



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Identificação de microRNAs de macrófagos murinos expressos  
diferencialmente em resposta à infecção por *Paracoccidioides  
brasiliensis***

**André Victor Gonçalves Rodrigues Rios  
Orientadora: Ildinete Silva Pereira**

**Brasília  
2018**

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular**

**Identificação de microRNAs de macrófagos murinos expressos  
diferencialmente em resposta à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***

**Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Molecular  
da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Brasília para  
obtenção do título de Mestre em  
Patologia Molecular.**

**André Victor Gonçalves Rodrigues Rios  
Orientadora: Ildinete Silva Pereira**

**Brasília  
2018**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, meu Senhor soberano, quem me abençoou com uma família maravilhosa que sempre esteve ao meu lado, me ensinando e apoiando em minhas decisões. Quem me abençoou com amigos que me fazem sorrir mesmos nos momentos de tristeza e com uma namorada que me dá um colo pra poder descansar. Quem me abençoou com todas as oportunidades que eu poderia ter para crescer e ser alguém na vida.

Não sou merecedor de Sua graça. Não sou merecedor de tanta bondade.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à minha família, que sempre me incentivou a estudar, e que sempre esteve ao meu lado em minhas decisões acadêmicas me apoiando e acreditando em meu potencial. Agradeço ao meu pai, Anderson, que sempre esteve presente me ajudando a ter uma visão mais clara dos meus objetivos, e à minha mãe Sheyla que sempre esteve orando e intercedendo por mim frente a Deus.

Agradeço aos meus amigos, que foram pontos de escape para os momentos mais estressantes, e que sempre conseguiam colocar um sorriso em meu rosto mesmo nos momentos de tristeza.

À Professora Ildinete, que teve muita paciência comigo enquanto todos os experimentos davam errado, e que acreditou em meu potencial para conseguir desenvolver os resultados.

Agradeço a Deus por ter colocado em minha vida a oportunidade de estagiar no laboratório de Biologia Molecular, num momento de minha vida em que tudo parecia não fazer sentido.

Agradeço à Lorena Derengowski, que me aceitou como estagiário, e me ensinou tanto enquanto eu estagiava. Que teve paciência comigo, com minha falta de conhecimento científico, e que sempre mostrou muito amor à ciência. Ao Hugo Costa, que foi um dos meus mentores enquanto eu estagiava no laboratório e que compartilhou de seu vasto conhecimento comigo.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, que sempre se mostraram totalmente dispostos a me ensinar, ajudar em todas as dificuldades, e que sempre tiveram paciência comigo.

Agradeço em especial ao Fabián, com quem trabalhei lado a lado durante todo o meu projeto de Mestrado, e com quem aprendi muitas e muitas coisas durante esta jornada. Agradeço também pela amizade, e por seu jeito honesto de ser.

Ao pessoal do laboratório de Imunologia Aplicada, que sempre disponibilizaram de seu espaço, de ajuda e de conhecimento para apoiar meu trabalho. Agradeço principalmente ao Rafael, que colaborou muito para o desenvolvimento deste trabalho e também aos professores Aldo e Anamélia que sempre se fizeram disponíveis para auxiliar em todas as minhas dúvidas relacionadas à imunologia.

Ao laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI), Especialmente ao Rafael Corrêa que nos apoiou em um momento de muita necessidade, sempre com muito boa vontade.

Ao eterno amigo “Hub da Ciência”, que está sempre derrubando as barreiras para o conhecimento.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, FAP-DF e Decanato de Pós-Graduação (DPP), pois sem eles nada disto seria possível.

Agradeço em especial à minha digníssima namorada Ingrith Marralla, que me acompanhou desde o início da jornada do Mestrado, e que sempre acreditou em minha capacidade. Foi quem esteve ao meu lado me dando forças toda vez que um experimento dava errado. Foi quem disse que eu conseguiria quando eu pensava que não conseguiria mais.

## RESUMO

MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs não-codificadores endógenos, de cerca de 23 nucleotídeos, que desempenham importante papel regulatório, a nível pós-transcricional, atuando em inúmeros processos biológicos em animais e plantas. Dentre os inúmeros processos onde os miRNAs atuam, é de importância a modulação da resposta imune inata, área de interesse central nas pesquisas realizadas por nosso grupo. Na interface da interação hospedeiro-patógeno, uma intensa reprogramação da expressão gênica tanto do hospedeiro, como do patógeno é observada, sendo descrito que tais alterações são de grande relevância na resultante da interação. Dentre os genes amplamente descritos como modulados estão os miRNAs do hospedeiro na resposta à infecção por patógenos. Considerando o papel regulatório dos miRNAs, vários estudos mostram sua importância na resposta imune contra bactérias e vírus, mas pouco se sabe sobre seu papel em infecções fúngicas. *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que causa paracoccidioidomicose, considerada a micose sistêmica mais prevalente no Brasil, e que se faz presente na maioria dos países da América Latina. Dados preliminares de nosso grupo mostraram um maior acúmulo de miRNAs relacionados à resposta imune a *P. brasiliensis*, especialmente o miR-155. O objetivo deste trabalho é identificar miRNAs diferencialmente modulados na resposta de macrófagos murinos frente à infecção pelo isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis*. Foram infectados macrófagos primários derivados da medula-óssea (BMDMs) de camundongos de linhagem C57BL/6 com leveduras de *P. brasiliensis*, e o RNA total foi extraído após os tempos de 30', 2h, 4h, 6h e 24h de infecção. A quantificação de miRNAs foi realizada por RT-qPCR utilizando o sistema TaqMan miRNA assay. Nesse estudo foram avaliados um conjunto de miRNAs já descritos como importantes na resposta imune a patógenos, tais como miR155 (5p e 3p), miR132, miR146a e miR125b. Os resultados revelam que, apesar de não ter havido modulação dos miRNAs nos tempos iniciais de interação fungo-macrófago, enquanto a partir de 6 e 24 horas de interação observamos um aumento no acúmulo do miR155 (as duas frações -5p e -3p) na célula hospedeira. Os transcritos miR146a e miR125b foram regulados negativamente tanto após 6 quanto após 24 horas de infecção, enquanto em nossos ensaios o miR132 não apresentou modulação em resposta à infecção por *P. brasiliensis*. Conforme descrito na literatura, o miR155-5p

encontra-se relacionado com a indução de uma resposta inflamatória, enquanto os miR146a e miR125b, são descritos como reguladores negativos desta resposta. Em concordância com a resposta imune de BMDMs murinos à infecção por *P. brasiliensis* descrita na literatura, observamos um aumento de acúmulo de miRs relacionados a uma modulação positiva da resposta inflamatória e uma diminuição do acúmulo de miRs relacionados a uma regulação negativa de tal resposta. Assim, o aumento no acúmulo de miR pró-inflamatório (miR155-5p e -3p) juntamente com a diminuição no acúmulo de miRs anti-inflamatórios (miR146a e miR125b), descrito em BMDMs da linhagem murina C57BL/6 infectados por *P. brasiliensis* provavelmente resulta na ativação de uma resposta imune inflamatória, descrita como uma resposta protetora contra *P. brasiliensis*. Visando entender a via de sinalização envolvida na ativação do miR155, foram infectados BMDMs de camundongos deficientes para os receptores Dectina-1, Dectina-2, Toll-Like receptor (TLR) 2 e TLR 4 e foi feita a quantificação dos níveis do miR155-5p após 6 e 24 horas de infecção. Os resultados principais mostram a participação dos TLRs 2 e 4 e Dectina-2 na ativação do miR155-5p. Embora o mecanismo molecular envolvido na sinalização positiva, responsável pela indução da expressão do miR155-5p, não tenha sido abordada nos seus vários níveis, esse trabalho aporta novas informações sobre a base molecular tanto do reconhecimento de *P. brasiliensis* no modelo *in vitro* de BMDMs murinos, como também da modulação de importantes efetores regulatórios da resposta imune inata a este patógeno. Em conclusão, este trabalho traz novos dados sobre a modulação de miRNAs em resposta à *P. brasiliensis*, e sobre as primeiras etapas da via de ativação do miR155 frente à infecção por este patógeno.

## ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs or miRs) are endogenous, small non-coding regulatory RNAs, of about 23 nucleotides length, which play an important regulatory role, at post-transcriptional level, acting in a myriad of biological processes in animals and plants. In the context of the research developed by our team, the importance of miRNAs in the modulation of the innate immune response is of our great interest. In the interface of host-pathogen interaction, an intense reprogramming of the gene expression is observed, not only in the host, but also in the pathogen, and this reprogramming is highly relevant to the infection outcome. Among the widely described genes modulated in response to pathogens are the host miRNAs. Several studies have shown their importance in the immune response against viruses and bacteria, but little is known about their role in fungal infections. *Paracoccidioides brasiliensis* is a dimorphic fungus which causes paracoccidioidomycosis, considered the most prevalent systemic mycosis in Brazil and in almost all countries in Latin America. Preliminary results of our group have showed a higher accumulation of miRNAs related to the immune response to *P. brasiliensis*, especially miR-155. The main goal of this work is to identify differentially modulated miRNAs in the response of macrophages against infection by virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis*. Bone-marrow derived macrophages (BMDM) from C57BL/6 mice were infected with yeast forms of *P. brasiliensis*, and total RNA was extracted after the time intervals of 30 min, 2h, 4h, 6h and 24h of infection. The quantification of miRNAs was performed by RT-qPCR using TaqMan miRNA assay. In this study a group of miRNAs described as having important participation in the immune response against pathogens, like miR155 (5p and 3p), miR132, miR146a and miR125b were evaluated. The results revealed that, despite no modulation was observed in the early time intervals of fungus-macrophage interaction, an increase in the levels of both fractions -5p and -3p of miR155 was observed in the host cells after 6 and 24 hours of interaction. The transcripts of miR146a and miR125b were both negatively regulated in 6 and 24 hours of infection while, in our assays, miR132 did not show any modulation in response to *P. brasiliensis*. As described in the literature, miR155-5p is associated to the induction of the inflammatory response, while miR146a and miR125b are described as negative regulators. In agreement to the literature observations with respect to the immune response of murine BMDMs to *P. brasiliensis*, we observed an



increase of miRs accumulation related to a positive modulation of the inflammatory response and a decrease of miRs accumulation related to a negative regulation of this response. Thus, the increase in the accumulation of pro-inflammatory (miR155-5p and 3p) together with the decrease of anti-inflammatory miRs (miR146a and miR125b), described in BMDMs of C57BL6's mice infected with *P. brasiliensis* probably results in the activation of an inflammatory immune response, described as a protective response against *P. brasiliensis*. In order to understand the signaling pathway involved in the activation of miR155, BMDMs from knockout mice for Toll-Like receptor (TLR) 2, Dectin-2 and TLR 4 were infected and the quantification of miR155-5p was performed after 6 and 24 hours of infection. Main results showed the participation of TLRs 2 and 4, and Dectin-2 in the activation of miR155-5p. Although the molecular mechanism involved in the positive signaling responsible for the induction of miR155 expression has not been fully addressed, this work provides new information on the molecular basis of *P. brasiliensis* recognition and modulation of important regulatory innate immune response effectors of primary murine macrophages. In conclusion, this work reveals new data on the modulation of miRNAs in response to *P. brasiliensis*, and on the first step of the activation pathway of miR155 in response to infection by this pathogen.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**PCM** – Paracoccidiodomicose

**BM** – Medula óssea

**BMDM** – Macrófagos derivados de medula óssea

**DC** – Células dendríticas

**IFN $\gamma$**  – Interferon gama

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**IL** – Interleucina

**NO** – Óxido nítrico

**CT** – Threshold cycle

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**mRNA** – RNA mensageiro

**ncRNAs** – RNAs não codificadores

**miRNA/miR** – micro RNA

**pri-miRNA** – micro RNA primário

**pre-miRNA** – micro RNA precursor

**TLR** – Receptores semelhantes a TOLL

**$\mu$ L** – Microlitro

**mL** – Mililitro

**ng** – nanograma

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**PBS** – Tampão Fosfato Salina

**UTR** – Região não traduzida

**RISC** – Complexo de silenciamento induzido por RNA

**PRR** – Receptor de reconhecimento padrão

**LCCM** – L929 Cell Conditioned Medium (Meio Condicionado de Células L929)

**g** - Gravidade

**mM** – mili Molar

**Th17** – Linfócito T CD4 secretor de Interleucina 17

**Tc17** – Linfócito T CD8 secretor de Interleucina 17

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição endêmica da paracoccidiodomicose.....	14
Figura 2 – Evolução da infecção por <i>P. brasiliensis</i> .....	16
Figura 3 – Resposta imune à paracoccidiodomicose .....	18
Figura 4 – Biogênese de microRNAs.....	22
Figura 5 – Interações de miRNAs com vias da inflamação .....	26
Figura 6 – Reação de transcrição reversa.....	35
Figura 7 – Processo de amplificação da reação de qPCR.....	36
Figura 8 – Análise da percentagem de fagocitose ao longo do tempo na co-cultura de macrófagos com <i>P. brasiliensis</i> .....	39
Figura 9 - Curvas de amplificação do miR155 e snRNA U6, empregando diferentes quantidades de RNA total e diferentes quantidades da enzima transcriptase reversa.....	43
Figura 10 - Curva de amplificação do miR155 e snRNA U6, empregando diferentes quantidades de RNA total .....	44
Figura 11 – Verificação da eficiência dos primers U6 e miR155 .....	45
Figura 12 - Análise do RNA total extraído de macrófagos dos grupos controle e infectado com <i>P. brasiliensis</i> ao longo da cinética de infecção .....	47
Figura 13 - Acúmulo de miR155 de macrófagos ao longo do tempo de interação com <i>P. brasiliensis</i> .....	47
Figura 14 - Acúmulo de microRNAs potencialmente importantes na resposta imune inata contra patógenos .....	51
Figura 15 – Funções dos PRRs no reconhecimento de PAMPs .....	53
Figura 16 - Acúmulo de miR155 nos tempos de 6 horas e 24 horas de interação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute (KO) para os receptores Dectina-1 e Dectina-2 com <i>P. brasiliensis</i> .....	55
Figure 17 - Acúmulo de miR155 nos tempos de 6 horas e 24 horas de interação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute (KO) para os receptores TLR2 e TLR4 com <i>P. brasiliensis</i> .....	57
Figure 18 - Microscopia óptica de macrófagos após 6 horas de infecção por Pb18. Células coradas conforme descrito na metodologia .....	70
Figure 19 - Microscopia óptica de macrófagos após 24 horas de infecção por Pb18. Células coradas conforme descrito na metodologia .....	71

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 – Características do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b> .....	<b>13</b>
1.1.1 - Aspectos gerais sobre a paracoccidioidomicose .....	13
1.1.2 - O modelo murino no estudo da paracoccidioidomicose .....	18
<b>1.2 - Aspectos gerais sobre miRNAs: definição, biogênese e mecanismo de ação</b> ..	<b>20</b>
1.2.1 - O papel dos miRNAs na resposta imunológica .....	24
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 – Objetivo geral</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2 – Objetivos específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3 - METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 - Obtenção de Meio Condicionado de Células L929 (LCCM)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2 – Animais</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 - Obtenção de medula óssea murina (BM)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4 - Diferenciação de células da BM em macrófagos M2 (BMM)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 – Obtenção de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> para os experimentos de interação com macrófagos</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6 – Determinação da porcentagem de fagocitose</b> .....	<b>31</b>
<b>3.7 – Cinética de interação: Macrófagos M2 e leveduras de <i>P. brasiliensis</i></b> .....	<b>31</b>
<b>3.8 – Extração do RNA total de Macrófagos murinos infectados com <i>P. brasiliensis</i> e análise de qualidade</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9 - Padronização da quantidade de RNA total a ser utilizada nas análises de expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	<b>32</b>
<b>3.10 – Verificação da eficiência dos primers U6 e miR155</b> .....	<b>33</b>
<b>3.11 – Síntese do cDNA e PCR em tempo real (RT-qPCR)</b> .....	<b>33</b>
<b>3.12 – Dosagem de citocinas</b> .....	<b>38</b>
<b>3.13 - Experimentos com camundongos nocaute (do inglês knockout – KO) para genes da via de sinalização (genes de receptores de reconhecimento padrão – PRR)</b> .....	<b>38</b>
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 - Porcentagem de fagocitose</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 - Dosagem de citocinas dos sobrenadantes de co-culturas de macrófagos com <i>P. brasiliensis</i> nos tempos de 30', 2 h, 4 h, 6 h e 24 h de interação</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3 - Padronização da concentração inicial de RNA total para os experimentos de RT-qPCR</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4 – Verificação da eficiência dos primers U6 e miR155</b> .....	<b>44</b>
<b>4.5 - Expressão de miR155 durante a cinética de infecção de macrófagos murinos por <i>P. brasiliensis</i></b> .....	<b>45</b>
<b>4.6 – Níveis de acúmulo de miR146a, miR125b, miR132 e miR155-3p nos tempos de 6 h e 24 h de interação de macrófagos com <i>P. brasiliensis</i></b> .....	<b>49</b>
<b>4.7 – Vias de ativação do miR155</b> .....	<b>52</b>
<b>4.8 – Análise de mRNAs de PRRs e de alvos dos miRNAs analisados</b> .....	<b>57</b>
<b>5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>59</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>70</b>

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Características do *Paracoccidioides brasiliensis*

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico descrito pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908. Sua forma leveduriforme se caracteriza por ser unicelular, de forma esférica e tem como principal característica morfológica a reprodução por brotamentos laterais, que geram uma estrutura semelhante a uma roda de leme. Tal estrutura facilita a identificação deste organismo e consequentemente o diagnóstico da paracoccidioidomicose. Os micélios são caracterizados por filamentos longos e septados, e no momento de transição dimórfica, podem ser observadas morfologias intermediárias entre micélio e levedura (Carbonell, 1969).

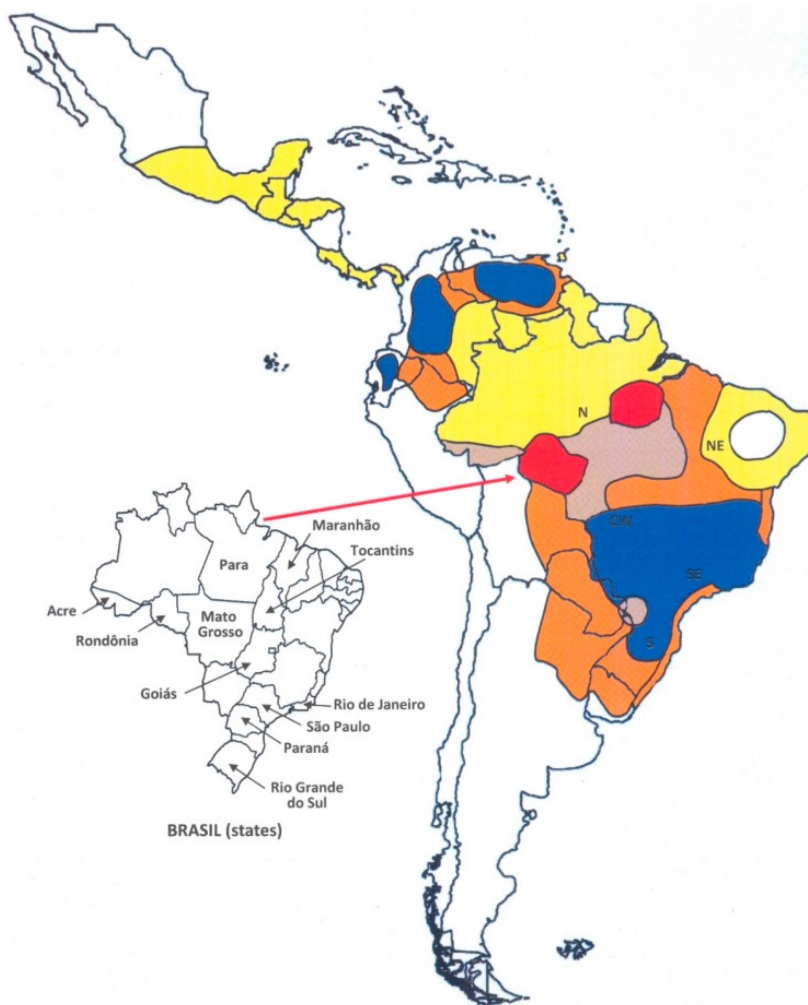
A transição dimórfica *in vitro* de *P. brasiliensis* depende unicamente da mudança de temperatura, sendo que em temperatura de 25°C, *P. brasiliensis* se apresenta na forma de micélio, transitando para a forma de levedura quando submetido à temperatura de 37°C (*in vitro*) ou no momento da invasão de tecidos do hospedeiro (Carbonell, 1969; Franco *et al.*, 1993, Patiño *et al.*, 1984).

Ainda não se sabe muito sobre a distribuição do *P. brasiliensis* na natureza, bem como sobre sua interação com o ambiente. Este fungo apresenta uma fase saprofítica em seu ciclo de vida, sendo encontrado principalmente na forma de micélio no solo (Restrepo *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2008). Sabe-se que algumas características do solo podem interferir na capacidade do fungo de sobreviver, como a baixa umidade e também a presença de quantidades elevadas de alumínio (Terçarioli *et al.*, 2007).

### 1.1.1 - Aspectos gerais sobre a paracoccidioidomicose

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é descrito como o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica prevalente na América Latina (Franco, 1987; McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001). Os principais locais atingidos pela PCM são Brasil, Venezuela e Colômbia, sendo que o Brasil conta com 80% dos casos como ilustrado na figura 1 (McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001; Martinez, 2017). No Brasil ocorrem aproximadamente 200

mortes por ano em virtude da PCM (Coutinho *et al.*, 2002) e o número estimado de casos de paracoccidioidomicose no país é de 3360 a 5600 casos por ano (Martinez, 2017). Segundo estes mesmos autores, um total de 1853 mortes ocasionadas por esta doença foram registradas entre os anos de 1986 e 2006 no Brasil, representando uma fração de 51% das mortes relacionadas a doenças fúngicas no país.



**Figura 1 – Distribuição endêmica da paracoccidioidomicose.** As áreas em azul mostram as primeiras áreas onde foram registradas endemias; em vermelho com endemia observada nas últimas décadas; em salmão áreas com evidências recentes de endemia crescente; em laranja áreas com endemia moderada; e em amarelo áreas com baixa endemia. Em branco vemos áreas sem casos registrados ou com casos raros de paracoccidioidomicose (Martinez, 2017).

Sua disseminação acontece por meio de propágulos de sua forma miceliana chamada de conídios, que podem infectar humanos pelas vias aéreas (Restrepo *et al.*, 2001). Seguente a isto, o curso da infecção pode tomar rumos diferentes, podendo seguir para total erradicação do fungo, ou disseminação do mesmo para os demais tecidos tomando forma latente ou crônica. A virulência do fungo e a resposta

imunológica do hospedeiro são fatores determinantes para o desenvolvimento da infecção. (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002).

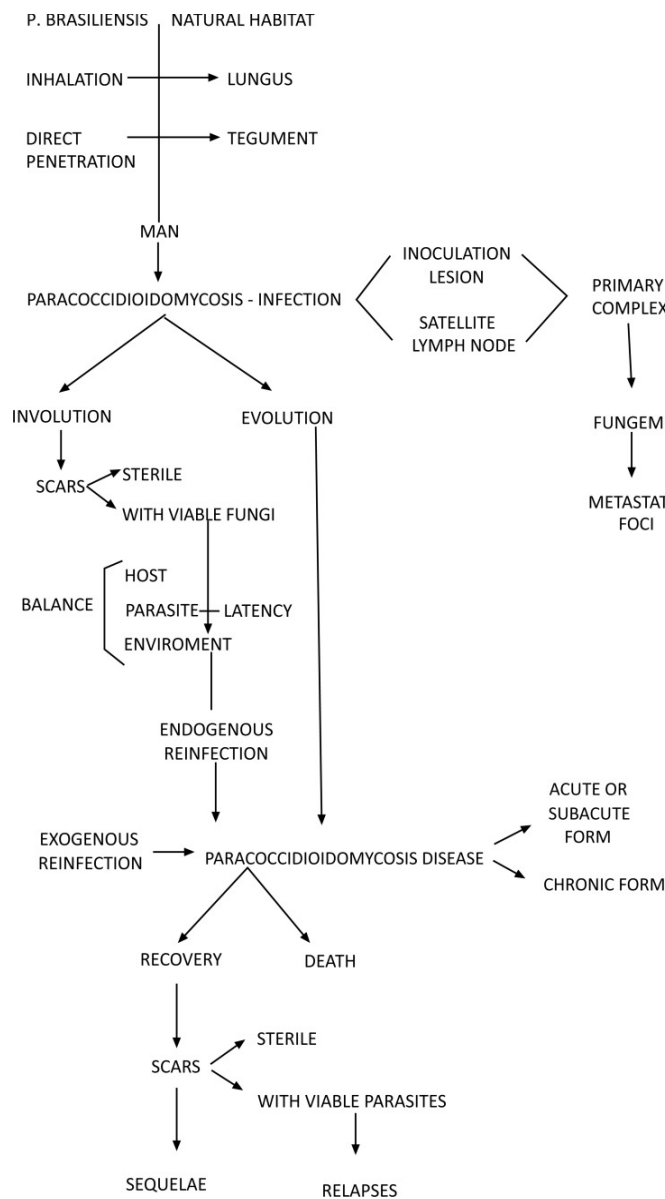
Após a inalação, as primeiras células de defesa as quais os conídios de *P. brasiliensis* encontram são os macrófagos alveolares residentes e as células dendríticas (DCs) presentes no parênquima pulmonar. (Cano *et al.*, 1998; Aristizabal, 1998; Gonzalez *et al.*, 2000).

A manifestação clínica pode acontecer de algumas formas diferentes, indo desde uma infecção assintomática até manifestações sintomáticas que podem ser agudas ou crônicas. A forma aguda da doença manifesta-se geralmente em crianças e jovens adultos, atingindo igualmente ambos os sexos. A forma mais grave da doença é capaz de causar lesões na pele e nas mucosas, afetando o trato gástrico em 50% dos casos. Os sintomas da fase aguda variam entre febre, perda de peso, anemia e aumento de linfonodos, sendo esta a forma da doença com maior índice de mortalidade. A forma crônica da doença geralmente associa-se a um grande período de latência do fungo e acomete geralmente indivíduos do sexo masculino com idades que variam entre 30 e 60 anos. Esta é a forma mais comum da PCM e, nesta forma, além de lesões nas mucosas também são vistas lesões nos pulmões (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Bocca *et al.*, 2013). Outros fatores considerados como fatores de risco podem influenciar no curso da infecção como tabagismo e alcoolismo (dos Santos *et al.*, 2003).

O principal fator determinante para o rumo que a infecção seguirá é a virulência do fungo pelo qual o paciente foi infectado. Clinicamente o grau de virulência pode ser determinado com base em diferentes fatores, como a quantificação de unidades formadoras de colônia após infecção (seja ela *in vivo* ou *in vitro*), índice de fagocitose e até mesmo curvas de sobrevivência. Os graus de virulência são definidos como alta, intermediária, baixa ou até mesmo avirulentos (Kashino *et al.*, 1985; Kurokawa *et al.*, 2005; Herbeler-Barbosa *et al.*, 2003).

De acordo com Mendes *et al* (2017), há alguns cursos diferentes que a infecção pode tomar a partir do momento de infecção. A princípio a infecção pode seguir para a evolução com o desenvolvimento da doença ou para involução com eliminação da carga fúngica ou com um estado de latência podendo haver reinfecção com desenvolvimento da doença. A partir do desenvolvimento da doença, a mesma pode evoluir para uma fase aguda ou para uma fase crônica podendo levar o hospedeiro a óbito. Em alguns casos de recuperação, a PCM pode acabar por

deixar sequelas ao indivíduo (Mendes *et al.*, 2017). A figura 2 ilustra o desenvolvimento da infecção no hospedeiro.



**Figura 2 – Evolução da infecção por *P. brasiliensis*.** A infecção pode evoluir para a erradicação da carga fúngica ou para o desenvolvimento da doença que pode levar a óbito ou ao desenvolvimento de sequelas ao indivíduo (Mendes *et al.*, 2017).

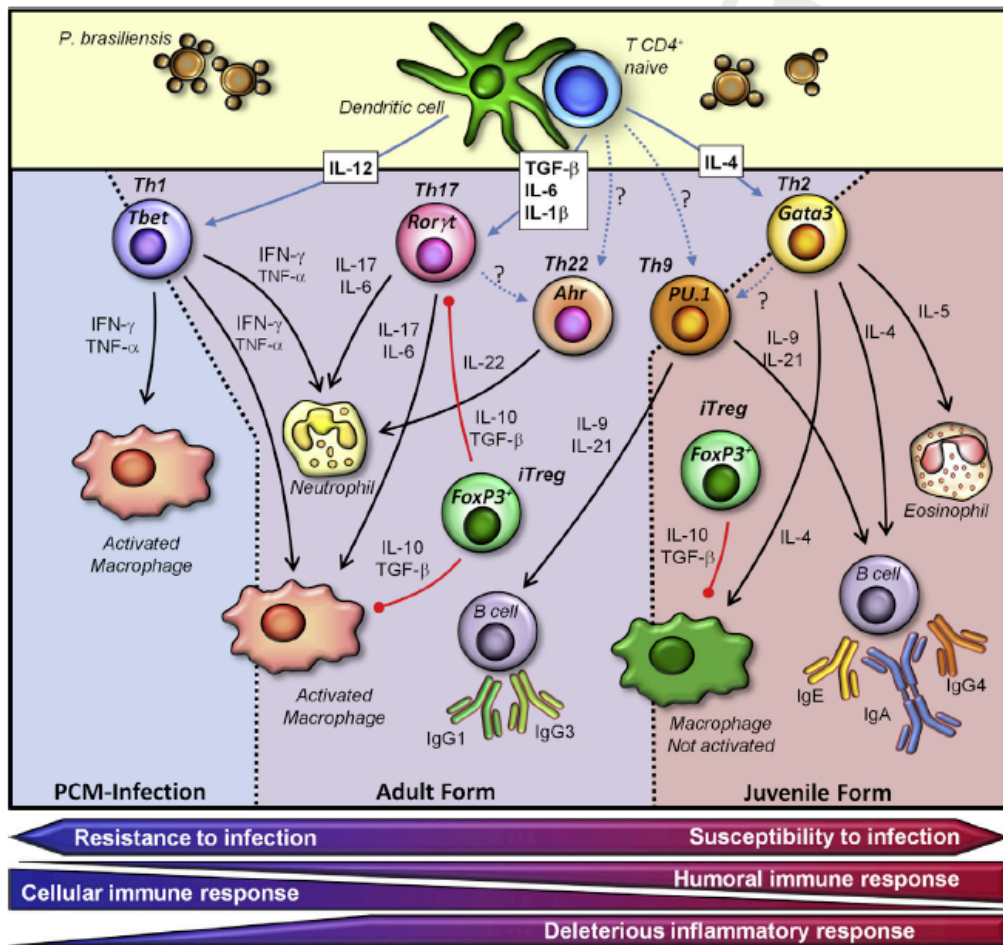
Pouco se sabe sobre a capacidade do fungo de se adaptar ao ambiente do hospedeiro, entretanto alguns fatores de virulência de *P. brasiliensis* podem ser descritos como importantes para o curso da infecção. Um exemplo é a produção de melanina, com ação protetora ao fungo, tanto por diminuir a internalização do mesmo por fagócitos como também por aumentar a resistência do fungo à capacidade fungicida destes fagócitos (da Silva *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2009). Outro fator importante de virulência deste fungo é sua capacidade de modular os componentes de sua parede celular, como por exemplo a  $\alpha$ -1,3-glucana, que



aparece unicamente na forma leveduriforme do fungo e está relacionada com a atenuação da virulência a medida que sua produção diminui (Kanetsuna & Carbonell, 1969; San-Blas & San-Blas, 1977).

A paracoccidiodomicose caracteriza-se por uma resposta predominantemente Th1, levando à ativação de macrófagos que é necessária para uma resistência efetiva contra a doença. A forma juvenil da doença, descrita por uma infecção do tipo aguda, com níveis mais altos de mortalidade, apresenta uma resposta predominantemente do tipo Th2, marcada pela inibição da ativação de macrófagos e assim, configurando um perfil de susceptibilidade à doença. A forma crônica da doença acomete principalmente adultos, e é caracterizada por uma resposta mista, do tipo Th17, que se caracteriza tanto pelo recrutamento de neutrófilos quanto pela ativação de macrófagos e de células B produtoras de anticorpos (Castro *et al.*, 2013).

Ainda segundo Castro *et al* (2013), a resistência à infecção é caracterizada pelo desenvolvimento de uma resposta imune mais celular, enquanto a susceptibilidade se caracteriza pelo desenvolvimento de uma resposta imune mais humoral como pode ser visto na figura 3.



**Figura 3 – Resposta imune à paracoccidiodomicose.** A resposta imune à PCM pode seguir três vertentes principais, sendo a resposta do tipo Th1, com uma resposta imune celular mais intensa, do tipo Th2, com uma resposta humoral mais intensa, ou do tipo Th17 com uma resposta mista (Castro et al., 2013).

Há relatos de que a resposta imune celular, caracterizada pela produção de citocinas do tipo 1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) parece ser o principal mecanismo de defesa contra *P. brasiliensis* (Cano et al., 1998; Souto et al., 2000). A produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é particularmente importante na PCM por ativar macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO), que atua como o principal agente microbicida contra *P. brasiliensis* (Bocca et al., 1998). O IFN- $\gamma$  também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), necessário para a persistência do granuloma (Souto et al., 2000).

### 1.1.2 - O modelo murino no estudo da paracoccidiodomicose

O estabelecimento do modelo murino como modelo para estudo da PCM e a caracterização de linhagens murinas suscetíveis e resistentes a esta infecção tem

permitido um maior entendimento sobre a evolução da resposta imunológica frente à infecção por esta micose. Os padrões de resistência à PCM são divididos entre muito resistente (A/Sn, A/J), resistente (C3H/He), resistência intermediária (Balb/C, CBA, C57BL/10, C3HeB/Fe) e suscetível (B10D2/nSn, B10A, B10D2/oSn) de acordo com a susceptibilidade de cada linhagem murina a este fungo (Calich *et al.*, 1985). Além destes, o C57BL/6 também é descrito com padrão de resistência intermediário (Arruda *et al.*, 2004).

A partir desta classificação, diversos estudos têm sido feitos para tentar entender melhor os mecanismos moleculares por trás destas respostas. Os camundongos A/Sn, modelos de resistência à PCM, apresentam maior sobrevivência e uma menor ocorrência de formação de granulomas em órgãos diversos, além de uma alta resposta imune celular. Já os camundongos suscetíveis como o B10.A, apresentam uma deficiência na resposta imune celular, bem como uma maior disseminação de leveduras pelos diversos órgãos, e presença de granulomas em diversos tecidos além da menor sobrevivência (Calich *et al.*, 1985; Cano *et al.*, 1995).

Experimentos realizados com camundongos e com ratos bloqueando a atividade de macrófagos mostraram o desenvolvimento de uma forma mais severa de PCM, com uma maior disseminação pelos órgãos e menor sobrevivência, mostrando a importância destas células no curso da infecção (Kashino *et al.*, 1995; Kerr *et al.*, 1983).

É interessante notar que a princípio encontra-se mais leveduras viáveis nos pulmões de indivíduos resistentes à doença do que nos pulmões de indivíduos suscetíveis à doença, o que nos leva a acreditar que os indivíduos resistentes a princípio possuem uma menor capacidade de conter a infecção do que os indivíduos suscetíveis (Pina *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 1995).

Sabe-se que camundongos suscetíveis à PCM tendem a ter uma polarização de macrófagos para o tipo M1, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, produção de óxido nítrico, e maior capacidade fagocítica e fungicida. Por outro lado, camundongos resistentes à doença demonstram um padrão de polarização a macrófagos M2, ou ativação alternativa, com liberação de citocinas anti-inflamatórias, menor capacidade fagocítica e fungicida, e uma resposta voltada ao controle da inflamação. Isto pode ser explicado pelas diferenças que podem ser observadas na expressão de receptores de reconhecimento padrão que estas

linhagens expressam. Camundongos resistentes possuem uma maior quantidade de receptores do tipo Dectina-1 na membrana de seus macrófagos, enquanto camundongos suscetíveis apresentam maior expressão de receptores TLR4, TLR2 e CD11 (Feriotti *et al.*, 2013; Souza-Silva *et al.*, 2015).

Este fenômeno é explicado por Calich *et al.* (2008), que diz que a maior produção de óxido nítrico proveniente de uma polarização a M1 feita pelos camundongos suscetíveis acaba por prejudicar o desenvolvimento de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, resultando em uma incapacidade de formar uma resposta imune adaptativa futuramente. Já a polarização a M2 que acontece em camundongos resistentes permite um desenvolvimento adequado de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> resultando em uma melhor resposta adaptativa que será capaz de controlar a infecção limitando sua disseminação e acabando por conferir um caráter de remissão da doença.

## **1.2 - Aspectos gerais sobre miRNAs: definição, biogênese e mecanismo de ação**

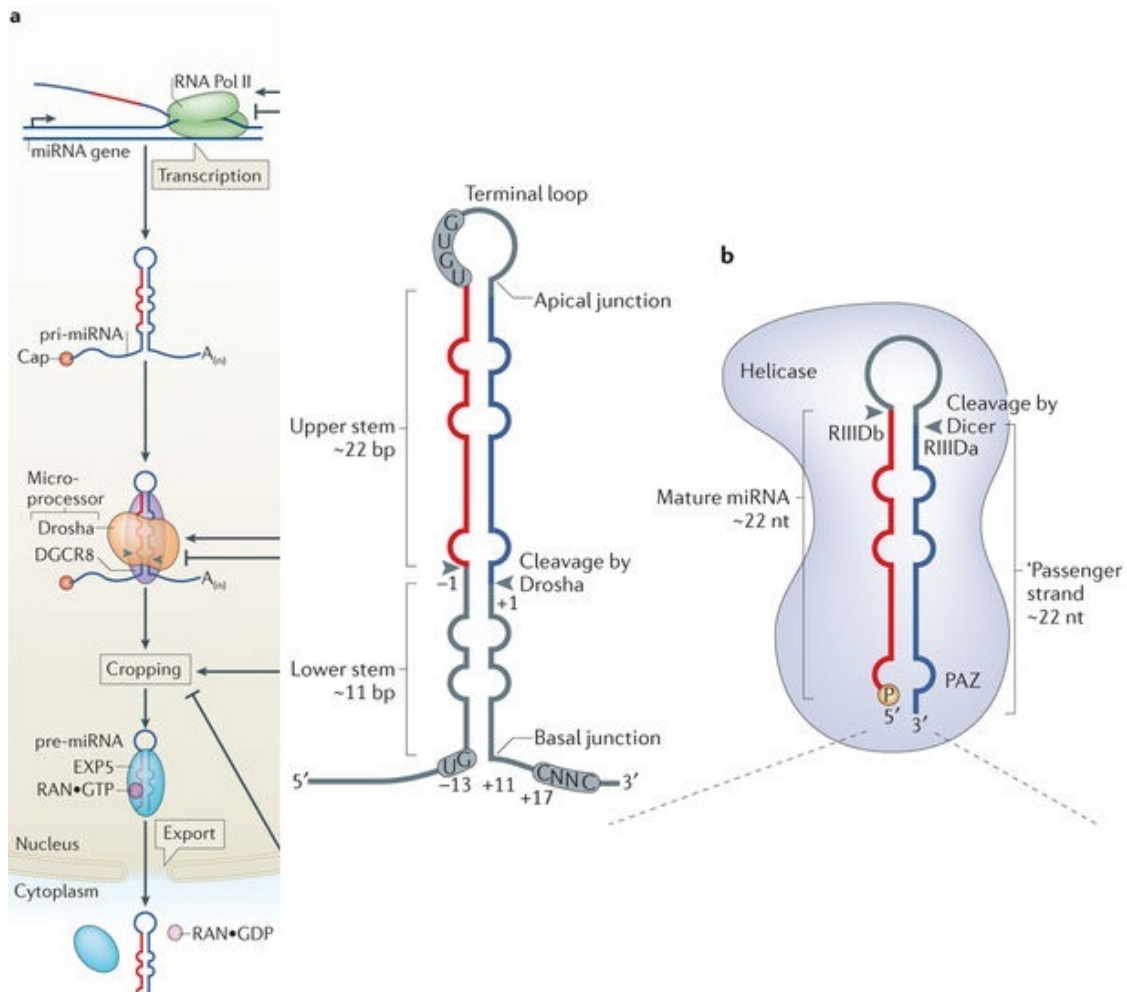
Dados atuais obtidos a partir de metodologias de sequenciamento de nova geração mostraram que praticamente todo o genoma dos eucariotos é transcrito e que a maior parte do transcritoma é constituído por RNAs não-codificadores (ncRNAs), sendo que apenas uma pequena porção destes transcritos codificam proteínas (Cheng *et al.*, 2005; The ENCODE Project Consortium, 2007; Amaral *et al.*, 2008).

Dentre as diversas famílias de ncRNAs, encontra-se o grupo dos microRNAs (miRNAs), que são pequenas moléculas de RNA não-codificadores com tamanho de cerca de 22 nucleotídeos e que desempenham importantes papéis no controle pós-transcricional da expressão gênica em eucariotos (Bartel, 2004; Ha e Kim, 2014). Análises de bioinformática sugerem que em humanos mais de 60% dos genes que codificam proteínas podem ser regulados por miRNAs. (Friedman *et al.*, 2009).

O primeiro miRNA foi descrito em 1993 por Lee *et al.* no nematóide *Caenorhabditis elegans*, e teve o nome de *lin-4*. Ao silenciar o gene *lin-4*, os autores perceberam que o desenvolvimento pós-embrionário do nematóide acabava sendo afetado, e em uma busca mais aprofundada perceberam que isto estava relacionado com variações na quantidade presente da proteína LIN-14. Em estudos de bioinformática, viu-se que a região 3'UTR do mRNA de LIN-14 possuía uma região

complementar à sequência de *lin-4* e em seguida com a utilização de genes repórter, foi possível demonstrar a interação entre estes RNAs, e mostrar o controle de *lin-4* sobre o mRNA de LIN-14 (Wightman et al., 1993).

Os genes que codificam miRNAs são evolutivamente conservados, e podem estar localizados em introns de genes codificadores de proteínas, em íntrons ou éxons de genes de ncRNAs longos ou em regiões intergênicas (Rodriguez *et al.*, 2004). O processo de biogênese dos miRNAs inclui múltiplos eventos. Inicialmente, os genes de miRNAs são transcritos em longos produtos primários, chamados de pri-miRNAs, pela RNA polimerase II ou III, e possuem uma extremidade cap 5'7-metil guanossina e uma cauda 3'poli-A. No núcleo, os pri-miRNAs são processados pelo complexo microprocessador formado pela enzima Drosha, com atividade RNase III, e seu co-fator DGCR8, gerando como produto uma molécula de RNA de aproximadamente 70 nucleotídeos conhecidas como miRNAs precursores (pre-miRNAs) (Lee *et al.*, 2002; Ha e Kim, 2014). Esses pré-miRNAs apresentam estruturas de dupla fita em forma de grampos (hairpin) e são transportados para o citoplasma pela proteína Exportina-5 (Lee *et al.*, 2003; Basyuk *et al.*, 2003; Ha e Kim, 2014). Uma vez no citoplasma, os pré-miRNAs são processados pela enzima Dicer (um outro membro da família das RNases III), que reconhece os miRNAs a partir de seu domínio helicase N-terminal (figura 4). A Dicer interage com uma proteína que possui um domínio de interação com RNA de dupla fita, que em humanos é chamada de TRBP (*TAR RNA binding-protein*) e modula o processamento dos pre-miRNAs realizado pela Dicer (Ha e Kim, 2014). O miRNA maduro clivado pela Dicer é, então, carregado para o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que possui como fator principal uma proteína Argonauta, que vem acompanhada por um complexo de duas proteínas associadas a choque térmico (HSP90 e HSC70) que são responsáveis por promover ativamente a abertura conformacional da Argonauta possibilitando a entrada do miRNA dupla fita. (Chendrimada *et al.*, 2005; Ketting *et al.*, 2001; Ha e Kim, 2014).



**Figura 4 – Biogênese de microRNAs.** a. Representação da biogênese de miRNAs a partir de sua transcrição pela RNA Polimerase II, associação ao complexo Drosha-DGCR8, clivagem e finalmente sua exportação pela exportina 5 do núcleo até o citoplasma. b. No citoplasma o pre-miRNA é clivado a miRNA maduro pela enzima Dicer, que será responsável por carregar o miRNA maduro dupla-fita até o complexo RISC (Adaptado de Ha *et al.*, 2014).

A partir do momento em que o miRNA de fita dupla é incorporado ao complexo RISC, acontece a seleção de qual fita será utilizada como guia para o silenciamento (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Este mecanismo ainda é pouco elucidado, porém segundo Han e Kim (2014), a seleção da fita guia ocorre pela preferência por uma fita com uma região terminal 5' relativamente mais instável. Segundo os mesmos autores, a escolha da fita guia também pode se basear no primeiro nucleotídeo da sequência, dando preferência a fitas que contenham uma Uracila como primeiro nucleotídeo.

Outros estudos apontam a importância biológica das fitas consideradas passageiras, evidenciando uma alternância entre estas duas fitas como fita guia chamada de *arm switching* e sugerindo que as fitas sejam classificadas apenas

como 5p e 3p (Griffiths-Jones *et al.*, 2011; Ro *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2010). Também já foi demonstrada a importância fisiológica da fita antes chamada de fita passageira, agindo independentemente da fita guia e regulando alvos diferentes destas (Okamura *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010; Mycko *et al.*, 2015).

Segundo Han e Kim (2014), a dominância da fita guia pode ser alterada por um processamento alternativo realizado pela Drosha, que pode alterar a estabilidade termodinâmica do miRNA dupla fita e facilitar a escolha alternativa da fita guia.

Uma vez selecionada a fita que servirá como guia, o RISC então orienta o miRNA a seu mRNA alvo e, dependendo do grau de complementaridade existente entre suas sequências de nucleotídeos, ocorrerá a clivagem do mRNA ou a supressão de sua tradução. Se as seqüências possuem 100% de complementariedade o mRNA será clivado, como primeiro evento; se há algumas discrepâncias, o complexo RISC além de impedir a ligação entre a PABP e o fator eIF4G necessária para o início da tradução, também é capaz de recrutar a proteína GW182, que por sua vez recruta outras proteínas que ativam a degradação do mRNA por deadenilação ou por clivagem do 5'm<sup>7</sup>G-cap (Iwakawa e Tomari, 2015). Caso haja clivagem do mRNA pelo complexo RISC, esta é mediada por enzimas da família das proteínas Argonautas, cuja atividade endonucleásica é codificada pelo domínio PIWI, semelhante ao domínio RNase H (Bartel, 2004; Engels & Hutvagner, 2006).

Hoje sabe-se que a maioria dos miRNAs de animais, alinham-se de forma imperfeita à sequência 3'-UTR do mRNA de seus alvos e promove a repressão destes seja pela inibição da tradução, seja promovendo a deadenilação desses mRNAs e sua consequente degradação (Chekulaeva and Filipowicz, 2009; Eulalio *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2010). Os miRNAs possuem uma região denominada *seed*, uma região que contém de 6-7 nucleotídeos (em geral do nucleotídeo 2 ao 9), e o alinhamento perfeito dessa sequência é primordial para a eficaz ação do miRNA (Bartel, 2009). Centenas de alvos podem ter o mesmo miRNA como regulador, formando uma cadeia complexa de regulação que pode ter ação em vias diversas. Do mesmo modo, vários miRNAs diferentes podem interagir com um mesmo mRNA, regulando sua expressão. (Kong & Han, 2005; Lewis *et al.*, 2003).

Para se proceder com uma análise funcional do papel de um miRNA em uma célula ou em um organismo, são necessários estudos funcionais que causem uma

perda ou um ganho de função deste miRNA, para que seja possível anotar o comportamento da célula em resposta à ausência desta molécula ou ao aumento de seus níveis, respectivamente. Estas análises fenotípicas de comportamento frente a uma determinada condição, com a perda ou o ganho de função possibilita um melhor entendimento da função global que o miRNA possui na regulação pós-transcricional da expressão gênica (Zhang *et al.*, 2013; Svoboda, 2015).

Os métodos mais utilizados para caracterização inicial da ação destas moléculas nas células são os ensaios moleculares de análise quantitativa de acúmulo de transcritos, como PCR em tempo real, microarranjos ou mesmo sequenciamento em larga escala (Pimentel *et al.*, 2015).

### **1.2.1 - O papel dos miRNAs na resposta imunológica**

Dados da literatura revelam a grande importância dos miRNAs na regulação de uma ampla gama de processos biológicos, contribuindo tanto para o desenvolvimento como para a regulação do Sistema Imune, entre outros (Revisado por Bi *et al.*, 2009). Além da importância dos miRNAs na diferenciação de células do sistema imunitário, trabalhos recentes indicam um importante papel desses pequenos RNAs no controle da resposta inflamatória (Bi *et al.*, 2009; O'Connell *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2007). Sabe-se que após o contato com o patógeno ocorre uma reprogramação da expressão gênica tanto na célula hospedeira quanto no patógeno, levando à modificação da expressão de centenas de genes. Entretanto, esse processo deve ser extremamente controlado, de modo a conter ou eliminar efetivamente o patógeno sem causar danos excessivos ao hospedeiro. Nesse sentido, estudos demonstram um importante papel de diversos miRNAs, tais como miR-155, miR-146 e miR-223, na regulação da resposta inflamatória após o reconhecimento de patógenos (Bi *et al.*, 2009). O'Connell *et al.* (2010) também associam estes e alguns outros miRNAs à regulação de processos inflamatórios diversos, como também que alguns processos inflamatórios podem regular a biogênese de miRNAs.

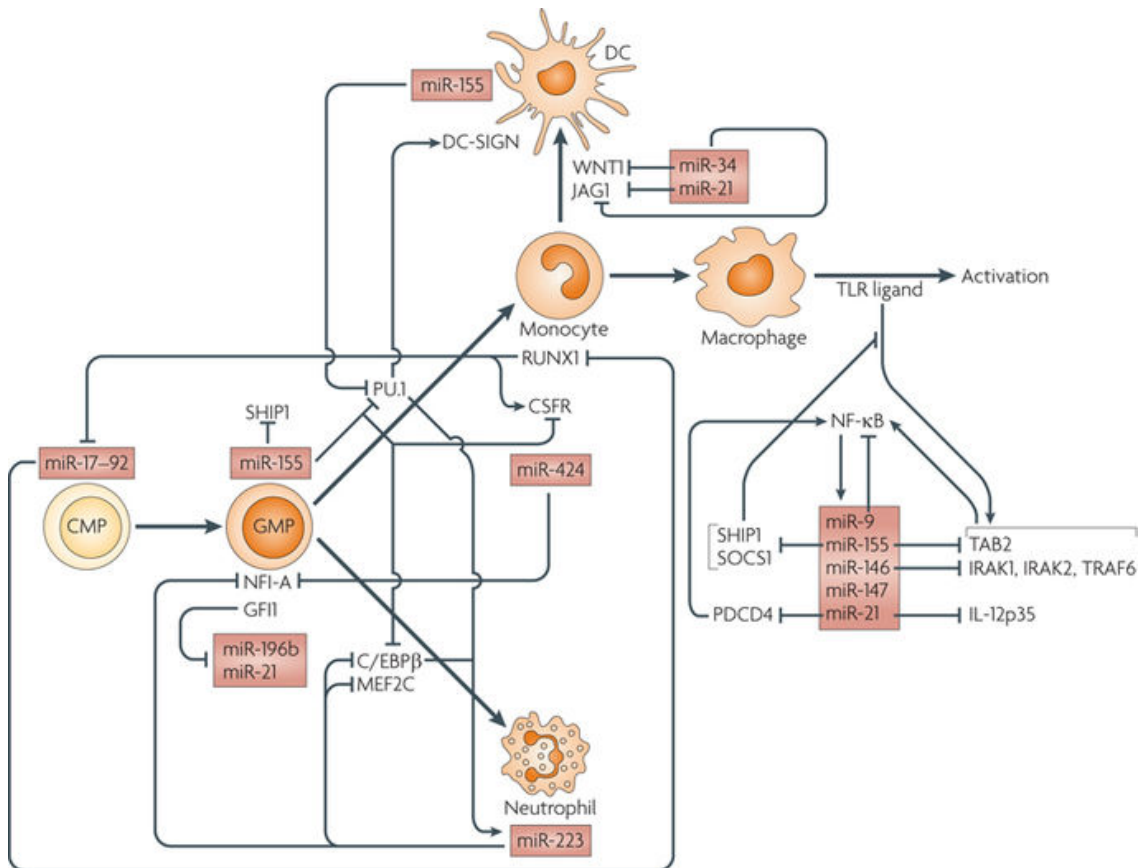
Um estudo com camundongos mutantes para o miR155 demonstrou menor produção de imunoglobulinas por linfócitos B, e menor capacidade de liberar quantidades suficientes de Interleucina-2 e Interferon  $\gamma$  por linfócitos T quando imunizados com fragmento C da toxina tetânica (Rodriguez *et al.*, 2007). Segundo



Xiaoyan *et al* (2016) o fator  $TNF\alpha$  é capaz de levar à indução da expressão de miR155 através das vias de sinalização TRAF ou MyD88, ativando fator de transcrição  $NF\kappa\beta$  que por sua vez possui afinidade ao promotor do gene *MIR155HG*. Além disto, já foi demonstrado que este miRNA é capaz de estimular a produção de  $TNF\alpha$  (Bala *et al.*, 2011), o que sugere um feedback positivo entre o miR155 e esta citocina. De acordo com estes autores, o efeito acumulativo deste miRNA em diversos alvos pode acabar influenciando em mRNAs de proteínas que proporcionam um aumento na estabilidade do mRNA de  $TNF\alpha$ .

Além disto, o miR155 também possui como alvos, reguladores da resposta imune como o SHIP1 (O'Connell *et al.*, 2009), e alguns supressores de sinalização de citocinas como SOCS1 (Lu *et al.*, 2009) e SOCS3 (Zhai *et al.*, 2013). miR155 é capaz de interferir no desenvolvimento de células mielóides em diversos pontos através da repressão de fatores-chaves como SHIP1 e SOCS1, mencionados acima, e também PU.1 e TAB2 (Figura 5). SHIP1 e SOCS1 são reguladores negativos das vias de sinalização responsivas a TOLL, enquanto TAB2 é uma citocina pró-inflamatória, e PU.1 é uma proteína cuja repressão resulta em uma diminuição da expressão de receptores CD-SIGN em células dendríticas. Essa classe de receptores corresponde a integrinas responsáveis pela ligação e reconhecimento de patógenos na membrana destas células (O'Connell *et al.*, 2010).

O miR146a possui como alvos os genes *IRAK1*, *IRAK2* e *TRAF6*, que são componentes importantes das vias de sinalização por TLRs (*Toll Like Receptors / Receptores Semelhantes a Toll*), que possuem importância no reconhecimento de antígenos e ativação da resposta inflamatória (Hou *et al.*, 2009; O'Connell *et al.*, 2010). Além disto, algumas citocinas pró-inflamatórias como interleucina-8 e MCP-2 também são alvos deste miRNA (Perry *et al.*, 2008; Rom *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que este miRNA pode estar associado a uma característica anti-inflamatória (Figura 5).



Nature Reviews | Immunology

**Figura 5 – Interações de miRNAs com vias da inflamação.** Os miRNAs são capazes de atuar na regulação das vias da inflamação em pontos diversos, desde a repressão de fatores relacionados a cascatas de sinalização até mesmo à diferenciação celular (O’Connell *et al.*, 2010).

O miR125b também possui como alvo uma citocina pró-inflamatória, o  $TNF\alpha$ . Níveis elevados de miR125b em macrófagos não ativados são responsáveis por manter estas células neste estado na ausência de infecção (Tili *et al.*, 2007). Outro miRNA potencialmente importante com ação anti-inflamatória é o miR132, que é capaz de regular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 através da regulação negativa de *IRAK4* (Kong *et al.*, 2015; Nahid *et al.*, 2013).

Em uma revisão sobre miRNAs associados à resposta imune contra fungos, Croston *et al* (2018) mostrou que todos os miRNAs mencionados acima possuem uma expressão alterada em resposta à fungos e, mais especificamente o miR125b e o miR132 em resposta a *P. brasiliensis* e o miR155 e o miR146a em resposta a *C. albicans*. O miR132 é citado como regulador da resposta mediada por sinalização de TLR2 e indução de ativação alternativa de macrófagos em resposta à infecção por *P. brasiliensis* enquanto o miR146a é descrito como regulador negativo da resposta mediada por sinalização de TLRs e também induz ativação alternativa de

macrófagos em resposta a infecção por *C. albicans*. Já para o miR155, além de descrito como regulador negativo de alguns reguladores da resposta mediada por sinalização via TLR, está associado à ativação clássica de macrófagos e promove uma resposta imune do tipo Th2 em resposta à infecção por *C. albicans*. Além dos miRNAs mencionados acima, diversos outros também são descritos como modulados em resposta à exposição do hospedeiro a diversos fungos (O'Connell *et al.*, 2018).

Resultados prévios do grupo, baseados em avaliação por RT-qPCR dos níveis de miRNAs de macrófagos potencialmente envolvidos na resposta imune após 6h de interação com *P. brasiliensis*, mostram que há um aumento significativo no acúmulo desses miRNAs de macrófagos murinos da linhagem A/J resistente à PCM após a interação com esse fungo. Isto sugere um potencial papel desses pequenos RNAs na regulação da expressão de genes alvos em resposta à infecção (Oliveira, 2016).

Tendo em vista a crescente importância de miRNAs na regulação da resposta imunológica e os poucos dados referentes ao papel desses pequenos RNAs em células hospedeiras infectadas por fungos patogênicos, esse trabalho teve como objetivo central avaliar a modulação diferencial dos miRNAs em macrófagos murinos infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*, um patógeno humano de interesse médico. Ademais, as micoses sistêmicas causadas por diversas espécies fúngicas, incluindo o *P. brasiliensis*, impõem um problema sério e crescente de saúde pública, sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo.

Com base nesses dados, e considerando suas potenciais ligações às vias da inflamação e resposta imune, foram escolhidos para análise neste trabalho os seguintes miRNAs: miR155, miR132, miR146a e miR125b. Também foram analisados os níveis de transcritos de alguns de seus respectivos mRNAs alvos, além da análise de transcritos de alguns receptores de reconhecimento padrão relacionados ao reconhecimento de *P. brasiliensis* quando da interação com o fagócito.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

Identificar o perfil de modulação de miRNAs de macrófagos murinos em resposta à infecção por leveduras do isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis* (Pb18).

### 2.2 – Objetivos específicos

Infecar macrófagos murinos derivados de medula (BMDM) da linhagem C57BL/6 com isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis* por diferentes intervalos de tempo e determinar dois intervalos de tempo a serem utilizados nos experimentos seguintes.

Determinar o índice de fagocitose e avaliar o curso da infecção pela dosagem de citocinas presentes no sobrenadante das co-culturas nos diferentes intervalos de tempo.

Extrair RNA total de BMDMs após tempos de 30', 2 h, 4 h, 6 h e 24 h de interação com o *P. brasiliensis*.

Padronizar a quantidade de RNA total a ser utilizada na síntese do cDNA para proceder com análise dos miRNAs.

Avaliar a expressão de miRNAs com conhecida importância na resposta imune inata a fungos por RT-qPCR.

Avaliar a expressão de alvos de miRNAs modulados diferencialmente conforme a curva de infecção.

Determinar mecanismo de ativação da expressão de miRNAs utilizando linhagens murinas com deleção para os genes *Dectina-1*, *Dectina-2*, *TLR2* e *TLR4* de receptores de reconhecimento padrão (PRRs).

### **3 - METODOLOGIA**

#### **3.1 - Obtenção de Meio Condicionado de Células L929 (LCCM)**

Alíquotas da linhagem celular de fibroblastos L929 foram descongeladas e rapidamente transferidas para tubo falcon contendo 5 mL de meio R10 (RPMI + 10% SFB). O tubo foi centrifugado a 300 x g por 5 minutos, o meio foi descartado e foram adicionados mais 5mL de meio R10. As células foram transferidas para garrafas de cultura de células e incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingir total confluência. Uma vez confluentes, o meio de cultura foi retirado, um novo meio R10 foi adicionado à garrafa e sete dias após o sobrenadante da cultura foi recuperado, filtrado em membrana de 0,22µm e armazenado a -20 °C até o uso.

#### **3.2 – Animais**

Para este trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos e de sexo feminino da linhagem C57BL/6 com idades entre 8 e 12 semanas de vida.

Em experimentos relacionados a vias de ativação, foram utilizados camundongos C57BL/6 deficientes para os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) TLR2, TLR4, Dectina-1 e Dectina-2 nas mesmas condições em que foram mantidos os camundongos selvagens.

A manutenção, o alojamento e todos os procedimentos realizados com estes animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) de acordo com o protocolo “UnB DOC nº 52657/2011”, e estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

#### **3.3 - Obtenção de medula óssea murina (BM)**

Para obtenção de células de medula óssea, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, e os fêmures e tíbias foram retirados e mantidos em meio RPMI. Posteriormente, foram transferidos para recipiente contendo álcool a 70% por 5 minutos, e transferidos de volta para meio RPMI estéril. Os ossos foram cortados ao meio, e com auxílio de seringas com agulhas, a parte interna dos mesmos foi lavada utilizando meio RPMI. O lavado interno das medulas foi passado por membrana Cell Strainer de 70 µm. O tubo contendo o lavado de medula foi

centrifugado a 300 x *g* por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de solução de lise de hemácias (*Red Blood Cell Lysing Buffer* – Sigma Aldrich) com homogeneização vigorosa por pipetagem durante 1 minuto. Após, foi adicionado RPMI até completar 15 mL, e o tubo foi centrifugado a 300 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI para contagem, e foi dada sequência para congelamento das mesmas ou para diferenciação em macrófagos.

### **3.4 - Diferenciação de células da BM em macrófagos M2 (BMM)**

Foram semeadas  $2 \times 10^6$  células de BM em 10 mL de meio R20/30 (RPMI-1640 + 20% SFB (Gibco) + 30% LCCM) em placas de petri de 90mm e incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. No terceiro dia de incubação, foram adicionados mais 10 mL de meio R20/30. No sétimo dia de incubação o sobrenadante da cultura foi descartado, e foram adicionados 4 mL de reagente Tryple (Gibco), e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 20 minutos. Após este tempo, as placas foram lavadas com o sobrenadante e o mesmo foi transferido para tubos de 50 mL. As placas foram lavadas com PBS gelado para recuperar o restante das células, e o mesmo foi transferido para o mesmo falcon de 50 mL contendo o sobrenadante. O tubo contendo células foi centrifugado a 300 x *g* por 8 minutos, e após isto o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio R5/10 (RPMI + 5% LCCM + 10% SFB). As células foram contadas em câmara de Neubauer com o corante de viabilidade azul de tripano e as determinadas quantidades foram transferidas para recipiente de uso (garrafas de cultura ou placas de cultura celular) por pelo menos 12 horas antes do uso.

### **3.5 – Obtenção de leveduras de *P. brasiliensis* para os experimentos de interação com macrófagos**

O fungo *P. brasiliensis* foi mantido em meio GPY (Glicose-Peptona-Extrato de Levedura) em tubos de vidro cilíndricos com tampas de rosca e mantidos em estufa em temperatura de 37 °C. A cada sete dias era realizada sua transferência para um novo tubo contendo meio de cultura fresco. Para os experimentos de infecção em macrófagos, foi utilizado fungo após 5 dias de cultivo. O fungo *P. brasiliensis* foi ressuspensão em meio RPMI, e foram utilizadas seringas com agulha em sistema *up*

*and down* para dissolução dos grumos. Em seguida, o tubo contendo a solução de leveduras foi deixado em repouso por 5 minutos para precipitação dos grumos maiores. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando corante de viabilidade azul de tripano.

### **3.6 – Determinação da porcentagem de fagocitose**

Para determinar a porcentagem de fagocitose, os macrófagos, obtidos como descrito acima, foram co-cultivados com leveduras de *P. brasiliensis* durante os tempos de 30 minutos, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h. Após cada tempo de infecção o sobrenadante foi removido e foi feita coloração utilizando o *kit* Panótico (Laborclin). Por microscopia óptica foram contadas as células em cada campo, com a contagem dividida em: 1. contagem de número de macrófagos total no campo; 2. número de leveduras fúngicas no campo; e 3. número de macrófagos aderidos a leveduras ou macrófagos com leveduras internalizadas. A microscopia foi realizada utilizando microscópio *Axio Observer GmbH (Carl Zeiss Microscopy)*.

A coloração pelo sistema Panótico se baseia na fixação das células com solução de triarilmetano (0,1%) seguida pela coloração do citoplasma utilizando solução de xantenos (0,1%) e marcação dos núcleos utilizando solução de tiazinas (0,1%). Visto que esta coloração por si só não permite dizer com certeza se uma levedura está apenas aderida ao macrófago ou se está internalizada por este, estes dois grupos foram contados juntamente para a determinação da porcentagem de fagocitose.

Para análise estatística da porcentagem de fagocitose, foi aplicada análise de variância por One-Way ANOVA. Para este teste também foi aplicada análise de índice de correlação de Pearson entre os pontos em razão do tempo.

### **3.7 – Cinética de interação: Macrófagos M2 e leveduras de *P. brasiliensis***

Foram semeados  $2 \times 10^6$  macrófagos em 6 mL de meio R5/10 e transferidos para garrafas de cultura de células de 50cm<sup>2</sup> com filtro na tampa e incubados por uma noite antes da infecção em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram adicionadas  $10^6$  células de *P. brasiliensis* nas garrafas dos grupos infectados, resultando em uma proporção de 2:1 (dois macrófagos para cada levedura). Nos tempos de 30', 2 h, 4 h, 6 h e 24 h após a infecção foram coletados 2 mL de sobrenadante da cultura de

cada tempo para dosagem de citocinas. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com 2 mL de PBS 1% aquecidos à temperatura de 37 °C para remoção das leveduras não fagocitadas e não aderidas. A seguir foi realizada a extração de RNA total de cada tempo a partir das células que se encontravam aderidas ao fundo das garrafas, conforme descrito abaixo.

### **3.8 – Extração do RNA total de Macrófagos murinos infectados com *P. brasiliensis* e análise de qualidade**

No decorrer de todo esse trabalho, foi utilizado *kit “mirVana™ isolation kit”* seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Este kit se baseia em uma extração orgânica seguida da imobilização do RNA em filtros de fibra de vidro visando purificar o RNA total e os miRNAs. Há duas opções de extração segundo o protocolo: uma extração direta que gera como produto final um único produto que é o RNA total; e uma extração fragmentada em duas partes que gera dois produtos finais, a fração de RNA total e a fração enriquecida com pequenos RNAs (<200 nucleotídeos). O método utilizado neste trabalho foi o de extração direta, obtendo como produto final unicamente o RNA total, que contém mRNAs, miRNAs e os demais RNAs celulares.

A integridade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL). A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria por absorção em 260 nm (*Nano Drop 2000, Thermo Scientific*) e a pureza das amostras foi determinada pela razão da absorbância A260/A280. Após quantificação por espectrofotometria, foi realizada quantificação do RNA por fluorimetria, utilizando *kit “Qubit® RNA BR assay”* (Qubit® 2.0 Fluorometer – Life Technologies).

### **3.9 - Padronização da quantidade de RNA total a ser utilizada nas análises de expressão gênica por RT-qPCR**

De acordo com o protocolo do kit TaqMan®, é sugerido o uso de uma quantidade de 10ng iniciais de RNA total para a síntese de cDNA. Entretanto, quando utilizada esta quantidade de RNA total para proceder com a síntese de cDNA, a qPCR feita a partir deste cDNA acabou apresentando Cts (*cycle thresholds*) acima de 35, ou seja, fora do limite possível de análise.



Tendo em vista que a proporção de miRNAs é uma pequena fração presente no RNA total, foi feita a padronização para definir a quantidade ideal de RNA total a ser utilizada nas reações de transcrição reversa visando atingir um Ct dentro do limite de confiança para análise.

Foram testadas diversas concentrações iniciais de RNA total para a síntese do cDNA (20 ng, 50 ng, 100 ng, 175 ng) e por sugestão do suporte técnico da Applied Biosystems, também foi realizado teste por aumento na concentração inicial de enzima transcriptase reversa na reação para síntese do cDNA. De acordo com os Cts observados na curva de concentrações e a quantidade de material disponível, foi escolhida a concentração de 100 ng iniciais para a análise do miR155; e o mesmo padrão foi utilizado para análise dos outros miRNAs analisados (miR146a, miR132 e miR125b), com exceção do miR155-3p que foi menos abundante, e exigiu o uso de uma concentração inicial de 175 ng de amostra para reação de transcrição reversa.

### **3.10 – Verificação da eficiência dos primers U6 e miR155**

Foi feita curva padrão para verificar a eficiência dos primers para o snRNA endógeno U6 e para o miR155. Para tal, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 100 ng de RNA total para cada reação. A partir do cDNA foram feitas 4 diluições (1:5) para proceder com 5 pontos na curva padrão iniciando com o ponto mais concentrado em que foi utilizado cDNA sem diluir até o ponto da maior diluição.

### **3.11 – Síntese do cDNA e PCR em tempo real (RT-qPCR)**

A síntese do cDNA a partir dos miRNAs foi realizada utilizando o *kit* “*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription*” (Invitrogen) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Os miRNAs analisados e suas sequências são mostrados na Tabela 1. As quantidades de RNA total utilizado foram padronizadas de acordo com a abundância dos miRNAs estudados. Foram utilizados 100 ng de RNA total para o snRNA U6 e para os seguintes miRNAs: miR155, miR132, miR146a e miR125b. Para o miR155-3p foram utilizados 175ng de RNA total na reação de transcrição reversa, devido à sua menor abundância (para esta análise, o cDNA de U6 foi feito com a concentração correspondente a 175ng iniciais, para proceder com a correta normalização dos dados). Foram realizadas reações de transcrição reversa com

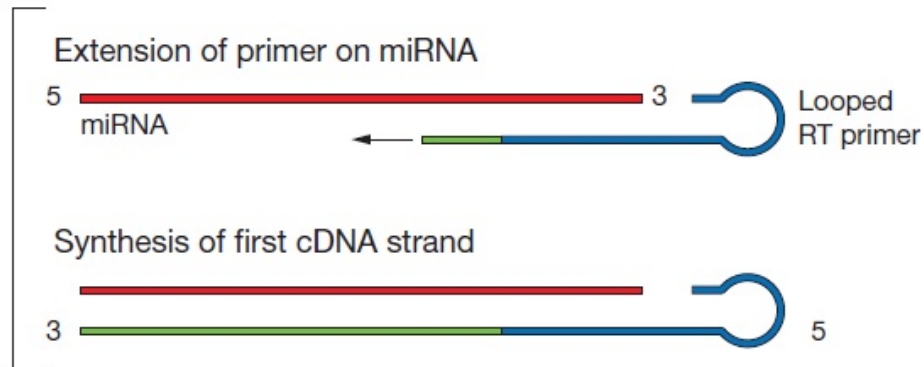
volume final de 15  $\mu\text{L}$ , contendo além das concentrações citadas de RNA total, 0,15  $\mu\text{L}$  de dNTPs (100 mM), 1  $\mu\text{L}$  de enzima *MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (50 U/ $\mu\text{L}$ ), 1,50  $\mu\text{L}$  de *Reverse Transcription Buffer 10X*, 0,19  $\mu\text{L}$  de *RNase Inhibitor* (20 U/ $\mu\text{L}$ ) sendo o volume final completado para 15  $\mu\text{L}$  com água *RNase Free*. Na realização dos testes para padronização das concentrações de RNA total inicial a ser utilizado, foram utilizados 1,5  $\mu\text{L}$  de enzima *MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (50 U/ $\mu\text{L}$ ) nas reações que se identificam por possuírem quantidade adicional desta enzima.

**Tabela 1.** miRNAs avaliados por RT-qPCR utilizando sondas TaqMan®

miRNA	Sequência do miRNA (5'-3')
miR155 (5p)	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
miR155* (3p)	CUCCUACCUGUUAGCAUUAAC
miR146a (5p)	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR125b (5p)	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
miR132 (3p)	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG

O sistema “*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription*” (Invitrogen) utiliza um método de quantificação por sondas em formato de haste alça (*stem-loop*), que possibilita a síntese de cDNA a partir de uma molécula pequena com iniciadores acoplados a um adaptador de estrutura secundária em formato de grampo, que aumenta a estabilidade da mesma e aumenta a especificidade da reação de PCR, dispensando por isso, a necessidade de tratamento das amostras com DNase I (Figura 6). Por este motivo e por haver pouca quantidade de amostra disponível, não foi realizado tratamento com DNase I, pois tal processo pode levar à uma grande perda de material.

## Step 1: Reverse Transcription

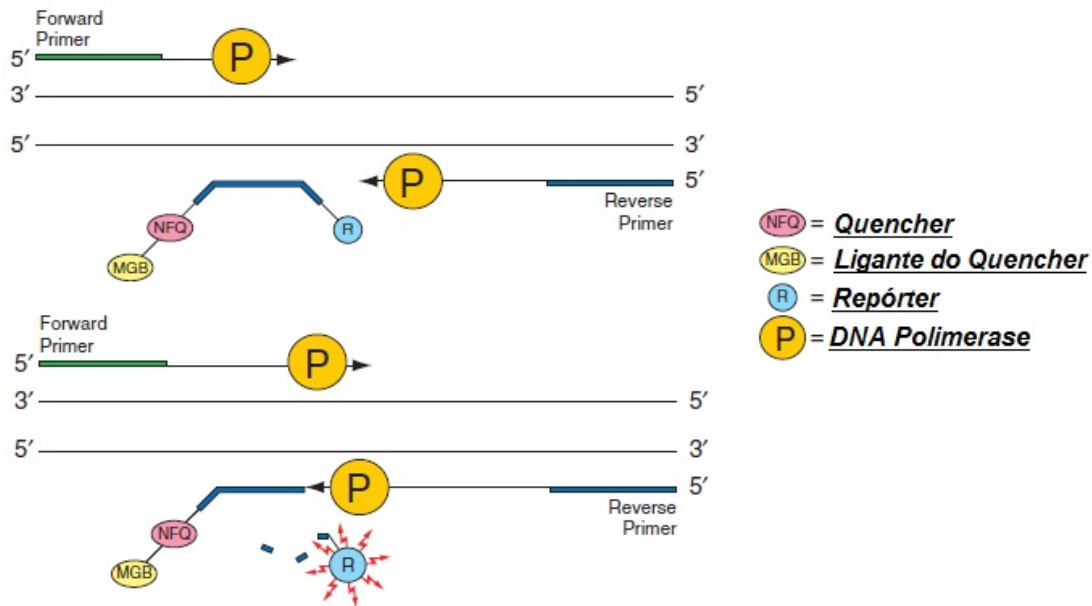


**Figura 6 – Reação de transcrição reversa.** Exemplificando o primer RT em formato de grampo, e demonstrando a síntese do cDNA (Adaptado do Protocolo fornecido pelo fabricante da enzima TaqMan® Small RNA Assays – Applied Biosystems).

A reação de síntese de cDNA, empregando a enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* foi realizada conforme recomendado pelo fabricante tendo sido realizadas as incubações de 16 °C por 30 minutos para anelamento dos primers, seguido por 42 °C por 30 minutos para a síntese da fita de cDNA e 85 °C por 5 minutos para inativação da enzima.

A reação de qPCR foi realizada utilizando o sistema “*TaqMan® Small RNA assays*” (*Applied Biosystems*) de detecção de miRNAs, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante com algumas alterações. O volume final da reação foi reduzido a 10 µL, dos quais 1 µL referente ao cDNA da amostra, 0,5 µL referentes às sondas *TaqMan® Small RNA Assay* (20x), 5 µL referentes ao *TaqMan® Universal PCR Master Mix II* (2x) e volume final completado para 10 µL com água *Rnase Free*.

Este sistema se baseia na amplificação mediada por primers, com utilização de uma sonda TaqMan®. Esta sonda contém um fluoróforo (repórter) e um “*quencher*”, que é responsável por absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo enquanto ambos estão próximos um do outro. A partir do momento em que ocorre a reação de PCR, a enzima DNA Polimerase cliva esta sonda com sua atividade exonucleásica e o *quencher* acaba se distanciando do fluoróforo, permitindo que este possa emitir energia que será captada pelo equipamento (Figura 7).



**Figura 7 – Processo de amplificação da reação de qPCR.** Demonstrando a amplificação do cDNA causando a clivagem da sonda e liberação do repórter que possibilitará a detecção da amplificação pelo equipamento (Adaptado do Protocolo fornecido pelo fabricante da enzima TaqMan® Small RNA Assays – Applied Biosystems).

O protocolo de ciclagem utilizado para esta reação foi conforme recomendado pelo fabricante, seguindo o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos, seguido por 95 °C por 10 minutos para desnaturação do cDNA e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação dos cDNAs e 60 °C por 60 segundos para anelamento das sondas e amplificação dos fragmentos alvos. O equipamento utilizado foi o *7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

A síntese de cDNA a partir dos mRNAs foi realizada utilizando o *kit “High Capacity cDNA Reverse Transcriptase”*, utilizando como molde 500 ng de RNA total em uma reação com volume final de 20 µL contendo 2 µL de tampão de transcriptase reversa (10x), dNTPs em uma concentração final de 4 mM, 2 µL de iniciadores *Random Primers* e 50 U da enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*, completando para o volume final com água *RNase Free*. O programa de ciclagem utilizado para a síntese de cDNA a partir de mRNAs foi de 10 minutos a 25 °C para anelamento dos primers, 120 minutos a 37 °C para a reação de transcrição reversa e aquecimento a 85 °C para inativação da enzima.

A reação de qPCR com o cDNA produzido a partir dos mRNAs foi realizada utilizando a enzima *“GoTaq® qPCR Master Mix”* seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante com algumas alterações. O volume final da reação foi reduzido a 10 µL, dos quais foram utilizados 2 µL de uma diluição 1:2 do cDNA, além dos primers

senso e antisenso nas concentrações finais de 0,2  $\mu$ M e 5  $\mu$ L do *GoTaq® qPCR Master Mix*, e a reação foi preenchida para o volume final com água *RNase Free*.

O sistema *GoTaq® qPCR Master Mix* utiliza o método de detecção por propriedade similar à do SYBR Green, que se acopla às estruturas de DNA dupla fita provenientes da amplificação e geram o sinal fluorescente que será lido pelo equipamento.

O protocolo de ciclagem utilizado para esta reação foi de 95 °C por 2 minutos para desnaturação do cDNA, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação do cDNA e 60 °C por 60 segundos para anelamento e amplificação dos fragmentos finalizando com uma curva de destaturação (*Melting Curve*) entre 60 °C e 95 °C para verificar as características especificidade dos primers pela presença de 1 ou mais produtos. A presença de mais de 1 produto em uma única reação indica que o primer não é específico unicamente para o fragmento de interesse.

Como controle negativo, foi realizada uma reação de qPCR como citado acima, porém utilizando 2  $\mu$ L de RNA total no lugar do cDNA, para verificar se havia contaminação por DNA genômico. Os primers referentes ao gene RPS9 utilizados foram conforme a Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequências dos primers de RPS9 utilizados na reação de qPCR

Primer	Sequência do Primer
RPS9 - sense	CTATTCACCATGCCCGTGTG
RPS9 - antisense	GAGAGTCCAGGCGAACAAATG

Os dados de quantificação relativa empregaram o método descrito por Livak e Schmittgen (2001), utilizando o método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  usando o snRNA U6 como normalizador dos miRNAs e o RPS9 como normalizador dos mRNAs. Seguindo este método, a comparação baseia-se nos valores de Ct, segundo descrito abaixo:

- i. Cálculo do  $\Delta CT$  ( $\Delta CT = CT_{\text{gene de interesse}} - CT_{\text{normalizador}}$ ); realizar este cálculo para o grupo controle (não infectado) e experimental (infectado)
- ii. Cálculo de  $\Delta\Delta CT$  ( $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{grupo experimental}} - \Delta CT_{\text{grupo controle}}$ )
- iii. Obtenção do valor de Fold Change: a normalização dos dados foi feita a partir do cálculo de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

A análise estatística do perfil de acúmulo do miR155 ao longo da cinética de infecção de macrófagos com *P. brasiliensis* foi realizada pelo método de Crescimento de Gompertz, propondo hipótese nula (Mello *et al.*, 2015).

Para análise dos dados referentes aos demais miRNAs analisados, foi realizado teste *t* entre o grupo controle e o grupo infectado de cada tempo e de cada miRNA.

Para todos os dados analisados, foi considerada significância estatística em testes com o valor de *p* menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Os asteriscos (\*) nas figuras indicam a significância estatística da comparação.

### **3.12 – Dosagem de citocinas**

A dosagem de citocinas foi realizada por método de ELISA, utilizando os *kits* “*DuoSet ELISA Development System*” para detecção de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (CCL2).

As leituras foram realizadas de acordo com o protocolo fornecido pelo *kit* em equipamento SpectraMax M3 (Molecular Devices) e analisado pelo software “*SoftMax Pro 5.2*”.

### **3.13 - Experimentos com camundongos nocaute (do inglês knockout – KO) para genes da via de sinalização (genes de receptores de reconhecimento padrão – PRR)**

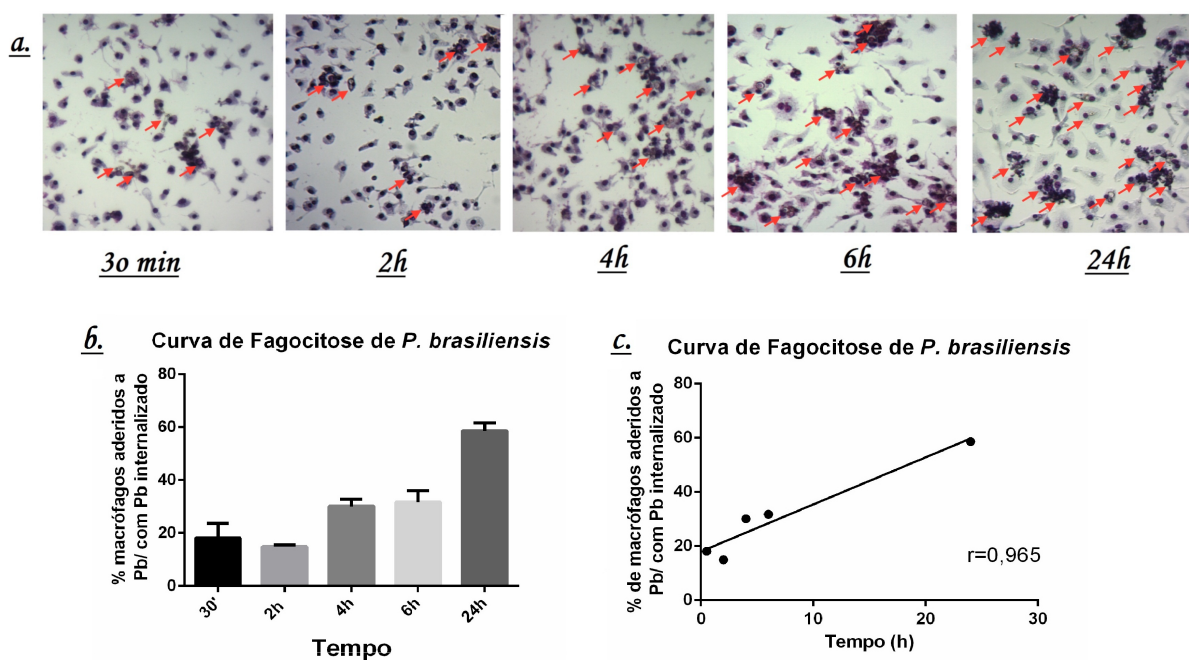
Foram semeados  $10^6$  macrófagos de cada linhagem por poço em placas de 6 poços com 2 mL de meio R5/10 por poço. Cada poço foi infectado com  $5 \times 10^5$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* Pb18. Após os tempos de 6 horas e 24 horas 2 mL dos sobrenadantes das co-culturas foram coletados para posterior análise de citocinas e as células foram lavadas conforme descrito no item 3.6 e lisadas conforme descrito no item 3.7.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Porcentagem de fagocitose

Visando uma melhor percepção do comportamento dos macrófagos quando em contato com o *P. brasiliensis*, foi realizada a infecção seguindo os tempos determinados de 30', 2 h, 4 h, 6 h e 24 h. Após cada tempo de infecção o sobrenadante da co-cultura foi retirado para dosagem de citocinas e os poços foram lavados com PBS e em seguida foi realizada coloração com o *kit* Panótico, conforme descrito na metodologia. Posteriormente, as células dos poços foram fotografadas em microscopia óptica para visualização das interações macrófago-fungo ao longo do tempo.

Nossos dados mostram que a porcentagem de macrófagos aderidos a *P. brasiliensis* varia positivamente em função do tempo (Figura 8). Os dados obtidos apresentam correlação positiva em função do tempo conforme pode ser confirmado pelo índice de correlação de Pearson, com  $r=0,9650$  e valor de  $p=0,0039$ .



**Figura 8 – Análise da porcentagem de fagocitose ao longo do tempo na co-cultura de macrófagos com *P. brasiliensis*.** **a.** Fotomicrografia nos tempos de 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas e 24 horas de infecção após coloração por *kit* Panótico. **b.** Percentual de fagocitose em cada do tempo. **c.** Análise de correlação entre porcentagem de macrófagos aderidos a leveduras ou com leveduras internalizadas em função do tempo. Correlação positiva com  $r=0,9650$  e valor de  $P=0,0039$ .

Agregados de células como observados neste trabalho (Figura 8a) já foram descritos por de Souza-Silva *et al* (2015) em macrófagos M2 de camundongos das linhagens B10.A e A/J infectados com *P. brasiliensis*. Segundo de Souza-Silva *et al*

(2015), macrófagos derivados da linhagem B10.A mostraram uma percentagem de fagocitose maior do que a observada para os macrófagos derivados da linhagem A/J (resistente à PCM), associando suscetibilidade à paracoccidiodomicose a uma resposta imune inicial exacerbada.

A partir dos dados apresentados neste trabalho (Figura 8), podemos perceber a formação de regiões em que os macrófagos formam um tipo de barreira ao redor das leveduras, muitas vezes com dois ou mais macrófagos em contato com uma única levedura, ou um aglomeramento de leveduras.

No anexo são mostradas duas figuras de microscopia óptica em momentos de 6 horas de interação, apresentando com mais detalhes as formações onde se pode visualizar diversos macrófagos interagindo com uma única levedura ou com um pequeno aglomerado de leveduras (Figuras 18 e 19).

#### **4.2 - Dosagem de citocinas dos sobrenadantes de co-culturas de macrófagos com *P. brasiliensis* nos tempos de 30', 2 h, 4 h, 6 h e 24 h de interação**

Foi realizada dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e MCP-1 nos sobrenadantes das co-culturas por método de ELISA. Entretanto, não foi possível quantificar estas citocinas pelo método de ELISA, apesar de as curvas padrão confeccionadas conforme recomendação do fabricante estarem de acordo com o esperado.

Como contrapartida a este problema, decidimos quantificar os níveis dos mRNAs que codificam estas citocinas por método de RT-qPCR. Entretanto as amostras de RNA que tínhamos disponíveis para análise encontrava-se em baixa concentração e baixa quantidade e não foi possível efetuar o tratamento com DNase I, imprescindível para tal análise. Devido à indisponibilidade de primers desenhados nas junções éxon-éxon para um gene endógeno, não foi possível realizar tal análise.

Segundo o apresentado acima, a análise sobre a progressão da infecção realizada neste trabalho (fagocitose, dosagem de citocinas e quantificação dos níveis de transcritos cujos produtos apresentam papel já descrito na resposta imune a *P. brasiliensis*) está unicamente amparada pelos ensaios de fagocitose, conforme mostrado na figura 8.



### 4.3 - Padronização da concentração inicial de RNA total para os experimentos de RT-qPCR

A metodologia antes utilizada em nosso grupo por Oliveira (2016) e Agostinho et al (2017) baseava-se na extração de RNA com separação de frações: fração de RNA total; e fração enriquecida com pequenos RNAs (<200nt). Segundo relatos da literatura (Podolska *et al.*, 2011; Redshaw *et al.*, 2013), o método de extração de RNA bem como a fração empregada na síntese de cDNA pode influenciar os estudos de expressão gênica de modo importante. Empregando a mesma metodologia tanto para extração de RNA como para os ensaios de RT-qPCR deste trabalho, Redshaw *et al* (2013) compararam os níveis de expressão de um conjunto de miRNAs usando RNA total ou a fração enriquecida com pequenos RNAs. Estes autores demonstraram uma diferença significativa nos níveis de miRNAs quando empregando a fração enriquecida de pequenos RNAs comparada ao uso do RNA total. Tais resultados sugerem que a comparação dos níveis de transcritos de miRNAs entre RNA total e fração enriquecida de pequenos RNAs não deve ser realizada diretamente.

Portanto, visando minimizar possíveis alterações nas proporções dos miRNAs devido ao fracionamento, neste trabalho foi empregada em todas as análises a fração correspondente a RNA total.

Também é importante ressaltar que o uso da fração enriquecida com pequenos RNAs (<200 nt) como molde para cDNA, implica em um custo extremamente elevado, uma vez que cada reação de cDNA será individualizada para cada miRNA.

A princípio foi utilizada a concentração de 10 ng de RNA total para a RT-qPCR, seguindo protocolo sugerido pela cartilha de procedimentos da “*TaqMan® Small RNA Assays*” da Applied Biosystems. Entretanto, as análises não foram possíveis devido à baixa abundância encontrada.

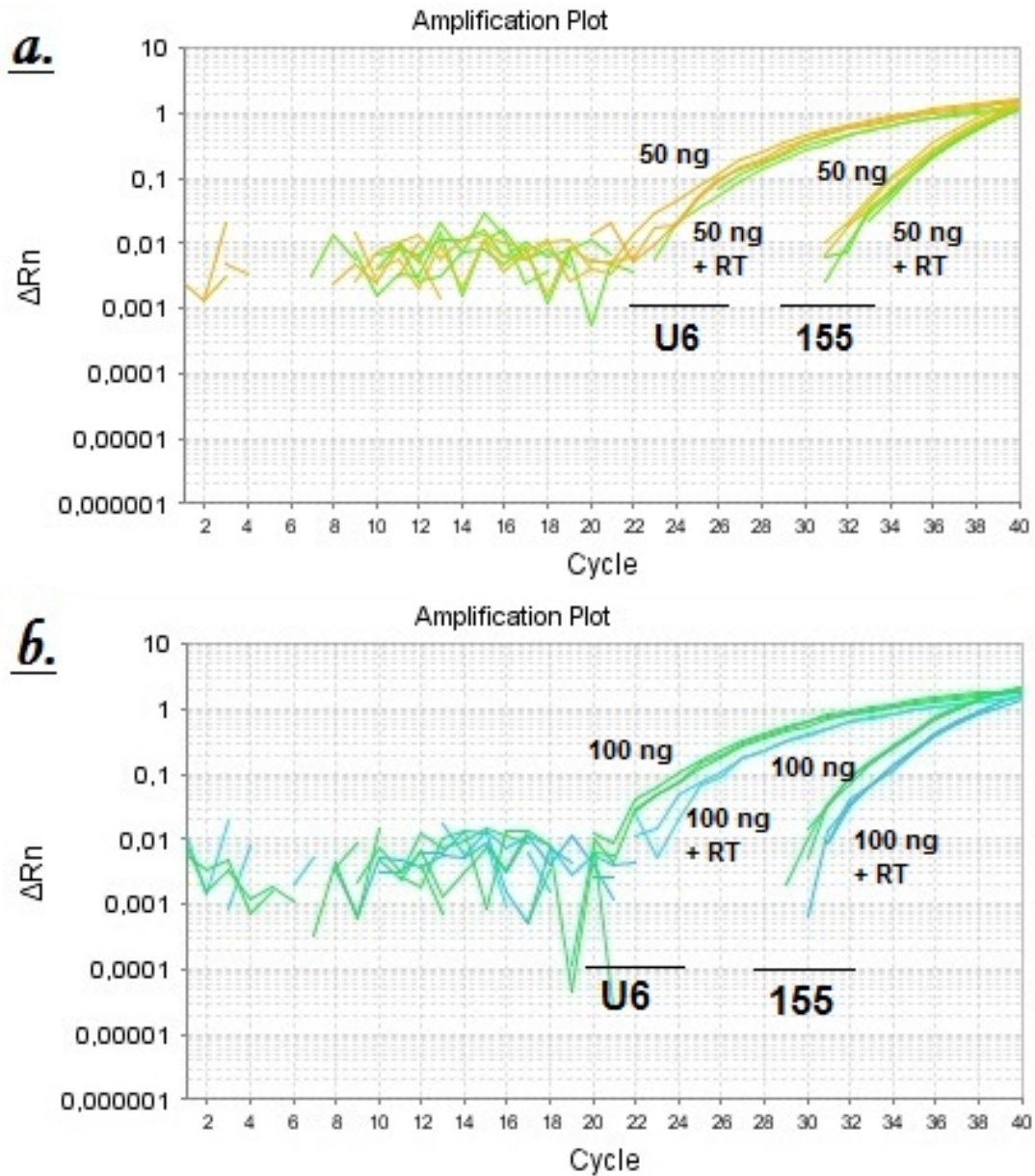
O uso do RNA total para análise de miRNAs já foi descrito em análises de miRNAseq (Drewry *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2014), e o kit mirVana demonstrou performance melhor do que o kit de extração TRIzol principalmente em reprodutibilidade (Guo *et al.*, 2014).

Para padronizar a quantidade inicial de RNA total a ser utilizada nas reações de transcrição reversa, por sugestão do suporte técnico da Applied Biosystems, foram feitas reações de transcrição reversa utilizando diferentes concentrações iniciais de RNA total, e em seguida foi realizada qPCR destes respectivos cDNAs em

diferentes concentrações. Também por sugestão do suporte técnico, foi feito teste com aumento de quantidade inicial de enzima RT com intuito de tentar elevar a eficiência da reação. O objetivo deste experimento foi de encontrar uma concentração inicial de RNA total para produzir uma quantificação significativa em um Ct aceitável para análise dos dados, visto que utilizando a concentração base indicada no *kit* os CTs estavam acima do ciclo 35. De acordo com o guia “*Getting Started*” de uso do equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), é desejável que o Ct esteja entre  $8 < CT < 35$ .

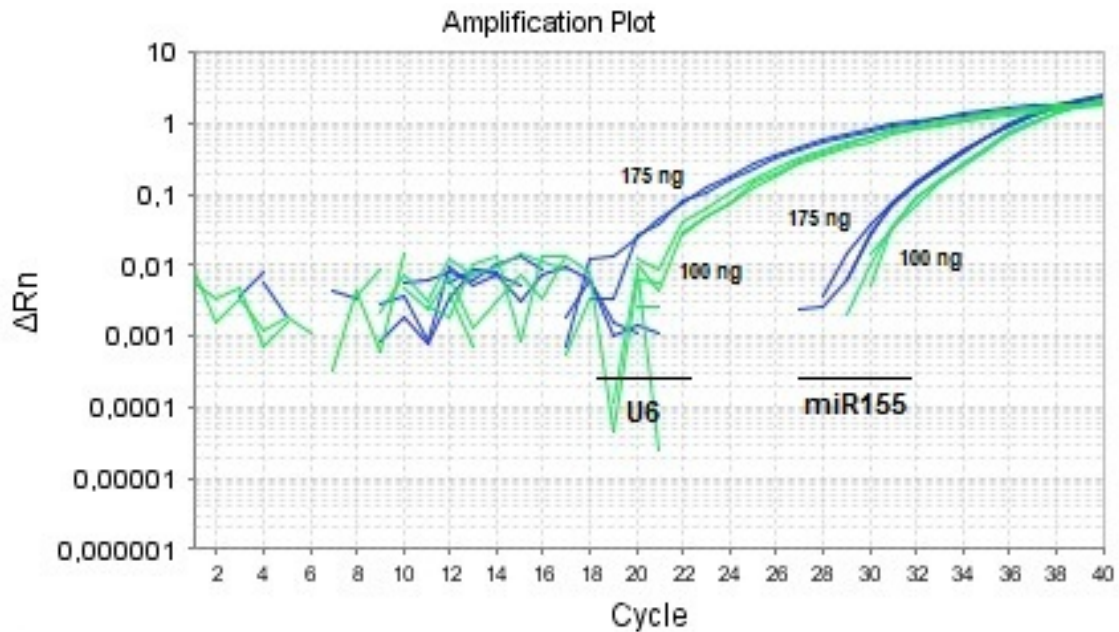
Na Figura 9a são mostradas as curvas de amplificação utilizando apenas 50ng de RNA total para a síntese do cDNA, e 50 ng de RNA com quantidade extra de enzima RT, e é possível notar curvas com Cts elevados, principalmente se tratando do miR155. Também foi observado um Ct mais alto nas reações com quantidade extra de enzima RT.

Conforme vemos na Figura 9b, a concentração de 100 ng inicial de RNA total foi capaz de diminuir o Ct para 31, enquanto o aumento na quantidade de enzima RT não aumentou a eficiência da reação mas, pelo contrário, diminuiu esta eficiência gerando um Ct de 32.



**Figura 9 - Curvas de amplificação do miR155 e snRNA U6, empregando diferentes quantidades de RNA total e diferentes quantidades da enzima transcriptase reversa.** Nessa figura é mostrado a comparação das amplificações de miR155 e snRNA U6 empregando para a síntese do cDNA as quantidades de 20 e 50ng de RNA total (figura 7a) e 50 e 100ng de RNA total (figura 7b). “+RT” refere-se ao uso de uma quantidade adicional da enzima transcriptase reversa conforme descrito na metodologia.

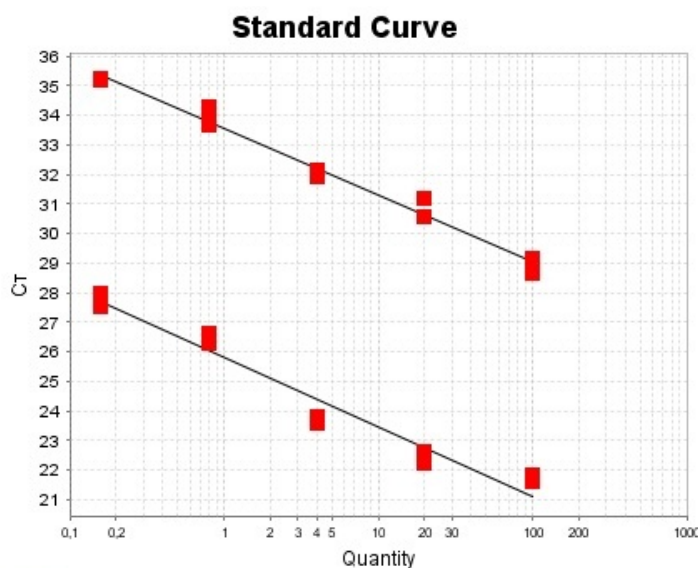
Conforme a Figura 10, a concentração de 175 ng aumentou ainda mais a eficiência da reação, diminuindo o Ct de 31 para 30. Entretanto para a maioria dos casos foi utilizada a concentração de 100 ng simplesmente em razão da disponibilidade de amostra.



**Figura 10 - Curva de amplificação do miR155 e snRNA U6, empregando diferentes quantidades de RNA total.** Nessa figura é mostrado a comparação das amplificações de miR155 e snRNA U6 empregando para a síntese do cDNA as quantidades de 100 e 175ng de RNA total.

#### 4.4 – Verificação da eficiência dos primers U6 e miR155

As curvas padrão para os primers dos genes snRNA U6 e miR155 foram feitas de acordo com o padrão indicado pelo software da Applied Biosystems, no qual a partir de uma concentração de 100ng de RNA foi realizada a reação de transcrição reversa conforme descrito na metodologia e a partir do cDNA quatro diluições seriadas 1:4 foram realizadas. A Figura 11 apresenta estas curvas padrão mostrando uma eficiência acima do esperado, e segundo o guia “*Real-time PCR handbook*” (Applied Biosystems) eficiências acima de 110% correspondem a possíveis contaminações com inibidores de PCR. Entretanto, os valores observados de  $R^2$  estão dentro do aceitável para a linearidade das curvas.



**Figura 11 – Verificação da eficiência dos primers U6 e miR155.** Curva superior referente ao transcrito miR155, com  $R^2$  de 0,984 e EFF% de 177,424. Curva inferior referente ao snRNA U6, com  $R^2$  de 0,961 e EFF% de 165,295. Concentração final de primers em 5X.

#### 4.5 - Expressão de miR155 durante a cinética de infecção de macrófagos murinos por *P. brasiliensis*

Dados prévios de nosso grupo com macrófagos murinos em resposta à interação com *C. albicans* demonstraram pela primeira vez que macrófagos que interagiram com hifas deste fungo apresentaram um aumento de acúmulo de miR125b, miR132, miR199 e miR223. Além disto, o acúmulo de miR155 e de miR146a encontram-se aumentados nestas células em resposta a leveduras mortas por calor. Este trabalho propôs o modelo de regulação da expressão do miR155, ativado pelo receptor Dectina-1 pela via de sinalização Syk em resposta ao contato com as  $\beta$ -Glucanas das leveduras ou ao contato com hifas deste fungo. Também demonstrou que os receptores do tipo TOLL (TLR2 e TLR4) são capazes de regular negativamente a expressão deste miRNA por uma via ainda não muito bem elucidada (Agustinho *et al.*, 2017).

microRNAs descritos por sua participação na resposta imune também foram estudados por Oliveira (2016) com as linhagens de camundongos A/J e B10.A, modelos de resistência e susceptibilidade à paracoccidiodomicose, respectivamente. Os dados apresentados por este trabalho demonstraram o aumento de acúmulo de cinco miRNAs em ambas as linhagens, sendo eles miR155, miR132, miR146, miR125b e miR455. Este aumento de acúmulo foi visto em ambas

as linhagens, o que não permitiu associar esses dados à resistência ou susceptibilidade à paracoccidiodomicose em si, entretanto pôde relacionar estes miRNAs à resposta imune frente ao contato com este fungo.

Além de verificar o acúmulo destes miRNAs, Oliveira (2016) também verificou o acúmulo dos precursores do miR155, concluindo que houve aumento tanto do transcrito primário (pri-miR155) quanto da molécula madura em resposta à interação com *P. brasiliensis*. Além disto, houve um aumento nos níveis de TNF $\alpha$  e diminuição na expressão de SHIP1, o que corrobora com o que se vê na literatura (Bala *et al.*, 2011; O'Connell *et al.*, 2009). Entretanto foi notado um aumento no acúmulo de SOCS1 e SOCS3 que a princípio são regulados negativamente pelo miR155. Estes dados mostram que apesar de serem alvos deste miRNA, a regulação pós-transcricional é muito mais complexa, podendo ser regulada por diversos outros fatores e em diversos outros níveis.

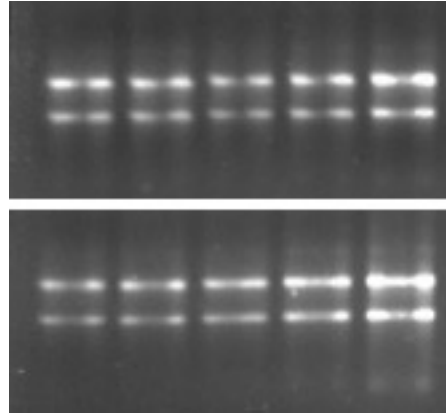
Baseado no interesse do grupo quanto ao entendimento da participação destas moléculas na interação patógeno-hospedeiro, este trabalho foi desenvolvido visando ampliar o entendimento destes dados em relação ao *P. brasiliensis*. Nesse sentido, para este trabalho foi utilizada a linhagem de camundongo C57BL/6 que permite abordar as vias de ativação de miRNA, pela disponibilidade de linhagens nocautes para genes de interesse. A comparação dos níveis de expressão entre as linhagens do tipo selvagem com as nocaute para genes de PRRs nos possibilita ter um primeiro panorama sobre qual via de sinalização está envolvida na indução da expressão de genes de miRNAs em resposta à *P. brasiliensis*.

Diferentemente dos trabalhos prévios do grupo, neste trabalho foi utilizado RNA total como molde nas reações de transcrição reversa, como descrito a seguir.

Visando proceder com a análise sobre o acúmulo diferencial de miRNAs expressos em células infectadas por *P. brasiliensis*, foram cultivados macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e os mesmos foram infectados em uma proporção de 2:1 com leveduras de Pb18.

Após os tempos determinados de infecção, o RNA foi extraído como descrito na metodologia.

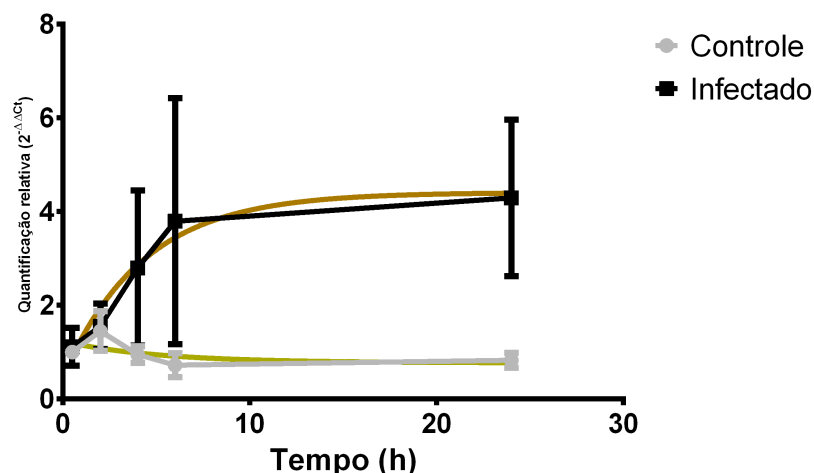
Foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Brometo de Etídio, para verificação da qualidade do RNA extraído (Figura 12).



**Figura 12 - Análise do RNA total extraído de macrófagos dos grupos controle e infectado com *P. brasiliensis* ao longo da cinética de infecção.** O RNA total foi analisado por eletroforese em gel de agarose, corado com Brometo de Etídio. Partes superior e inferior do gel de agarose referem-se, respectivamente ao RNA total de macrófagos do grupo controle (não infectado) e do infectado, respectivamente, nos tempos de 30', 2h, 4h, 6h e 24h de infecção.

Conforme mostrado na figura 13, ao longo da cinética de interação macrófago – *P. brasiliensis*, o acúmulo de miR155 foi observado principalmente a partir do tempo de 6 horas. Foi realizado teste de regressão não linear, comparando as curvas dos grupos controle e infectado utilizando os dados obtidos no tempo de 30 minutos do grupo controle como normalizador dos resultados mostrados na figura 12. Foi utilizado método de crescimento de Gompertz para análise das curvas, e foi observada rejeição da hipótese nula, sugerindo uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas dos grupos controle e infectado com valor de  $p=0,0293$ .

### miR155 Cinética de interação



**Figura 13 - Acúmulo de miR155 de macrófagos ao longo do tempo de interação com *P. brasiliensis*.** RNA total extraído de macrófagos nos diferentes tempos de infecção com *P. brasiliensis* foi empregado em experimentos de RT-qPCR com uso de sondas TaqMan®. Os dados são referentes a representativos de três experimentos independentes. Hipótese nula rejeitada com  $p=0,0293$ .

O acúmulo do miR155 ao longo do tempo pode ser interpretado por sua importância na regulação de diversos processos biológicos (Faraoni *et al.* 2009), como aqueles relacionados a diversos tipos de câncer (Al-Haidari *et al.*, 2018), e principalmente considerando que o mesmo também participa da regulação de processos relacionados à resposta imune (Pedersen e David, 2008; Xiaoyan *et al.*, 2016). O miR155 possui como alvos transcritos cujos produtos participam de vias relacionadas à inflamação, como FADD, IKK e RIP (Pedersen e David, 2008), como por exemplo descrito por Taganov *et al.* (2006) mostrando o aumento dos níveis deste miRNA em células THP-1 após estímulo com LPS. Este miRNA apresenta regulação positiva dependente de NF $\kappa$ B, um fator de transcrição associado à inflamação, em macrófagos murinos derivados de medula. Além disto, o miR155 também demonstra aumento de acúmulo em resposta a diferentes microrganismos, como mostrado por Schnitger *et al* (2011) em BMDMs da linhagem murina C57BL/6 em resposta a *Listeria monocytogenes*, em células RAW264.7 em resposta a *Mycobacterium tuberculosis* (Wang *et al.*, 2013), e em BMDMs da linhagem murina C57BL/6 em resposta a *Candida albicans* (Monk *et al.*, 2010; Agostinho *et al.*, 2017).

De acordo com Alexander *et al* (2015), os miR155 e miR146a podem ser transportados entre células dendríticas através de exossomos, os quais atuam tanto na regulação pós-transcricional na célula em que são produzidos, como também da célula receptora do exossomo. Numerosos dados da literatura descrevem evidências segundo as quais miRNAs transferidos entre células via exossomos desempenham importante papel funcional, provavelmente participando de uma rede de comunicação intercelular que contribui para coordenação da resposta imune em nível do organismo (revisado por Zhang *et al.*, 2018).

Em paradoxo, o miR155 exibe características tanto anti-inflamatórias inibindo fatores como MyD88 e IKK $\epsilon$ , quanto pró-inflamatórias inibindo fatores inibidores da via de sinalização TOLL como SHIP1 e SOCS1. Isto demonstra a complexidade do sistema de regulação por miRNAs, colocando em destaque a dificuldade de se elucidar os efeitos isolados destas moléculas no contexto do sistema biológico (Agostinho *et al.*, 2017).

Outra participação importante do miR155 na inflamação é sua indução responsiva a TGF- $\beta$  (Kong *et al.*, 2008), o qual por sua vez possui características predominantemente anti-inflamatórias (Ceppi *et al.*, 2009). Ainda de acordo com



Ceppi *et al.* (2009), o miR155 também possui papel importante no controle da resposta inflamatória de células dendríticas humanas em resposta a LPS. Além disto, o miR155 é capaz de estimular respostas Th1 e Th17 e ativação clássica de macrófagos após estímulo inflamatório (Croston *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos em nosso trabalho, demonstram o acúmulo nos níveis de miR155 ao longo das 24h de interação *ex-vivo* (Macrófago M2 x *P. brasiliensis*), sugerindo uma ação regulatória desse miRNA nesse modelo de estudo.

Considerando o papel global do miR155 em diversos processos biológicos normais e patológicos, sendo de interesse deste trabalho sua participação no controle da resposta imune inata e adaptativa, como amplamente descrito na literatura, podemos sugerir sua possível importância na regulação da resposta de macrófagos murinos à infecção por *P. brasiliensis*.

#### **4.6 – Níveis de acúmulo de miR146a, miR125b, miR132 e miR155-3p nos tempos de 6 h e 24 h de interação de macrófagos com *P. brasiliensis***

Com base nos dados vistos a partir da curva de infecção, decidimos utilizar apenas as amostras de 6 horas e de 24 horas para a análise de outros miRNAs de interesse.

Além da análise do miR155-5p (Figura 13), também foram analisados os níveis de miR155-3p nos tempos de 6 horas e de 24 horas de infecção. Além de ter um acúmulo aumentado no tempo de 6 horas de infecção, o miR155-3p demonstrou em 24 horas de infecção uma expressão ainda mais elevada do que a vista para miR155-5p (Figuras 14a/b).

Sabe-se que as alternâncias entre as duas fitas de miRNA maduro na incorporação no complexo RISC pode ocorrer em função do tipo celular e/ou condição analisada, sendo demonstrado que ambas as fitas do miR maduro podem ter função biológica na regulação da expressão gênica (Han e Kim, 2014). Na dissertação de de Marco Antônio de Oliveira (Oliveira, 2016) empregando o modelo murino de camundongos A/J, foi observado tanto um maior acúmulo relativo do miR155-3p, como também o aumento pronunciado da razão entre os níveis das duas fitas maduras (miR155-3p/miR155-5p) em resposta à infecção por *P. brasiliensis*. No trabalho atual, não foi possível determinar essa razão pelo uso de diferentes quantidades de RNA na análise dos níveis das duas fitas do miR155,

como descrito no ítem 3.10 da metodologia. Novas análises são necessárias para o entendimento do possível papel funcional das duas fitas desse importante miRNA na resposta imune de macrófagos à infecção por *P. brasiliensis*.

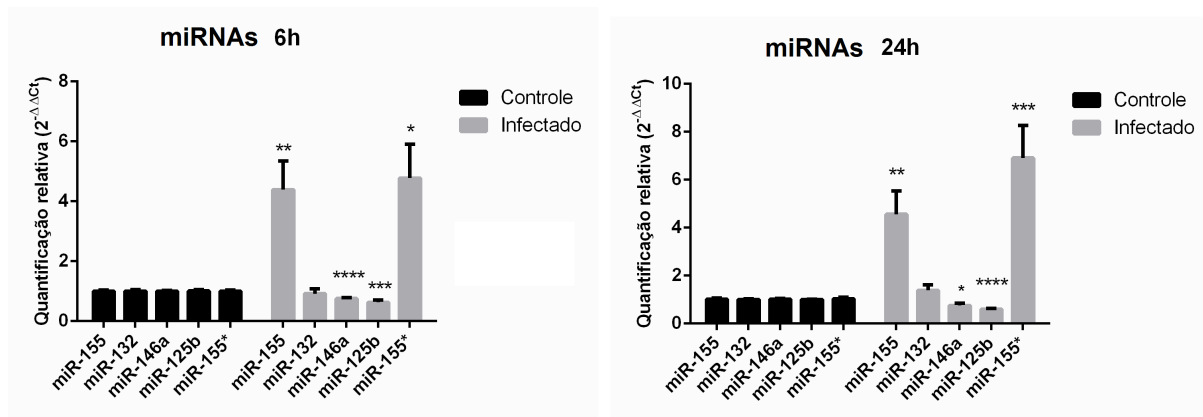
Outros miRNAs de interesse quando se trata de infecção e resposta imune inata foram analisados neste trabalho. A seguir apresentamos os resultados desse trabalho e o descrito na literatura para estes miRNAs em diferentes modelos experimentais.

Dentre os miRNAs deste estudo está o miR132, que foi demonstrado juntamente ao miR155 com padrão elevado em células THP-1 em resposta a LPS no trabalho publicado por Taganov *et al* (2006). miR132 também participa da regulação de componentes da via de sinalização TOLL2 como o IRAK4 além de demonstrar um aumento de acúmulo em monócitos e células dendríticas em resposta à infecção por *Aspergillus fumigatus* (Croston *et al.*, 2018), e de acordo com Agostinho *et al* (2017), mostrou acúmulo elevado em macrófagos murinos após infecção por *Candida albicans*. Entretanto, em nossos resultados o miR132 não mostrou diferença de acúmulo quando comparados os dados de controle e infectado tanto no tempo de 6 horas (Figura 14a) quanto no tempo de 24 horas de infecção (Figura 14b), demonstrando a dificuldade de análises comparativas entre diferentes dados obtidos com diferentes modelos e diferentes metodologias.

O miR146a foi outro miRNA analisado por nosso grupo como potencial regulador na resposta imune inata, e este mostrou-se diminuído no grupo infectado tanto no tempo de 6 horas de infecção quanto no tempo de 24 horas (Figura 14a/b). Estes dados divergem daqueles descritos na literatura, quando se trata de resposta imune, pois Taganov *et al* (2006) mostrou que o miR146a tem seu acúmulo aumentado em células THP-1 em resposta a LPS. De acordo com Agostinho *et al.* (2017), o miR146a também mostrou-se positivamente regulado em macrófagos murinos em resposta à infecção por *Candida albicans*. O miR146a é também descrito por regular negativamente a produção de citocinas, e inibir a resposta Th1 (Croston *et al.*, 2018). Este miRNA regula negativamente a expressão de IRAK1, IRAK2 e TRAF6, que são componentes importantes da via de sinalização mediada por receptores da família TOLL (O'Connell *et al.*, 2010).

Assim como o miR146a, o miR125b também mostrou acúmulo diminuído no grupo infectado tanto no tempo de 6 horas quanto no tempo de 24 horas (Figura 14a/b). Tal comportamento já foi visto em macrófagos RAW264.7 frente a um

estímulo por LPS (Tili *et al.*, 2007). Entretanto, quando frente à infecção por hifas de *C. albicans* o miR125b mostrou-se regulado positivamente (Agustinho *et al.*, 2017). De acordo com Lee *et al.* (2016), o miR125b pode ser responsável por regular a diferenciação de macrófagos assim como processos inflamatórios, sendo capaz de inibir a resposta imune inata de macrófagos suprimindo as atividades fagocíticas e bactericidas destes macrófagos. Além disto, estes autores também mostram que este miRNA é modulado pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B, e regula negativamente a produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , desta maneira regulando negativamente a resposta inflamatória.



**Figura 14 - Acúmulo de microRNAs potencialmente importantes na resposta imune inata contra patógenos.** Quantificação feita por RT-qPCR utilizando sondas TaqMan. **a.** e **b.** Quantificação relativa (Fold Change) dos miRNAs miR155, miR132, miR146a, miR125b e miR155\* nos tempos de 6 e 24 horas de infecção, respectivamente. Os valores de  $p$  considerados foram  $p < 0,05$ . Significância: \*  $< 0,0197$ ; \*\*  $< 0,0078$ ; \*\*\*  $< 0,0005$ ; \*\*\*\*  $< 0,0001$ .

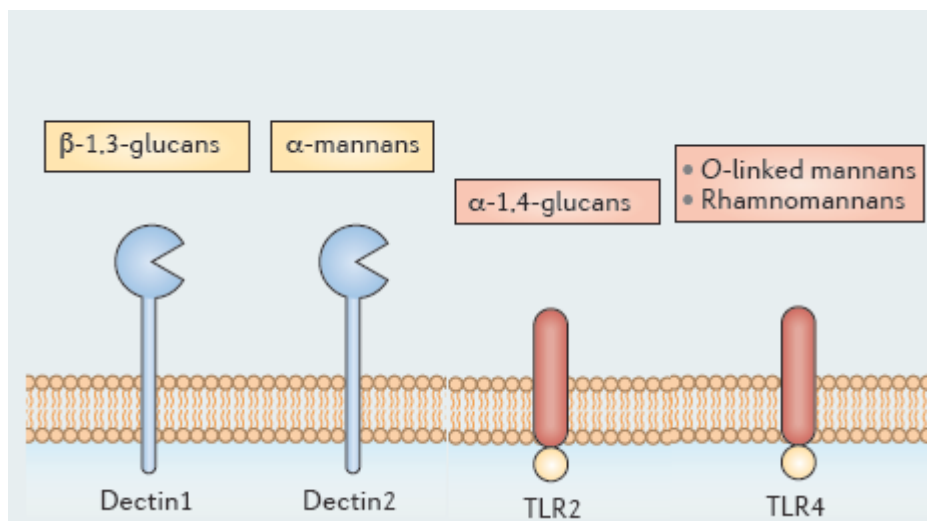
Os resultados mostrados aqui também contrastam com o que foi observado em trabalho prévio de nosso grupo, obtidos por Marco Antônio de Oliveira. Tais dados mostram um aumento de acúmulo dos miRNAs miR132, miR146a e miR125b em macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A (Oliveira, 2016). Entretanto, como descrito anteriormente, vale ressaltar que o modelo deste trabalho utiliza a linhagem murina C57BL/6, uma linhagem de resistência intermediária à paracoccidiodomicose (Arruda *et al.*, 2004), e que tais aparentes divergências poderiam ser explicadas por um comportamento diferente desta linhagem em resposta ao fungo. Além disto, no trabalho anterior foram utilizados macrófagos peritoneais, que possuem uma característica de ativação e diferenciação extremamente diferente daquela vista em macrófagos primários diferenciados *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos.

Também é importante notar a diferença metodológica entre estes dois trabalhos de nosso grupo, visto que o modelo deste trabalho utiliza RNA total para as análises, enquanto no modelo anterior foi utilizado uma fração enriquecida com pequenos RNAs. Foi mostrado por Redshaw *et al* (2013) que o método de extração utilizado pode interferir diretamente nas análises de microRNAs a partir das amostras obtidas, e que não é possível comparar diretamente os dados obtidos com tais diferentes amostras de RNA.

A observação da diminuição do acúmulo de miR146a e de miR125b, ambos reguladores negativos da resposta inflamatória e do aumento de acúmulo de miR155, regulador de reguladores negativos da mesma resposta inflamatória, possibilita a associação dos dados a um perfil de indução de resposta inflamatória no modelo estudado. Considerando que o miR155 está associado à produção de  $TNF\alpha$ , importante no desenvolvimento da resposta imune, e que o miR125b que é regulador negativo dos transcritos desta molécula encontra-se negativamente modulado neste modelo, estes dados fortalece a hipótese de perfil pró-inflamatório no modelo estudado em resposta a *P. brasiliensis*.

#### **4.7 – Vias de ativação do miR155**

Visando avaliar a via de sinalização envolvida na ativação da expressão do miR155, foram utilizados camundongos nocautes para quatro genes que codificam PRRs relacionados à resposta imune. A partir da escolha de quatro receptores previamente descritos como importantes receptores na resposta imune contra *P. brasiliensis*, a figura 15 apresenta os receptores escolhidos, assim como suas funções no reconhecimento de diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs).



**Figura 15 – Funções dos PRRs no reconhecimento de PAMPs.** Dectina 1 é responsável pelo reconhecimento de  $\beta$ -1,3-glucanas, enquanto Dectina 2 é capaz de reconhecer  $\alpha$ -mananas. Toll-Like Receptor 2 é capaz de reconhecer  $\alpha$ -1,4-glucanas, enquanto Toll-Like Receptor 4 reconhece O-Linked mananas e Rhamnomannans (Adaptado de Erwig e Gow, 2016).

Dectina-1 é um importante PRR na resposta imune e reconhecimento de patógenos, e já foi descrito como importante receptor na resposta imune a *P. brasiliensis* principalmente relacionado à fagocitose deste patógeno (Thind *et al.*, 2015). De acordo com Bachiega *et al.* (2015), Dectina-1 é responsável por ativar a liberação de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) por neutrófilos em resposta à infecção por *P. brasiliensis*. As NETs são armadilhas extracelulares criadas pelos neutrófilos a partir da liberação de seu material intracelular para o meio extracelular como histonas, DNA e elastase, com intenção de prender os patógenos nestas armadilhas. Entretanto, em nosso trabalho o uso da linhagem nocaute para esse gene parece não interferir na ativação do miR155 quando comparado com os resultados obtidos com a linhagem do tipo selvagem, sugerindo que este receptor parece não apresentar influência no processo de ativação deste miRNA (Figura 16a).

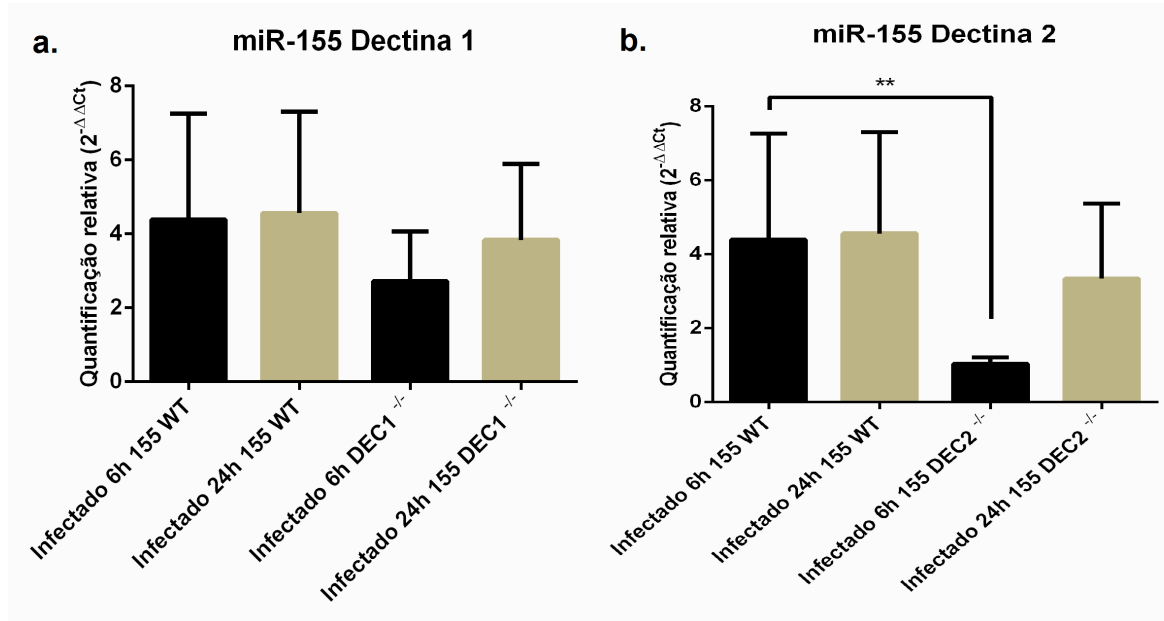
É sabido que o receptor Dectina-1 é responsável principalmente pelo reconhecimento de  $\beta$ -Glucanas (Erwig e Gow, 2016), e que as  $\beta$ -Glucanas são encontradas principalmente na fase de micélio do *P. brasiliensis* enquanto na fase de levedura são encontradas principalmente  $\alpha$ -Glucanas (Almeida *et al.*, 2013). Segundo Puccia *et al.* (2011), O recobrimento da parede do fungo por  $\alpha$ -Glucanas ajuda a proteger o fungo contra o reconhecimento por Dectina-1. Portanto, considerando o uso de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* nos experimentos

realizados no presente trabalho, entende-se uma menor participação deste receptor nos processos em geral e uma não participação do mesmo na ativação de miR-155.

De acordo com Cardoso-Miguel *et al.* (2017), o receptor Dectina 2 também possui uma função importante na resposta imune a *P. brasiliensis*. Estes autores demonstram que macrófagos deficientes para este receptor produzem uma menor quantidade de TNF- $\alpha$  e de IL-6 em resposta à infecção por *P. brasiliensis*, enquanto células dendríticas produzem menores quantidades de TNF- $\alpha$ , IL6, IL10 e IL-1 $\beta$ . Com base nestes dados, foi analisado o acúmulo de miR155 nas células provenientes de linhagem nocaute para este receptor.

Não foi observado aumento no acúmulo do miR155 no tempo de 6 horas de infecção de células deficientes para o receptor Dectina-2. Quando comparados os grupos infectados de células selvagens e de células mutantes, houve diferença significativa entre estes grupos, o que significa que o acúmulo deste miRNA neste tempo foi significativamente diminuído em comparação com o acúmulo em células selvagens infectadas. Entretanto, no tempo de 24 horas de infecção, nota-se um aumento de acúmulo de miR155 nas células deficientes para Dectina 2, com uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo infectado (Figura 16b). Estes dados sugerem uma participação do receptor Dectina 2 na ativação do miR155 apenas no tempo de 6 horas de infecção, e, com base nos dados observados em células nocaute para TLR2, poderia ser sugerida uma possível participação cooperativa entre estes receptores na ativação deste miRNA por *P. brasiliensis*. Entretanto, evidências experimentais diretas são necessárias para abordar esta questão.

Dectina-2 é um receptor responsável pelo reconhecimento principalmente de  $\alpha$ -mananas (Erwig e Gow, 2016), e de acordo com o que foi mostrado por Ferreira *et al* (2004) os receptores de manose são importantes no reconhecimento e fagocitose de *P. brasiliensis*, o que pode explicar a importância deste receptor também na ativação do miR155.



**Figura 16 - Acúmulo de miR155 nos tempos de 6 horas e 24 horas de interação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute (KO) para os receptores Dectina-1 e Dectina-2 com *P. brasiliensis*.** Dados referentes a RT-qPCR utilizando sondas TaqMan. Eixo Y referente ao Fold Change. **a e b.** Expressão do miR155 nos tempos de 6 horas e 24 horas de infecção comparando a expressão deste miRNA em células de camundongo selvagem, e em células de camundongo nocaute para o genes que codificam os receptores Dectina 1 e Dectina 2, respectivamente. O teste estatístico realizado foi Teste *t*, e o valor considerado para significância foi de  $p < 0,05$ . Foi realizado teste *t* entre o grupo controle e infectado para cada tempo separadamente.

Além do receptor Dectina-1, também é descrito participação dos receptores do tipo TOLL no reconhecimento do *P. brasiliensis*, dentre eles o TLR2 e o TLR4 (Loures *et al.*, 2015).

Sabe-se que os TLRs podem modular a expressão de genes de miRNAs, tanto induzindo como reprimindo sua expressão. Sabe-se por exemplo, que o miR155 pode sofrer regulação negativa em resposta à sinalização por IL-10 e os receptores TOLL podem estar envolvidos neste processo (O'Neil *et al.*, 2011). O fungo *P. brasiliensis* induz a produção de IL-10 em células dendríticas de camundongos suscetíveis à PCM, a partir da sinalização mediada principalmente através de receptores como TLR2 e Dectina-1 (Thind *et al.*, 2015). Foi avaliado o acúmulo de miR155 nas células deficientes para o receptor TLR2. O que foi visto foi que ainda há um maior acúmulo deste miRNA no tempo de 6 horas de infecção ( $p=0,0221$ ). Quando comparamos o acúmulo relativo deste miRNA entre o grupo infectado de células selvagens e o grupo infectado da linhagem deficiente em TLR2, percebemos uma diminuição significativa no acúmulo de miR155 comparado às células de linhagem selvagem. Entretanto, esta regulação só é observada para o tempo inicial de interação macrófago-fungo, uma vez que não foi obtida diferença significativa no

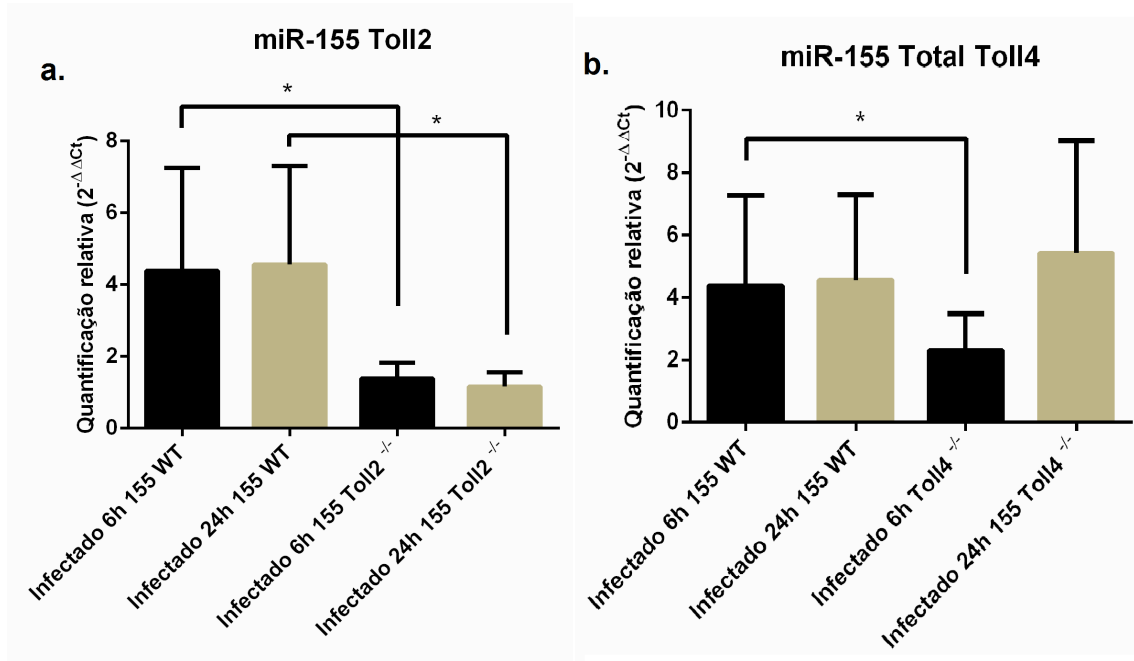
tempo de 24 horas de infecção (Figura 17a). Estes dados indicam que este receptor pode ter um papel fundamental na ativação deste miRNA, no tempo inicial de infecção, e baseado nos dados vistos para o mutante de Dectina 2, podemos sugerir que estes receptores possam cooperar para uma regulação deste miRNA.

Considerando a capacidade de TLR2 no reconhecimento de  $\alpha$ -Glucanas (Erwig e Gow, 2016), um dos principais componentes da parede celular de *P. brasiliensis* em sua forma leveduriforme (Tomazett *et al.*, 2005), pode-se correlacionar a importância deste receptor na ativação de miR155 com o tipo de estrutura que este receptor reconhece e a forma celular fúngica utilizada nos experimentos realizados neste trabalho.

O TLR 4 foi outro receptor da classe dos “Toll Like” analisado. Este receptor é ativado pela Paracoccina, uma proteína presente no *P. brasiliensis* e é capaz de estimular produção de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Freitas *et al.*, 2016). Além disto, o TLR4 possui uma participação importante no processo de indução da proliferação de células Th17/Tc17 em resposta a *P. brasiliensis* (Loures *et al.*, 2015). O acúmulo de miR155 nas células mutantes para este receptor mostrou uma diferença estatisticamente significativa no grupo de células deficientes para este receptor no tempo de 6 horas de infecção, agindo na diminuição da indução de miR155 numa fase mais inicial da infecção, e sem diferença significativa para o tempo de 24 horas de infecção (Figura 17b). Assim, nossos dados sugerem a participação desta via de sinalização na ativação deste miRNA.

Assim como Dectina-2, TLR 4 é um receptor de manose, neste caso relacionado ao reconhecimento de “rhamnomannans” e de “O-Linked”-mananas (Erwig e Gow, 2016). O que pode explicar a participação deste receptor na ativação deste miRNA visto a importância dos receptores de manose no reconhecimento e fagocitose de *P. brasiliensis* (Ferreira *et al.*, 2004)





**Figure 17 - Acúmulo de miR155 nos tempos de 6 horas e 24 horas de interação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute (KO) para os receptores TLR2 e TLR4 com *P. brasiliensis*.** Dados referentes a RT-qPCR utilizando sondas TaqMan. Eixo Y referente ao Fold Change. **a** e **b**. Expressão do miR155 nos tempos de 6 horas e 24 horas de infecção comparando a expressão deste miRNA em células de camundongo selvagem, e em células de camundongos nocaute para os genes que conferem a produção dos receptores TLR2 e TLR4, respectivamente. O teste estatístico realizado foi Teste *t*, e o valor considerado para significância foi de  $P < 0,05$ . Foi realizado teste *t* entre o grupo controle e infectado para cada tempo separadamente. Foram feitas comparações entre os grupos infectados das células selvagens e das células nocaute.

#### 4.8 – Análise de mRNAs de PRRs e de alvos dos miRNAs analisados

Visando melhor entender o comportamento regulatório destes miRNAs, também decidimos avaliar os níveis de transcritos de mRNAs alvos dos miRNAs avaliados neste estudo. Além disto, decidimos avaliar a expressão de mRNAs dos receptores de reconhecimento padrão relacionados à resposta imune e reconhecimento de *P. brasiliensis*.

Entretanto, ao dar início a tais experimentos observamos uma quantidade insuficiente de material afim de realizar o tratamento do RNA com DNaseI, uma vez que vários de nosso primers não foram desenhados considerando regiões de junções exon-exon que em princípio permitiria o uso de RNA sem tal tratamento prévio. A título de exemplo, foi realizada uma qPCR a partir do RNA total extraído das infecções, sem proceder com a reação de RT para síntese de cDNA, e foi verificado amplificação para o gene endógeno RPS9, a ser usado nas normalizações dos dados.

Portanto, é necessário o desenho de novos primers baseados em regiões das junções éxon-éxon para todos os genes a serem analisados, incluindo os genes de referência (controle constitutivo) e/ou, a repetição de outros experimentos de infecção visando a obtenção de uma quantidade de RNA total suficiente para o tratamento com DNaseI.

## 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma recente revisão da literatura, Croston *et al* (2018) debatem sobre a regulação de miRNAs na resposta imune do hospedeiro após infecção fúngica. Croston *et al* (2018) ressaltam que a expressão diferencial de miRNAs em diferentes modelos de estudo de inflamação aponta para um conjunto comum de miRNAs, cuja expressão é modulada diferencialmente em modelos de infecção fúngica. Esses autores, destacam o miR155 por sua participação na regulação de processos imunes, contribuindo em diferentes modelos fúngicos para o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 e Th17, que constitui em um fenótipo protetor na resposta à *P. brasiliensis* (Feriotti *et al.*, 2013). Outro miRNA também identificado como possivelmente comum à resposta a fungos é o miR146a atuando pela diminuição da resposta Th1, empregando um mecanismo contrário ao descrito para miR155 (Croston *et al.*, 2018). Considerando que os níveis de miR155 estão aumentados e miR146a diminuídos na resposta de macrófagos a *P. brasiliensis*, os resultados obtidos nessa dissertação corroboram com os descritos na literatura. Nossos dados também corroboram sobre a importância desses dois miRNAs no controle da resposta imune inata a *P. brasiliensis*.

O aumento no acúmulo de miR155 a partir de 6 horas de infecção sugere que este miRNA pode estar relacionado à regulação fina de fatores relacionados à resposta imune contra *P. brasiliensis*.

O aumento no acúmulo de miR155 juntamente com a diminuição de acúmulo de miR146a e miR125b, confere um perfil de regulação pró-inflamatório para o modelo, pois miR146a e miR125b são conhecidos por regular negativamente fatores importantes de vias inflamatórias, enquanto miR155 é conhecido por modular negativamente reguladores negativos da inflamação, levando a uma indução da resposta pró-inflamatória.

Ainda são necessários testes com os alvos destes miRNAs com objetivo de melhor entender o comportamento destes alvos e a atividade destes miRNAs no contexto geral regulatório dentro deste modelo de estudo.

Os dados obtidos a partir de experimentos com camundongos nocaute para os receptores de reconhecimento padrão dão indícios de que TLR2 e Dectina-2 possam participar significativamente e de forma cooperativa na ativação do miR155, enquanto TLR4 parece também ter uma importante participação neste processo.

O modelo apresentado pela figura 17 relaciona a ativação do miR155 pelos receptores analisados no presente trabalho, e relaciona o aumento de acúmulo de miR155 e a diminuição de acúmulo de miR146a e miR125b com o desenvolvimento de um perfil pró-inflamatório de macrófagos M2 de camungongos C57BL/6 em resposta à infecção por células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Com base na importância que os miRNAs têm mostrado na regulação de diversos processos biológicos, e na possível ligação dos miRNAs avaliados neste trabalho com a resposta imune, este trabalho traz novas percepções sobre o comportamento destes miRNAs em resposta ao *P. brasiliensis*, visto que pouco se sabe em relação à regulação por miRNAs em resposta a este organismo.

Estudos adicionais são necessários para possibilitar um melhor entendimento do comportamento destes miRNAs, assim como sua função no contexto geral da resposta a *P. brasiliensis*.

Com base nos resultados e considerações apresentadas nessa dissertação, as principais perspectivas futuras para continuação deste trabalho são:

- Realizar a dosagem de citocinas com o objetivo de melhor avaliar e acompanhar o curso da infecção.

- Desenhar primers projetados às regiões de junção éxon-éxon para prosseguir com análise de expressão dos mRNAs de interesse.

- Avaliar os níveis dos mRNAs de citocinas importantes para a resposta imune.

- Avaliar os níveis de mRNAs de alguns alvos dos miRNAs para tentar validar a relação inversa descrita para miRNAs e seus alvos.

- Avaliar os níveis de mRNAs de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para tentar entender melhor a complexidade da via de ativação do miR155 e possivelmente de outros miRNAs de interesse na resposta imune a fungos.

- Estudo com antagonistas destes miRNAs para melhor entender a complexa relação entre um miRNA e seus alvos, como amplamente discutido na literatura.

## 6 - REFERÊNCIAS

AGUSTINHO, D. P. *et al.* Dectin-1 is required for miR155 upregulation in murine macrophages in response to *Candida albicans*. **Virulence**, v. 8, n. 1, p. 41-52, 2017.

ALEXANDER, M. *et al.* Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. **Nature communications**, v. 6, p. 7321, 2015.

AL-HAIDARI, A. *et al.* MiR-155-5p controls colon cancer cell migration via post-transcriptional regulation of Human Antigen R (HuR). **Cancer Letters**, 2018.

ALMEIDA, F. B. D. R. *et al.*  $\alpha$ -(1, 4)-Amylase, but not  $\alpha$ - and  $\beta$ -(1, 3)-glucanases, may be responsible for the impaired growth and morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis* induced by N-glycosylation inhibition. **Yeast (Chichester, England)**, v. 31, n. 1, p. 1, 2014.

AMARAL, P. P. *et al.* The eukaryotic genome as an RNA machine. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1787-1789, 2008.

ARISTIZABAL, B. H. *et al.* Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.

ARRUDA, C. *et al.* Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infection and immunity**, v. 72, n. 7, p. 3932-3940, 2004.

BACHIEGA, T. F. *et al.* Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 228-235, 2016.

BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008.

BALA, S. *et al.* Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1436-1444, 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BASYUK, E. *et al.* Human *let-7* stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 22, p. 6593-6597, 2003.

BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. **Journal of cellular physiology**, v. 218, n. 3, p. 467-472, 2009.

BOCCA, A. L. *et al.* Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, 1998.

BOCCA, A. L. *et al.* Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177-1191, 2013.

CALICH, V. L. G. *et al.* Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 5, p. 585, 1985.

CALICH, V. L. G. *et al.* Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-236, 2008.

CANO, L. E. *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CANO, L. E. *et al.* Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CARBONELL, L. M. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of bacteriology**, v. 100, n. 2, p. 1076-1082, 1969.

CARDOSO-MIGUEL, M.R.D. *et al.* Dectinas 2 e 3 Desempenham Diferentes papéis, in vitro, na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Patol Trop*, v. 46 (supl.1):6. 2017.

CEPPI, M. *et al.* MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2735-2740, 2009.

CHEKULAEVA, M.; FILIPOWICZ, W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 3, p. 452-460, 2009.

CHENDRIMADA, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 740, 2005.

CHENG, J *et al.* Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. **Science**, v. 308, n. 5725, p. 1149-1154, 2005.

CHIANG, H. R. *et al.* Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. **Genes & development**, v. 24, n. 10, p. 992-1009, 2010.

COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

CROSTON, T. L. *et al.* MicroRNA regulation of host immune responses following fungal exposure. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 170, 2018.

DA SILVA, M. B. *et al.* Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 1, p. 197-205, 2006.

DE SOUZA SILVA, C. *et al.* The effects of *Paracoccidioides brasiliensis* infection on GM-CSF-and M-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophage from resistant and susceptible mice strains. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

DREWRY, M. *et al.* miRNA profile in three different normal human ocular tissues by miRNA-Seq. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 57, n. 8, p. 3731-3739, 2016.

ENCODE PROJECT CONSORTIUM. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 799, 2007.

ENGELS, B. M.; HUTVAGNER, G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. **Oncogene**, v. 25, n. 46, p. 6163, 2006.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163, 2016.

EULALIO, A. *et al.* Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. **Rna**, v. 15, n. 1, p. 21-32, 2009.

FARAONI, I. *et al.* miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 6, p. 497-505, 2009.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 351-379, 2010.

FERIOTTI, C. *et al.* Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54845, 2013.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology letters**, v. 94, n. 1-2, p. 107-114, 2004.

FRANCO, M. *et al.* Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Current topics in medical mycology**, v. 5, p. 115, 1993.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.

FREITAS, M. S. *et al.* Paracoccin induces M1 polarization of macrophages via interaction with TLR4. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1003, 2016.

FRIEDMAN, R. C. *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, v. 19, n. 1, p. 92-105, 2009.

GONZALEZ, A. *et al.* Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. **Infection and immunity**, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, 2000.

GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* MicroRNA evolution by arm switching. **EMBO reports**, v. 12, n. 2, p. 172-177, 2011.

GUO, Y. *et al.* A comparison of microRNA sequencing reproducibility and noise reduction using mirVana and TRIzol isolation methods. **International journal of computational biology and drug design**, v. 7, n. 2-3, p. 102-112, 2014.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509, 2014.

HEBELER-BARBOSA, F.; MONTENEGRO, M. R.; BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Medical mycology**, v. 41, n. 2, p. 89-96, 2003.

HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J. *et al.* Fungal strategies to evade the host immune recognition. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 51, 2017.

HOU, J. *et al.* MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2150-2158, 2009.

IWAKAWA, H.; TOMARI, Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 11, p. 651-665, 2015.

KANETSUNA, F. *et al.* Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1036-1041, 1969.

KASHINO, S. S. *et al.* Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 130, n. 3, p. 131-140, 1995.

KASHINO, S. S. *et al.* In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, n. 3, p. 173-178, 1985.

KERR, I. B. *et al.* Paracoccidioidomycosis in silica-treated rats. **Immunology letters**, v. 7, n. 3, p. 129-133, 1983.



KETTING, R. F. *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes & development**, v. 15, n. 20, p. 2654-2659, 2001.

KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 209-216, 2003.

KONG, H. *et al.* The effect of miR-132, miR-146a, and miR-155 on MRP8/TLR4-induced astrocyte-related inflammation. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 57, n. 1, p. 28-37, 2015.

KONG, W. *et al.* MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor  $\beta$ /Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 22, p. 6773-6784, 2008.

KONG, Y.; HAN, J. MicroRNA: biological and computational perspective. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 3, n. 2, p. 62-72, 2005.

KUROKAWA, C. S. *et al.* Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 257-262, 2005.

LEE, H.; KIM, T. S.; JO, E. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. **BMB reports**, v. 49, n. 6, p. 311, 2016.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, Y. *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **The EMBO journal**, v. 21, n. 17, p. 4663-4670, 2002.

LEE, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415, 2003.

LEWIS, B. P. *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-798, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>  $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOURES, F. V. *et al.* TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 261, 2015.

LU, L. *et al.* Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 80-91, 2009.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MCEWEN, J. G. *et al.* In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of medical research**, v. 26, n. 3, p. 305-306, 1995.

MELLO, F. *et al.* Growth curve by Gompertz nonlinear regression model in female and males in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 4, p. 2309-2315, 2015.

MENDES, R. P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The open microbiology journal**, v. 11, p. 224, 2017.

MONK, C. E.; HUTVAGNER, G.; ARTHUR, J. S. C. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13669, 2010.

MYCKO, M. P. *et al.* miR-155-3p drives the development of autoimmune demyelination by regulation of heat shock protein 40. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16504-16515, 2015.

NAHID, M. A. *et al.* Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1250-1263, 2013.

O'CONNELL, R. M. *et al.* Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 111, 2010.

O'CONNELL, R. M. *et al.* Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 17, p. 7113-7118, 2009.

OLIVEIRA, M. A. Estudo da participação de microRNAs na regulação da resposta imune inata de macrófagos murinos à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. 2016. 74 f., il. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Molecular) -Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

O'NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 163, 2011.

OKAMURA, K. *et al.* The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, n. 4, p. 354, 2008.

PATIÑO, M. M.; BURGOS, L. C.; RESTREPO, A. Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 22, n. 6, p. 509-511, 1984.

PEDERSEN, I.; DAVID, M. MicroRNAs in the immune response. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 391-394, 2008.

PERRY, M. M. *et al.* Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5689-5698, 2008.

PIMENTEL, F. *et al.* Technology in microRNA profiling: circulating microRNAs as noninvasive cancer biomarkers in breast cancer. **Journal of laboratory automation**, v. 20, n. 5, p. 574-588, 2015.

PINA, A. *et al.* Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 5, p. 1088, 2008.

PODOLSKA, A. *et al.* How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 4, 2011.

PUCCIA, R. *et al.* The *Paracoccidioides* cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 257, 2011.

REDSHAW, N. *et al.* A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability. **Biotechniques**, v. 54, n. 3, p. 155-64, 2013.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?. **Medical mycology**, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RO, S. *et al.* Tissue-dependent paired expression of miRNAs. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 17, p. 5944-5953, 2007.

RODRIGUEZ, A. *et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome research**, v. 14, n. 10a, p. 1902-1910, 2004.

RODRIGUEZ, A. *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 608-611, 2007.

ROM, S. *et al.* CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 7, p. 2292-2300, 2010.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical mycology**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: Cell wall structure and virulence. **Mycopathologia**, v. 62, n. 2, p. 77-86, 1977.

SANTOS, W. A. *et al.* Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 19, n. 1, p. 245-253, 2003.

SCHNITGER, A. K. D. *et al.* *Listeria monocytogenes* infection in macrophages induces vacuolar-dependent host miRNA response. **PLoS one**, v. 6, n. 11, p. e27435, 2011.

SCHWARZ, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, 2003.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, M. B. *et al.* Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 644-648, 2009.

SOUTO, J. T. *et al.* Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000.

SVOBODA, P. A toolbox for miRNA analysis. **FEBS letters**, v. 589, n. 14, p. 1694-1701, 2015.

TAGANOV, K. D. *et al.* NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12481-12486, 2006.

TERÇARIOLI, G. R. *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC microbiology**, v. 7, n. 1, p. 92, 2007.

THIND, S. K.; TABORDA, C. P.; NOSANCHUK, J. D. Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424-432, 2015.

TILI, E. *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5082-5089, 2007.

TOMAZETT, P. K. *et al.* The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 2, p. 309-325, 2005.

WANG, J. *et al.* MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003697, 2013.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-862, 1993.

XIAOYAN, W. *et al.* MicroRNA-155: a novel armamentarium against inflammatory diseases. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 708-716, 2017.

YANG, J. *et al.* Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. **Rna**, v. 17, n. 2, p. 312-326, 2011.

ZHAI, A. *et al.* Borna disease virus encoded phosphoprotein inhibits host innate immunity by regulating miR-155. **Antiviral research**, v. 98, n. 1, p. 66-75, 2013.

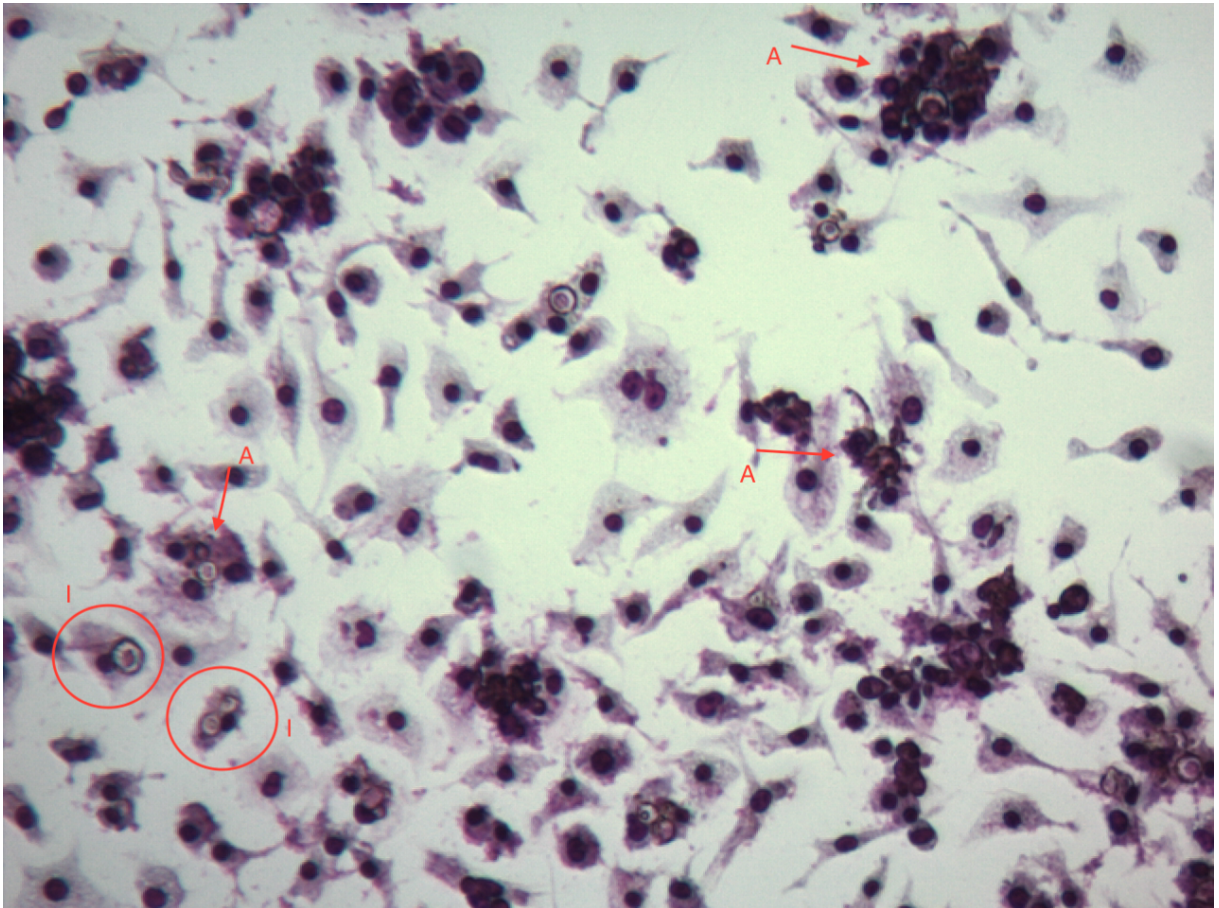
ZHANG, H.; SHYKIND, B.; SUN, T. Approaches to manipulating microRNAs in neurogenesis. **Frontiers in neuroscience**, v. 6, p. 196, 2013.

ZHANG, W. *et al.* Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 90, 2018.

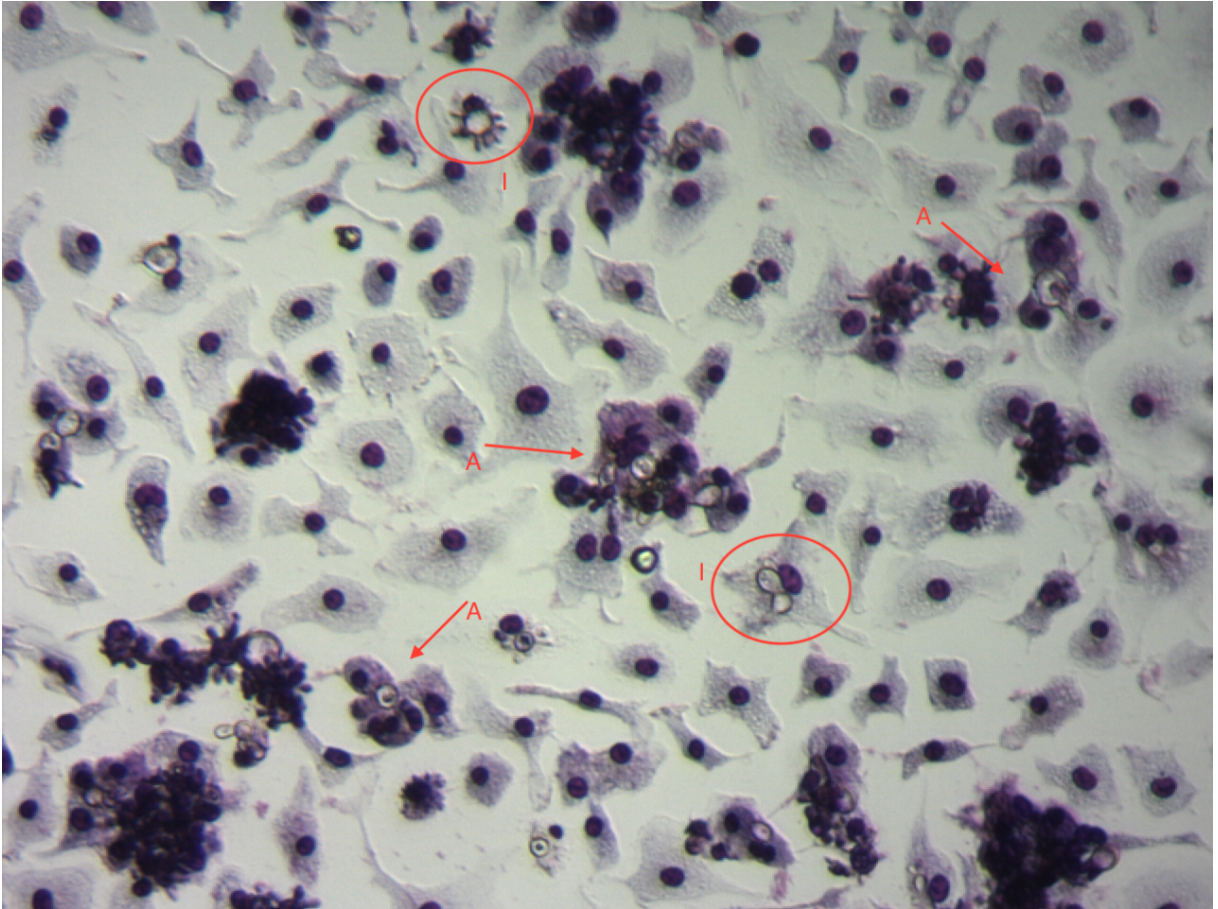
ZHOU, H. *et al.* miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. **Blood**, v. 116, n. 26, p. 5885-5894, 2010.

## APÊNDICE

Figuras de microscopia de macrófagos após infecção por *P. brasiliensis*.



**Figure 18 - Microscopia óptica de macrófagos após 6 horas de infecção por Pb18.** Células coradas conforme descrito na metodologia. Nesta imagem é possível notar sítios aglomeração de 2 ou mais macrófagos envolvidos por 1 ou mais leveduras de Pb18 (mostrados pela seta, marcados com a letra "A"). Em alguns sítios é visível a provável internalização de leveduras, mesmo que com este experimento não seja possível afirmar que as mesmas estão de fato internalizadas (mostrados pelos círculos, e marcados com a letra "I").



**Figure 19 - Microscopia óptica de macrófagos após 24 horas de infecção por Pb18.** Células coradas conforme descrito na metodologia. Nesta imagem também é possível notar sítios com 2 ou mais macrófagos envolvidos por 1 ou mais leveduras de Pb18 (mostrados pela seta, marcados com a letra "A"). Em alguns sítios é visível a provável internalização de leveduras, mesmo que com este experimento não seja possível afirmar que as mesmas estão de fato internalizadas (mostrados pelos círculos, e marcados com a letra "I").