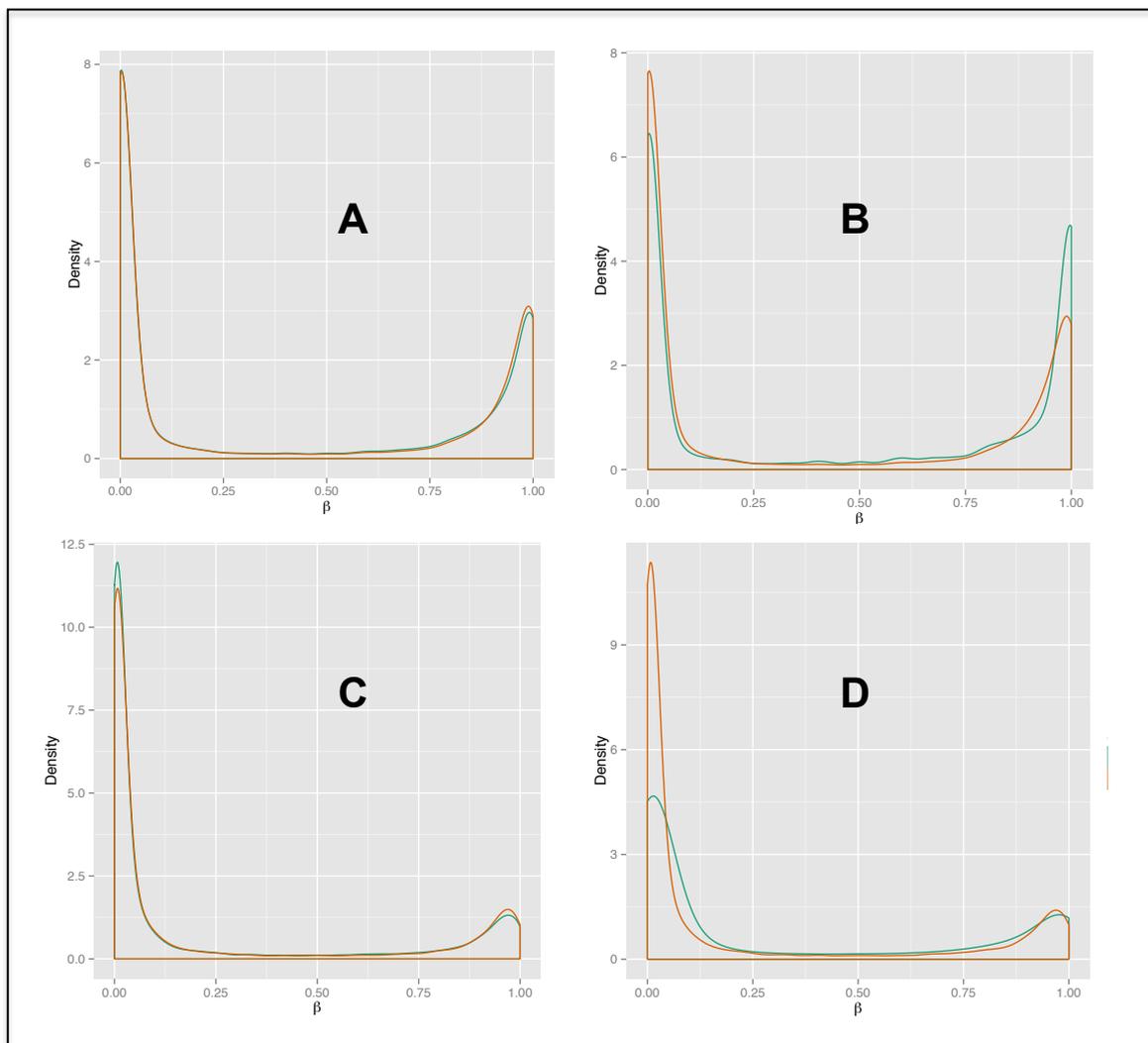
estimuladas onde há sutil perda no pico a esquerda correspondente a não estimulados (Figura 30 - C – linha verde). Em linhagem Balb estas diferenças não são visíveis (Figura 30 - A).

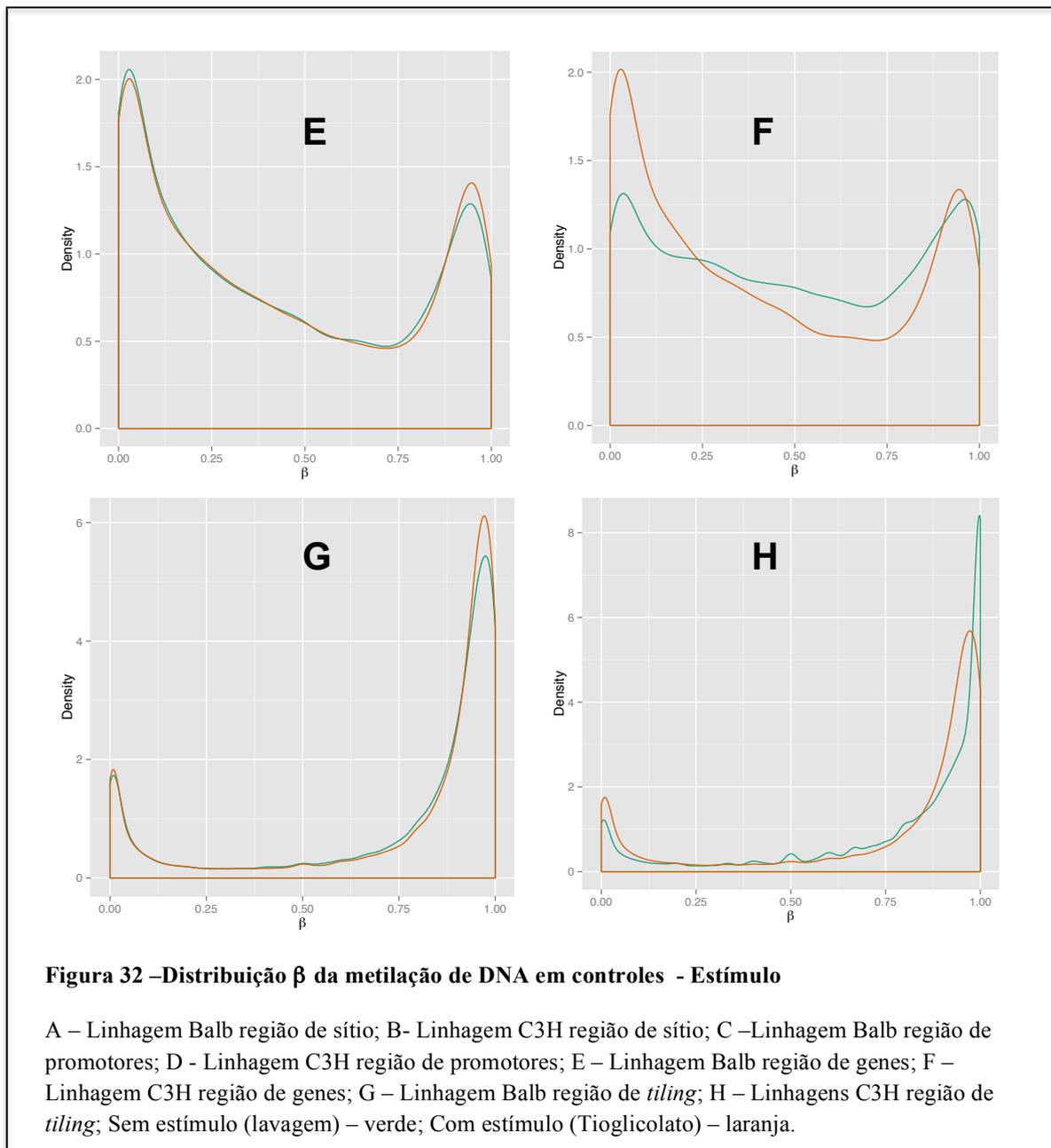
A figura 31 demonstra a distribuição  $\beta$  da metilação na região de *tiling*.



Seguindo os padrões das outras regiões a distribuição da metilação na região de *tiling* também demonstra alterações quando comparadas células estimuladas e não estimuladas. Em C3H é possível ver que o pico referente a células não estimuladas desvia a direita (Figura 31 – B – linha verde), o que sugere maior metilação que em células estimuladas. O mesmo tipo de desvio pode ser visto quando comparadas a células agrupadas em estímulo e não estímulo (Figura 31 – C – linha verde). Em Balb também é possível notar que células estimuladas tendem a ganhar metilação, devido ao pequeno desvio da distribuição referente a estímulo a direita (Figura 31 – A – linha laranja).

A fim de verificar se o fator infecção interferiu nas diferenças na distribuição da metilação visualizadas entre células estimuladas e não estimuladas, ou seja devido alguma atuação do parasita nas células ou simplesmente pela presença de Tioglicolato, foi realizado a análise da distribuição  $\beta$  dos sítios de metilação de DNA somente entre os controles de Balb e C3H estimulados e não estimulados nas regiões de sítio, promotores, genes e *tiling*. O resultado pode ser visualizado na Figura 32.



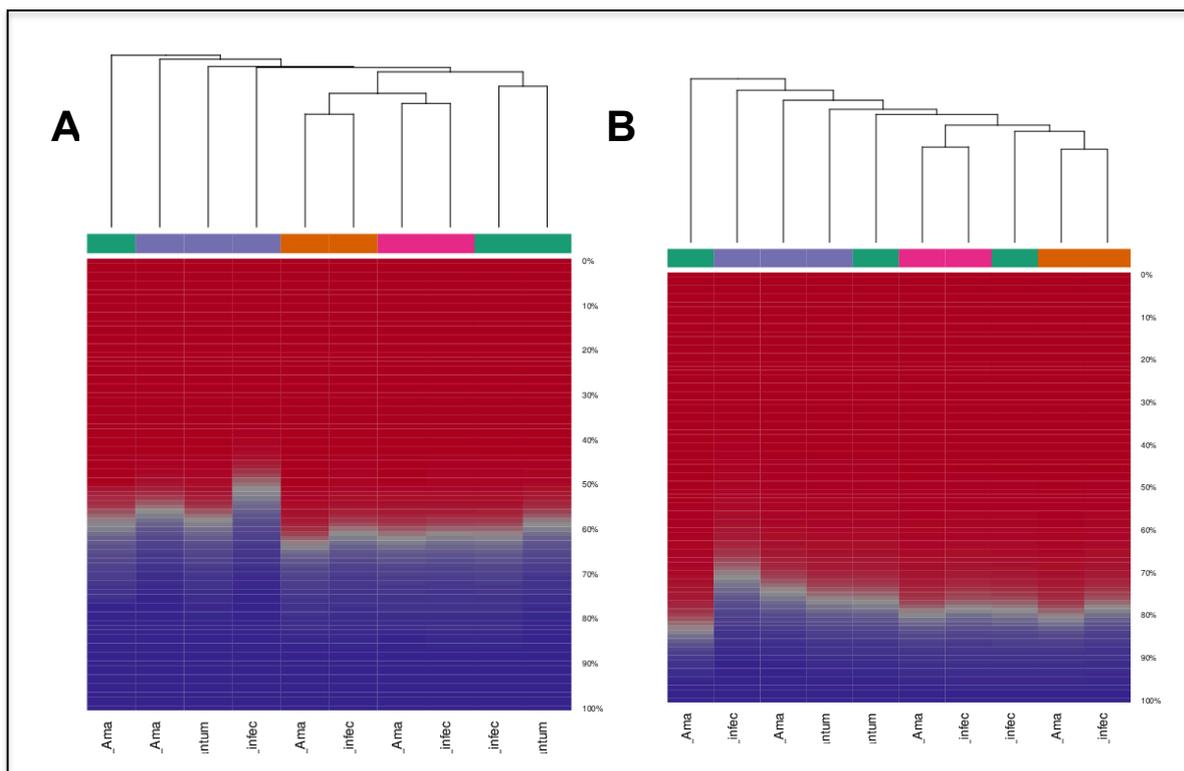


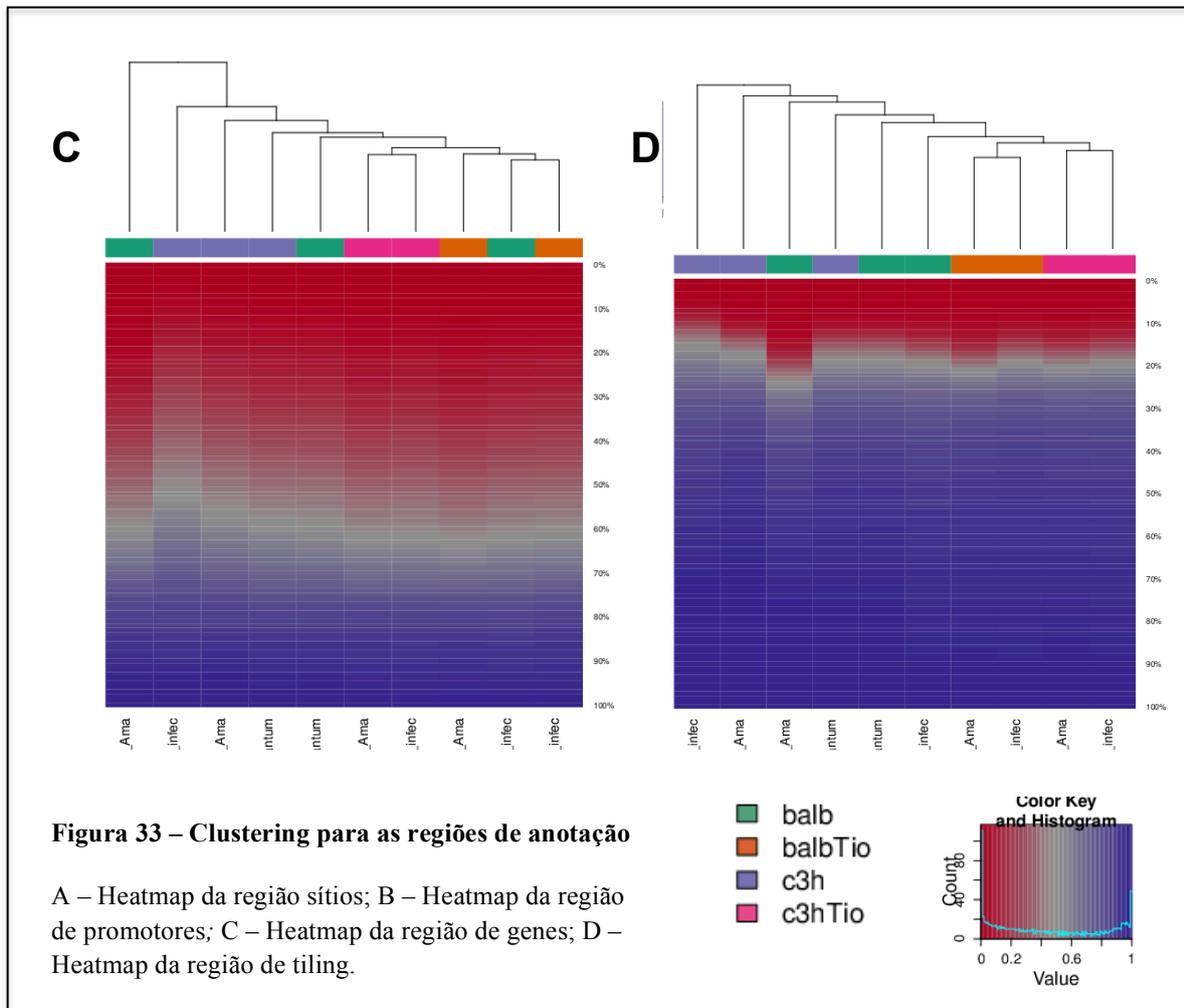
A distribuição  $\beta$  para os controles, demonstra que realmente existe diferenças entre células oriundas de animais estimulados e não estimulados, corroborando principalmente a análise de PCA (Figura 11) assim excluindo o fator infecção. Como nas análises anteriores, verifica-se que animais C3H tendem a sofrer mais influência pelo estímulo por Tioglicolato, demonstrando perda da metilação em todas as regiões para as células estimuladas (Figura 32 – B, D, F e H, linhas laranjas). Apesar de não ser tão evidente as mudanças que ocorrem na linhagem Balb, é possível verificar discreta diferença na região de promotores e *tiling*, nestas regiões as células estimuladas tendem a ganhar metilação (Figura 32 – C e G, linha laranja),

assim como na comparação de status – infecção e controle, novamente C3H e Balb respondem a estímulos de maneira oposta.

### 7.6.7. Agrupamento

A análise de cluster tem como intuito agrupar as amostras que tenham maior semelhança em relação a uma certa característica, a análise foi realizada nas regiões de anotação em todas as amostras, a fim de verificar a similaridade entre as proporções na metilação (Figura 33).





Na análise de sítios é possível visualizar que as amostras se agrupam com suas respectivas linhagens, o que não acontece nas outras regiões, entretanto as amostras estimuladas de ambas as linhagens se encontram pareadas em quase todas as regiões exceto em genes. O controle de C3H aparente ter maior concentração de metilação que as amostras infectadas da mesma linhagem e também que na sua linhagem estimulada com Tioglicolato. As diferenças entre as proporções de metilação são pequenas, entretanto como esta análise leva em consideração a proximidade das características de todas as amostras, talvez pelo fato de existir uma amostra *outlier* isso influencie na visualização.

## 8 – DISCUSSÃO

A técnica de RRBS é um método que permite a análise de maior número de amostras com reduzido custo, além de baixa exigência de cobertura, o estudo aqui descrito demonstrou que a técnica é viável para triagem da metilação nas diferentes variáveis do estudos *in vitro*. Um estudo da metilação de DNA em diferentes células e tecidos com RRBS, entre elas 82 diferentes tecidos, culturas primárias e linhagens celulares pode verificar a separação destes grupos correlacionando o padrão de metilação (Varley et al. 2013). RRBS é comparável as outras demais técnicas de análise de metilação e exceto por WGBS, RRBS demonstra maior capacidade de cobrir regiões de promotores e ilhas (Bock et al. 2010; Stevens et al. 2013).

O número de sequências obtidas e a qualidade foram satisfatórios, entretanto a cobertura de algumas amostras foi abaixo da média de 5x, o que pode ser observado como *outlier* em algumas análises. Smith e colaboradores (2009) descreveram que 5 a 10 milhões de sequências seriam o suficiente para uma cobertura de 8x em RRBS. “In silico” a cobertura de 1x representaria 6,8 milhões de sítios CpG e em ensaios biológicos com cobertura  $\geq 4x$  seria o suficiente para cobrir 80-90% destes sítios (Wang et al. 2013). Contudo é sugerido o aprofundamento no sequenciamento (10 a 20 milhões de sequências) o que é adequado para aumentar a capacidade de detecção dos níveis de metilação (Bock et al. 2010; Gu et al. 2011).

O genoma do camundongo é de aproximadamente 2,7gb, com cerca de 22 milhões de sítios CpG e mais de 25 mil CpGI. A enzima *MspI* corta sítios CC|GG, e estima-se que o genoma seja cortado em 2 milhões fragmentos, cada um contém no mínimo um sítio CpG de interesse. A técnica de RRBS é recomendada para análises de estudo comparativos em metilação de DNA, não sendo no entanto indicado para construção de metilomas, RRBS é capaz de cobrir no mínimo 12% do genoma (Harris et al. 2010; Deaton e Bird 2011; Chatterjee et al. 2012; Stevens et al. 2013). Devido a seleção de fragmentos de interesse, a exigência de cobertura para a técnica de RRBS é baixa, já que normalmente os sítios CpG estão dispersos ao longo do genoma e a técnica permite o enriquecimento dos mesmos.

A análise de componentes principais sugeriu diferenças na metilação de DNA entre as comparações, principalmente em relação a utilização de elicitação por Tioglicolato de sódio (Figura 10). O Tioglicolato é utilizado rotineiramente para aumentar o números de células (o

que reduz o número de animais) em diversas pesquisas com macrófagos. A utilização deste estímulo não leva ao aumento da atividade fagocítica e não haveria ativação de macrófagos (Leijh et al. 1984), entretanto não há nenhum estudo relacionado a padrões de metilação e infecção, nem caracterizando se ocorre a polarização dos macrófagos.

Sabe-se que células elicitadas e não elicitadas por Tioglicolato de sódio apresentam modulação distinta de receptores FcγR quando expostas a antígenos (Michl et al. 1979), este é um importante receptor na resposta imune inata, principalmente para o início da fagocitose de parasitas opsonizados. Também foram observadas diferenças no metabolismo de distintos substratos como glicose, lipídeos e oxigênio. Macrófagos elicitados por Tioglicolato apresentavam maior metabolismo de O<sub>2</sub> (Cohen, Ryan, e Root 1981) diferenças na distribuição de partículas intramembranas (Santos e De Souza 1983) e redução na oxidação de ácidos graxos (Peres et al. 1999) Alterações de receptores e nas vias de metabolização de ácido graxos pode ter influência no curso da Leishmaniose, não há estudos correlacionando o estímulo de macrófagos (seja através de Tioglicolato ou mesmo na diferenciação de monócitos para macrófagos) e a infecção.

A distribuição  $\beta$  realizada nas análises comparativas representa uma distribuição binominal, o que é normal para a representação de metilação de DNA, já que a maioria dos sítios no genoma se encontram metilados ou não metilados. Na imagem 9 referente a todos os sítios verifica-se que a maior densidade de sítios se encontra na região referente a baixa concentração de metilação, isso se deve a dois fatores: a digestão e seleção de fragmentos pela enzima *MspI* o que enriquece a seleção de ilhas CpG (CpGI) e promotores (Gu et al. 2010); e a seleção destas regiões as quais são principalmente descritas com alta concentração de CpG (promotores e CpGI), que normalmente se encontrando hipometiladas (Weber et al. 2007; Deaton e Bird 2011; Baubec e Schübeler 2014).

É possível sugerir nas comparações entre infecção x controle discreta diferença nas proporções da metilação de DNA em sítios, genes, promotores e *tiling* (figura 13, 14, 15 e 16). Um único estudo com *L. donovani* e metilação de DNA (450 *BeadChip array*) foi realizado por Marr e colaboradores (2014), com células de linhagem THP-1 (humanas), não com macrófagos peritoneais. Neste estudo o autor mostrou alteração na metilação de DNA entre infecção e controle no período de tempo de 48 horas, sendo principalmente em áreas de baixa e média concentração de sítios CpG, o que significa áreas fora da maioria dos promotores e ilhas. No trabalho aqui apresentado verifica-se que estas alterações ocorrem em

regiões ricas em CpG, principalmente por se tratar de um método que tende a selecionar tais regiões. Mesmo a região de *tiling* que abrange regiões maiores (5kb) demonstrou alguma alteração entre infecção e controle. Já foi demonstrado que diferentes métodos de avaliação da metilação de DNA podem ser comparados, existindo vantagens e desvantagens entre eles, entretanto as análises podem ser comparadas (Harris et al. 2010; Bock et al. 2010; Stevens et al. 2013).

THP-1 é uma linhagem celular muito utilizada para estudos com fagocitose, esta linhagem é derivada de monócitos oriundos de leucemia monocítica aguda. Um estudo comparativo entre monócitos, macrófagos derivados de monócitos e células THP-1 estimuladas com PMA (acetato de forbol miristato, processo que diferencia as células em monócitos), mostrou diferenças morfológicas na expansão citoplasmática e aumento do número de lisossomos, além de resistência a apoptose e diferente modulação de receptores TLR2 entre as células (Daigneault et al. 2010). Contudo, estudos usando THP-1 como macrófagos na interação com componentes do sistema cardiovascular, demonstram boa correlação epigenética e os autores consideram como um bom espelho para doença deste sistema (Qin 2012).

A diferença na distribuição da metilação entre as espécies de Leishmaniose cutânea (*L. amazonensis*) e visceral (*L. infantum*) foi muito sutil, não sendo possível afirmar tal diferença principalmente na linhagem Balb. Apesar do padrão de resposta imune entre espécies de *Leishmania spp.* ser praticamente igual e induzirem a mesma resposta imune, é possível verificar certa diferença na concentração de citocinas. A concentração de algumas citocinas como TNF- $\alpha$  é maior e mais aguda na doença cutânea, que leva a grande lesão tecidual. O TNF- $\alpha$  está associado a diversas doenças que degenerativas ósseas e neurológicas, a fase com maior apresentação de lesões cutâneas na doença cutânea e principalmente na muco-cutânea tem sido associadas a altas concentrações desta citocina. A resposta frente à leishmaniose visceral apresenta o mesmo perfil de citocinas, entretanto parece que há algum tipo de “atraso” nesta resposta, onde o parasita permanece em silêncio, assim após alguns dias é possível verificar o aumento do número do parasita e também das citocinas em baço e fígado (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998; Stanley e Engwerda 2007; Nylén e Eidsmo 2012; Lotz et al. 2012; Borrajo et al. 2014).

Animais Balb e C3H são uma mesma espécie e possuem carga genética semelhante, mas desde muito tempo sabe-se que diferentes linhagens de camundongos têm distinta

resposta imunológica à diversos patógenos, na triagem realizada por este estudo é possível sugerir de maneira consistente que há diferença na metilação de DNA entre espécies susceptíveis e resistentes (figura 22, 23, 24 e 25), excluindo o fator infecção ou controle como mostrado pela figura 26. O comportamento das linhagens em resposta à *Leishmania spp.* também são diferenciados, animais Balb e CBA apresentam a forma clínica patognomônica da doença, que muitas vezes pode ser fatal. Por outro lado, os animais C3H, C57BL/6 e C57BL/10 são normalmente resistentes, desenvolvendo poucas ou nenhuma lesão e muitas vezes ocorrendo auto-cura e debelação do parasita. Esta característica está associada ao tipo de respostas efetuada a CD4+. Os animais susceptíveis são descritos por apresentarem maior estímulo e presença de células Th2, enquanto que os resistentes têm maior presença de células Th1. Respostas diferenciadas na ativação de CD4+ são extremamente importantes para a sobrevivência de um organismo, a polarização de Th1 e Th2 é dependente de citocinas produzidas por diversas células. A polarização de células T *in vitro* envolve processos epigenéticos como alteração de histonas, metilação de DNA e modificação de cromatina, a enzima DNMT1 é essencial para a regulação de genes envolvidos na diferenciação de células T (Scott 1991; Ribeiro-de-Jesus et al. 1998; DeKrey, Lima, e Titus 1998; Lee et al. 2001; Kuroda, Kito, e Yamashita 2002; Lang et al. 2003; Wilson, Rowell, e Sekimata 2009; Probst et al. 2012; Schwarz et al. 2013).

Animais susceptíveis tratados com agentes anti-citocinas como anti- IL-4, são capazes de responder a doença, não demonstrando sinais e podendo debelar o parasita, o inverso ocorre em animais resistentes (C3H) tratados anti-IL12, o que leva a apresentação de sinais como animais susceptíveis (Scott 1991; Sacks e Noben-Trauth 2002; Schwarz et al. 2013). A comparação entre transcritos de C57BL/6 e Balb infectados com *L. amazonensis* demonstrou mais de 208 genes diferentemente expressos entre as duas linhagens, genes relacionados ao metabolismo de lipídeo, estresse oxidativo, citocinas, receptor Fcγ e sistema complemento (Probst et al. 2012). Não há estudos correlacionando outros mecanismos como proteômica e epigenética e provavelmente há distinções essenciais nestas áreas entre as linhagens. As duas linhagens apresentam fenótipos distintos, o que significa a presença de diferentes concentrações de proteínas, que por sua vez tem mecanismos epigenéticos envolvidos.

Macrófagos sofrem grande influência de seu ambiente, diversos trabalhos demonstram que estímulos podem levar a diferentes respostas no fenótipo de macrófagos. O estudo da polarização de macrófagos apesar de ainda não totalmente esclarecido, demonstra que o tipo

M1 tende a ter maior atividade pró-inflamatória que o M2, entretanto estudos para diferenciar estes dois tipos são basicamente *in vitro* (Filardy 2010, Diaz-Gandarilla 2013, Juhas 2015, Miles 2014). O processo de coleta de macrófagos pode se dar de muitas formas: macrófagos derivados de monócitos de sangue, macrófagos derivados de medula óssea, macrófagos de peritônio e macrófagos elicitados com Tioglicolato. Para que ocorra a expressão e ativação do fenótipo são utilizados citocinas no meio de cultura e então as células se diferenciam, sabe-se que alterações de histonas ocorrem diferencialmente entre macrófagos M1 e M2, o que também ocorre entre monócitos e macrófagos. É muito provável que modificações epigenéticas ocorram também em macrófagos derivados de monócito de sangue, de medula e estimuladas por Tioglicolato (Takeuch e Akira 2011; Mullican et al. 2011; Sica e Mantovani 2012; Kittan et al. 2013; Ivashkiv 2013).

Na investigação dos sítios de metilação de DNA deste estudo dois testes sugerem diferenças na metilação quando comparadas as células tratadas com Tioglicolato e as células que foram apenas recuperadas na lavagem. Como pode ser notado nas figura 10, através da análise de componentes principais e figuras 28, 29, 30 e 31 (linha laranja) através da distribuição  $\beta$ , células estimuladas tendem a apresentar sítios com menor densidade de metilação, o que é bem visível na região de promotores (figura 29), principalmente na linhagem C3H. Saeed e colaboradores 2014 demonstrou alterações epigenéticas e na expressão de genes quando comparados grupos de monócitos em quatro estados de diferenciação: monócitos, macrófagos derivados de monócitos, macrófagos (derivados de monócitos) tolerantes por LPS e macrófagos treinados por  $\beta$ - glucano (derivados de monócitos). Ele verificou que a dinâmica entre histonas tem padrões distintos entrem os 4 grupos e também 12% dos fatores de transcrição mostraram variação na expressão entre os grupos. Poucos trabalhos tentam correlacionar diferentes tipos de macrófagos ou mesmo identificar o impacto da estimulação *in vitro* sobre as células. Macrófagos elicitados por Tioglicolato de animais susceptíveis (CBA) mostraram o aumento da expressão de genes relacionados a lipídeos, entretanto sem alteração no combate ao parasita, os autores sugeriram que seria provavelmente devido a modulação do vacúolo que permite a sobrevivência do parasita (Probst et al. 2012).

Uma comparação entre a linhagem celular RAW264.7 e células elicitadas por Tioglicolato mostraram boa correlação na resposta imune e inflamatória, entretanto células elicitadas se diferenciavam quanto a expressão de genes que participam da síntese de lipídeos

(Maurya et al. 2013). O estudo com linhagem celular Huh7 (hepatocarcinoma) infectadas por *L. donovani* também verificou que o metabolismo de colesterol é alterado pelo parasita através de clivagem pelo fator de virulência GP63 em proteínas Dicer, que atuam sobre miRNAs, o que levaria a alterações pós traducionais (Descoteaux, Moradin, e Arango Duque 2013; June Ghosh et al. 2013).

O colesterol é um fator essencial para sinalização celular, inclusive na resposta inflamatória na manutenção da membrana, o que é essencial para a apresentação de antígenos, além de formação do vacúolo (Bansal, Bhatti, e Sehgal 2005). Hipocolestolemia é um indicador de prognóstico em pacientes com Leishmaniose visceral (Lal et al. 2010; J Ghosh et al. 2011). Apesar da alteração no metabolismo de lipídeos existir entre ambas as células, ainda restam algumas questões, já que nestas comparações ambas as células utilizadas estão modificadas do original, não sendo utilizados macrófagos sem estímulos para controle.

No trabalho aqui apresentado é importante salientar que as comparações realizadas são sequenciamento de amostras únicas, o que dificulta a obtenção de dados estatisticamente significantes. Contudo as análises por distribuição beta são métodos de distribuição estatística plausíveis, que sugerem alterações nos níveis de metilação na maioria das comparações em muitas regiões de anotação, ocorrendo principalmente na correlação entre linhagens e estímulos. Um outro fato a se abordar é que o período de infecção das células foi de 72 horas. A fagocitose de ambas amastigotas e promastigotas se inicia logo após o primeiro contato do parasita com a célula, em poucos minutos o parasita se liga ao receptor e já é possível verificar alguma internalização. O início da fagocitose leva cerca de 3 a 9 minutos após o primeiro contato com a célula, em 10 minutos já possível observar alterações de citoesqueleto. Cerca de 30 a 60 minutos este processo está finalizado, com todos os parasitas completamente internalizados, neste período já possível verificar a expressão de MHC II. Entre 2 a 18 horas é possível verificar a atividade de enzimas proteolíticas, o processo de transformação de promastigota para amastigota leva 5 dias (Courret et al. 2002).

Alterações epigenéticas são rápidas e agudas, se o parasita é capaz de ser fagocitado em até uma hora, talvez seja dentro deste período que o processo de modificações epigenéticas ocorra no hospedeiro em resposta ao parasita. O trabalho de Marr e colaboradores (2014) correlacionando metilação de DNA na interação parasita hospedeiro, apresentou 443 sítios diferentemente metilados significantes período de infecção das células foi de 48 horas e estes dados foram obtido através de array capaz de avaliar 485 mil sítios. No

trabalho aqui apresentado a amostra com menor número de sítios avaliados teve mais de 1,5 milhão de sítios. Foi demonstrado pela distribuição beta e a correlação nas análises secundárias que existem diferenças na metilação de DNA nas regiões anotadas, entretanto não pode ser estatisticamente calculada.

## 9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O trabalho descrito demonstra que a utilização da técnica de RRBS é satisfatória para investigação da variabilidade na metilação de DNA entre diferentes características do estudo *in vitro* na interação parasita hospedeiro;

Através das análises fica sugestivo que a metilação de DNA é alterada durante a infecção, sendo mais acentuada em animais de linhagem C3H;

A resposta ao parasita é inversa nas linhagens Balb e C3H, enquanto C3H sugere ter perda na metilação em células infectadas, Balb demonstra ganho na metilação em células infectadas. Esta modulação aparece mais intensa nas regiões de promotores, *tiling* e genes;

Não foi possível verificar diferenças entre a resposta para espécies que desenvolvem doença cutânea e visceral nas amostras analisadas;

As linhagens Balb e C3H diferem nos níveis de metilação em todas as regiões, o que é independente da infecção.

Animais estimulados e não estimulados apresentam distintos padrões de metilação, sendo que o estímulo leva a perda de metilação, o que é mais sugestivo em C3H, já que Balb apresenta discreta mudança.

Elaborar trabalhos futuros com RRBS e maior número de amostras poderiam validar estatisticamente as diferenças na metilação encontradas neste estudo. A utilização de células infectadas em diferentes tempos também poderia verificar a dinâmica destas modificações. Verificar a variação epigenética nos diferentes tipos celulares usados no estudo *in vitro* em resposta a infecção. Investigar alterações a níveis de proteômica e transcriptoma entre as linhagens usadas como modelo de infecção. Elaborar estudos para a padronização *in vitro*.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abu-Dayyeh, Issa, Marina Tiemi Shio, Shintaro Sato, Shizuo Akira, Benoit Cousineau, e Martin Olivier. 2008. “Leishmania-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif”. *PLoS Negl Trop Dis* 2 (12): e305–e305.
- Alvarado, S., R. D. Fernald, K. B. Storey, e M. Szyf. 2014. “The Dynamic Nature of DNA Methylation: A Role in Response to Social and Seasonal Variation”. *Integrative and Comparative Biology* 54 (1): 68–76. doi:10.1093/icb/icu034.
- Assenov, Yassen, Fabian Müller, Pavlo Lutsik, Jörn Walter, Thomas Lengauer, e Christoph Bock. 2014. “Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads”. *Nature Methods* 11 (11): 1138–40. doi:10.1038/nmeth.3115.
- Bacellar, Olívia, Argemiro D’oliveira, Selma Jerônimo, e Edgar M. Carvalho. 2000. “IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis”. *Cytokine* 12 (8): 1228–31.
- Bansal, Devendra, Harinderpal Singh Bhatti, e Rakesh Sehgal. 2005. “Role of cholesterol in parasitic infections”. *Lipids Health Dis* 4 (10): 1–7.
- Baubec, Tuncay, e Dirk Schübeler. 2014. “Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation”. *Current opinion in genetics & development* 25: 85–92.
- Baylin, Stephen B., e James G. Herman. 2000. “DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics”. *Trends in Genetics* 16 (4): 168–74.
- Belkaid, Yasmine, Karl F. Hoffmann, Susana Mendez, Shaden Kamhawi, Mark C. Udey, Tom A. Wynn, e David L. Sacks. 2001. “The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure”. *The Journal of experimental medicine* 194 (10): 1497–1506.
- Bird, A. 2002. “DNA methylation patterns and epigenetic memory”. *Genes & Development* 16 (1): 6–21. doi:10.1101/gad.947102.
- Bock, Christoph, Eleni M. Tomazou, Arie B. Brinkman, Fabian Müller, Femke Simmer, Hongcang Gu, Natalie Jäger, Andreas Gnirke, Hendrik G. Stunnenberg, e Alexander Meissner. 2010. “Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies”. *Nature biotechnology* 28 (10): 1106–14.
- Borrajo, Ana, Ana I. Rodriguez-Perez, Carmen Diaz-Ruiz, Maria J. Guerra, e Jose L. Labandeira-Garcia. 2014. “Microglial TNF- $\alpha$  mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin”. *Glia* 62 (1): 145–57.
- Boyle, Patrick, Kendell Clement, Hongcang Gu, Zachary D. Smith, Michael Ziller, Jennifer L. Fostel, Laurie Holmes, Jim Meldrim, Fontina Kelley, e Andreas Gnirke. 2012. “Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling”. *Genome Biol* 13 (10): R92.
- Braun, Laurence, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Manickam Yogavel, Aurélie Curt-Varesano, Rose-Laurence Curt-Bertini, Tahir Hussain, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Yohann Coute, Hervé Pelloux, e Isabelle Tardieux. 2013. “A *Toxoplasma dense* granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation”. *The Journal of experimental medicine* 210 (10): 2071–86.

- Canton, Johnathan. 2014. "Phagosome maturation in polarized macrophages". *Journal of leukocyte biology* 96 (5): 729–38.
- Cedar, Howard, e Yehudit Bergman. 2012. "Programming of DNA methylation patterns". *Annual review of biochemistry* 81: 97–117.
- Chandra, Dinesh, e Sita Naik. 2008. "Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism". *Clinical & Experimental Immunology* 154 (2): 224–34.
- Chatterjee, Aniruddha, Euan J. Rodger, Peter A. Stockwell, Robert J. Weeks, e Ian M. Morison. 2012. "Technical considerations for reduced representation bisulfite sequencing with multiplexed libraries". *BioMed Research International* 2012.
- Cohen, M. S., J. L. Ryan, e R. K. Root. 1981. "The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect of monolayer formation." *The Journal of Immunology* 127 (3): 1007–11.
- Cope, Andrew, Gaelle Le Fric, John Cardone, e Claudia Kemper. 2011. "The Th1 life cycle: molecular control of IFN- $\gamma$  to IL-10 switching". *Trends in immunology* 32 (6): 278–86.
- Costa, Carlos HN, Régis BB Gomes, Mauro RB Silva, Lourdes M. Garcez, Patricia KS Ramos, Regina S. Santos, Jeffrey J. Shaw, John R. David, e James H. Maguire. 2000. "Competence of the human host as a reservoir for Leishmania chagasi". *Journal of Infectious Diseases* 182 (3): 997–1000.
- Couper, Kevin N., Daniel G. Blount, e Eleanor M. Riley. 2008. "IL-10: the master regulator of immunity to infection". *The Journal of Immunology* 180 (9): 5771–77.
- Courret, Nathalie, Claude Fréhel, Nelly Gouhier, Marcel Pouchelet, Eric Prina, Pascal Roux, e Jean-Claude Antoine. 2002. "Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites". *Journal of cell science* 115 (11): 2303–16.
- Daigneault, Marc, Julie A. Preston, Helen M. Marriott, Moira K. B. Whyte, e David H. Dockrell. 2010. "The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages". Organizado por T. Mark Doherty. *PLoS ONE* 5 (1): e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668.
- David Sibley, L. 2011. "Invasion and intracellular survival by protozoan parasites". *Immunological reviews* 240 (1): 72–91.
- Deaton, Aimée M., e Adrian Bird. 2011. "CpG islands and the regulation of transcription". *Genes & development* 25 (10): 1010–22.
- de Celis, Hector Álvarez, Carolina P. Gómez, Albert Descoteaux, e Pascale Duplay. 2015. "Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during Leishmania major infection". *Microbes and Infection* 17 (4): 285–94.
- DeKrey, Gregory K., Hermenio C. Lima, e Richard G. Titus. 1998. "Analysis of the immune responses of mice to infection with Leishmania braziliensis". *Infection and immunity* 66 (2): 827–29.
- de Monerri, Natalie C. Silmon, e Kami Kim. 2014. "Pathogens hijack the epigenome: a new twist on host-pathogen interactions". *The American journal of pathology* 184 (4): 897–911.
- de Moraes, Carlos Gustavo Vieira, Ana Karina Castro Lima, Rodrigo Terra, Rosiane Freire dos Santos, Silvia Amaral Gonçalves Da-Silva, e Patrícia Maria Lourenço Dutra. 2014. "The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection". *BioMed Research International* 2015.

- Dent, Lindsay A. 2002. “For better or worse: common determinants influencing health and disease in parasitic infections, asthma and reproductive biology”. *Journal of reproductive immunology* 57 (1): 255–72.
- De Prins, Sofie, Gudrun Koppen, Griet Jacobs, Evi Dons, Els Van de Mierop, Vera Nelen, Frans Fierens, et al. 2013. “Influence of Ambient Air Pollution on Global DNA Methylation in Healthy Adults: A Seasonal Follow-Up”. *Environment International* 59 (setembro): 418–24. doi:10.1016/j.envint.2013.07.007.
- Descoteaux, Albert, Neda Moradin, e Guillermo Arango Duque. 2013. “Leishmania Dices Away Cholesterol for Survival”. *Cell Host & Microbe* 13 (3): 245–47. doi:10.1016/j.chom.2013.02.018.
- Díaz-Gandarilla, José A., Carlos Osorio-Trujillo, Verónica Ivonne Hernández-Ramírez, e Patricia Talamás-Rohana. 2013. “PPAR activation induces m1 macrophage polarization via cPLA 2-COX-2 inhibition, activating ros production against Leishmania mexicana”. *BioMed research international* 2013.
- Dinarello, Charles A. 2000. “Proinflammatory cytokines”. *Chest Journal* 118 (2): 503–8.
- Duque, Guillermo Arango, e Albert Descoteaux. 2014. “Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases”. *Frontiers in immunology* 5.
- Dworkin, Amy M., Tim H.-M. Huang, e Amanda Ewart Toland. 2009. “Epigenetic Alterations in the Breast: Implications for Breast Cancer Detection, Prognosis and Treatment”. *Seminars in Cancer Biology* 19 (3): 165–71. doi:10.1016/j.semcancer.2009.02.007.
- El Kasmi, Karim C., Joseph E. Qualls, John T. Pesce, Amber M. Smith, Robert W. Thompson, Marcela Henao-Tamayo, Randall J. Basaraba, Till König, Ulrike Schleicher, e Mi-Sun Koo. 2008. “Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens”. *Nature immunology* 9 (12): 1399–1406.
- Epelman, Slava, Kory J. Lavine, e Gwendalyn J. Randolph. 2014. “Origin and functions of tissue macrophages”. *Immunity* 41 (1): 21–35.
- Faria, Marilia S., Flavia CG Reis, e Ana Paula CA Lima. 2012. “Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters?” *Journal of parasitology research* 2012.
- Feng, S., S. J. Cokus, X. Zhang, P.-Y. Chen, M. Bostick, M. G. Goll, J. Hetzel, et al. 2010. “Conservation and Divergence of Methylation Patterning in Plants and Animals”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (19): 8689–94. doi:10.1073/pnas.1002720107.
- Gautier, Emmanuel L., Tal Shay, Jennifer Miller, Melanie Greter, Claudia Jakubzick, Stoyan Ivanov, Julie Helft, Andrew Chow, Kutlu G. Elpek, e Simon Gordonov. 2012. “Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages”. *Nature immunology* 13 (11): 1118–28.
- Gavani, AS Mazloumi, M. H. Hodjati, H. Mohite, e C. R. Davies. 2002. “Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matchedcluster randomised trial”. *The Lancet* 360 (9330): 374–79.
- Ghosh, J, C S Lal, K Pandey, V N R Das, P Das, K Roychoudhury, e S Roy. 2011. “Human Visceral Leishmaniasis: Decrease in Serum Cholesterol as a Function of Splenic Parasite Load”. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 105 (3): 267–71. doi:10.1179/136485911X12899838683566.
- Ghosh, June, Mainak Bose, Syamal Roy, e Suvendra N. Bhattacharyya. 2013. “Leishmania Donovanii Targets Dicer1 to Downregulate miR-122, Lower Serum Cholesterol, and Facilitate Murine Liver Infection”. *Cell Host & Microbe* 13 (3): 277–88. doi:10.1016/j.chom.2013.02.005.

- Gomes, M. V. d. M., e G. G. Pelosi. 2013. “Epigenetic Vulnerability and the Environmental Influence on Health”. *Experimental Biology and Medicine* 238 (8): 859–65. doi:10.1177/1535370213490630.
- Gómez-Díaz, Elena, Mireia Jordà, Miguel Angel Peinado, e Ana Rivero. 2012. “Epigenetics of host–pathogen interactions: the road ahead and the road behind”.
- Gradoni, L., e M. Gramiccia. 1994. “Leishmania infantum tropism: strain genotype or host immune status?” *Parasitology Today* 10 (7): 264–67.
- Gu, Hongcang, Christoph Bock, Tarjei S Mikkelsen, Natalie Jäger, Zachary D Smith, Eleni Tomazou, Andreas Gnirke, Eric S Lander, e Alexander Meissner. 2010. “Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution”. *Nature Methods* 7 (2): 133–36. doi:10.1038/nmeth.1414.
- Guiducci, Cristiana, Alain P. Vicari, Sabina Sangaletti, Giorgio Trinchieri, e Mario P. Colombo. 2005. “Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection”. *Cancer research* 65 (8): 3437–46.
- Harris, R. Alan, Ting Wang, Cristian Coarfa, Raman P. Nagarajan, Chibo Hong, Sara L. Downey, Brett E. Johnson, Shaun D. Fouse, Allen Delaney, e Yongjun Zhao. 2010. “Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications”. *Nature biotechnology* 28 (10): 1097–1105.
- Heyn, Holger, e Manel Esteller. 2012. “DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges”. *Nature Reviews Genetics* 13 (10): 679–92. doi:10.1038/nrg3270.
- Hong, Changjin, Nathan L. Clement, Spencer Clement, Saher S. Hammoud, Douglas T. Carrell, Bradley R. Cairns, Quinn Snell, Mark J. Clement, e William E. Johnson. 2013. “Probabilistic alignment leads to improved accuracy and read coverage for bisulfite sequencing data”. *BMC bioinformatics* 14 (1): 337.
- Hu, Shaohui, Jun Wan, Yijing Su, Qifeng Song, Yaxue Zeng, Ha Nam Nguyen, Jaehoon Shin, et al. 2013. “DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors”. *Elife* 2: e00726.
- Ishii, M., H. Wen, C. A. S. Corsa, T. Liu, A. L. Coelho, R. M. Allen, W. F. Carson, et al. 2009. “Epigenetic Regulation of the Alternatively Activated Macrophage Phenotype”. *Blood* 114 (15): 3244–54. doi:10.1182/blood-2009-04-217620.
- Ismail, Ahmed, Ahmed M. El Hassan, Kåre Kemp, Soha Gasim, Abd El Gadir MY Kadaru, Torsten Møller, Arsalan Kharazmi, e Thor G. Theander. 1999. “Immunopathology of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL): T-cell phenotypes and cytokine profile”. *The Journal of pathology* 189 (4): 615–22.
- Ivashkiv, Lionel B. 2013. “Epigenetic regulation of macrophage polarization and function”. *Trends in immunology* 34 (5): 216–23.
- Jacobson, Nils G., Susanne J. Szabo, Renate M. Weber-Nordt, Zhong Zhong, Robert D. Schreiber, J. E. Darnell, e Kenneth M. Murphy. 1995. “Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 3 and Stat4.” *The Journal of experimental medicine* 181 (5): 1755–62.
- Jaramillo, Maritza, Maria Adelaida Gomez, Ola Larsson, Marina Tiemi Shio, Ivan Topisirovic, Irazú Contreras, Randi Luxenburg, et al. 2011. “Leishmania Repression of Host Translation through mTOR Cleavage Is Required for Parasite Survival and Infection”. *Cell Host & Microbe* 9 (4): 331–41. doi:10.1016/j.chom.2011.03.008.
- Ji, Jiexiang, Jiaren Sun, e Lynn Soong. 2003. “Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis”. *Infection and immunity* 71 (8): 4278–88.

- Jones, Peter A. 2012. "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond". *Nature Reviews Genetics* 13 (7): 484–92. doi:10.1038/nrg3230.
- Juhas, Ulana, Monika Ryba-Stanisławowska, Patryk Szargiej, e Jolanta Myśliwska. 2015. "Different pathways of macrophage activation and polarization." *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 69: 496.
- Kane, Margaret Mentink, e David M. Mosser. 2001. "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis". *The Journal of Immunology* 166 (2): 1141–47.
- Kaye, Paul, e Phillip Scott. 2011. "Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface". *Nature Reviews Microbiology* 9 (8): 604–15.
- Kima, Peter E. 2007. "The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist". *International journal for parasitology* 37 (10): 1087–96.
- Kittan, Nicolai A., Ronald M. Allen, Abhay Dhaliwal, Karen A. Cavassani, Matthew Schaller, Katherine A. Gallagher, William F. Carson, et al. 2013. "Cytokine Induced Phenotypic and Epigenetic Signatures Are Key to Establishing Specific Macrophage Phenotypes". Organizado por Gernot Zissel. *PLoS ONE* 8 (10): e78045. doi:10.1371/journal.pone.0078045.
- Kohli, Rahul M., e Yi Zhang. 2013. "TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation". *Nature* 502 (7472): 472–79. doi:10.1038/nature12750.
- Kondo, Takeshi, Taro Kawai, e Shizuo Akira. 2012. "Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling". *Trends in immunology* 33 (9): 449–58.
- Körner, Heinrich, Brendan McMorran, Dirk Schlüter, e Phillip Fromm. 2010. "The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers". *International journal for parasitology* 40 (8): 879–88.
- Kuroda, Etsushi, Tomohiro Kito, e Uki Yamashita. 2002. "Reduced expression of STAT4 and IFN- $\gamma$  in macrophages from BALB/c mice". *The Journal of Immunology* 168 (11): 5477–82.
- Laird, Peter W. 2010. "Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis". *Nature Reviews Genetics* 11 (3): 191–203.
- Lal, Chandra S., Neena Verma, Vidya N. Rabidas, Alok Ranjan, Krishna Pandey, Rakesh B. Verma, Dharmendra Singh, Sanjay Kumar, e Pradeep Das. 2010. "Total Serum Cholesterol Determination Can Provide Understanding of Parasite Burden in Patients with Visceral Leishmaniasis Infection". *Clinica Chimica Acta* 411 (23-24): 2112–13. doi:10.1016/j.cca.2010.08.041.
- Lambertz, Ulrike, Judith Maxwell Silverman, Devki Nandan, W. Robert McMaster, Joachim Clos, Leonard J. Foster, e Neil E. Reiner. 2012. "Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis". *Journal of leukocyte biology* 91 (6): 887–99.
- Lang, Thierry, Nathalie Courret, Jean-Hervé Colle, Geneviève Milon, e Jean-Claude Antoine. 2003. "The levels and patterns of cytokines produced by CD4 T lymphocytes of BALB/c mice infected with *Leishmania major* by inoculation into the ear dermis depend on the infectiousness and size of the inoculum". *Infection and immunity* 71 (5): 2674–83.
- Lawrence, Toby, e Gioacchino Natoli. 2011. "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity". *Nature reviews immunology* 11 (11): 750–61.
- Lee, Peggy P., David R. Fitzpatrick, Caroline Beard, Heidi K. Jessup, Sophie Lehar, Karen W. Makar, Mercedes Pérez-Melgosa, et al. 2001. "A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival". *Immunity* 15 (5): 763–74.

- Leijh, P. C., T. L. Van Zwet, M. N. Ter Kuile, e R. Van Furth. 1984. "Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages." *Infection and immunity* 46 (2): 448–52.
- Liehl, Peter, Vanessa Zuzarte-Luis, e Maria M. Mota. 2015. "Unveiling the pathogen behind the vacuole". *Nature Reviews Microbiology*.
- Lotz, Jeffrey C., Victor Haughton, Scott D. Boden, Howard S. An, James D. Kang, Koichi Masuda, Anthony Freemont, Sigurd Berven, Dilip K. Sengupta, e Lawrence Tanenbaum. 2012. "New treatments and imaging strategies in degenerative disease of the intervertebral disks". *Radiology* 264 (1): 6–19.
- Lynn, Miriam A., e W. Robert McMaster. 2008. "Leishmania: conserved evolution–diverse diseases". *Trends in parasitology* 24 (3): 103–5.
- Marazzi, Ivan, Jessica S. Y. Ho, Jaehoon Kim, Balaji Manicassamy, Scott Dewell, Randy A. Albrecht, Chris W. Seibert, et al. 2012. "Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic". *Nature* 483 (7390): 428–33. doi:10.1038/nature10892.
- Marr, Alexandra K., Julia L. MacIsaac, Ruiwei Jiang, Adriana M. Airo, Michael S. Kobor, e W. Robert McMaster. 2014. "Leishmania donovani infection causes distinct epigenetic DNA methylation changes in host macrophages".
- Mathur, Ram Kumar, Amit Awasthi, Pallavi Wadhone, Boppana Ramanamurthy, e Bhaskar Saha. 2004. "Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses". *Nature medicine* 10 (5): 540–44.
- Matlashewski, Greg. 2001. "Leishmania Infection and Virulence". *Medical Microbiology and Immunology* 190 (1-2): 37–42. doi:10.1007/s004300100076.
- Mauricio, Isabel Larginho, M. K. Howard, J. R. Stothard, e M. A. Miles. 1999. "Genomic diversity in the Leishmania donovani complex". *Parasitology* 119 (03): 237–46.
- Maurya, M. R., S. Gupta, X. Li, E. Fahy, A. R. Dinasarapu, M. Sud, H. A. Brown, et al. 2013. "Analysis of Inflammatory and Lipid Metabolic Networks across RAW264.7 and Thioglycolate-Elicited Macrophages". *The Journal of Lipid Research* 54 (9): 2525–42. doi:10.1194/jlr.M040212.
- McCall, Laura-Isobel, Wen-Wei Zhang, Kurt Dejgaard, Vanessa Diniz Atayde, Alexander Mazur, Shalindra Ranasinghe, Jing Liu, Martin Olivier, Tommy Nilsson, e Greg Matlashewski. 2015. "Adaptation of Leishmania donovani to cutaneous and visceral environments: in vivo selection and proteomic analysis". *Journal of proteome research* 14 (2): 1033–59.
- McGuinness, David H., Prabhjyot K. Dehal, e Richard J. Pleass. 2003. "Pattern Recognition Molecules and Innate Immunity to Parasites". *Trends in Parasitology* 19 (7): 312–19. doi:10.1016/S1471-4922(03)00123-5.
- Michl, JOSEF, MARGARET M. Pieczonka, J. Cc Unkeless, e S. C. Silverstein. 1979. "Effects of immobilized immune complexes on Fc-and complement-receptor function in resident and thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages." *The Journal of experimental medicine* 150 (3): 607–21.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, e A. M. Hill. 2000. "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm". *The Journal of Immunology* 164 (12): 6166–73. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166.
- Moore, Lisa D., Thuc Le, e Guoping Fan. 2013. "DNA methylation and its basic function". *Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23–38.
- Moradin, Neda, e Albert Descoteaux. 2012. "Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages". *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2.
- Morales, Miguel A., Reiko Watanabe, Christine Laurent, Pascal Lenormand, Jean-Claude Rousselle, Abdelkader Namane, e Gerald F. Späth. 2008. "Phosphoproteomic analysis of Leishmania donovani pro-and amastigote stages". *Proteomics* 8 (2): 350–63.

- Mullican, S. E., C. A. Gaddis, T. Alenghat, M. G. Nair, P. R. Giacomini, L. J. Everett, D. Feng, et al. 2011. "Histone Deacetylase 3 Is an Epigenomic Brake in Macrophage Alternative Activation". *Genes & Development* 25 (23): 2480–88. doi:10.1101/gad.175950.111.
- Muñoz-Cánoves, Pura, e Luciano Di Croce. 2015. "Special Issue: Epigenetics". *FEBS Journal* 282 (9): 1569–70.
- Muraille, Eric, Oberdan Leo, e Muriel Moser. 2014. "TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?" *Frontiers in immunology* 5.
- Murphy, Michaela L., Ulrike Wille, Eric N. Villegas, Christopher A. Hunter, e Jay P. Farrell. 2001. "IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection". *European journal of immunology* 31 (10): 2848–56.
- Murray, Henry W., Christina M. Lu, Smita Mauze, Sherry Freeman, Andre L. Moreira, Gilla Kaplan, e Robert L. Coffman. 2002. "Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy". *Infection and Immunity* 70 (11): 6284–93.
- Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdts, Siamon Gordon, John A. Hamilton, Lionel B. Ivashkiv, e Toby Lawrence. 2014. "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines". *Immunity* 41 (1): 14–20.
- Murray, Peter J., e Stephen T. Smale. 2012. "Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways". *Nature immunology* 13 (10): 916–24.
- Noben-Trauth, Nancy, Rosalia Lira, Hisashi Nagase, William E. Paul, e David L. Sacks. 2003. "The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*". *The Journal of Immunology* 170 (10): 5152–58.
- Novais, Fernanda O., Lucas P. Carvalho, Sara Passos, David S. Roos, Edgar M. Carvalho, Phillip Scott, e Daniel P. Beiting. 2014. "Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology". *Journal of Investigative Dermatology*.
- Nylén, S., e L. Eidsmo. 2012. "Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis". *Parasite immunology* 34 (12): 551–61.
- O'Garra, Anne, e Kenneth M. Murphy. 2009. "From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce TH1 development". *Nature immunology* 10 (9): 929–32.
- Okwor, Ifeoma, Ping Jia, e Jude E. Uzonna. 2015. "Interaction of Macrophage Antigen 1 and CD40 Ligand Leads to IL-12 Production and Resistance in CD40-Deficient Mice Infected with *Leishmania major*". *The Journal of Immunology* 195 (7): 3218–26.
- Okwor, Ifeoma, Zhirong Mou, Dong Liu, e Jude Uzonna. 2012. "Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis". *Frontiers in immunology* 3.
- O'Shea, John J., e Peter J. Murray. 2008. "Cytokine signaling modules in inflammatory responses". *Immunity* 28 (4): 477–87.
- Patterson, Kate, Laura Molloy, Wenjia Qu, e Susan Clark. 2011. "A metilação do DNA: Modificação e Análise de bissulfito".
- Peres, C. M., J. Procopio, M. Costa, e R. Curi. 1999. "Thioglycolate-elicited rat macrophages exhibit alterations in incorporation and oxidation of fatty acids". *Lipids* 34 (11): 1193–97.
- Podinovskaia, Maria, e Albert Descoteaux. 2015. "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction". *Future microbiology* 10 (1): 111–29.

- Probst, Christian M., Rodrigo A. Silva, Juliana PB Menezes, Tais F. Almeida, Ivana N. Gomes, Andréia C. Dallabona, Luiz S. Ozaki, Gregory A. Buck, Daniela P. Pavoni, e Marco A. Krieger. 2012. "A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection". *BMC microbiology* 12 (1): 22.
- Puri, Vidhi, Aneesh Goyal, Rajan Sankaranarayanan, Anton J. Enright, e Tushar Vaidya. 2011. "Evolutionary and functional insights into *Leishmania* META1: evidence for lateral gene transfer and a role for META1 in secretion". *BMC evolutionary biology* 11 (1): 334.
- Qin, Zhenyu. 2012. "The Use of THP-1 Cells as a Model for Mimicking the Function and Regulation of Monocytes and Macrophages in the Vasculature". *Atherosclerosis* 221 (1): 2–11. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003.
- Ribeiro-de-Jesus, A., Roque Pacheco de Almeida, Hélio Lessa, Olívia Bacellar, e E. M. Carvalho. 1998. "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31 (1): 143–48.
- Romano, Audrey, Ehud Inbar, Alain Debrabant, Melanie Charmoy, Phillip Lawyer, Flavia Ribeiro-Gomes, Mourad Barhoumi, et al. 2014. "Cross-Species Genetic Exchange between Visceral and Cutaneous Strains of *Leishmania* in the Sand Fly Vector". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (47): 16808–13. doi:10.1073/pnas.1415109111.
- Sacks, David, e Nancy Noben-Trauth. 2002. "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice". *Nature Reviews Immunology* 2 (11): 845–58.
- Santos, A. B., e W. De Souza. 1983. "Surface charge and ultrastructure of the cell surface of resident and thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages." *Journal of submicroscopic cytology* 15 (4): 897–911.
- Saraiva, Margarida, e Anne O'Garra. 2010. "The regulation of IL-10 production by immune cells". *Nature Reviews Immunology* 10 (3): 170–81.
- Schneider, Anne G., Delbert S. Abi Abdallah, Barbara A. Butcher, e Eric Y. Denkers. 2013. "Toxoplasma Gondii Triggers Phosphorylation and Nuclear Translocation of Dendritic Cell STAT1 While Simultaneously Blocking IFN $\gamma$ -Induced STAT1 Transcriptional Activity". Organizado por Mohamed Ali Hakimi. *PLoS ONE* 8 (3): e60215. doi:10.1371/journal.pone.0060215.
- Schultz, Matthew D., Yupeng He, John W. Whitaker, Manoj Hariharan, Eran A. Mukamel, Danny Leung, Nisha Rajagopal, et al. 2015. "Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation". *Nature* 523 (7559): 212–16. doi:10.1038/nature14465.
- Schwarz, Tobias, Katharina A. Remer, Wiebke Nahrendorf, Anita Masic, Lisa Siewe, Werner Müller, Axel Roers, e Heidrun Moll. 2013. "T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine". *PLoS Pathog* 9 (6): e1003476.
- Scott, Phillip. 1991. "IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis." *The Journal of Immunology* 147 (9): 3149–55.
- Sellers, R. S., C. B. Clifford, P. M. Treuting, e C. Brayton. 2012. "Immunological Variation Between Inbred Laboratory Mouse Strains Points to Consider in Phenotyping Genetically Immunomodified Mice". *Veterinary Pathology Online* 49 (1): 32–43.
- Sharma, Umakant, e Sarman Singh. 2008. "Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control". *J Vector Borne Dis* 45 (4): 255–72.

- Shenker, N, e J M Flanagan. 2012. “Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research”. *British Journal of Cancer* 106 (2): 248–53. doi:10.1038/bjc.2011.550.
- Shio, Marina Tiemi, Kasra Hassani, Amandine Isnard, Benjamin Ralph, Irazu Contreras, Maria Adelaida Gomez, Issa Abu-Dayyeh, e Martin Olivier. 2011. “Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion”. *Journal of tropical medicine* 2012.
- Sica, Antonio, e Alberto Mantovani. 2012. “Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas”. *The Journal of clinical investigation* 122 (122 (3)): 787–95.
- Singh, Harinder. 2014. “Transcriptional and epigenetic networks orchestrating immune cell development and function”. *Immunological reviews* 261 (1): 5–8.
- Smith, Zachary D., Hongcang Gu, Christoph Bock, Andreas Gnirke, e Alexander Meissner. 2009. “High-Throughput Bisulfite Sequencing in Mammalian Genomes”. *Methods* 48 (3): 226–32. doi:10.1016/j.ymeth.2009.05.003.
- Smith, Zachary D., e Alexander Meissner. 2013. “DNA methylation: roles in mammalian development”. *Nature Reviews Genetics* 14 (3): 204–20.
- Späth, Gerald F., Sima Drini, e Najma Rachidi. 2015. “A touch of Zen: post-translational regulation of the Leishmania stress response”. *Cellular microbiology* 17 (5): 632–38.
- Stanley, Amanda C., e Christian R. Engwerda. 2007. “Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis”. *Immunology and cell biology* 85 (2): 138–47.
- Stevens, Michael, Jeffrey B. Cheng, Daofeng Li, Mingchao Xie, Chibo Hong, Cécile L. Maire, Keith L. Ligon, Martin Hirst, Marco A. Marra, e Joseph F. Costello. 2013. “Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods”. *Genome research* 23 (9): 1541–53.
- Szyf, M. 2012. “The Early-Life Social Environment and DNA Methylation”. *Clinical Genetics* 81 (4): 341–49. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01843.x.
- Takeuchi, Osamu, e Shizuo Akira. 2011. “Epigenetic control of macrophage polarization”. *European journal of immunology* 41 (9): 2490–93.
- Teh, A. L., H. Pan, L. Chen, M.-L. Ong, S. Dogra, J. Wong, J. L. MacIsaac, et al. 2014. “The Effect of Genotype and in Utero Environment on Interindividual Variation in Neonate DNA Methylomes”. *Genome Research* 24 (7): 1064–74. doi:10.1101/gr.171439.113.
- Thorvaldsdottir, H., J. T. Robinson, e J. P. Mesirov. 2013. “Integrative Genomics Viewer (IGV): High-Performance Genomics Data Visualization and Exploration”. *Briefings in Bioinformatics* 14 (2): 178–92. doi:10.1093/bib/bbs017.
- Tran, Hong, Jacob Porter, Ming-an Sun, Hehuang Xie, e Liqing Zhang. 2014. “Objective and comprehensive evaluation of bisulfite short read mapping tools”. *Advances in bioinformatics* 2014.
- Trinchieri, Giorgio. 2003. “Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity”. *Nature Reviews Immunology* 3 (2): 133–46.
- Varley, K. E., J. Gertz, K. M. Bowling, S. L. Parker, T. E. Reddy, F. Pauli-Behn, M. K. Cross, et al. 2013. “Dynamic DNA Methylation across Diverse Human Cell Lines and Tissues”. *Genome Research* 23 (3): 555–67. doi:10.1101/gr.147942.112.
- Vazquez, Monica I., Jovani Catalan-Dibene, e Albert Zlotnik. 2015. “B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment”. *Cytokine*.
- Veeck, Jürgen, e Manel Esteller. 2010. “Breast Cancer Epigenetics: From DNA Methylation to microRNAs”. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (1): 5–17. doi:10.1007/s10911-010-9165-1.
- Vignali, Dario AA, e Vijay K. Kuchroo. 2012. “IL-12 family cytokines: immunological playmakers”. *Nature immunology* 13 (8): 722–28.

- Vouldoukis, Ioannis, Pierre-André Bécherel, Valentina Riveros-Moreno, Michel Arock, Otamires Da Silva, Patrice Debré, Dominique Mazier, e M. Djavad Mossalayi. 1997. “Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation”. *European journal of immunology* 27 (4): 860–65.
- Waddington, Conrad H. 2012. “The epigenotype”. *International journal of epidemiology* 41 (1): 10–13.
- Wang, Nan, Hongwei Liang, e Ke Zen. 2014. “Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance”. *Frontiers in immunology* 5.
- Wang, Tao, Qi Liu, Xianfeng Li, Xiaobing Wang, Jinchen Li, Xiaochun Zhu, Zhong Sheng Sun, e Jinyu Wu. 2013. “RRBS-Analyser: A Comprehensive Web Server for Reduced Representation Bisulfite Sequencing Data Analysis”. *Human mutation* 34 (12): 1606–10.
- Weber, Michael, Ines Hellmann, Michael B Stadler, Liliana Ramos, Svante Pääbo, Michael Rebhan, e Dirk Schübeler. 2007. “Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome”. *Nature Genetics* 39 (4): 457–66. doi:10.1038/ng1990.
- Weitzman, Matthew D., e Jonathan B. Weitzman. 2014. “What’s the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity”. *Cell host & microbe* 15 (3): 283–94.
- Wen, Andy Y., Kathleen M. Sakamoto, e Lloyd S. Miller. 2010. “The role of the transcription factor CREB in immune function”. *The Journal of Immunology* 185 (11): 6413–19.
- Wilson, Christopher B., Emily Rowell, e Masayuki Sekimata. 2009. “Epigenetic control of T-helper-cell differentiation”. *Nature Reviews Immunology* 9 (2): 91–105.
- Wu, Hao, e Yi Zhang. 2014. “Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions”. *Cell* 156 (1): 45–68.
- Xin, Lijun, Kui Li, e Lynn Soong. 2008. “Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes”. *Molecular immunology* 45 (12): 3371–82.
- Xi, Yuanxin, Christoph Bock, Fabian Müller, Deqiang Sun, Alexander Meissner, e Wei Li. 2012. “RRBSMAP: a fast, accurate and user-friendly alignment tool for reduced representation bisulfite sequencing”. *Bioinformatics* 28 (3): 430–32.
- Zanluqui, N. G., P. F. Wowk, e P. Pinge-Filho. 2015. “Macrophage Polarization in Chagas Disease”. *J Clin Cell Immunol* 6 (317): 2.
- Ziller, Michael J., Hongcang Gu, Fabian Müller, Julie Donaghey, Linus T.-Y. Tsai, Oliver Kohlbacher, Philip L. De Jager, et al. 2013. “Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome”. *Nature* 500 (7463): 477–81. doi:10.1038/nature12433.

## ANEXO A

- 600µl de solução de lise (50mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) com 1% dodecil sulfato de sódio (SDS) acrescido 15µl de proteinase K (10mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA) deixar por 1 hora a 60 °C, depois 100 °C para inativação da enzima;
- Adicionar 600µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizar e aguardar 10 minutos sob agitação em temperatura ambiente;
- Centrifugar 13000 rpm por 10 minutos e remover o sobrenadante;
- Adicionar 600µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizar;
- Centrifugar 13000 rpm por 10 minutos;
- Recuperar o sobrenadante e adicionar 100µl de acetato de sódio e 200 µl de etanol absoluto, deixar a -20 °C *over night*;
- Centrifugar a 13000rpm a 4 °C por 10 minutos;
- Lavar o precipitado com etanol 70% duas vezes;
- Ressuspender em 50µl de TE 0,1X (10mM Tris/HCl pH8, 1mMEDTA).

Após a extração do DNA as amostras ainda foram purificadas com Agecourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, DE), seguindo o protocolo do fabricante.

- Foi adicionado 60µl de AMPure XP a 10µl de DNA extraído mais 20µl de TE 1X;
- 10 minutos em temperatura ambiente;
- Colocar os tubos na estante magnética, deixar 5 minutos;
- Remover o sobrenadante e manter o tubo na estante;
- Lavar com 200µl etanol 80% por duas vezes;
- Remover todo etanol e deixar secar por 10 minutos;

- Retirar da estante e ressuspender com 20 $\mu$ l de EB-buffer (Qiagen, DE);
- Colocar na estante e esperar 5 minutos para recuperar o volume.

## ANEXO B

Mix:

10x Tampão- (HotStart Qiagen, DE)

dNTPs (2,5mM – Invitrogen, USA)

Illumina primer LPX1.1 (10uM, Illumina, USA)

Illumina primer LPX2.1 (10uM, Illumina, USA)

HotstartTaq (5U, Qiagen, DE)

Temperatura:

15'- 95 °C

30''- 95 °C

30''- 60 °C      14 ciclos

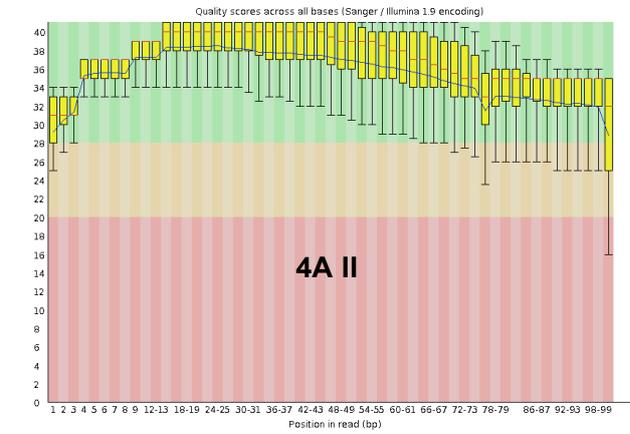
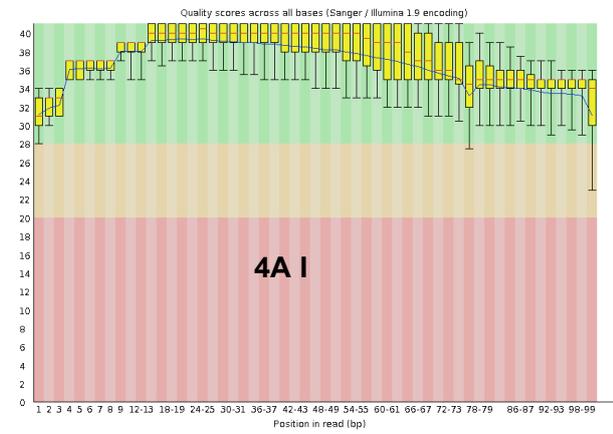
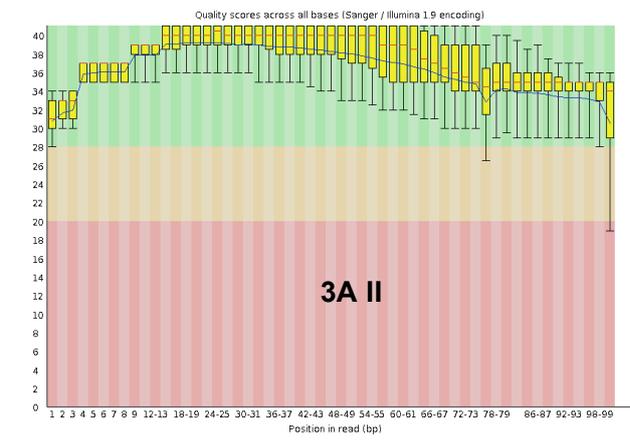
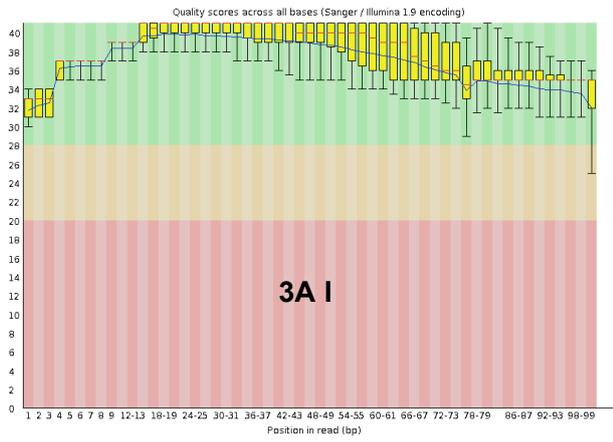
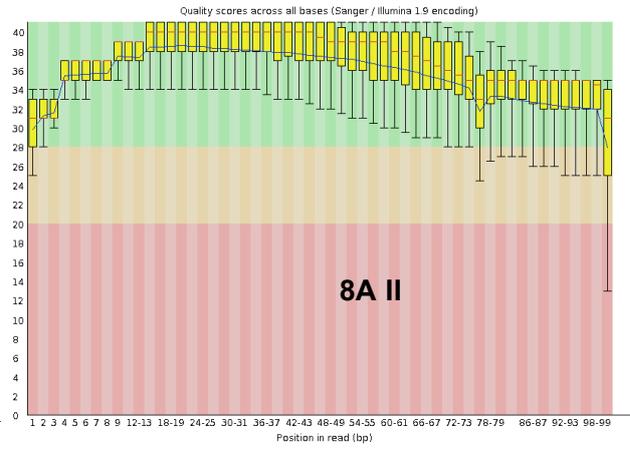
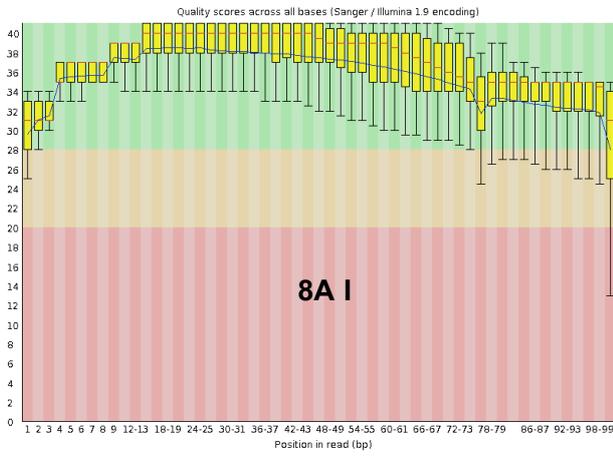
1'- 72 °C

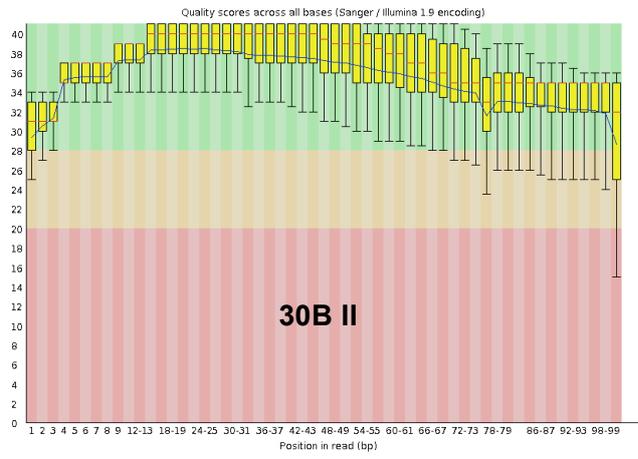
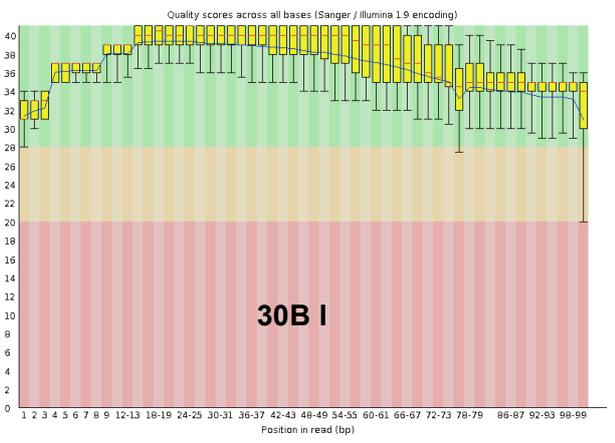
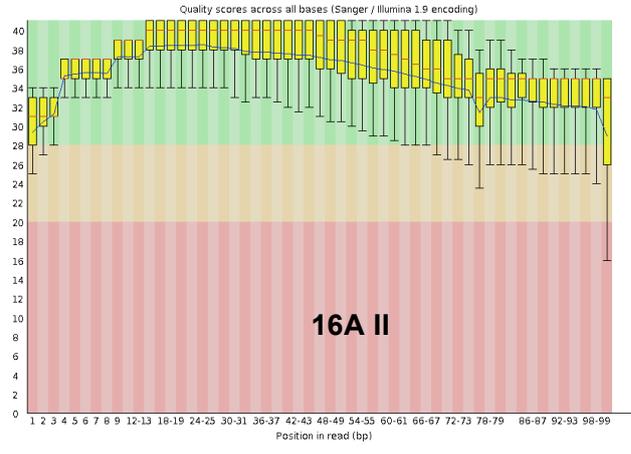
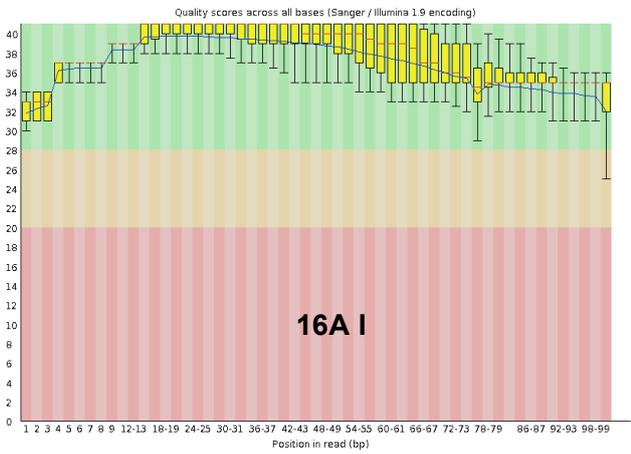
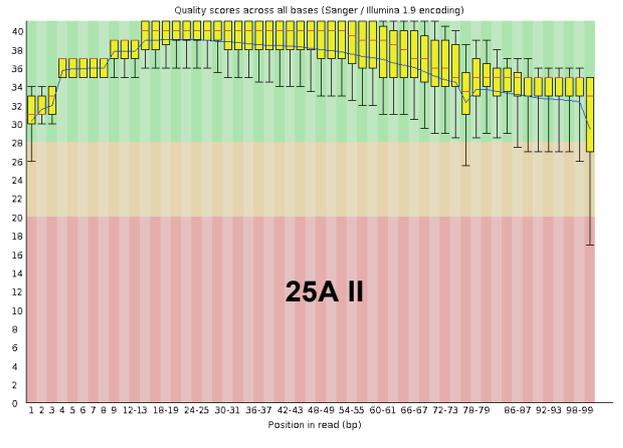
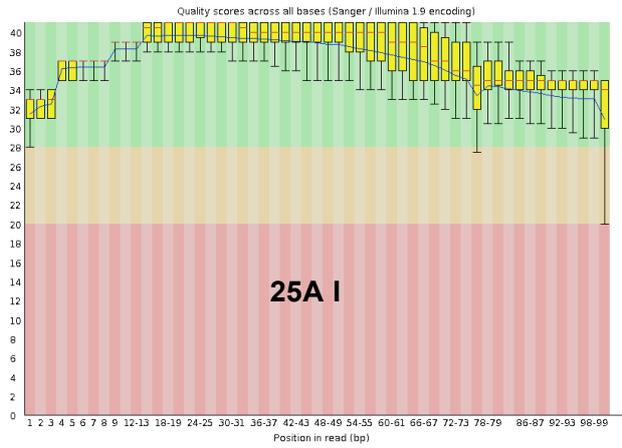
7'- 72 °C

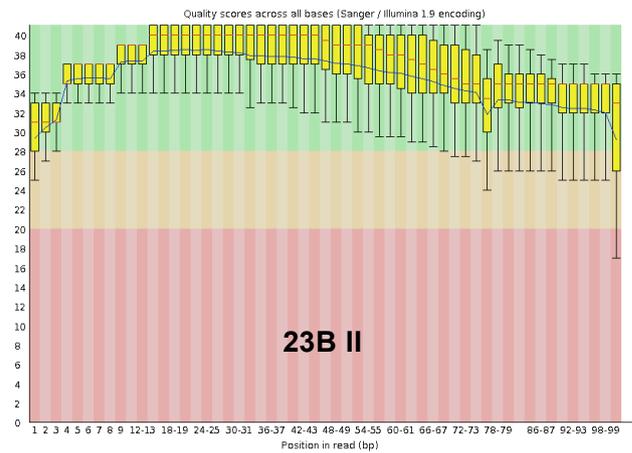
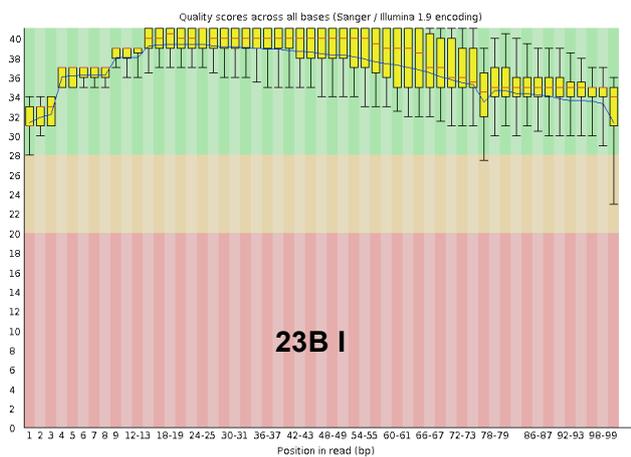
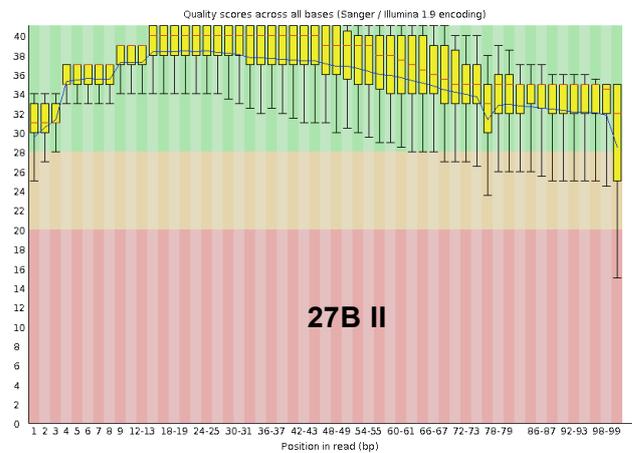
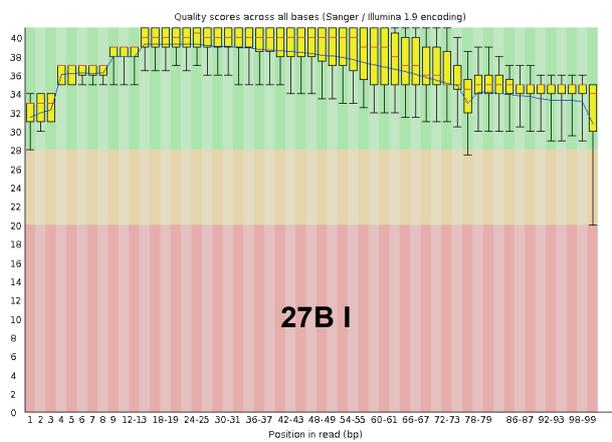
### ANEXO C

			compa1 by state	compa2 by state	compa3 by state	compa4 by state	compa5 by state	compa6 by state	compa7 group by strain	compa8 group by strain
Sample	state	strain	compa1	compa2	compa3	compa4	compa5	compa6	compa7	compa8
8_Balb_Ama	disease	balb	disease						balb	
3A_Balb_s_infec	control	balb	control	control					balb	balb
4A_Balb_Infantum	disease	balb		disease						balb
30B_C3H_Ama	disease	c3h			disease				c3h	
27B_C3H_s_infec	control	c3h			control	control			c3h	c3h
23B_C3H_infantum	disease	c3h				disease				c3h
7A_Balb_TIO_Ama	disease	balbTio					disease			
1A_Balb_TIO_s_infec	control	balbTio					control			
25A_C3H_TIO_Ama	disease	c3hTio						disease		
16A_C3H_TIO_s_infec	control	c3hTio						control		

compa9 group by strain and stimulus	compa10 group by stimulus susceptible	compa11 group by stimulus resistant	compa12 group strain x stimulus	comp13 control strain susceptible	comp14 control strain resistant	comp15 control strain
Compa9	compa10	compa11	compa12	compa13	compa14	compa15
	balb		nostimulus			
	balb		nostimulus	balb		balb
		c3h	nostimulus			
		c3h	nostimulus		c3h	c3h
balbTio	balbTio		stimulus			
balbTio	balbTio		stimulus	balbTio		
c3hTio		c3hTio	stimulus			
c3hTio		c3hTio	stimulus		c3hTio	







Sequências dos ensaios 7A, 1A, 8A, 3A, 4A, 25A, 16A, 30B, 27B, e 23B através de FastQC. No eixo  $x$  são expressas as bases dentro da sequência, no eixo  $y$  os valores de 0-40 são scores de qualidade baseado em Phread, o que demonstra a chance de erros de bases na sequência, sendo o score 30 equivale a um precisão de 99,9% e 40 99,99% respectivamente.