



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Estudo da participação de microRNAs na regulação da
resposta imune inata de macrófagos murinos à
infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***

Marco Antônio de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

Brasília

2016

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

**Estudo da participação de microRNAs na regulação da resposta imune inata de
macrófagos murinos à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Molecular
do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Molecular.**

Aluno: Marco Antônio de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra Ildinete Silva Pereira

Coorientadora: Dra Lorena da Silveira Derengowski

Brasília

2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha família pelo carinho e apoio ao longo de todos esses anos. Em especial aos meus pais, Mauro e Marísia, que além de todo o amor e apoio logístico (principalmente minha mãe – te dou trabalho, hein?), sempre valorizaram e priorizaram minha educação. Sem eles não teria chegado até aqui.

À Ildinete, minha orientadora, sempre nos ensinando a ver além dos simples dados – função essencial a um pesquisador – e inspirando a levar a vida de um jeito leve e com bom humor.

À Lorena, minha coorientadora, por me ensinar desde o início e sempre estimular seus alunos a serem intelectual e tecnicamente independentes. Aspectos cruciais ao meu amadurecimento científico ao longo desses anos de laboratório.

A todos os membros do LabMOA pela ajuda sempre que necessário e pela descontração sempre bem vinda. Em especial, um muito obrigado à Nathália, Fabiana, Daniel, Calliandra e Patrícia, colegas de trabalho e amigos queridos.

À Fernanda, que apesar de se enquadrar no grupo de “colegas de trabalho e amigos queridos” merece um parágrafo especial por aguentar minhas aleatoriedades e compartilhar o veneno e pelos conselhos científicos também. Ô dupla...

À Samia, melhor parceira de trabalho e da vida. Os Fluxos da Alegria definitivamente faziam a diferença nos dias de trabalho. Não é à toa que *S&M* é a melhor sigla para etiquetar tubos!

Aos professores do Laboratório de Imunologia Aplicada Aldo e Anamélia por disponibilizarem seu espaço para realização de alguns ensaios, sempre me recebendo bem e dando contribuições importantes para o desenvolvimento e interpretação do trabalho. Agradeço também à professora Cynthia, um dos meus principais referenciais de ser humano, pelo carinho e por sempre me receber tão bem.

À Paris, *in memoriam*, sempre muito transparente e cheia de conteúdo.

À dona Fátima, dona Ivanildes, Ivone e Thompson pelo apoio técnico tão essencial ao laboratório e pelas conversas descontraídas na copa.

Fora da vida laboratorial, agradeço aos meus grandes amigos Doze (às vezes conhecido como Guilherme), Aline e Érika pelos inúmeros almoços sempre muito agradáveis para matar as saudades e falar da vida.

Ao pessoal do Atados, membros atuais e membros eternos. O mundo precisa dessa paixão de vocês por torná-lo um lugar melhor. Tomás e Ricardo, muitos divãs,

chá e baladas ainda. Luti véi, a pessoal mais genial que conheço. Michelito, O galã. Carol e André, nosso casal inusitado. E olha Ludy, tem muitos gráficos! Vamo que vamo sempre, povo lindo!

Ao Gustavo. Só posso agradecer por todo o amor, apoio e os momentos maravilhosos com você ao longo de praticamente todo esse mestrado. Você foi a melhor parte.

Por fim, agradeço à FAP-DF e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Durante o processo de interação patógeno-hospedeiro ambos os organismos envolvidos sofrem uma ampla reprogramação do padrão global de expressão gênica, o que tem sido mostrado ser crucial na definição da resultante dessa interação. Dentre os inúmeros genes com expressão alterada no hospedeiro encontram-se aqueles que codificam microRNAs (miRNAs), um grupo de pequenas moléculas de RNA regulatórias atuante nos mais diversos processos celulares, incluindo a regulação da resposta imune tanto inata quanto adaptativa. Embora vários trabalhos venham mostrando a importância dos miRNAs na resposta imune de hospedeiros mamíferos a bactérias e vírus, pouco se sabe a respeito do papel desses reguladores em infecções fúngicas. Nesse sentido, buscamos analisar o papel de miRNAs na resposta imune inata de hospedeiros murinos à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, um dos agentes etiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM), considerada a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. Os ensaios iniciais com macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens A/J e B10.a, modelos definidos de resistência e suscetibilidade à PCM, respectivamente, e leveduras do isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis* revelaram o aumento dos cinco miRNAs avaliados: miR-125b, miR-132, miR-146a, miR-155 e miR-455, sugerindo a participação dessas moléculas na regulação da resposta a *P. brasiliensis*. No entanto, a ausência de um padrão de indução distinto entre as duas linhagens possivelmente indica que os miRNAs avaliados não possuem papel determinante no estabelecimento de respostas distintas entre as duas linhagens nas fases iniciais da interação com o fungo. Devido seu papel chave na regulação da resposta imune e aos altos níveis de acúmulo diferencial em resposta a *P. brasiliensis* aqui descritos, o miRNA miR-155 foi escolhido para análises mais abrangentes envolvendo sua biogênese e ação na modulação de transcritos alvo. O acúmulo do precursor pri-miR-155 observado sugere uma maior transcrição do gene MIR155HG contribuindo em parte para os altos níveis do miRNA maduro. Por sua vez, o aumento na razão entre os níveis de miR-155-3p e miR-155-5p pode indicar uma modulação do grau de estabilidade da fita 3p e regulação de seus processos de decaimento. A avaliação dos níveis de transcritos alvo de miR-155-5p forneceu resultados variáveis. Enquanto o aumento de TNF α e redução de SHIP1 estão de acordo com o já descrito na literatura em resposta a miR-155, o aumento nos níveis de SOCS1 e SOCS3, negativamente regulados pelo miRNA, demonstra as dificuldades de se estabelecer

paralelos diretos entre os níveis de um miRNA e seus alvos em um contexto de alta reprogramação do padrão global de expressão gênica. Também foram realizados ensaios de infecção empregando macrófagos derivados de medula de animais nocautes para os genes de TLR4 e dectina-1 para avaliação da sua participação na modulação dos níveis de miR-155-5p. Os resultados obtidos evidenciam a sinalização desses receptores de membrana como reguladores negativos, direta ou indiretamente, de miR-155-5p em resposta a *P. brasiliensis*. Para possibilitar o estudo do papel funcional de miRNAs na resposta imune, experimentos foram realizados visando validar um modelo de silenciamento de miRNAs através da transfecção *in vitro* de inibidores (antimiR). Resultados preliminares utilizando sondas marcadas com fluorescência e inibidores de um miRNA controle demonstraram uma alta eficiência de transfecção de BMDMs e eficácia no silenciamento do miRNA controle let-7. Desta forma, os resultados aqui apresentados são de relevância por sugerirem, pela primeira vez, a participação de miRNAs na regulação de vias envolvidas na resposta imune inata a *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

During host-pathogen interactions both organisms go through a wide genetic reprogramming, a process believed to be crucial in the establishment of the infection. Amongst all the host's genes showing this altered expression are the ones encoding for microRNAs (miRNAs), small regulatory RNA molecules acting on many biological processes, including regulation of both innate and adaptive immune responses. Although the importance of microRNAs in the immune response to bacteria and viruses by mammalian hosts has been reported by many groups, little is known about their participation in fungal infections. In this context, we aimed at analyzing the role of microRNAs in the innate immune response of murine hosts to infection by *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of Paracoccidioidomycosis (PCM) – the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Initial infection assays performed with peritoneal macrophages from resistant (A/J) and susceptible (B10.a) mouse strains and yeast cells from the virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis* showed an increase of the levels of five miRNAs: miR-125b, miR-132, miR-146a, miR-155 e miR-455, indicating a participation of these molecules on the regulation of the response to *P. brasiliensis*. However, the similar patterns of miRNA induction on both strains possibly suggests that the miRNAs studied do not have a determinant role in the establishment of the distinct inflammatory responses presented by the two strains in the early stages of interaction with the fungus. Therefore, we chose to perform the following analyses just with the A/J strain. miR-155 was selected for a more complete characterization of its biogenesis and target transcripts regulation based on its key role in regulating many aspects of the immune response and the high levels of differential accumulation in response to *P. brasiliensis* observed by us. The accumulation of the precursor pri-miR-155 observed suggests an influence of the transcription of the gene MIR155HG on the increase in the mature miRNA levels. The changes in the miR-155-3p to miR-155-5p ratio following *P. brasiliensis* infection may indicate an altered stability degree and turnover rate of the 3p strand. The assessment of the levels of miR-155-5p target mRNAs showed varying results. While upregulation of TNF α and downregulation of SHIP1 are in accordance with the expected effects of miR-155-5p, the high levels of SOCS1 and SOCS3, negatively regulated by this miRNA, reflect the difficulties in establishing direct parallels between the levels of a miRNA and its targets in a context of broad genetic reprogramming. Finally, we performed infection assays using BMDM

from TLR4 or dectin-1 knockout mice to assess the role of these receptors in the regulation of miR-155 levels. Results show that in the absence of the receptors miR-155 accumulates in even higher levels, pointing the signaling by TLR4 and dectin-1 as negative regulators, directly or indirectly, of miR-155 in response to *P. brasiliensis*. In order to allow the study of the functional role of miRNAs in the immune response, we tested a model for miRNA silencing by *in vitro* transfection of miRNA inhibitors (antimiR). Preliminary results using fluorescent-labelled antimiR and inhibitors for a control miRNA showed a high transfection efficiency in primary macrophages and proper effect on silencing the control miRNA let-7. In conclusion, the results presented are of great significance for suggesting, for the first time, the involvement of miRNAs in the regulation of the innate immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMDM – Macrófagos derivados de medula óssea

cDNA – DNA complementar

Ct – *Threshold cycle*

dNTP – deoxirribonucleotídeos fosfato

EGTA – ácido etilenoglicol tetracético

FADD - *Fas-Associated protein with Death Domain*

HGMA2 - *High-mobility group AT-hook 2*

h – horas

IFN γ – Interferon gama

IKK ϵ - *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon*

IL - interleucina

i.p. – intraperitoneal

IRAK - *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

LPS – Lipopolissacarídeo

M (mM, nM) – molar (milimolar, nanomolar)

MCP-1 - *monocyte chemotactic protein 1* (também conhecido como CCL2)

mm – milímetro

mL – mililitro

min – minutos

MIR155HG – *miR-155 Host Gene*

miRNA, miR – microRNAs

miRISC – complexo de silenciamento induzido por microRNAs

mRNA – RNA mensageiro

ng - nanograma

nm - nanômetro

nt – nucleotídeo

PBS – tampão fosfato salina

PCM – paracoccidiodomicose

pH – potencial de hidrogeniônico

pre-/pri-miRNA – miRNA precursor/ miRNA primário

Ripk1 - *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*

rpm – rotações por minuto

RT-qPCR – transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (tempo real)

SFB – soro fetal bovino

SHIP1 - *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1*

snRNA – pequenos RNAs nucleares

SOCS1 - *Suppressor of cytokine signaling 1*

t.a – temperatura ambiente

TLR – receptores do tipo Toll

TMMP – proteção de miRNA mediada por alvo

TNF α - *Tumor necrosis fator α*

TRAF6 - *TNF receptor associated factor 6*

U – Unidade de ação enzimática

5'/3' UTR – *5'/3' Untranslated Region*

V – volume

μ L - microlitro

$^{\circ}$ C – grau centígrado

% - porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese e estrutura de microRNAs.....	17
Figura 2. Participação de miRNAs no desenvolvimento e ativação de componentes do sistema imune.....	22
Figura 3. Sistema haste- alça para síntese de cDNA a partir de miRNA.	39
Figura 4. Sistema de detecção TaqMan® em RT-qPCR	41
Figura 5. Níveis de citocinas após interação macrófago x <i>P. brasiliensis</i>	45
Figura 6. Indução dos níveis de miRNAs em macrófagos de camundongos A/J e B10.A em resposta a <i>P. brasiliensis</i>	46
Figura 7. Variação no acúmulo de transcritos de diferentes etapas no processo de biogênese de miR-155	49
Figura 8. Acúmulo diferencial de transcritos regulados por miR-155-5p	52
Figura 9. Participação de receptores de membrana na indução do acúmulo de miR-155-5p.....	55
Figura 10. Avaliação do modelo para transfecção de inibidores de microRNA.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores para genes murinos utilizados nos ensaios de RT-qPCR Erro! Indicador não definido.

Tabela 2. microRNAs avaliados por RT-qPCR..... 411

Tabela 3. Quantificação relativa de microRNAs de macrófagos peritoneais murinos de A/J após interação com leveduras de Pb18..... 72

Tabela 4. Quantificação relativa de microRNAs de macrófagos peritoneais murinos de B10.a após interação com leveduras de Pb18 733

Tabela 5. Quantificação relativa de mRNAs alvos de miR-155-5p em macrófagos peritoneais murinos de A/J após interação com leveduras de Pb18 733

Tabela 6. Quantificação relativa de miR-155-5p de macrófagos derivados de medula de camundongos C57Bl/6 após interação de seis horas com leveduras de Pb18 744

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 microRNAs	15
1.1.1 Aspectos gerais da biologia e biogênese de microRNAs	15
1.1.2 Ferramentas moleculares no estudo de miRNAs	20
1.1.3 microRNAs e a regulação da resposta imune	22
1.2 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	25
1.2.1 Paracoccidioidomicose e aspectos gerais da biologia de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	25
1.2.2 Interação patógeno-hospedeiro no desenvolvimento da paracoccidioidomicose	27
1.2.3 Modelos experimentais de resistência e suscetibilidade a paracoccidioidomicose	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Linhagens celulares e manutenção	34
3.1.1 Animais	34
3.1.2 Obtenção de macrófagos primários	34
3.1.3 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	35
3.2 Ensaio de interação patógeno – hospedeiro	36
3.3 Verificação dos níveis de citocinas	36
3.4 Análise dos níveis de acúmulo diferencial de transcritos murinos por Transcrição Reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR)	37
3.5 Avaliação do modelo de transfecção <i>in vitro</i> de inibidores de microRNA	42
3.6 Análise e apresentação de dados	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Modulação dos níveis de miRNAs de macrófagos murinos suscetíveis ou resistentes em resposta à interação com <i>P. brasiliensis</i>	44
4.2 Acúmulo diferencial de transcritos das várias etapas da biogênese de miR-155 e alguns de seus alvos em resposta a <i>P. brasiliensis</i>	47
4.3 Participação dos receptores de membrana TLR4 e Dectina-1 na indução de miR-155	54
4.4 Avaliação do modelo de transfecção de inibidores de microRNA para ensaios de perda de função	56

5. CONCLUSÃO.....	60
6. PERSPECTIVAS.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICE	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 microRNAs

1.1.1 Aspectos gerais da biologia e biogênese de microRNAs

Importante componente dentre os RNAs não-codificadores, os microRNAs são pequenas moléculas de RNAs regulatórios com tamanho aproximado de 22 nucleotídeos cuja principal função é a regulação em nível pós-transcricional da expressão gênica tendo como alvo as moléculas de RNAs mensageiros (Bartel, 2004; Ameres & Zamore, 2013; Kim *et al.*, 2009). Predições baseadas em estudos de bioinformática sugerem que em humanos mais de 60% dos genes codificadores de proteínas sejam regulados por miRNAs (Friedman *et al.*, 2009). Um dos principais bancos de dados de sequências de miRNAs, o miRBase (<http://www.mirbase.org/>) conta atualmente com 2588 entradas referentes a sequências de miRNAs maduros para humanos e 1915 para camundongos (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014 e atualizações do *release 21* obtidas no site).

O primeiro miRNA descrito foi identificado em 1993 no nematóide *Caenorhabditis elegans* por Lee *et al.* (1993), sendo denominado lin-4. Esses autores observaram que o silenciamento do gene de lin-4 afetava diretamente o desenvolvimento pós-embriônico do nematóide e que variações temporais em seus níveis estavam inversamente correlacionadas à variações nos níveis da proteína LIN-14, que quando ausente leva a efeitos opostos aos observados com o silenciamento de lin-4. Em um outro trabalho, Wightman *et al.* (1993) descreveram a presença de regiões localizadas na região 3'UTR do mRNA lin-14 que continham sequências complementares a lin-4. Com a utilização de vetores contendo essas sequências e um gene repórter os autores puderam verificar o efeito direto de lin-4 sobre esse mRNA, sugerindo que essa interação RNA-RNA era a responsável pelo controle dos níveis de LIN-14.

Os genes que codificam miRNAs são evolutivamente conservados, e podem estar localizados em íntrons ou éxons de genes codificadores de proteínas e de longos RNAs não codificadores ou em regiões intergênicas (Rodriguez *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009). Quando presentes em íntrons, os miRNAs são denominados mirtrons, representando 38% dos genes de miRNAs murinos (Chiang *et al.*, 2010). O processo de biogênese de miRNA acontece em várias etapas, com algumas ocorrendo no núcleo e

outras no citoplasma da célula. A primeira etapa nesse processo acontece no núcleo com a transcrição pela RNA polimerase II do miRNA primário (pri-miRNA), molécula precursora em que se encontra a sequência do miRNA maduro. Sendo transcrito pela RNA polimerase II, a via mais comum, o pri-miRNA consiste de uma molécula maior (podendo ter vários kb de comprimento) apresentando as estruturas CAP 5'-metilguanossina e cauda 3' poli-A, semelhante a um mRNA. Ainda no núcleo o pri-miRNA é alvo de um complexo microprocessador constituído principalmente por Drosha (uma endorribonuclease tipo III) e DGCR8 (do inglês “*DiGeorge Syndrome critical region 8*” em mamíferos). DGCR8 possui sítios de ligação ao RNA que orientam o correto posicionamento do pri-miRNA no sítio catalítico de Drosha para que este seja então clivado pela RNase, liberando o miRNA precursor (pre-miRNA), uma molécula de aproximadamente 70 nt contendo uma região com estrutura secundária em grampo de cabelo. O pre-miRNA é então transportado para o citoplasma pela proteína Exportina-5, onde será mais uma vez inserido em um complexo microprocessador com características semelhantes ao complexo nuclear. Esse complexo citoplasmático tem como principais componentes funcionais a RNase do tipo III Dicer e TRBP. Dicer cliva o pre-miRNA nas duas extremidades da haste da estrutura em forma de grampo, removendo a alça e as extremidades 5' e 3' livres gerando, dessa forma, um dímero constituído pelas duas fitas maduras do miRNA, denominadas fita 5p e fita 3p de acordo com sua posição em relação às extremidades 5' e 3' do pre-miRNA. Uma das fitas será incorporada posteriormente no complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), complexo multiprotéico efetor responsável pela regulação guiada pelo miRNA (Bartel, 2004; Ameres & Zamore, 2013; Rügger & Großhans, 2012). As etapas envolvidas no processo de biogênese e a estrutura de um miRNAs estão representadas na **Figura 1**.

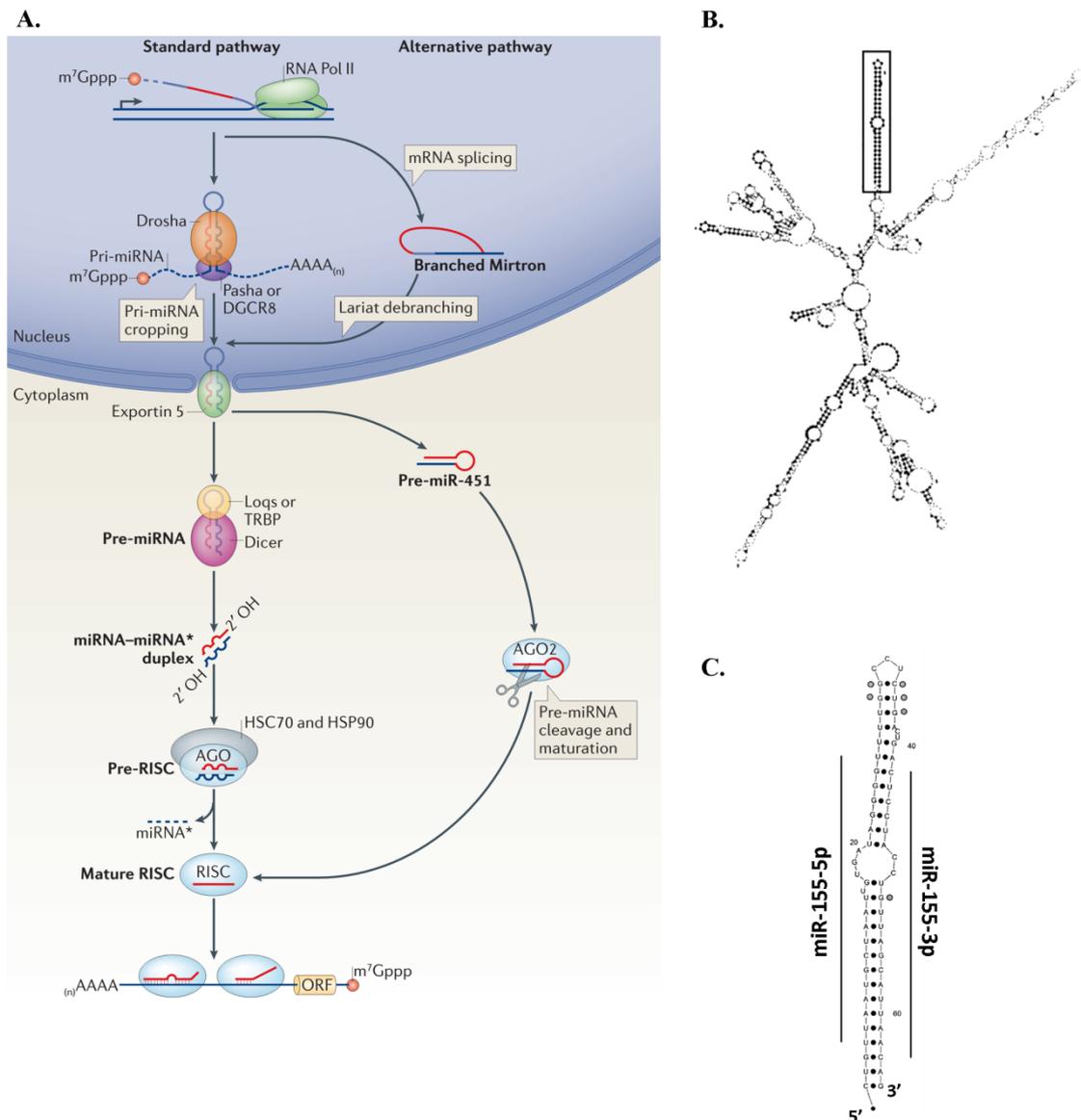


Figura 1. Biogênese e estrutura de microRNAs. (A). Etapas no processo de biogênese de microRNAs. Uma via alternativa de geração de miRNA a partir de um íntron é mostrada ao lado da via canônica de processamento (Adaptado de Ameres & Zamore, 2013.). (B). Estrutura do pri-miR-155. Em destaque está indicada a localização do pre-miRNA. (C). Estrutura do pre-miR-155 contendo as duas fitas maduras miR-155-5p e miR-155-3p. (Adaptado de Tam, 2001).

Incorporação no complexo miRISC: seleção de fita. Normalmente a incorporação no complexo miRISC acontece de forma assimétrica, com uma das fitas sendo preferencialmente incorporada enquanto a outra seria liberada no citoplasma e degradada, o que levou à utilização dos termos fita guia (miRNA) e fita passageira (miRNA*). O mecanismo mais aceito para determinação da fita dominante (aquela preferencialmente incorporada no miRISC e conseqüentemente acumulada em maiores

níveis) é o modelo termodinâmico de assimetria de estabilidade na região 5' entre as duas fitas maduras. De acordo com esse modelo, o miRNA apresentando uma menor estabilidade no pareamento de sua região 5' no dímero forneceria as condições mais favoráveis para sua incorporação no complexo de silenciamento, independentemente de sua localização 5p ou 3p (Khvorova *et al.*, 2013; Schwarz *et al.*, 2003). No entanto, estudos posteriores começaram a trazer à luz aspectos na biologia de miRNAs que questionam a universalidade desse modelo de seleção.

O primeiro desses pontos é a alteração entre os braços 5p e 3p como fita dominante de um miRNA dependendo do contexto, fenômeno conhecido como *arm switching* (Griffiths-Jones *et al.*, 2011; Ro *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2010). Utilizando análises por PCR ou análises em larga escala, como sequenciamento de pequenos RNAs e utilização de bancos de dados, esses autores identificaram a prevalência de fitas opostas em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento embrionário de camundongos (Chiang *et al.*, 2010; Ro *et al.*, 2007) e entre duas espécies de insetos na conservada família de miRNA miR100/10 (Griffiths-Jones *et al.*, 2011). Outro ponto a questionar o modelo de seleção de fita por estabilidade termodinâmica é a constatação do papel funcional da fita passageira (miRNA*) de diversos miRNAs. Estudos de genômica comparativa revelaram a conservação de sequências de miRNA* e de sequências complementares em possíveis mRNA alvo, indicando a existência de uma pressão seletiva para sua manutenção (Okamura *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2011). Além disso, análises funcionais com validação de alvos, ganho e perda de função e verificação da incorporação em miRISC já comprovaram a importância fisiológica de vários miRNA*, que agem de maneira independente da sua fita irmã, regulando alvos distintos (Okamura *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010; Mycko *et al.*, 2015). Esses pontos reforçam a adequação da substituição da nomenclatura miR/miR*, baseada na oposição fita funcional/fita passageira, dando preferência à utilização dos termos miR-5p e miR-3p.

Mecanismos de ação e seleção de alvos. Após a montagem do complexo ribonucleoprotéico o miRNA incorporado serve de guia para seleção do mRNA a ser silenciado pelo miRISC. A identificação de um mRNA alvo ocorre por complementariedade de base entre as duas moléculas, ainda que os mecanismos não estejam completamente elucidados. O modelo canônico é baseado na complementariedade perfeita de uma região de 7-8 nucleotídeos no miRNA denominada

seed (Bartel, 2009), porém a ocorrência de outras formas de pareamento é possível. Loeb *et al.* (2012), por exemplo, demonstraram que em linfócitos T 40% das ligações miRISC-sítios alvo guiadas pelo miRNA miR-155-5p se dão por pareamento não canônico, mas ressaltam que a regulação exercida por esse tipo de pareamento é mais branda que a observada quando da ocorrência de reconhecimento através da *seed* clássica.

Após o reconhecimento do alvo e a ligação de miRISC o processo de silenciamento pode ocorrer por dois mecanismos: clivagem e degradação do mensageiro ou repressão da tradução, que em etapas posteriores também leva à degradação do mRNA (Gurtan & Sharp, 2013). O principal efetor no complexo de silenciamento é a proteína Argonauta, sendo a isoforma Ago2 a única com atividade de endonuclease. De maneira geral, o grau de complementariedade entre o miRNA e seu alvo é que irá definir o mecanismo através do qual o silenciamento ocorrerá. Um alto grau de complementariedade está ligado à presença de Ago2 e clivagem direta, enquanto pareamentos imperfeitos, os mais comuns em animais, levam inicialmente a um bloqueio da tradução causando posteriormente uma cascata de eventos envolvendo desadenilação do mRNA e perda de Cap 5' 7-metilguanosina culminando na degradação do transcrito pelas vias canônicas de decaimento de mRNAs (Gurtan & Sharp, 2013).

Divergindo da função clássica de inibição da expressão, alguns trabalhos vêm mostrando uma participação de miRNAs induzindo a expressão de alguns de seus alvos. Vasudevan *et al.* (2007) descreveram pela primeira vez a capacidade de miR-396-3 de induzir a tradução do Fator de necrose tumoral α (TNF α) sob condições de restrição nutricional, com o mesmo efeito sendo observado para let-7 e miRcxcr4 (um miRNA sintético) sobre vetores carregando sítios alvo para esses miRNAs. Estudos posteriores revelaram a ocorrência do mesmo fenômeno para outros miRNAs em contextos diversos, como células quiescentes, oócitos imaturos do anfíbio *Xenopus laevis* e tumorigênese (Truesdell *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Ainda que os mecanismos envolvidos na indução de mRNA alvos por miRNAs não estejam bem definidos, esses dois trabalhos indicam também a importância da compartimentalização do processo, que parece ser realizado somente por complexos ribonucleoprotéicos montados no núcleo das células.

1.1.2 Ferramentas moleculares no estudo funcional de miRNAs

Quando se estuda a participação de um miRNA em um processo biológico, as análises iniciais dizem respeito à observação de variações em seus níveis em resposta ao estímulo avaliado. Nesses casos são muito empregadas técnicas de identificação e quantificação relativas ou absolutas como PCR quantitativa em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) para análises individuais, ensaios de microarranjos otimizados para quantificação de miRNA ou sequenciamentos em larga escala (NGS, miRNA-seq), que permitem a quantificação simultânea dos níveis de um número enorme de miRNAs (Pimentel *et al.*, 2014). No entanto, ainda que essas análises mostrem o efeito do fenômeno estudado sobre os níveis de um ou vários miRNAs e isso possa indicar indiretamente uma possível participação dessas moléculas na regulação do processo sendo estudado, somente a sua caracterização funcional fornece pistas mais diretas do efeito de miRNA sobre o sistema e sua rede de regulação.

Dentre as principais metodologias no estudo funcional de miRNAs estão as que envolvem modulações em seus níveis na célula ou organismo em ensaios de ganho ou de perda de função. Os ensaios de ganho de função são feitos com o aumento nos níveis de um miRNA por meio da adição de mímicos sintéticos do miRNA maduro ou transfecção de pre-miRNAs sintéticos, que após processados pela maquinaria da própria célula geram moléculas do miRNA, aumentando o número de cópias disponíveis. A ideia é que com a expressão ectópica e consequente maior disponibilidade do miRNA estudado os efeitos causados por sua regulação ocorrerão com maior intensidade, sendo mais fáceis de serem observados. Além disso, os fenótipos observados estarão ocorrendo unicamente em resposta às alterações nos níveis daquele miRNA, reduzindo a interferência da participação de outras moléculas (Zhang *et al.*, 2013; Svobod, 2015). Ainda que bastante presente na literatura e fornecendo resultados importantes, alguns estudos têm mostrado a possibilidade de ocorrência de efeitos inespecíficos em resposta à transfecção em concentrações muito altas e atividade indesejada da fita passageira, que diferentemente do dímero endógeno normalmente se trata de uma fita com complementariedade perfeita à fita principal, apontando a importância de realização de testes preliminares e uso de controles apropriados para validação do método no sistema estudado (Jin *et al.*, 2015; Søkilde *et al.*, 2015).

Para ensaios de perda de função duas metodologias bastante usadas são inibidores de miRNA e esponjas de miRNA. Agindo por mecanismos distintos essas

metodologias são aplicadas com o objetivo de suprimir a disponibilidade de um miRNA estudado para avaliar os efeitos decorrentes da ausência da inibição exercida por ele sobre seus alvos (Zhang *et al.*, 2013; Svobod, 2015). Inibidores de miRNA, também conhecidos como *antimiR* são oligonucleotídeos sintéticos cuja sequência é complementar à molécula do miRNA maduro, se ligando a ele e bloqueando sua capacidade de incorporação no miRISC e ligação com seus mRNAs alvo. Modificações químicas das mais diversas são realizadas nos nucleotídeos para alterar as propriedades do antimiR, podendo conferir maior especificidade na ligação ao miRNA, estabilidade do dímero formado e capacidade de silenciamento e menor suscetibilidade do inibidor à degradação por nucleases celulares. Dentre as modificações mais frequentes estão a adição de grupamentos 2'-O-metil, conjugação com colesterol (antagomiRs) e os LNA (do inglês *locked nucleic acids*) (Stenvang *et al.*, 2012). Já as esponjas de miRNA são transcritos sintéticos contendo várias cópias da sequência alvo da *seed* de um ou vários miRNAs. Sua função principal é a de sequestrar moléculas do miRNA para diminuir sua disponibilidade e conseqüentemente seus efeitos na célula (Ebert *et al.*, 2007). Uma das desvantagens dos ensaios de perda de função é a possibilidade de obtenção de resultados falso-negativos, uma vez que a ocorrência da regulação de um mesmo mensageiro alvo por diferentes miRNAs pode compensar a perda de apenas um deles.

Outro método para estudo do papel funcional de um microRNA *in vivo* é a geração de organismos geneticamente modificados apresentando deleções do gene do miRNA sob estudo. A geração de camundongos com deleção do gene Mir155HG (*miR-155 host gene*) por Rodriguez *et al.* (2007), por exemplo, permitiu a identificação da importância desse miRNA na função de diversas células do sistema imune. Outra abordagem interessante da utilização de camundongos geneticamente modificados no estudo funcional de miR-155 foi a geração de animais modificados para expressarem um transgene contendo a sequência de uma proteína repórter e sequências alvo de miR-155 em um mesmo transcrito (Phiwpan *et al.*, 2015). Dessa forma, os níveis da proteína repórter serão regulados pela ação direta de miR-155 endógeno, servindo de sensor para medição da ação do miRNA em tempo real *in vivo* em diferentes tecidos e tipos celulares.

A possibilidade de verificar de maneira direta o efeito de um miRNA sobre um alvo é de grande importância, uma vez que apenas a quantificação dos níveis do miRNA não reflete diretamente sua capacidade de ação, que pode ser influenciada por diversos

fatores como taxa de incorporação no miRISC, proporção miRNA: mRNA alvo, entre outros (Shug *et al.*, 2013).

1.1.3 microRNAs e a regulação da resposta imune

A regulação por miRNAs se estende por praticamente todos os processos biológicos, como já esperado quando consideradas as estimativas de quantidades de transcritos alvo em mamíferos. Dentre esses processos está a manutenção da homeostasia e desenvolvimento do sistema imune, com inúmeros trabalhos demonstrando que miRNAs podem modular vários aspectos da resposta imune tais como diferenciação de células imunitárias e expressão de citocinas, sendo cruciais tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa (revisado por Bi *et al.*, 2009; Lu & Liston, 2009; Alam & O'Neill, 2011). A **Figura 2** apresenta um levantamento da participação de vários miRNAs no processo de desenvolvimento e ativação dos componentes da resposta imune inata e adaptativa

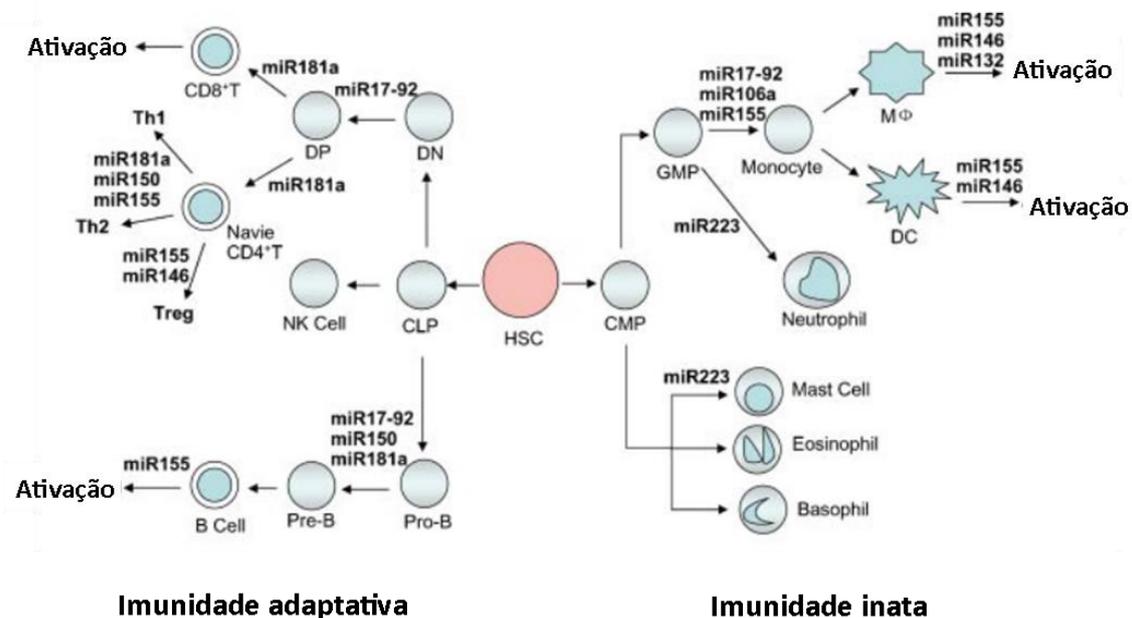


Figura 2. Participação de miRNAs no desenvolvimento e ativação de componentes do sistema imune. HSC: célula tronco hemocitopoética; CLP: células linfóides progenitoras; CMP: células mielóides progenitoras; GMP: Progenitor granulócito-monócito; DN: linfócito T duplo-negativo; DP: linfócito T duplo-positivo; MΦ: macrófago; DC: célula dendrítica. (Adaptado de Bi *et al.*, 2009)

Como exemplo pode ser citado o miR-155, inicialmente descrito como um miRNA oncogênico por sua participação na indução policlonal e estabelecimento de diferentes classes de linfomas de células B (Eis *et al.*, 2005; Costinean *et al.*, 2006). Rodriguez *et al.* (2007) puderam observar a importância desse miRNA na regulação de inúmeros aspectos do sistema imunológico após a geração de camundongos portando uma deleção do éxon 2 do gene MIR155HG, éxon em que se encontra o pre-miR-155. Após imunização com fragmento C da toxina tetânica (TetC) linfócitos B de camundongos deficientes em miR-155 produziram menores quantidade de imunoglobulinas, enquanto linfócitos T não foram capazes de liberar quantidades suficientes de interleucina-2 e interferon γ . Além disso, foram observadas interferência na capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas e alterações no padrão de produção de citocinas por células Th2.

Outro evento importante regulado por miRNAs é a polarização na ativação de macrófagos. Banerjee *et al.* (2013b) mostraram o papel do miRNA let-7c em promover uma polarização do fenótipo de ativação alternativa M2, caracterizado por uma resposta mais voltada ao controle da inflamação, com menor atividade fungicida e maior produção de citocinas anti-inflamatórias, em detrimento do padrão de ativação clássico M1. Outros miRNAs também foram identificados como tendo participação nesse processo de polarização de macrófagos (Graff *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013a).

Além do controle do desenvolvimento e função de células do sistema imune para manutenção da homeostase, diversos estudos já foram realizados sobre a participação de miRNAs na regulação da resposta imune a diferentes tipos de microrganismos patogênicos, como vírus, bactérias e fungos (Głobinska *et al.*, 2014 ; Maudet *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Monk *et al.*, 2010; das Gupta *et al.*, 2014).

Tendo por base sua participação na resposta a patógenos já descrita na literatura, especialmente nos poucos trabalhos com fungos (Monk *et al.*, 2010; das Gupta *et al.*, 2014), e a modulação nos níveis de alvos diretamente envolvidos na sinalização e resposta inflamatória foram escolhidos cinco miRNAs para estudo no presente trabalho: miR-125b-5p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p e miR-455-3p. Estes miRNAs geralmente tem seu acúmulo induzido em resposta à interação de macrófagos com um patógeno, regulando diretamente elementos das vias de sinalização. O principal papel por eles exercido nesse cenário é o de controle da resposta imune, tendo normalmente um efeito anti-inflamatório.

Considerando os alvos de miR-125b e miR-146a fica evidente a ação anti-inflamatória desses miRNAs. miR-146a age diminuindo os níveis de IRAK1, IRAK2 e TRAF6, importantes componentes da via de sinalização de TLR (Receptores Semelhantes a Toll), receptores chave no reconhecimento e ativação de resposta inflamatória a patógenos (Hou *et al.*, 2009). Citocinas pró-inflamatórias também são controladas por miR-146a agindo diretamente sobre seus mensageiros (interleucina-8 e MCP-2) (Perry *et al.*, 2008; Rom *et al.*, 2010) ou indiretamente através da inibição de um regulador positivo, como é o caso de IL-12p70, que é controlada por miR-146a através da inibição de Notch1 por esse miRNA (Bai *et al.*, 2012).

Outra citocina pró-inflamatória negativamente regulada por um miRNA é o TNF α . Aumentos nos níveis de miR-125b parecem causar uma diminuição na tradução de TNF α após ligação desse miRNA em sítios na região 3'UTR de seu mensageiro (Tili *et al.*, 2007). Os autores propõe que altos níveis de miR-125b em macrófagos não ativados seja importante para prevenir a ativação dessas células na ausência de uma infecção microbiana.

Contrastando com miR-125b, Tili *et al.* (2007) também demonstraram que aumentos nos níveis de miR-155 induzem uma maior tradução de TNF α . O aumento da tradução está relacionado a uma maior estabilidade do mensageiro ocasionada pela ligação de efetores em sua região 3'UTR. Ainda não está elucidado, no entanto, se miR-155 se liga diretamente ao mRNA de TNF α ou se apenas regula um possível efetor. Além da indução de TNF α , a inibição da expressão de alguns reguladores negativos da resposta imune como inositol polifosfato 5-fosfatase contendo o domínio SH2 1 (SHIP1) (O'Connell *et al.*, 2009) e os supressores da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3) (Lu *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2013) indicam um papel pró- e não anti-inflamatório de miR-155. Alguns outros alvos de miR-155 são as proteínas FADD, IKK ϵ e Ripk1 (Tili *et al.*, 2007).

A ação anti-inflamatória de miR-132 se dá através da inibição das citocina pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 por meio da regulação negativa direta de IRAK4, uma molécula adaptadora na via de sinalização por TLRs dependente de MyD88 (Kong *et al.*, 2015; Nahid *et al.*, 2013). miR-132 também foi proposto como um importante miRNA na resposta específica a fungos (das Gupta *et al.*, 2014).

A participação de miR-455 na resposta imune ainda não está bem estabelecida. Alvos envolvidos em vias de sinalização em resposta a patógenos e controle da resposta inflamatória ainda não foram identificados. Porém, miR-455 apresentou altos níveis de

indução em resposta a ativação de macrófagos por LPS e por leveduras de *Candida albicans* (Monk *et al.*, 2010).

1.2 Paracoccidioides brasiliensis

1.2.1 Paracoccidioidomicose e aspectos gerais da biologia de *Paracoccidioides brasiliensis*

A paracoccidioidomicose (PCM) é considerada a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. Causada pelos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, sua ocorrência é limitada ao continente americano, com uma distribuição entre México e Argentina, sendo as principais áreas de ocorrência o Brasil (com 80% dos casos reportados), Venezuela, Colômbia e Argentina (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Martiniez, 2015). A taxa de mortalidade por PCM no Brasil chega a 1,43 casos por milhão de habitantes, tendo sido responsável por mais de 50% dos casos entre as micoses sistêmicas no Brasil no período de 1998 a 2006 (Coutinho *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009). No mesmo período foram registrados 6732 casos de admissões em hospitais decorrentes de PCM (uma taxa de 4,3 ocorrências por milhão de habitantes), representando 49% do total de entradas devido a micoses sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2015). No entanto, estudos precisos sobre a epidemiologia da PCM são de difícil realização devido aos longos períodos de latência do fungo no organismo associado a dificuldades de diagnóstico e por não se tratar de uma doença de notificação compulsória.

O primeiro relato de *P. brasiliensis* na literatura foi realizado por Adolpho Lutz em 1908. Descrito como o agente etiológico da PCM, trata-se de um fungo dimórfico cuja transição morfológica é regida por variações de temperatura (Patiño *et al.*, 1984). À temperatura ambiente (25°C), *P. brasiliensis* é encontrado na forma de micélio, caracterizada por longos filamentos septados, ocorrendo a transição para a forma leveduriforme em temperaturas maiores (37 °C *in vitro*) ou após invasão de tecidos do hospedeiro (Carbonell, 1969; Patiño *et al.*, 1984). As leveduras são caracterizadas por sua natureza unicelular e forma esférica que se reproduzem por brotamentos laterais, o que gera uma estrutura semelhante a uma roda de leme, sendo essa a principal característica morfológica para identificação taxonômica e no diagnóstico desse grupo. Durante o período de transição são observadas formas intermediárias tanto na passagem de micélio para levedura quanto de levedura para micélio (Carbonell, 1969). Porém, como descrito por esses autores, o processo de diferenciação ocorre por mecanismos

diferentes dependendo da direção dessa transição: quando da passagem de micélio para levedura, regiões interseptais da hifa aumentam e se transformam em leveduras, enquanto na passagem de levedura para micélio surgem estruturas alongadas a partir da levedura que posteriormente se diferenciam em hifas, ocorrendo a morte da levedura e não sua transformação.

Pertencente à família Ajellomycetaceae, ordem Onygenales (Untereiner *et al.*, 2004), o grupo *Paracoccidioides* é atualmente composto por duas espécies descritas: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2014). A grande diversidade entre os vários isolados de *P. brasiliensis* em diversos aspectos como morfologia de colônias *in vitro*, leveduras e conídios (Kurokawa *et al.*, 2005; Theodoro *et al.*, 2012), distribuição geográfica (Theodoro *et al.*, 2012; Richini-Pereira *et al.*, 2009) e níveis de virulência (Kashino *et al.*, 1985; Kurokawa *et al.*, 2005) mostra tratar-se de um grupo não homogêneo. A classificação taxonômica em fungos tradicionalmente leva em consideração a avaliação dos estágios de reprodução sexuada, o que têm sido uma das dificuldades na classificação de *Paracoccidioides*, uma vez que estruturas sexuais e mesmo a ocorrência desta forma de reprodução ainda não foram definidas nesse grupo. Dessa forma, os estudos de taxonomia em *Paracoccidioides* têm sido embasados em análises moleculares de filogenia e genética de populações levando em consideração também aspectos morfológicos e distribuição geográfica dos isolados. Partindo de análises de similaridade entre sequências do DNA codificador do RNA ribossômico 26S e a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em conjunto com dados de distribuição geográfica foi proposta a existência de pelo menos três espécies crípticas dentro do complexo *P. brasiliensis*: S1, PS2 e PS3 (Matute *et al.*, 2006; Theodoro *et al.*, 2012).

É importante ressaltar, no entanto, que a existência de reprodução sexuada em *Paracoccidioides* tem sido proposta a partir de análises moleculares onde foi observada a presença de genes relacionados a acasalamento, como o locus MAT, com diversos desses genes apresentando maiores níveis de acúmulo durante a forma filamentosa (Torres *et al.*, 2010; Desjardins *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2013), bem como indícios da ocorrência de recombinações gênicas entre as espécies crípticas (Matute *et al.*, 2006).

A distribuição de *P. brasiliensis* na natureza e suas interações com demais fatores bióticos e abióticos ainda não está completamente definida. Durante seu ciclo de vida, este fungo apresenta uma fase saprofítica, sendo encontrado majoritariamente na forma de micélio no solo (Restrepo *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2008). O efeito de

algumas qualidades físicas dos solos sobre a capacidade de crescimento de *P. brasiliensis* tem sido estudado por alguns grupos para delimitações dos nichos ecológicos (conjunto de fatores bióticos e abióticos que supram as necessidades de um organismo, conferindo a ele vantagens competitivas) ocupados por *P. brasiliensis*, porém muito ainda precisa ser avaliado (Restrepo *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2008). Textura do solo (argiloso ou arenoso), grau de humidade e presença de alguns elementos químicos são alguns dos fatores já estudados, tendo sido observado um efeito negativo sobre o crescimento de *P. brasiliensis* em situações de baixa humidade e presença de grandes quantidades de alumínio (Terçarioli *et al.*, 2007).

Em resposta a condições ambientais desfavoráveis *P. brasiliensis* pode produzir e liberar conídios como forma de dispersão. Ao serem inalados pelo hospedeiro e atingirem os pulmões, esses conídios (ou fragmentos de hifas) podem sofrer uma transição para a forma leveduriforme, levando ao estabelecimento da infecção e iniciando outra fase em seu ciclo de vida, ainda que a passagem por um hospedeiro não seja uma etapa obrigatória em seu desenvolvimento (revisado por Bagagli *et al.*, 2008). Além de humanos, alguns mamíferos selvagens já foram descritos como hospedeiros de *P. brasiliensis*, sendo exemplos: *Cavia aperea* (porquinho da Índia), *Sphiggurus spinosus* (porco- espinho), *Gallictis vittata* (furão), *Procyon cancrivorus* (guaxinim) e diferentes espécies de tatus (*Dasypus spp*) (revisado por Bagagli *et al.*, 2008). A ocorrência de PCM em cães também já foi confirmada (Ricci *et al.*, 2004; de Farias *et al.*, 2011).

1.2.2 Interação patógeno-hospedeiro no desenvolvimento da PCM

A PCM pode apresentar diferentes formas de manifestação clínica, indo desde uma infecção assintomática conhecida como paracoccidioidomicose-infecção e identificada por uma resposta imune celular a antígenos do patógeno em indivíduos saudáveis após contato com o fungo, a manifestações sintomáticas na forma aguda ou crônica da doença (Bocca *et al.*, 2013; Martinez, 2015). A forma aguda (juvenil) manifesta-se em crianças e jovens adultos, atingindo igualmente ambos os sexos. Representa uma forma mais grave da doença, podendo ser encontradas lesões na pele e mucosas, acometendo o trato gástrico em aproximadamente 50% dos casos, além de sintomas como febre, perda de peso, anemia e aumento de linfonodos, sendo a forma com o maior índice de mortalidade. Quanto à fase crônica (adulta), há uma maior incidência entre homens e indivíduos com idade entre 30 e 60 anos, possivelmente

estando associada ao grande período de latência do fungo, e é a forma de PCM mais comum (chegando a representar até 90% dos casos). Nessa forma também há a ocorrência de lesões mucocutâneas e distribuição restrita a alguns órgãos, como pulmão. (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Bocca *et al.*, 2013)

A contaminação por *P. brasiliensis* ocorre por meio da inalação de propágulos presentes em aerossóis provenientes de solo contaminado em áreas endêmicas, normalmente relacionadas a atividades agrícolas (Restrepo *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2008). Esses propágulos, ou conídios, se instalam então nos pulmões, onde começam o processo de transição para a forma infecciosa de levedura. A presença desse patógeno aciona as primeiras etapas da resposta imune por parte do hospedeiro, constituída principalmente pela ativação de monócitos/neutrófilos com grande liberação de citocinas e presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Mcewen *et al.*, 1987; Lopera *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2015). A partir desse contato inicial, o desenvolvimento de PCM e a definição da manifestação clínica apresentada e gravidade da infecção serão determinados pelo balanço entre a virulência do isolado e a capacidade do organismo de responder a ele e controlar a infecção.

Virulência em *P. brasiliensis*. Uma das características com bastante variação entre diferentes isolados é o grau de virulência apresentado pelas leveduras de *P. brasiliensis*. Quantificação de unidades formadoras de colônia após infecção *in vitro* e *in vivo*, ensaios de fagocitose e curvas de sobrevivência são alguns dos ensaios já realizados com diferentes isolados, tanto isolados clínicos clássicos ou novos e isolados de animais selvagens, que permitiram sua classificação em um espectro de virulência contendo membros com virulência alta, intermediária, baixa ou mesmo avirulentos (Kashino *et al.*, 1985; Kurokawa *et al.*, 2005; Herbeler-Barbosa *et al.*, 2003).

Os mecanismos à base dessa variabilidade ainda não foram elucidados, sendo essa possivelmente uma tarefa bastante complexa, dado o caráter multifatorial e dinâmico do estabelecimento da virulência em patógenos. O contexto genético e interações ambientais podem ter um importante papel na seleção de fatores de virulência. Como exemplos de atributos de virulência em *P. brasiliensis* podem ser citados a capacidade de crescimento a 37°C, produção de melanina, que quando presente exerce um efeito protetor diminuindo a internalização por fagócitos e aumentando a resistência a sua capacidade fungicida (da Silva *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2009), reprogramação de seu transcrito e proteoma como um mecanismo de adaptação aos diversos nichos do hospedeiro e/ou do ambiente (revisado por Tavares *et*

al., 2015), e a modulação de componentes da parede celular, como a presença de α -1,3-glucana restrita à fase leveduriforme e sua relação com atenuação da virulência quando há uma menor produção desse componente (Kanetsuna & Carbonell, 1969; San-Blas & San-Blas, 1977).

Resposta do hospedeiro a *P. brasiliensis*. Se opondo às propriedades de virulência do patógeno está a capacidade do organismo de montar uma resposta imune apropriada para contenção do microrganismo invasor, e é o balanço entre esses dois pontos que irá definir a resultante da interação patógeno-hospedeiro. O estabelecimento de modelos animais para estudo da PCM e da resposta imune a seu agente etiológico mostrou a existência de diferentes padrões de suscetibilidade entre nove linhagens de camundongos, que pelo padrão da resposta apresentada puderam ser divididos em quatro grupos: muito resistente (A/Sn); resistente (C3H/He); resistência intermediária (Balb/C, CBA, C57Bl/10, C3HeB/Fe) e suscetível (B10D2/nSn, B10.A, B10D2/oSn) (Calich *et al.*, 1985). Os autores observaram também que as comparações entre animais de linhagens de diferentes contextos genéticos indicavam uma relação entre fatores genéticos e padrão de resposta. Dessa forma, animais da linhagem resistente A/Sn e suscetível B10.A foram utilizados para estudos de herança gênica que permitiram apontar o papel de um único gene autossômico, nomeado *Pbr*, no estabelecimento da resistência determinada geneticamente, porém a caracterização desse gene e estudos mais aprofundados ainda são necessários (Calich *et al.*, 1987).

Além da determinação genética, o estado de saúde e associação com outros fatores de risco, como tabagismo e alcoolismo (dos Santos *et al.*, 2003), também podem influenciar na montagem de uma resposta imune protetora e no desenvolvimento da PCM.

1.2.3 Modelos experimentais de resistência e suscetibilidade à PCM

A definição de modelos experimentais de PCM é muito importante no estudo dessa doença por permitir a caracterização de padrões de resposta e determinação dos mecanismos por eles responsáveis. Esses modelos são muito importantes principalmente no estudo da montagem inicial da resposta imunológica, uma vez que devido aos longos períodos de incubação e ocorrência de fases iniciais assintomáticas em humanos os casos de PCM são normalmente diagnosticados e acompanhados em estágios já mais avançados da interação. A partir da classificação de linhagens de camundongo em quatro diferentes graus de resistência a *P. brasiliensis* por Calich *et al.*

(1985) diversos trabalhos têm sido realizados para uma melhor caracterização das bases moleculares responsáveis por essas respostas empregando-se as linhagens A/Sn e B10.A, modelos de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

Em resposta à infecção por *P. brasiliensis* camundongos A/Sn apresentaram maior sobrevivência, com menor ocorrência de granulomas em diferentes órgãos, recuperação de leveduras viáveis restrita aos pulmões e alta resposta imune celular (hipersensibilidade do tipo tardio positiva). Por outro lado, camundongos suscetíveis apresentaram uma resposta oposta, com menor sobrevivência, maior disseminação de leveduras e presença de granulomas em diversos órgãos, incluindo desenvolvimento de lesões cutâneas e anergia na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (Calich *et al.*, 1985; Cano *et al.*, 1995).

Um dos componentes chave na resposta imune inata a patógenos, macrófagos exercem importante papel no controle da infecção por *P. brasiliensis*. Como demonstrado por Kashino *et al.* (1995) em camundongos A/Sn e B10.D2/oSn e por Kerr *et al.* (1983) em ratos, o bloqueio da atividade de macrófagos por elementos como carbono coloidal e sílica resulta no desenvolvimento de formas mais severas de PCM, com diminuição da sobrevivência e maior número e disseminação de lesões nas duas linhagens. Em condições normais um resultado a princípio contraditório pode ser observado: nos primeiros estágios da infecção um maior número de leveduras viáveis pode ser recuperado de pulmões de camundongos resistentes em comparação à linhagem suscetível, o que indica uma menor capacidade de contenção da infecção por parte dos macrófagos de camundongos resistentes (Pina *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 1995). Através de uma caracterização mais aprofundada do padrão da resposta formada por macrófagos desses modelos Feriotti *et al.* (2013) demonstraram que macrófagos peritoneais da linhagem suscetível apresentaram uma polarização em direção ao fenótipo de ativação clássica M1, com maior capacidade fagocítica e fungicida, alta produção de óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias (como interleucina-12) e expressão de genes marcadores característicos. Já os macrófagos da linhagem resistente apresentaram uma polarização em direção ao fenótipo de ativação alternativa M2, caracterizado por uma resposta mais voltada ao controle da inflamação, com menor atividade fungicida e maior produção de citocinas anti-inflamatórias (como interleucina-10) (Feriotti *et al.*, 2013; Sousa-Silva *et al.*, 2015). Um dos fatores responsáveis por essa polarização de ativação distinta entre as duas linhagens pode ser a participação de diferentes receptores de membrana no reconhecimento do fungo e ativação da resposta

inflamatória. Enquanto macrófagos de camundongos suscetíveis apresentam maior expressão dos receptores TLR2, TLR4 e CD11, em macrófagos de camundongos resistentes há uma maior expressão de dectina-1 (Feriotti *et al.*, 2013; Sousa-Silva *et al.*, 2015). Ferreira *et al.*. (2007) mostraram um efeito mais significativo da ativação por TLR2 em resposta a *P. brasiliensis* em células dendríticas de B10.a do que o observado para A/J, sugerindo a participação de TLR2 no estabelecimento da suscetibilidade a PCM.

Essa aparente contradição observada nos padrões de ativação de macrófagos nos primeiros estágios da resposta a *P. brasiliensis*, no entanto, pode ser um ponto chave na definição do grau de severidade da PCM. O alto grau de ativação e produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos suscetíveis gera uma cascata geral de ativação, levando a grandes níveis de produção de óxido nítrico que por sua vez acabariam por prejudicar o desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺, causando anergia ou depleção dessas células. A incapacidade de montar uma resposta imune adaptativa celular satisfatória, por sua vez, seria responsável pela menor capacidade de controle da infecção em estágios mais tardios, ocorrendo a disseminação do fungo para outros órgãos e desenvolvimento da forma progressiva da doença nessa linhagem. Já a resposta inicial menos pronunciada apresentada em animais resistentes permitiria um desenvolvimento apropriado de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, com controle do crescimento fúngico e limitação de sua disseminação, conferindo o caráter remissivo da PCM nesse modelo (revisado por Calich *et al.*, 2008).

A prevalência da PCM na América do Sul e sua classificação como doença tropical negligenciada tornam de crucial importância um abrangente entendimento da resposta imune do hospedeiro a *P. brasiliensis*, seu agente etiológico. Dado o interesse de nosso grupo no estudo da regulação da resposta a fungos, com ênfase em *P. brasiliensis*, vários estudos sobre a reprogramação transcritômica de células fagocíticas estimuladas por esse fungo vêm sendo realizados. Assim, buscamos abordar neste trabalho um novo aspecto do estudo da regulação da resposta imune a *P. brasiliensis*: a análise do papel de uma classe de moléculas regulatórias descritas como cruciais no ajuste fino de inúmeros processos biológicos, dentre eles o desenvolvimento e ativação de células do sistema imune, os miRNAs. Embora vários trabalhos venham mostrando a importância dessas moléculas na regulação da resposta imune de hospedeiros mamíferos

a bactérias e vírus, pouco se sabe a respeito do papel desses reguladores em infecções fúngicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a participação de microRNAs de macrófagos murinos na resposta imune inata à infecção por leveduras do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o acúmulo diferencial de miRNAs de macrófagos primários em resposta à infecção por leveduras de *P. brasiliensis* em linhagens murinas suscetíveis e resistentes à PCM;
- Analisar o efeito da interação com leveduras de *P. brasiliensis* sobre diferentes etapas no processo de biogênese e processamento de miR-155 e sobre alguns transcritos alvo desse miRNA;
- Determinar o papel de receptores de membrana de macrófagos no acúmulo diferencial de miR-155-5p em resposta a leveduras de *P. brasiliensis*;
- Estabelecer modelo de silenciamento de miRNAs em macrófagos primários através de transfecção de inibidores visando aplicação em estudos do papel funcional de miRNAs na regulação da resposta imune inata a *P. brasiliensis*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares e manutenção

3.1.1 Animais

Camundongos das linhagens B10.A e A/J foram escolhidos, respectivamente, como modelos de suscetibilidade e resistência à PCM, de acordo com a literatura (Calich *et al.*, 1985). A linhagem C57BL/6 foi utilizada na caracterização de vias de sinalização relacionadas ao acúmulo de miR-155-5p por ser o contexto genético dos camundongos nocaute disponíveis, enquanto camundongos Balb/c foram usados nos ensaios de transfecção de inibidores de miRNA. Os animais foram mantidos nas instalações do biotério do Instituto de Biologia e utilizados sempre entre oito e doze semanas de idade.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Proc. UnBDoc 52657/2011).

3.1.2 Obtenção de macrófagos primários

Macrófagos peritoneais. A atração de macrófagos para a região abdominal foi realizada injetando-se em cada animal 4 mL de Tioglicolato (Sigma-Aldrich) 3% estéril i.p em camundongos A/J e B10.A. Após quatro dias foi realizada a eutanásia dos animais em câmara de CO₂ e os macrófagos recuperados por meio de lavagem peritoneal pela injeção de 10 mL de meio RPMI 1640 gelado, centrifugados (300 x g/ 8 min/4°C) e ressuspendidos em RPMI para contagem do número de células em câmara de Neubauer, na presença de corante vital Azul de Tripiano. Foram inoculadas 7,5 x 10⁶ (A/J) ou 9 x 10⁶ (B10.A) células por garrafa de cultura de células de 75 cm² em meio RPMI 1640 suplementado com 2% Soro Fetal Bovino (SFB) inativado por calor (56°C, 30 min). As células foram incubadas por uma noite em incubadora de CO₂ (37° C, 5% CO₂) para aderência dos macrófagos, após a qual foram adicionados 12 mL de RPMI + SFB 2% novo e realizados os ensaios de interação.

Macrófagos derivados de medula óssea. Fêmures e tíbias foram recuperados de camundongos C57BL/6 ou Balb/c e a medula óssea retirada por meio de lavagem dos ossos com RPMI 1640 em ambiente estéril. Os ossos foram cortados ao meio e,

com uma agulha de 0,45x13 mm inserida no canal medular, 4 mL ou 3 mL (fêmur e tíbia, respectivamente) de meio RPMI 1640 foram utilizados para lavar cada metade em tubos falcon de 50 mL. O lavado foi então centrifugado (300 x g/8 min/4°C) e as células posteriormente tratadas com 1 mL de solução de hemólise (Sigma- Aldrich) por um minuto, sendo adicionados ao final desse tempo 20 mL de meio de cultura. Procedeu-se nova centrifugação e ressuspensão das células para contagem em câmara de Neubauer com corante vital Azul de Tripiano. Em placas de Petri contendo 10 mL de meio de diferenciação [RPMI suplementado com SFB 20% e meio condicionado de cultura de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1) 30%] foram adicionadas 2×10^6 células por placa. No quarto dia as placas foram suplementadas com mais 10 mL de meio de diferenciação. No sétimo dia o meio de cultura foi removido e as placas lavadas com tampão fostato (PBS) estéril. Para ressuspender os macrófagos diferenciados aderidos à placa de Petri, a cultura de cada placa foi tratada com 4 mL do reagente TrypLE® Express (Gibco) e mantidas em incubadora de CO₂ (37° C, 5% CO₂) por 20 minutos. Após esse período o reagente foi recuperado e centrifugado (300 x g/8 min /4°C). Os macrófagos sedimentados foram ressuspensos e contados em câmara de Neubauer. Uma suspensão de 2×10^6 células por poço foi inoculada em placas de cultura de seis poços contendo 2 mL de meio de manutenção (RPMI suplementado com SFB 10% e meio condicionado de cultura de fibroblastos L929 5%) e mantidas em incubadora de CO₂ (37° C, 5% CO₂) por uma noite para aderência dos macrófagos. No dia seguinte foram realizados os ensaios de infecção.

3.1.3 *Paracoccidioides brasiliensis*

Leveduras do isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis* foram mantidas em meio Fava-Netto sólido (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, D-glicose 4% e ágar 1,8%. pH 7,2) em estufa bacteriológica aquecida a 37°C, sendo realizados repiques semanais durante todo o período de duração do projeto.

Devido à grande formação de grumos no cultivo líquido de células de levedura do isolado Pb18, previamente aos ensaios de interação com macrófagos peritoneais, era necessário um protocolo para desagregar as células, conforme descrito a seguir. Células de Pb18 foram inoculadas em erlenmeyer contendo 200 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%. pH 7,2) e crescidas por cinco dias a 37°C sob agitação (150 rpm). Após esse período, o erlenmeyer foi mantido na bancada por 10 a

15 minutos para sedimentação dos grumos maiores e com o uso de uma pipeta sorológica, 150 mL da cultura foram recuperados. Três ciclos de centrifugação (4500 rpm/ 5 min/ t.a.) e lavagem com PBS estéril foram então realizados para remoção do meio YPD, sendo realizada ao final a contagem das leveduras em câmara de Neubauer e inoculação das mesmas nas garrafas contendo macrófagos. Para os ensaios de interação com macrófagos diferenciados de medula as leveduras de Pb18 foram cultivadas em tubos de Fava-Netto sólido por quatro dias. Partes da cultura foram então recuperadas utilizando-se alças de platina para transferência de partes da cultura sólida para tubos contendo 8 mL de PBS estéril e pérolas de vidro. A suspensão de células passava por dois ciclos de 15 segundos de agitação em vortex para separação de grumos. Após decantação dos grumos de grande tamanho, a cultura foi então recuperada e centrifugada (4500 rpm/ 5 min/ t.a.), seguindo-se a contagem das leveduras em câmara de Neubauer e inoculação de 10^6 células nos poços contendo 2×10^6 macrófagos.

3.2 Ensaios de interação patógeno – hospedeiro

Todos os ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos foram realizados por um período de seis horas de interação com leveduras de Pb18 vivas em uma proporção macrófago:levedura de 2:1. Durante esse período as placas foram mantidas em incubadora de CO₂ (37° C, 5% CO₂). Poços contendo macrófagos não infectados (sem a presença de *P. brasiliensis*), porém submetidos aos mesmos procedimentos e condições experimentais, foram utilizados como grupo controle.

3.3 Verificação dos níveis de citocinas

Ao fim do período de interação macrófago x levedura, os sobrenadantes das coculturas foram recuperados, centrifugados (4500 rpm/ 5 min/ t.a.) para remoção das células presentes, transferidos para tubos eppendorf de 2 mL e mantidos a -20°C para posterior análise dos níveis de citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta às leveduras de Pb18. A quantificação das citocinas foi realizada pelo método de ELISA com o kit Ready-SET-Go!® (eBioscience). Em placas de 96 poços com fundo chato foram colocados em cada poço 50 µL da solução do anticorpo de captura diluído em PBS nas concentrações especificadas para o fabricante para cada anticorpo específico. As placas foram então cobertas e incubadas a 4°C durante a noite, sendo os poços posteriormente lavados três vezes com 100 µL de solução de lavagem (PBS 1X +

Tween 0,05%) e então tratados com 50 µL de solução de bloqueio (PBS 1X + BSA 1%) por uma hora. Após mais três ciclos de lavagem foi montada a curva padrão de referência por meio de diluição seriada da proteína recombinante padrão (*standard*) de cada citocina em solução de bloqueio, sendo feitos sete pontos com um fator de diluição de 2 vezes e um volume final de 50 µL por poço. As amostras de sobrenadante a serem analisadas foram adicionadas em triplicatas de 50 µL nos demais poços e a placa incubada novamente a 4°C por uma noite. No terceiro dia, após mais três ciclos de lavagem, foram acrescentados 50 µL da solução do anticorpo de detecção seguindo-se uma incubação de uma hora a temperatura ambiente, três ciclos de lavagem, adição de 50 µL da solução de streptavidina em todos os poços e mais 30 minutos de incubação a temperatura ambiente protegida da luz. A placa foi lavada novamente, 50 µL da solução de substrato adicionados em cada poço seguido de incubação de 15 a 30 minutos sob proteção da luz. Após o período de reação da streptavidina com o substrato foram acrescentados 25 µL da solução de parada da reação e os resultados obtidos por leitura de absorbância a 450 nm em leitor de ELISA.

3.4 Análise dos níveis de acúmulo diferencial de transcritos murinos por Transcrição Reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Extração de RNA: As extrações de RNA foram realizadas com o kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion), conforme recomendações do fabricante. Trata-se de um sistema de extração orgânica seguida de imobilização do RNA em filtros de fibra de vidro, permitindo a separação do RNA em duas frações: RNA total depletado de pequenos RNAs e uma fração enriquecida com pequenos RNAs (tamanho <200 nucleotídeos). Após a recuperação dos sobrenadantes para análise de citocinas, as placas foram lavadas com PBS para remoção de células não-aderidas. Em seguida, foi adicionado o tampão de lise do *kit* diretamente na placa contendo as células, seguindo-se exatamente como recomendado pelo protocolo do fabricante. A qualidade e integridade do RNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (para as frações de RNA total) e quantificação em espectrofotômetro (NanoPhotometer®, modelo P330; Implen), avaliando a absorção em 260 nm para quantificação do RNA e a razão entre as leituras A_{260}/A_{280} para análise do grau de pureza da amostra. A integridade das frações enriquecidas com pequenos RNAs foi considerada indiretamente, de acordo com a qualidade de suas frações de RNA total correspondentes.

Tratamento com DNase: Para evitar a interferência causada pela presença de DNA genômico nas amostras de RNA durante a análise de acúmulo de transcrito por RT-qPCR, as amostras de RNA total depletado de pequenos RNAs foram submetidas a tratamento com RQ1 DNase® (Promega). Brevemente, as amostras foram tratadas com 1 U de DNase I para cada micrograma de RNA por trinta minutos a 37°C, seguindo-se a adição de solução de parada (EGTA 2 mM) e incubação a 65°C por dez minutos para inativação da reação. O RNA foi então recuperado por meio de precipitação padrão com acetato de sódio (0,3 M) e etanol (2,5V) (Sambrook & Russel, 2001), sendo o pellet final ressuspensionado em água livre de RNases. Novamente, a qualidade e integridade do RNA recuperado foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificação por leitura da absorção na região do ultra-violeta (nanofotômetro).

Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA): A síntese de cDNA a partir de mRNAs presentes nas frações de RNA total depletado de pequenos RNAs tratadas com DNase I foi realizada por meio do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems). Foi utilizado como molde 1 µg de RNA em reações de 20 µL contendo 2 µL de tampão da transcriptase reversa (10X), dNTPs 4 mM, 2 µL de iniciadores de sequências aleatórias (*Random Primers*) (10X) e 50 U da enzima transcriptase reversa MultiScribe™. A reação de síntese do cDNA ocorreu sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e aquecimento a 85°C por 5 minutos para inativação térmica da enzima.

Para a síntese de cDNA a partir de miRNAs presentes nas frações de RNA enriquecido com RNAs de pequeno tamanho foi utilizado o kit de transcrição reversa *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Invitrogen), que utiliza o sistema de quantificação haste-alça (*stem-loop*). Essa metodologia possibilita a síntese da primeira fita de cDNA a partir de moléculas tão pequenas quanto miRNAs por utilizar um sistema de iniciadores acoplados a adaptadores com uma estrutura secundária em forma de grampo de cabelo, o que aumenta a estabilidade e o comprimento final da fita de cDNA e confere maior especificidade na amplificação por PCR, também tornando desnecessário o tratamento das amostras de RNA com DNase I (**Figura 3**). A síntese do cDNA específico para cada miRNA foi realizada em tubos eppendorf independentes utilizando-se 10 ng de RNA como molde em reações de 15 µL contendo 1,5 µL de tampão da transcriptase reversa (10X), mistura de dNTPs 1 mM, 3 µL de iniciadores TaqMan® (5X), 3,8 U de inibidor de RNase e 50 U da enzima transcriptase reversa MultiScribe™. A reação de síntese do cDNA se deu sob as seguintes condições: 16°C

por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos para desnaturação da enzima.

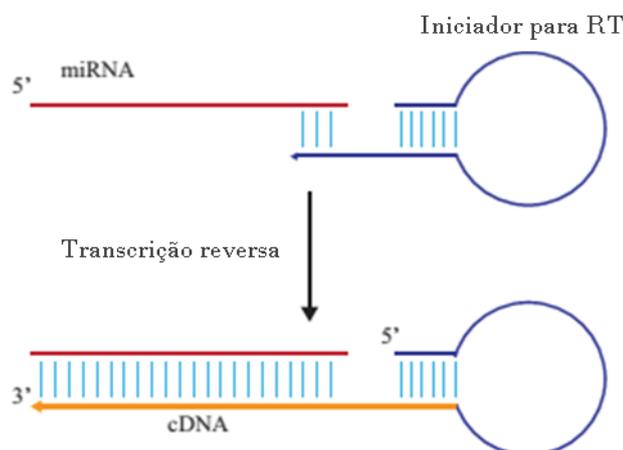


Figura 3. Sistema haste- alça para síntese de cDNA a partir de miRNA. O iniciador utilizado para a síntese da fita de cDNA por transcrição reversa (RT) apresenta uma estrutura em grampo de cabelo que confere maior estabilidade e comprimento à fita de DNA sintetizada e uma maior especificidade na quantificação por RT-qPCR. Adaptado de Pimentel *et al.*, 2014.

RT-qPCR: A quantificação do acúmulo diferencial de transcritos foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. Para análise de mRNA e Pri-miRNA foi utilizado o método de detecção por SYBR® Green, um intercalante de dupla fita de DNA fluorescente. Os ensaios foram realizados em reações de 10 µL contendo 5 µL de solução completa para qPCR com SYBR® Green 2X (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada iniciador e 2 µL da reação de síntese de cDNA diluída oito vezes. Como parâmetros dos ciclos de amplificação foram realizados uma etapa inicial a 95°C por 20 segundos para ativação da DNA polimerase e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Após os ciclos de amplificação foi realizada a análise da curva de dissociação (*melting curve*) dos produtos para verificação da especificidade da amplificação. A quantificação relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Esse método se baseia na comparação dos valores de Ct (ciclo de amplificação em que o sinal emitido atinge o limiar de detecção, *Threshold cycle*) entre as amostras dos grupos controle e experimental após normalização inicial pelo Ct de um

gene constitutivo, onde $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{grupo experimental})} - \Delta Ct_{(\text{grupo controle})}]$ e $[\Delta Ct = Ct_{(\text{gene estudado})} - Ct_{(\text{gene constitutivo})}]$. Como controle constitutivo foi escolhido o gene Rps9, que codifica uma das proteínas componentes da subunidade ribossomal 40S. Todos os pares de iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se o programa *Primer3*, disponível no endereço eletrônico <http://primer3.ut.ee/>, e analisados quanto a formação de estruturas secundárias e dímeros por meio do programa OligoAnalyzer, disponível no endereço eletrônico <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. As sequências dos iniciadores utilizados se encontram na **Tabela 1**.

Tabela 1. Iniciadores para genes murinos utilizados nos ensaios de RT-qPCR com SYBR® Green.

Gene	Iniciadores	Sequência (5' → 3')
Rps9	RPS9 S	CTATTCACCATGCCCGTGTG
	RPS9 As	GAGAGTCCAGGCGAACAATG
Pri-miR-155	Pri-155 S	ACTAGCACTCACATGGAACAAATGG
	Pri-155 As	CCAGGTTATGACTAGCACATTAAATGATAG
Pre-miR-155	Pre-155 S	GCTAATTGTGATAGGGGTTTTGG
	Pre-155 As	GTTAATGCTAACAGGTAGGAGTC
TNF α	TNF α S	GTACCTTGTCTACTCCCAGGTTCTCT
	TNF α As	GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC
Ship1	SHIP1 S	GGTGGTACGGTTTGGAGAGA
	SHIP1 As	ATGCTGAGCCTCTGTGGTCT
Socs1	SOCS1 S	ACTTCTGGCTGGAGACCTCA
	SOCS1 As	CCCAGACACAGGCTGCTACA
Socs3	SOCS3 S	ATTCACCCAGGTGGCTACAG
	SOCS3 As	GCCAATGTCTTCCCAGTGTT
Hgamma2	HGMA2 s	GGAGGAGCGAAACCGAAATC
	HGMA2 As	AGAGAAGGGAGGGAGAGAGG

S: senso; As: antissenso.

Já o acúmulo diferencial de miRNAs foi avaliado pelo sistema de detecção TaqMan®. Diferentemente do modelo por SYBR® Green, o sistema TaqMan se baseia na utilização de sondas compostas por uma sequência específica para o fragmento alvo, acoplada a duas moléculas, conhecidas como *reporter* e *quencher*, ligadas às extremidades opostas da sonda. O *reporter* é a molécula capaz de emitir sinal fluorescente de modo constante. Já o *quencher* é uma molécula capaz de absorver o sinal liberado pelo *reporter* quando a distância entre eles é pequena. Durante a etapa de anelamento a sonda se liga à sequência alvo e com a extensão realizada pela polimerase ocorre a clivagem da sonda devido a atividade de exonuclease 5' → 3' da enzima, o que

afasta o *reporter* do *quencher*. Assim, a fluorescência emitida pelo *reporter* pode ser detectada pelo aparelho (**Figura 4**). Os ensaios foram realizados em reações de 10 µL contendo 5 µL de solução completa para qPCR TaqMan® 2X (Applied Biosystems), 0,5 µL de Ensaio TaqMan® Pequenos RNAs (20X), que contém os iniciadores e a sonda específicos, e 1 µL da reação de síntese de cDNA. A quantificação relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo escolhido como gene constitutivo o RNU6, um snRNA componente do spliceossomo. Os microRNAs estudados são listados na **Tabela 2**.

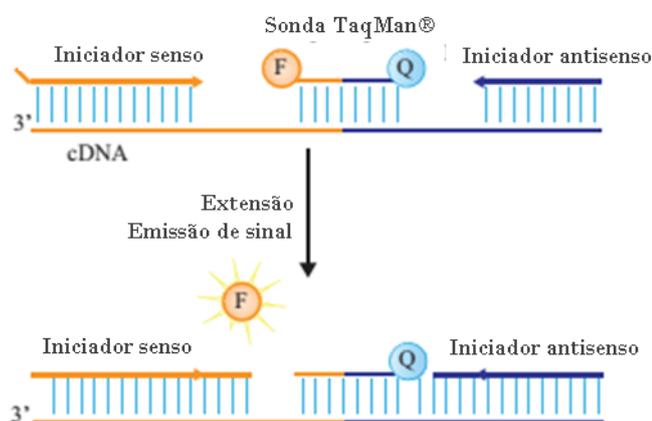


Figura 4. Sistema de detecção TaqMan® em RT-qPCR. As sondas TaqMan apresentam um fluoróforo (F) e um *quencher* (Q) em extremidades opostas. Enquanto próximos, o quencher absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo, impedindo que os sensores recebam o sinal. Durante a extensão realizada pela DNA polimerase a sonda é clivada devido à atividade de exonuclease da enzima, liberando o fluoróforo e permitindo a emissão do sinal, que será proporcional à quantidade de cópias do cDNA sintetizadas naquele ciclo. Adaptado de Pimentel *et al.*, 2014.

Tabela 2. miRNAs avaliados por RT-qPCR com uso de sondas TaqMan®.

miRNA	Sequência do miRNA
miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG
miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-155-5p	UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU
miR-155-3p (*)	CUCCUACCUGUUAGCAUUAAC
miR-455-3p	GCAGUCCACGGGCAUUAACAC

(*): miRNA maduro antes classificado como fita estrela.

3.5 Avaliação do modelo de transfecção *in vitro* de inibidores de microRNA

Para o estudo do papel funcional de miRNAs no processo de regulação da resposta imune foi escolhido o método de perda de função através do uso de inibidores de microRNA (antimiR). No entanto, por serem utilizadas células primárias de camundongo nos ensaios em vez de células de cultura já padronizadas, torna-se necessária a avaliação inicial do modelo de transfecção a ser usado para sua validação e padronização.

Avaliação da eficiência da transfecção: foi utilizado o antimiR Cy3TM Dye-Labeled Anti-miRTM Negative Control #1 (Ambion), um antimiR com sequência aleatória (*scramble*, não tendo assim complementariedade e efeito sobre nenhum miRNA endógeno) marcado com o fluoróforo Cy3TM, e Lipofectamine® 3000 (Invitrogen) como agente carreador. O antimiR foi incubado em diferentes concentrações na presença de Lipofectamine® 3000 por 5 minutos à temperatura ambiente em meio Opti-MEM® (Gibco) para formação de complexos lipossomo catiônico-AntimiR. Em seguida, 50 µL foram adicionados em placas de cultura de células de 24 poços contendo 2×10^5 macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de Balb/c em 1 mL de meio RPMI + SFB 10% por poço. As concentrações finais de antimiR por poço foram 5 nM, 50 nM e 100 nM. As placas foram mantidas em incubadora de CO₂ (37° C, 5% CO₂) por 72 horas e observadas em microscópio invertido com sistema de captura de fluorescência (Axio Observer Z1 – Carl Zeiss Microscopy) em intervalos de 12 horas para obtenção de imagens. As imagens obtidas foram analisadas no programa ZEN (Carl Zeiss Microscopy) e a comparação entre microscopias de campo claro e fluorescência foi usada para identificação e contagem de células positivas para Cy3® como forma de quantificar a eficiência da transfecção, expressa em porcentagem de células positivas. Para cada condição foram obtidas imagens de cinco campos diferentes. Como controles foram usados poços contendo células não transfectadas, células incubadas somente com Lipofectamine® 3000 e células transfectadas com antimiR não marcado.

Confirmação da eficácia do modelo de perda de função: foram realizados ensaios de transfecção de dois controles: Anti-miRTM miRNA Inhibitor Negative Control #1 (Ambion), controle negativo de anti-miR de sequência aleatória (*scramble*) para análise dos efeitos causados pelo sistema de transfecção; e Anti-miRTM hsa-let-7c miRNA Inhibitor Positive Control (Ambion), controle positivo de antimiR para perda

de função do miRNA let-7c. O uso do controle anti-miR-let7c permite a avaliação da eficácia através da quantificação do acúmulo de transcritos de Hgma2, que codifica para uma proteína de cromatina não histônica e cujo mRNA é um alvo validado de let-7c.

Em meio Opti-MEM® os inibidores foram incubados na presença de Lipofectamine® 3000 por 5 minutos à temperatura ambiente e então, 250 µL foram adicionados em placas de cultura de células de 6 poços contendo 2×10^6 BMDMs de Balb/c em 2 mL de meio RPMI + SFB 10% por poço, e o anti-miR na concentração final de 50 nM. Após serem mantidas em incubadora de CO₂ (37° C, 5% CO₂) por 48 horas as placas foram lavadas com PBS estéril à temperatura ambiente e 1 mL de Trizol adicionado em cada poço para lise das células. Ao lisado celular foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa e centrifugação (12.000 x g /15 min/ 4°C) para separação de fases. A fase aquosa foi recuperada, misturada a 500 µL de isopropanol e, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, o RNA total foi recuperado por centrifugação (12.000 x g /10 min/ 4°C). O sobrenadante foi então descartado e o sedimento de RNA lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo novamente centrifugado (7.500 x g /5 min/ 4°C). O etanol foi descartado e as amostras mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos para secagem, sendo ao final ressuspensas em água livre de RNase. O RNA obtido foi submetido às etapas de tratamento com DNase I, síntese da primeira fita de cDNA e RT-qPCR descritas acima. O acúmulo diferencial de transcritos de Hgma2 foi estabelecido em relação aos níveis presentes em células não transfectadas.

3.6 Análise e apresentação de dados

Ao analisar individualmente os resultados das replicatas independentes pode ser observado sempre o mesmo padrão de modulação no acúmulo dos genes avaliados, indicando um comportamento definido em resposta a *P. brasiliensis*. Porém, as grandes variações na intensidade das induções entre os experimentos dificultam o agrupamento dos dados para análises estatísticas apropriadas. Dessa forma, foi escolhido apresentar no corpo do trabalho os resultados referentes a um experimento representativo das demais replicatas, o que torna inapropriado o tratamento estatístico dos dados. Os resultados obtidos para todos os experimentos independentes são apresentados no **Apêndice** no final do trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modulação dos níveis de miRNAs de macrófagos murinos suscetíveis ou resistentes em resposta à interação com *P. brasiliensis*.

O estudo da participação de microRNAs na regulação do processo de resposta imune inata foi realizado por meio de ensaios de interação *in vitro* entre macrófagos peritoneais e leveduras do isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis*. As linhagens de camundongo A/J e B10.A foram escolhidos, respectivamente, como modelos de resistência e suscetibilidade à PCM. Devido às dificuldades em utilizar as duas linhagens ao mesmo tempo em um mesmo experimento decorrentes de problemas com a disponibilidade de animais, diferentes inóculos de Pb18 tiveram que ser usados entre os ensaios com cada linhagem, dificultando uma comparação quantitativa direta entre os valores das quantificações realizadas. Assim, as comparações dos níveis de miRNAs entre as duas linhagens foram realizadas principalmente em termos de comportamento e tendências qualitativas.

Primeiramente, para confirmação da ativação dos macrófagos, a resposta imune foi analisada pela quantificação da secreção de algumas citocinas pelos macrófagos após 6h de interação com leveduras de Pb18 (macrófago:levedura de 2:1). Conforme mostrado na **Figura 5**, os altos níveis observados tanto de citocinas pró- inflamatórias (TNF α e interleucina 6 - IL-6), quanto anti-inflamatórias (interleucina 10 - IL-10), assim como o aumento na produção da quimiocina MCP-1, indicam a montagem de uma resposta típica a Pb18, conforme descrito na literatura (Medeiros *et al.*, 2015, Feriotti *et al.*, 2013, Sousa-Silva *et al.*, 2015, Calich e Kashino, 1998).

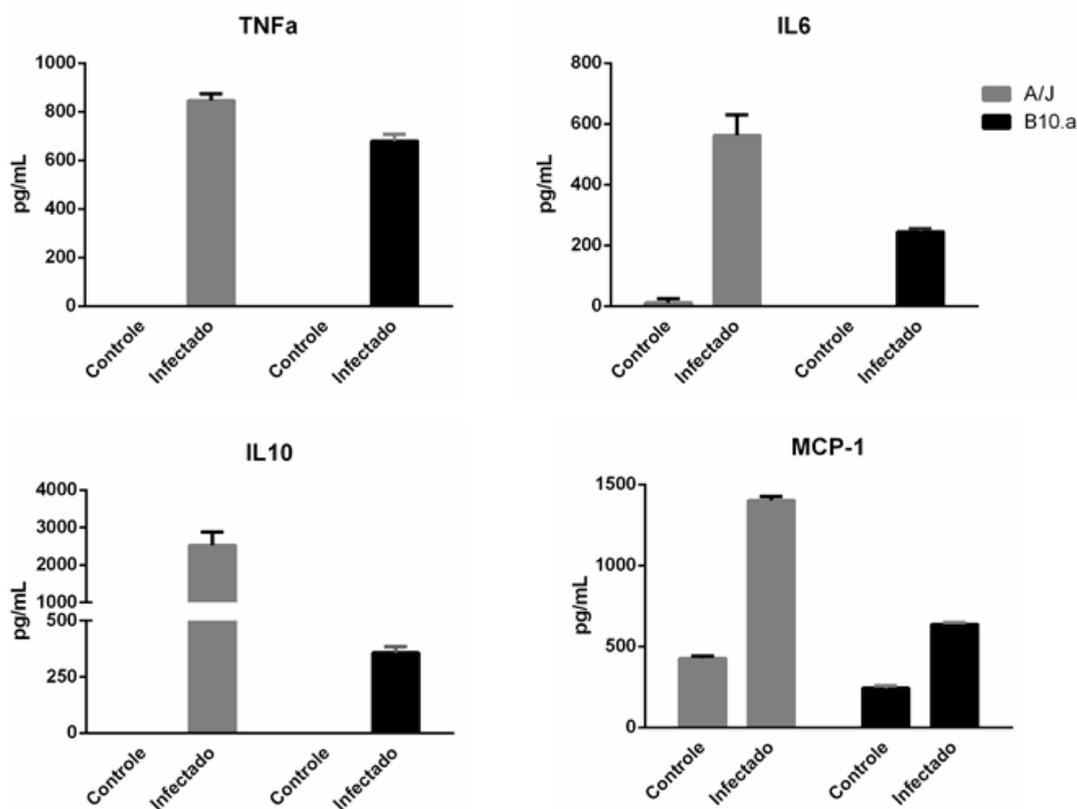


Figura 5. Níveis de citocinas após interação macrófago x *P. brasiliensis* quantificados por ELISA para as duas linhagens avaliadas (A/J e B10.A). Resultados representativos de três experimentos independentes. Barras de erro representam desvio padrão de triplicatas técnicas.

Tendo comprovado a ativação dos macrófagos nos ensaios de infecção por meio da quantificação de citocinas, o acúmulo de miRNAs foi quantificado por RT-qPCR com uso de sondas TaqMan e os resultados são mostrados na **Figura 6**. Os miRNAs avaliados foram miR-125b-5p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p e miR-455-3p. A seleção destes miRNAs deu-se por sua conhecida participação em diferentes etapas do processo de regulação da resposta imune de maneira geral (revisado em Bi *et al.*, 2009, Alam e O’Neil, 2011) e também, principalmente, por seu destaque nos poucos trabalhos descrevendo o envolvimento destes reguladores na resposta imune a fungos (Monk *et al.*, 2010 e Das Gupta *et al.*, 2014). Foi observado um aumento de aproximadamente duas a oito vezes no acúmulo de transcritos de todos os miRNAs avaliados na resposta a *P. brasiliensis*, indicando a possível participação desses miRNAs na regulação da resposta imune a este fungo. O aumento nos níveis de acúmulo de miRNAs descrito acima está de acordo com o observado na literatura, uma vez que é atribuído a estas moléculas o papel de ajuste fino de um dado processo, onde

pequenas variações nos seus níveis podem ter consequências importantes na tradução e efeito nos níveis de seus alvos. Quanto à comparação entre as linhagens A/J e B10.A não foi possível observar um padrão claramente distinto que permita a associação dos miRNAs estudados com o estabelecimento de respostas distintas entre as duas linhagens nas fases iniciais da interação com o fungo. Quando comparado com os demais miRNAs dentro de cada linhagem o miR-132-3p apresenta, com exceção do miR-155-5p, um aumento aparentemente mais pronunciado em B10.A do que em A/J, o que pode indicar uma maior participação desse miRNA em macrófagos da linhagem suscetível. Entretanto, esta diferença nos níveis do miR-132-3p entre as duas linhagens precisará ser confirmada com a realização de experimentos que permitam a realização das devidas análises estatísticas para comparações direta dos resultados.

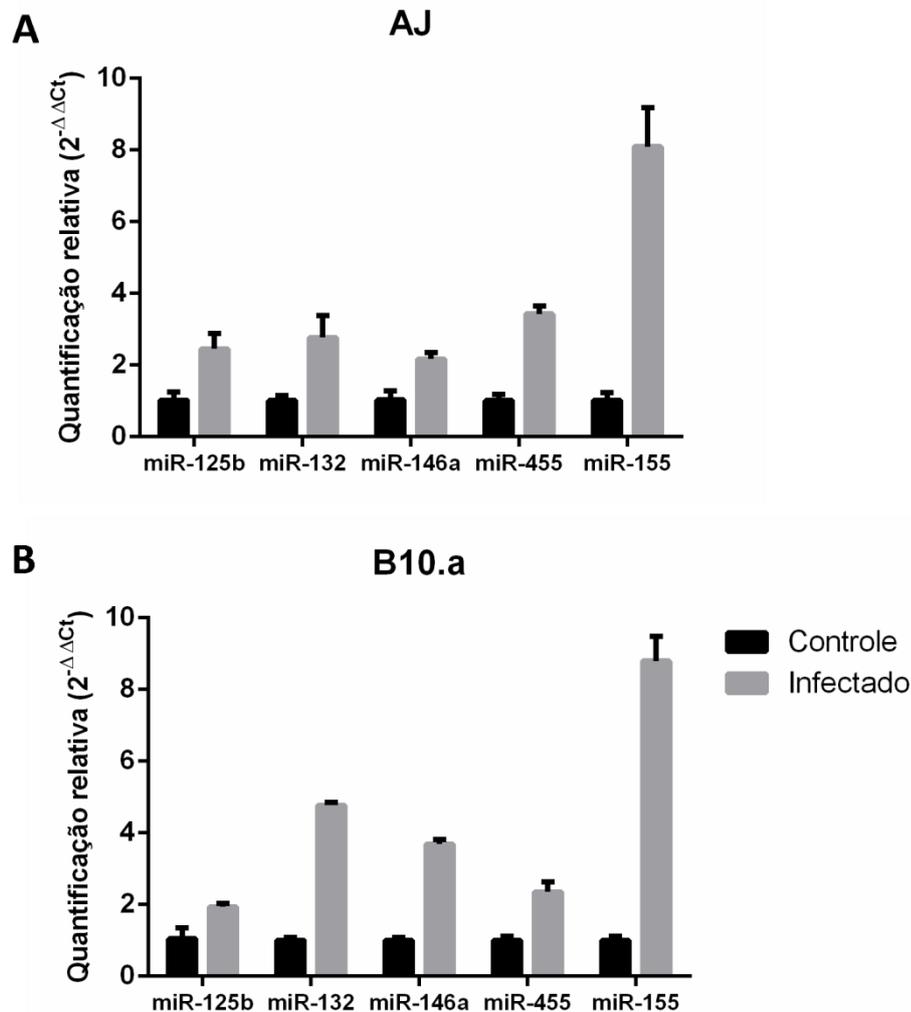


Figura 6. Indução dos níveis de miRNAs em macrófagos de camundongos das linhagens (A.) A/J e (B.) B10.A em resposta a seis horas de interação com *P. brasiliensis*. Resultados

obtidos por RT-qPCR com uso de sondas TaqMan® e representativos de três experimentos independentes. Barras de erro representam desvio padrão de triplicatas técnicas.

A escolha direcionada de miRNAs já descritos na participação da regulação da resposta imune pode justificar a ausência de padrões divergentes. Sendo assim, para uma melhor descrição e entendimento da possível participação de miRNAs no estabelecimento dos diferentes padrões de resistência ou suscetibilidade na PCM, será importante a realização de experimentos de larga escala que permitam a análise do acúmulo diferencial de centenas de miRNAs entre as linhagens. Assim, no contexto desta dissertação e com base nos resultados mostrados na **Figura 6**, foi escolhida apenas a linhagem A/J para continuação das análises (em pequena escala).

4.2 Acúmulo diferencial de transcritos das várias etapas da biogênese de miR-155 e alguns de seus alvos em resposta a *P. brasiliensis*

Ainda dentro das análises do acúmulo diferencial de miRNAs, ressaltamos o aumento de cerca de oito vezes observado para o miRNA miR-155-5p, enquanto para os demais miRNAs analisados o aumento foi cerca de 2 a 4 vezes. Essa prevalência de miR-155-5p entre os miRNAs com maior acúmulo é compatível com diversos relatos na literatura quando estudada a resposta imune inata a diferentes patógenos (*Listeria monocytogenes* – Schnitger *et al.*, 2011; *Mycobacterium tuberculosis* – Wang *et al.*, 2013; *Candida albicans* – Monk *et al.*, 2010) sugerindo que, ainda que possa indicar uma resposta imune genérica a diversos micro-organismos, esse miRNA possui papel importante em sua regulação. Outro dado da literatura refere-se à característica multifuncional do miR-155, com participação em diversos processos biológicos normais ou patológicos, com ênfase para seu papel crítico na modulação da resposta imune inata e adaptativa (Faraoni *et al.*, 2009; O’Connell *et al.*, 2007 Schulte *et al.*, 2013), o que é de particular interesse para o tema desenvolvido nesta dissertação. Assim, um estudo mais aprofundado desse miRNA foi realizado.

Acúmulo do pri- e pre-miR-155. Primeiramente foi analisado o efeito da infecção de macrófagos peritoneais da linhagem murina A/J por Pb18 sobre o acúmulo de precursores das diferentes etapas no seu processo de biogênese. O precursor de miR-155 (pre-miR-155) contendo as duas fitas maduras miR-155-5p e miR-155-3p se localiza em uma região com estrutura secundária em grampo encontrada no terceiro éxon do *miR-155 host gene* (MIR155HG), antigamente nomeado *B-Cell Integration*

Cluster (BIC) (Tam, W., 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2002), sendo o miRNA primário (pri-miR-155) o transcrito de MIR155HG. O aumento nos níveis de pri-miR-155 observado em resposta a *P. brasiliensis* dá indícios de que os aumentos de miR-155 maduro devem-se a uma maior transcrição do gene MIR155HG e não somente a um maior grau de processamento de seus precursores, um resultado importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na dinâmica de regulação dos níveis desse miRNA dentro da célula (**Figura 7.A**). No entanto, os níveis de pri-miR-155 não devem ser utilizados como medida direta dos níveis de miR-155 maduro. Como demonstrado por Eis *et al.* (2005) e Slezak-Prochazka *et al.* (2013), em linfomas humanos de células B, há um grande acúmulo do transcrito processado de MIR155HG (após splicing, poliadenilação e adição de cap) no citoplasma, onde não pode ser utilizado pelo complexo nuclear Drosha/DGCR8 para gerar miR-155 maduro, mas que é rotineiramente quantificado como pri-miR-155 juntamente com os transcritos presentes no núcleo. Assim, as taxas do miR-155 e outros miRNAs dependem de uma complexa regulação de sua expressão nos diversos níveis: transcrição, processamento, transporte núcleo-citoplasma e decaimento.

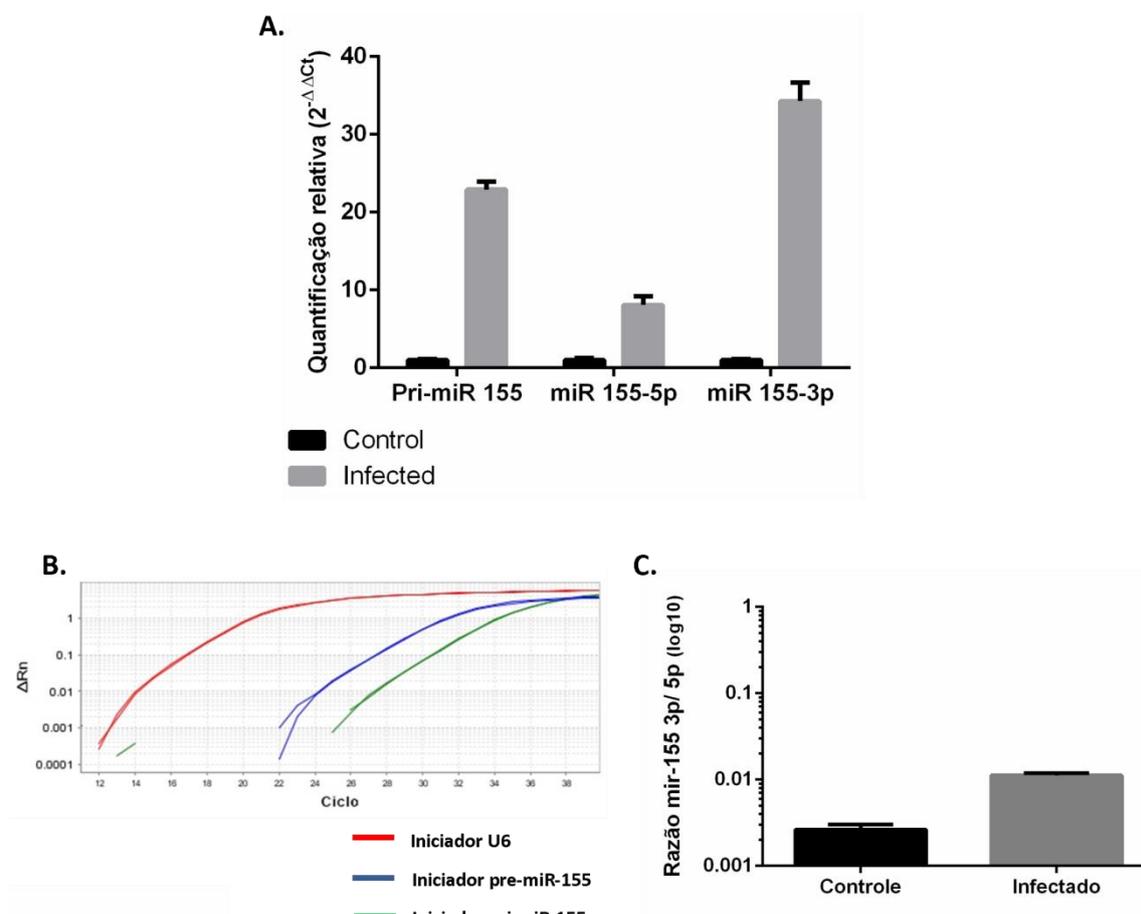


Figura 7. Variação no acúmulo de transcritos de diferentes etapas no processo de biogênese de miR-155 de macrófagos peritoneais murinos de A/J em resposta à interação com *P. brasiliensis* por seis horas. (A.) Quantificação relativa dos níveis do microRNA primário – pri-miR-155 – e as suas duas fitas maduras. (B.) Curvas de amplificação para dois iniciadores (Pri-miR-155 e Pre-miR-155) utilizando-se a fração enriquecida com pequenos RNAs da uma mesma amostra. U6: curva de amplificação do iniciador de RNU6. (C.) Razão entre os níveis das duas fitas maduras de miR-155 antes e após interação. RT-qPCR com uso de sondas TaqMan® para as fitas maduras e SybrGreen® para o miRNA primário. Resultados representativos de três experimentos independentes. Barras de erro representam desvio padrão de triplicatas técnicas.

Seguindo a via de processamento para geração de miR-155 maduro, foi realizada neste trabalho uma tentativa de quantificação do precursor do miR-155, o pre-miR-155. Como o pre-miR-155 faz parte do transcrito primário, o pri-miR-155, iniciadores desenhados para amplificação do pre-miRNA inevitavelmente amplificariam o pri-miRNA concomitantemente. Para tentar contornar esse problema foi realizado um teste utilizando como molde para a síntese de cDNA a fração de RNAs enriquecidas em pequenos RNAs, uma vez que tendo sido realizada a separação de frações com o kit utilizado esta deveria ser constituída majoritariamente de moléculas com até 200 nt, e quantificação por RT-qPCR com SYBR® Green (**Figura 7.B**). Tanto nas reações contendo iniciadores para pri-miR-155 quanto para pre-miR-155 foi observado amplificação, o que indica a presença das duas formas também na amostra enriquecida em pequenos RNAs. O menor valor de Ct observado na curva de amplificação com os iniciadores de pre-miR-155 pode ser resultado da influência do pri-miR-155 também servir como molde para a amplificação com esses iniciadores, revelando que por meio desta análise não podemos inferir sobre os níveis de acúmulo desse produto da via de biogênese do miRNA maduro. Ainda que permita apenas uma análise semi-quantitativa, uma abordagem possível para a avaliação dos três componentes na biogênese de miR-155 é a realização de ensaios de *northern blot*, uma vez que a marcação e identificação das moléculas ocorre após a sua separação por tamanho, uma ótima forma de diferenciar pri-miRNAs, pre-miRNAs e miRNAs maduros.

Acúmulo do miR-155 maduro – fitas 5p e 3p. Como descrito acima na **Figura 6**, miR-155-5p apresentou o maior acúmulo em resposta à infecção dentre as

denominadas fitas maduras guia dos demais miRNAs testados neste trabalho. Porém, um acúmulo relativo extremamente mais pronunciado pode ser observado para o miR-155-3p, anteriormente chamado miR-155*, como mostra a **Figura 7.A**. Além da intrigante intensidade de acúmulo de miR-155-3p, outro ponto importante é a mudança ocorrida quando calculada a razão entre os níveis dos dois miRNA maduros (miR-155-3p/ miR-155-5p) dentro dos grupos infectado e não infectado (**Figura 7.C**). Essa mudança no equilíbrio entre os níveis das duas fitas favorecendo um acúmulo de miR-155-3p é importante por sugerir, juntamente com seu acúmulo pronunciado, um papel relevante para esse miRNA maduro na regulação da resposta a *P. brasiliensis*. É importante apontar que, mesmo com esse grande aumento em resposta a *P. brasiliensis*, os níveis de miR-155-3p permaneceram sempre muito abaixo dos observados para sua fita irmã, como evidenciado pelas razões sempre menores que 1. Recentemente, dados da literatura têm descrito cada vez mais a participação da fita estrela ou passageira de muitos miRNAs na regulação dos níveis de diversos mRNAs nas células, demonstrando um efeito biológico significativo no ajuste fino de diversos processos celulares por essas fitas antes consideradas sem função (Okamura *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2011). É importante ter em mente que os dois miRNAs maduros são transcritos e processados como um único RNA até a fase de dímero. Neste sentido, as diferenças em seus níveis na célula devem-se principalmente a mecanismos de degradação preferencial de miR-155-3p, sendo a mudança na razão entre a fita 3p (fita passageira) com relação à fita 5p (fita guia) o resultado de alterações dinâmicas desse processo de degradação. Sendo assim, uma das possíveis explicações para a alteração da razão 3p:5p pode ser uma maior estabilidade da fita estrela, o que pode ser o resultado do mecanismo de proteção de microRNA mediada por alvo (do inglês *Target-mediated microRNA protection - TMMP*) (Chatterjee *et al.*, 2011). Esse modelo descreve o mecanismo através do qual um aumento na disponibilidade de sequências alvo de um miRNA, por exemplo por meio de um maior acúmulo de algum de seus mRNAs alvos, diminui sua taxa de degradação quando carregado no complexo miRISC e ligado ao mRNA, protegendo-o da ação de exorribonucleases endógenas (Chatterjee *et al.*, 2011). Esse fenômeno foi também explorado por Kang *et al.* (2013) para explicar aumentos mais pronunciados no acúmulo da fita estrela do que da fita guia, uma vez que os autores constataram um efeito muito mais brando no acúmulo das fitas guias quando a disponibilidade de sítios alvo para estas é aumentada pela transfeção de transcritos sintéticos contendo várias cópias dos sítios alvo para esses miRNAs do que o aumento relativo no acúmulo

observado para sua fita irmã. Esses autores discutem então que a ocorrência desse fenômeno seja devido à existência de um limiar no número de sequências alvo disponíveis a partir do qual a TMMP possui menor influência na estabilidade do miRNA, uma vez que as fitas dominantes tendem a ter mais alvos e participar de redes de regulação mais amplas (Yang *et al.*, 2011).

A alteração da razão miR-155-3p/ miR-155-5p mostrada na **Figura 7.C** também foi observada em macrófagos murinos após interação com *Cryptococcus neoformans* em nosso grupo (Derengowski, L. S., dados ainda não publicados). Comportamento semelhante pode ser encontrado no trabalho de Zhou *et al.* (2010), no qual os autores ainda propõem e validam IRAKM como um alvo de miR-155-3p. Com relação a alvos de miR-155-3p, Mycko *et al.* (2015), em um estudo recentemente publicado, identificaram mais dois alvos regulados por esse miRNA: Dnaja2 e Dnajb1, envolvidos no controle da resposta imune como reguladores negativos da diferenciação de linfócitos Th17.

Dificuldades inerentes à predição de alvos para miRNAs*, existência de poucos alvos descritos na literatura e problemas com o desenho de iniciadores para IRAKM impediram a análise de acúmulo de alvos do miR-155-3p para verificação da participação de TMMP sobre os resultados aqui apresentados, sendo necessária a realização de mais experimentos para melhor entender as causas e importância da mudança na razão entre as duas fitas irmãs em resposta à infecção por *P. brasiliensis*. Os níveis de Dnaja2 e Dnajb1 não foram avaliados por terem sido essas moléculas descritas como alvos de miR-155-3p já durante o processo de escrita do presente trabalho, sendo no entanto importantes objetos de estudo para as etapas futuras.

Acúmulo de mRNAs alvos de miR-155-5p. O principal mecanismo de ação de miRNAs é o recrutamento de um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) para regulação negativa da expressão de um mRNA alvo, seja levando à degradação imediata do transcrito ou impedindo a sua tradução. Assim, como forma de verificar a participação de miR-155 na resposta de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem A/J à interação com leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, após 6h de interação, foi medido o acúmulo de transcritos de alguns mRNAs propostos e alguns já validados experimentalmente como alvos de miR-155-5p: Fator de necrose tumoral α (TNF α), Inositol polifosfato 5-fosfatase contendo o domínio SH2 1 (SHIP1), Supressores da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3), todos estes componentes de vias de sinalização e regulação da resposta imune. Como apresentado

na **Figura 8**, observa-se que os mRNAs alvos testados apresentaram diferentes perfis quanto aos respectivos acúmulos diferenciais em resposta à infecção.

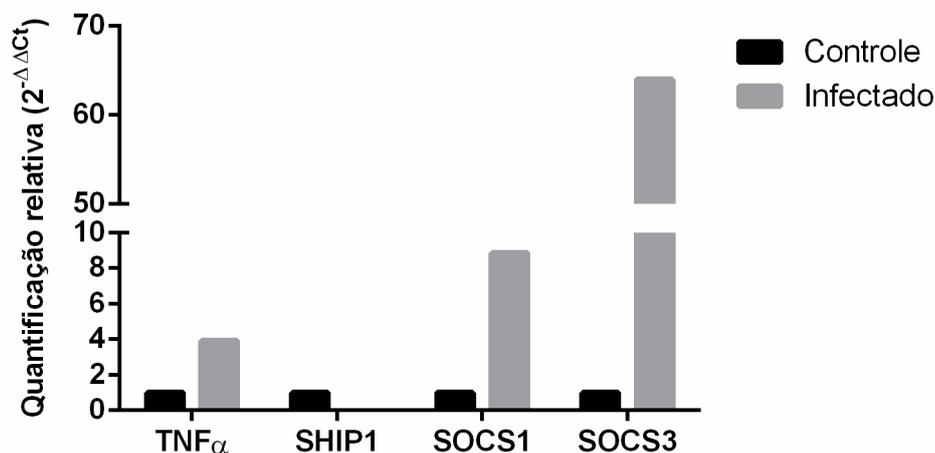


Figura 8. Acúmulo diferencial de transcritos regulados por miR-155-5p. Macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem A/J em resposta à interação de seis horas com *P. brasiliensis* foram avaliados quanto aos níveis de quatro mRNAs preditos como alvos, conforme descrito na literatura: Fator de necrose tumoral α (TNF α), Inositol fosfatase 1 com domínio SH2 (SHIP1), Supressores da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3). Resultados obtidos por RT-qPCR com uso de SYBRGreen® e representativos de três experimentos independentes.

A análise dos níveis de mRNA de TNF α , que codifica uma importante citocina pró-inflamatória, mostra um aumento de acúmulo do transcrito em resposta à interação com as leveduras de Pb18. Ainda que o mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, trabalhos descritos na literatura relatam uma maior expressão de TNF α como resultado de um aumento na estabilidade do transcrito ou aumento da eficiência de sua tradução, em resposta ao acúmulo de miR-155-5p. Ensaio de luciferase mostraram que a inserção de mutações em sequências ricas em AU da região 3'UTR do mRNA de TNF α levou a um menor acúmulo e a uma diminuição da resposta a variações nos níveis de miR-155-5p. Ainda não está definido, porém, se a esse sítio 3'UTR se liga o próprio miRNA diretamente ou se miR-155-5p age de maneira indireta, regulando efetores que por sua vez se ligariam a estas sequências do 3'UTR do mRNA TNF α (Bala *et al.*, 2011; Tili *et al.*, 2007). De toda forma, aumentos nos níveis de miR-155-5p levam a

uma maior meia-vida do mensageiro, resultando em um maior acúmulo do transcrito (**Figura 8**) e aumento na tradução da proteína, como mostrado pelos níveis de citocina no sobrenadante da cultura **Figura 5**.

O único mRNA alvo analisado a sofrer uma diminuição em seus níveis foi SHIP1, com redução de no mínimo 50% quando considerados os três experimentos independentes. SHIP1, que codifica a enzima inositol fosfatase, exerce uma regulação negativa da resposta imune através da inibição da via das fosfatidilinositol-3 quinases (PI3K), levando a uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da fagocitose por macrófagos (Sly *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2001). Em acordo com os resultados aqui obtidos com *P. brasiliensis*, O'Connell *et al.* (2009) e Cremer *et al.* (2009) demonstraram a diminuição dos níveis tanto do mRNA quanto da proteína de SHIP1 em resposta a aumentos de miR-155-5p, tanto através de ensaios de inibição e indução do miRNA quanto em resposta a um patógeno (*Francisella tularensis* – Cremer *et al.*, 2009).

SOCS1 e SOCS3 tiveram um aumento de no mínimo 8 e 5 vezes, respectivamente, em seu acúmulo, considerando os três experimentos independentes realizados. Ainda que miR-155-5p seja relacionado a uma inibição da expressão desses alvos, Lu *et al.* (2009), além de validarem experimentalmente SOCS1 como alvo de miR-155, demonstraram que entre células Treg com expressão normal ou deficiente de miR-155 não há variação no acúmulo de seu mRNA, mas que o silenciamento relaciona-se a menores níveis de tradução da proteína decorrente da ação do miRNA. Zhai *et al.* (2013) demonstraram o efeito de miR-155-5p sobre os níveis tanto do mRNA quanto da respectiva proteína de SOCS3 em ensaios de ganho e de perda de função desse miRNA. É importante considerar, no entanto, que todas essas observações foram realizadas em um cenário mais controlado, onde apenas os níveis do miRNA estudado eram alterados. Já em um contexto mais complexo, como na resposta a um micro-organismo, há o envolvimento simultâneo de diferentes miRNAs juntamente com a regulação da expressão em diversos níveis realizada por outros mecanismos moleculares, sendo possivelmente essa intervenção de outros reguladores e ativadores os responsáveis pelos altos níveis de SOCS1 e SOCS3 mesmo em um cenário de acúmulo pronunciado de miR-155-5p. Como o nome do gene sugere, SOCS 1 e 3 participam do controle da inflamação exercendo uma regulação negativa da resposta celular a citocinas, especialmente interferon γ (IFN- γ) e interleucina 6 (IL-6), diminuindo a ativação de macrófagos em um sistema de retroalimentação negativa

(revisado por Linossi *et al.*, 2013). Um maior acúmulo de transcritos desses efetores pode ser observado em macrófagos após interação com alguns patógenos, como *Streptococcus pyogenes* e *P. brasiliensis* (Wu *et al.*, 2015; Feriotti *et al.*, 2013) em consonância com os resultados aqui apresentados, servindo como um importante mecanismo no balanço da resposta inflamatória, que quando muito exacerbada pode passar a ser prejudicial ao organismo.

Como evidenciado por SOCS1 e SOCS3, a quantificação do acúmulo de transcritos alvos é uma medida muito indireta da função de um miRNA. A proposição de um alvo passa por várias etapas, desde a predição por ferramentas de bioinformática a experimentos de perda e ganho de função e ensaios de luciferase, sendo o efeito de um miRNA sobre seu alvo caracterizado em uma condição onde a única variável é a quantidade do miRNA específico sob estudo e mesmo nesses casos a simples quantificação de mRNA de alvos não oferece uma resposta completa, uma vez que existem diferentes possibilidades de ação como a manutenção dos níveis de mRNA mas a diminuição dos níveis de proteína, como no caso de SOCS1. Em cenários com a ocorrência de diversos eventos simultâneos, como na resposta a patógenos, os efeitos de um miRNA sobre um alvo direto podem não ser tão evidentes, mas sua participação como agente exercendo um ajuste fino para manutenção de estados de equilíbrio pode ter importante papel. Além disso, como exemplificado por Lu *et al.* (2015) em um estudo sobre a interação mRNA-miRNA, um miRNA poderá agir de formas diferentes em relação à regulação de um alvo em uma maneira dependente do contexto e tipo celular considerados.

4.3 Participação dos receptores de membrana TLR4 e Dectina-1 na indução de miR-155

Visando entender um pouco sobre os mecanismos de indução da expressão de miR-155, BMDMs de camundongos C57Bl/6 nocaute para os genes de TLR4 ou Dectina-1 foram infectados com leveduras de Pb18. A interação ocorreu por um período de 6h após o qual as células murinas foram lisadas para extração de RNA e análise dos níveis de miR-155-5p em relação aos respectivos controles não tratados. Como apresentado na **Figura 9**, todos os grupos apresentaram um maior acúmulo do miR-155-5p em relação a seus controles, em resposta à *P. brasiliensis*. Porém, na ausência de TLR4 ou Dectina-1 ocorreu um aumento muito mais acentuado que o observado para macrófagos de animais do tipo selvagem. Esses resultados sugerem a participação dos

receptores em um mecanismo de regulação negativa de miR-155 em *P. brasiliensis* sem deixar claro, no entanto, se essa regulação acontece por atuação direta das vias de sinalização controladas por esses receptores sobre os níveis de transcrição, processamento e/ou degradação do miRNA ou se acontece de maneira indireta através de modulação de indutores/inibidores. A manutenção do acúmulo de miR-155-5p com a deleção dos receptores, no entanto, indica que nem Dectina-1, nem TLR4 são responsáveis pela indução do miRNA em resposta a *P. brasiliensis*. É importante considerarmos que apenas um tempo precoce da interação foi avaliado e também a linhagem do camundongo empregada neste estudo.

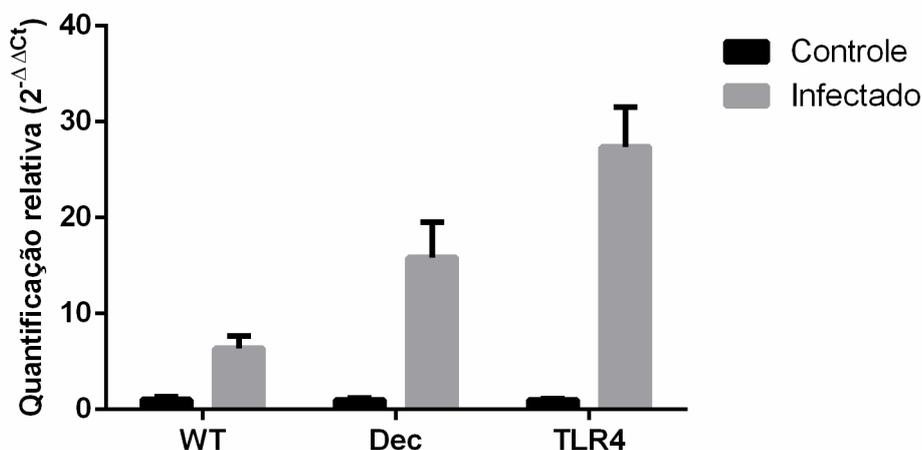


Figura 9. Participação de receptores de membrana na indução do acúmulo de miR-155-5p. Níveis do miRNA foram analisados após seis horas de interação entre BMDM (2×10^6 células) de camundongos da linhagem C57Bl/6 e leveduras de Pb18 (macrófago:levedura de 2:1). WT: Selvagem; Dec: *Knockout* Receptor de Dectina-1 ; TLR4: *Knockout* TLR4. Resultados obtidos por RT-qPCR com uso de sondas TaqMan® e representativos de dois experimentos independentes. Barras de erro representam desvio padrão de triplicatas técnicas.

Um importante regulador negativo de miR-155 já descrito na literatura é a interleucina 10. Essa importante citocina anti-inflamatória age diminuindo a taxa de transcrição de MIR155HG através da ativação da via de sinalização por STAT3 (McCoy *et al.*, 2010). Alguns estudos já demonstraram o papel de Dectina-1, um importante PRR no reconhecimento de fungos, na produção de IL-10. Uma diminuição nos níveis de IL-10 liberada por células dendríticas de camundongos B10.A em resposta

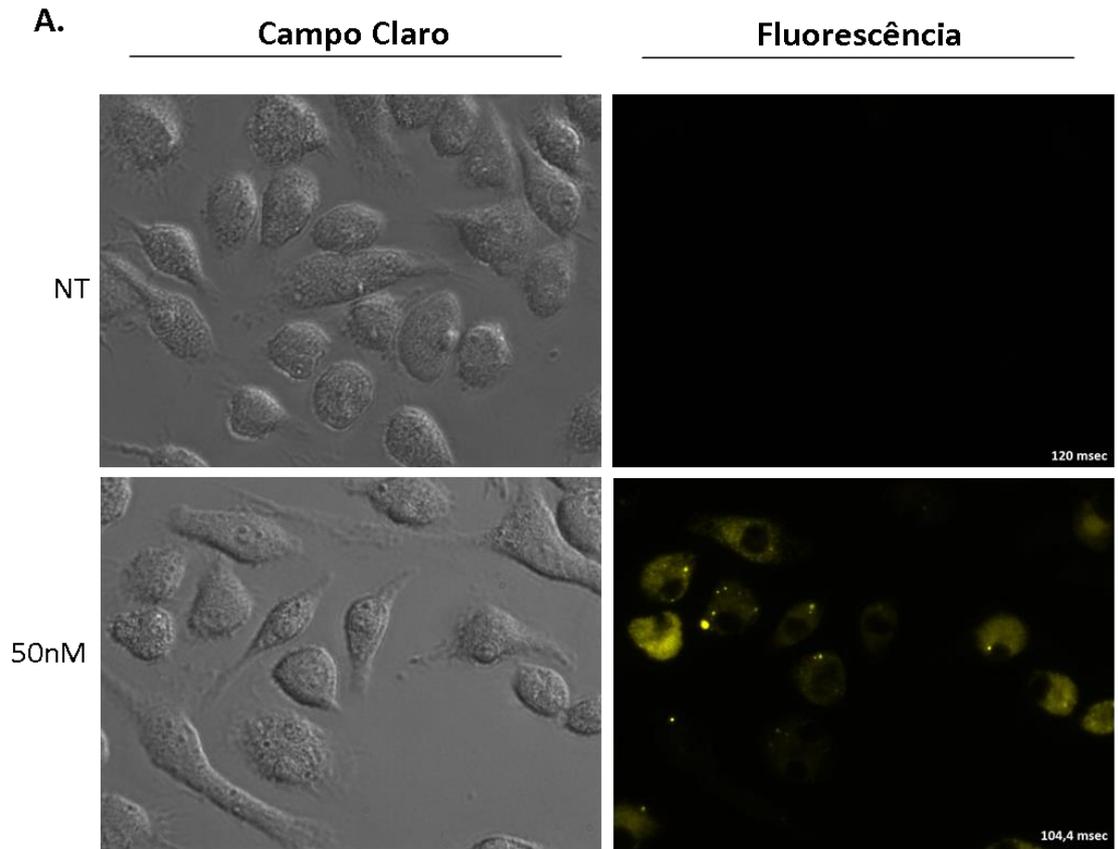
a *P. brasiliensis* quando tratadas com laminarina, um antagonista de dectina-1, foi observada por Ferreira *et al.* (2007). Na mesma linha de raciocínio, macrófagos com a deleção desse receptor também apresentaram uma menor produção de IL-10 em resposta a zymosan, uma partícula rica em β -glucanas agonista de dectina-1 (Elcombe *et al.*, 2013). Outro receptor de membrana importante no reconhecimento de patógenos, o TLR4, também possui uma relação interessante com IL-10. Apesar de ser um importante ativador da imunidade inata, respondendo principalmente a LPS, sua sinalização leva também à produção de IL-10 como forma de modular a resposta inflamatória em um sistema de retroalimentação negativa, impedindo assim uma resposta exacerbada e danosa ao organismo (McCoy *et al.*, 2010). Considerando a participação desses dois receptores na produção de IL-10, sua ausência pode ter resultado em menores níveis da citocina, diminuindo seu efeito inibitório sobre miR-155-5p, o que explicaria os aumentos no acúmulo observados para esse miRNA nos macrófagos mutados. A quantificação de IL-10 nos sobrenadantes recuperados das coculturas, a ser realizada, poderá confirmar essa explicação acerca destes resultados.

4.4 Avaliação do modelo de transfecção de inibidores de miRNA para ensaios de perda de função

Dada a natureza complexa das relações entre um miRNA e seus alvos e os diversos modelos possíveis de ação desses RNAs regulatórios, a quantificação de alterações no acúmulo de miRNAs e mRNAs alvo fornece apenas de maneira indireta informações sobre a participação dessas moléculas em resposta ao estímulo sendo estudado. Para análises mais específicas das funções de um miRNA em um dado contexto podem ser empregadas diversas metodologias, como ensaios de ganho ou perda de função através de mímicos ou inibidores de miRNAs, mutações em sítios de ligação ao miRNA presentes em um alvo e utilização de organismos com deleção de um miRNA individual ou até mesmo toda uma família (modelos e técnicas revisadas por Zhang *et al.*, 2013).

Para estudos sobre o papel funcional de miR-155-5p e miR-155-3p na resposta imune inata a fungos em nosso grupo foi escolhido o modelo de perda de função por meio da utilização de inibidores de miRNA (antimiRs). Como nossos principais modelos de interação patógeno- hospedeiro são realizados com células primárias é necessário validar e padronizar o sistema de transfecção transiente antes da realização dos ensaios. Para tanto, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos Balb/c

foram transfectados com antimiRs controle marcados com o fluoróforo Cy3® para verificação da eficiência de transfecção por meio de microscopia de fluorescência. Os ensaios foram realizados em placas contendo 2×10^5 células (BMDMs) por poço transfectadas com combinações de três concentrações de antimiR (5 nM, 50 nM e 100 nM) e duas concentrações de Lipofectamine® 3000 (0,75 µl/mL e 1,5 µl/mL), sendo as análises realizadas em intervalos de 12h. Como podemos observar na **Figura 10.A e B**, para todas as condições foi obtido um grande número de células positivas para Cy3®, com taxas superiores a 80% a partir de 24h de incubação, indicando uma alta eficiência do sistema de transfecção utilizado. Como controles foram usados poços contendo células não transfectadas, células incubadas somente com Lipofectamine® 3000 e células transfectadas com antimiR não marcado, não tendo sido observado para nenhum deles a emissão de autofluorescência. Já o efeito direto da inibição de miRNA por meio da transfecção de antimiR foi avaliado através da transfecção de 10^6 células com 50 nM do antimiR controle positivo, um inibidor do miRNA let-7c. Após 48h de incubação foi realizada a extração do RNA dos macrófagos e os níveis de HGMA2, um RNA alvo de let-7c, quantificados por RT-qPCR. O aumento de 2,5 vezes em relação aos controles não transfectados ou transfectados com sondas de sequência aleatória demonstra o bloqueio da regulação de let-7c sobre o transcrito de HGMA2, evidenciando a eficácia do modelo (**Figura 10.C**). Os ensaios foram realizados apenas uma vez até o momento, sendo necessária a realização de replicatas para confirmação dos resultados preliminares.



B.

Tempo	% positivas					
	5 nM		50 nM		100 nM	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2
12h	61,3	76,7	84,8	87,8	86,2	92,9
24h	91,6	82,1	89	94,9	87,9	93,1
36h	92,5	100	100	100	93,3	97,9
48h	95,6	98,9	96	99	97,3	94,8

C.

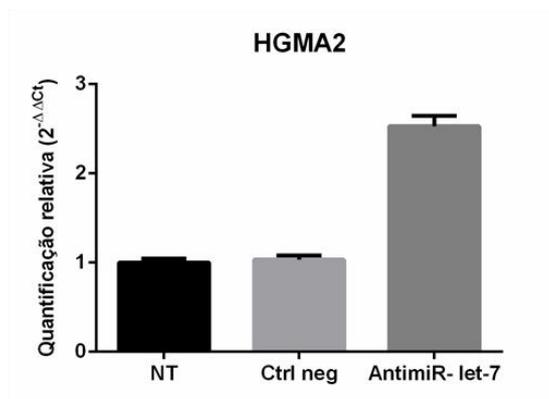


Figura 10. Avaliação do modelo para transfecção de inibidores de microRNA. Foram

utilizados BMDM de camundongos Balb/c, com Lipofectamina® 3000 como carreador das sondas. (A) Microscopias de campo claro e fluorescência de macrófagos transfectados ou não com inibidores de microRNAs marcados com o fluoróforo Cy3®. Como controles negativos foram utilizadas células não transfectadas, células incubadas apenas com lipofectamina ou transfectadas com sondas não marcadas. Imagens representativas. NT: Não Transfectado; 50nM: Transfectado com 50nM de inibidor de miRNA. (B) Quantificação por contagem de células positivas na microscopia de fluorescência para verificação da eficiência de transfecção. 5nM, 50nM, 100nM: concentrações de inibidor de miRNA utilizadas; Concentrações de Lipofectamina - L1: 0,75 µl/mL; L2: 1,5 µl/mL. (C) Níveis de HGMA2 após 48 horas de transfecção obtidos por RT-qPCR e normalizados em relação ao grupo não transfectado. NT: Não Transfectado; Ctrl neg: Controle Negativo (*scrambled*); AntimiR-let-7: Controle positivo (inibidor do miRNA let-7). Barras de erro representam desvio padrão de triplicatas técnicas. Os experimentos foram realizados apenas uma vez.

Testes para verificação de citotoxicidade em células transfectadas foram realizados por citometria de fluxo após tratamento com iodeto de propídio (*PI*) para marcação das células mortas. Porém, dificuldades em soltar os macrófagos das placas de cultura após incubação de 24h e 48h impossibilitaram a análise dos dados, uma vez que os métodos alternativos de soltura empregados também apresentaram baixa eficiência e podem ter interferido nos resultados. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) serão realizados para verificação de citotoxicidade do sistema de transfecção e dos inibidores.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a participação de miRNAs na regulação da resposta imune inata ao fungo *P. brasiliensis in vitro*. Inicialmente foram realizados ensaios visando comparar variações no acúmulo de cinco miRNAs maduros (miR-125b-5p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p e miR-455-3p) em macrófagos de camundongos das linhagens A/J e B10.A, modelos de resistência e suscetibilidade à infecção por *P. brasiliensis*, infectados com leveduras do isolado virulento Pb18. Foi registrado um aumento nos níveis de todos os miRNA estudados, indicando sua possível participação na regulação da resposta imune inata à *P. brasiliensis*. Padrões de indução semelhantes foram observados entre as duas linhagens, não permitindo relacioná-los ao estabelecimento de respostas inflamatórias distintas entre as linhagens suscetível e resistente nas fases iniciais da interação com o fungo.

A seguir, em função do papel crítico na regulação da resposta imune inata e adaptativa que vem sendo atribuído ao miR-155, passamos a realizar um estudo mais aprofundado sobre este miRNA. O miR-155-5p é bastante importante para o estabelecimento de uma resposta imune apropriada, e nossos dados mostraram que em resposta à infecção houve um aumento de seu transcrito primário (pri-miR-155), bem como dos níveis das duas fitas maduras. Estes dados acerca dos precursores deste miRNA sugerem que a indução desse miRNA ocorra em parte devido a uma maior taxa de transcrição do gene MIR155HG, não dependendo somente de modulações em seu processamento. Quanto às fitas maduras, o aumento muito mais pronunciado de miR-155-3p em relação ao observado para miR-155-5p e a alteração na razão entre os níveis das duas fitas pode ser um bom indicativo de um papel funcional da fita passageira.

A quantificação do acúmulo de transcritos alvo de miR-155-5p apresentou padrões variados: enquanto o aumento de TNF α e a diminuição de SHIP1 representam o comportamento esperado sob ação do miRNA, o acúmulo de SOCS1 e SOCS3, a princípio regulados negativamente por miR-155-5p, deixa claro a dificuldade de relacionar o efeito de um único miRNA sobre seu alvo em um contexto de alta reprogramação genética como é a resposta imunológica. Por fim, experimentos utilizando macrófagos com deleção de dois importantes receptores de membrana (dectina-1 e TLR4) mostraram que a indução de miR-155 em resposta a *P. brasiliensis* não se deve à ativação das vias de sinalização a partir destes receptores, os quais exerceriam na realidade um efeito negativo sobre os níveis desse miRNA. Porém, os

mecanismos levando a essa regulação negativa sobre o acúmulo de miR-155-5p ainda precisam ser elucidados. Para permitir uma abordagem mais direta do papel funcional de miR-155 estão planejados ensaios de perda de função através de transfecção com inibidores de microRNA. Os resultados preliminares aqui apresentados para validação do modelo de transfecção indicam uma alta eficiência da transfecção de macrófagos primários e a capacidade desses inibidores de bloquearem a função de um miRNA.

Embora vários trabalhos venham mostrando a importância de miRNAs na resposta imune de hospedeiros mamíferos a diversos patógenos, apenas alguns poucos estudos sobre a participação desses reguladores na resposta a fungos foram realizados. Assim, os resultados aqui apresentados são de relevância por sugerirem, pela primeira vez, a participação de miRNAs na regulação de vias envolvidas na resposta imune inata à *P. brasiliensis*.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentou as avaliações iniciais da participação de miRNAs na regulação da resposta imune inata. Para dar continuidade à linha de investigação, constam como perspectivas desse trabalho:

1. Avaliação do efeito da infecção por *P. brasiliensis* sobre os níveis de miRNAs em diferentes tempos de interação para caracterização da dinâmica de indução de miRNAs e regulação de seus alvos;
2. Comparação do padrão de modulação de miRNAs por isolados de *P. brasiliensis* com diferentes níveis de virulência;
3. Indução de resposta inflamatória por antígenos específicos de *P. brasiliensis* para caracterização do papel de miRNAs na resposta exclusivamente voltada a esse fungo
4. Realização de novos experimentos para finalização da validação e padronização do modelo de silenciamento por antimicroRNA, incluindo a realização dos ensaios de citotoxicidade;
5. Ensaios de perda de função para estudo do papel funcional de miR-155-5p e miR-155-3p, com avaliação da importância desses miRNAs em eventos como fagocitose, atividade fungicida e produção de Citocinas.
6. Sequenciamento em larga escala para análise de transcrito de macrófagos murinos após interação com *P. brasiliensis* na ausência e na presença de antimicroRNA para proposição de alvos regulados por miR-155 e importantes na regulação da resposta a esse fungo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M.M., and O'Neill, L.A. (2011). MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *European Journal of Immunology* 41, 2482–2485.
- Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 475–488.
- Bagagli, E., Theodoro, R.C., Bosco, S.M.G., and McEwen, J.G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165, 197–207.
- Bai, Y., Qian, C., Qian, L., Ma, F., Hou, J., Chen, Y., Wang, Q., and Cao, X. (2012). Integrin CD11b Negatively Regulates TLR9-Triggered Dendritic Cell Cross-Priming by Upregulating microRNA-146a. *The Journal of Immunology* 188, 5293–5302.
- Bala, S., Marcos, M., Kodys, K., Csak, T., Catalano, D., Mandrekar, P., and Szabo, G. (2011). Up-regulation of MicroRNA-155 in Macrophages Contributes to Increased Tumor Necrosis Factor (TNF) Production via Increased mRNA Half-life in Alcoholic Liver Disease. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1436–1444.
- Banerjee, S., Cui, H., Xie, N., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Thannickal, V.J., Abraham, E., and Liu, G. (2013a). miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 288, 35428–35436.
- Banerjee, S., Xie, N., Cui, H., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Abraham, E., and Liu, G. (2013b). MicroRNA let-7c Regulates Macrophage Polarization. *The Journal of Immunology* 190, 6542–6549.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bi, Y., Liu, G., and Yang, R. (2009). MicroRNAs: Novel Regulators During the Immune Response. *Journal of Cellular Physiology* 218, 467–472.
- Bocca, A.L., Amaral, A.C., Teixeira, M.M., Sato, P.K., Shikanai-Yasuda, M.A., and Soares Felipe, M.S. (2013). Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiology* 8, 1177–1191.
- Calich, V.L.G., and Kashino, S.S. (1998). Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31, 615–623.
- Calich, V.L.G., Singer-Vermes, L.M., Siqueira, A.M. and Burger, E.(1985). Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *British Journal of experimental Pathology*. 66, 585-594.
- Calich, V.L., Burger, E., Kashino, S.S., Fazioli, R.A., and Singer-Vermes, L.M. (1987). Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infection and Immunity* 55, 1919–1923.

- Calich, V.L.G., da Costa, T.A., Felonato, M., Arruda, C., Bernardino, S., Loures, F.V., Ribeiro, L.R.R., de Cássia Valente-Ferreira, R., and Pina, A. (2008). Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* *165*, 223–236.
- Cano, L.E., Singer-Vermes, L.M., Vaz, C.A., Russo, M., and Calich, V.L. (1995). 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* *63*, 1777–1783.
- Carbonell, L.M. (1969). Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bacteriology* *100*, 1076–1082.
- Chatterjee, S., Fasler, M., Büssing, I., and Großhans, H. (2011). Target-Mediated Protection of Endogenous MicroRNAs in *C. elegans*. *Developmental Cell* *20*, 388–396.
- Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E., et al. (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & Development* *24*, 992–1009.
- Costinean, S., Zanasi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E μ -miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 7024–7029.
- Coutinho, Z.F., Silva, D. da, Lazéra, M., Petri, V., Oliveira, R.M. de, Sabroza, P.C., and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saúde Pública* *18*, 1441–1454.
- Coutinho, Z.F., Wanke, B., Travassos, C., Oliveira, R.M., Xavier, D.R., and Coimbra, C.E.A. (2015). Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Tropical Medicine & International Health* *20*, 673–680.
- Cox, D., Dale, B.M., Kashiwada, M., Helgason, C.D., and Greenberg, S. A Regulatory Role for Src Homology 2 Domain-containing Inositol 5-Phosphatase (SHIP) in Phagocytosis Mediated by Fc Receptors and Complement Receptor 3 (M 2; CD11b/CD18).
- Cremer, T.J., Ravneberg, D.H., Clay, C.D., Piper-Hunter, M.G., Marsh, C.B., Elton, T.S., Gunn, J.S., Amer, A., Kanneganti, T.-D., Schlesinger, L.S., et al. (2009). MiR-155 Induction by *F. novicida* but Not the Virulent *F. tularensis* Results in SHIP Down-Regulation and Enhanced Pro-Inflammatory Cytokine Response. *PLoS ONE* *4*, e8508.
- da Silva, M.B. da, Thomaz, L., Marques, A.F., Svidzinski, A.E., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Travassos, L.R., and Taborda, C.P. (2009). 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* *104*, 644–648.
- da Silva, M.B., Marques, A.F., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Travassos, L.R., and Taborda, C.P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection* *8*, 197–205.

- Das Gupta, M., Fliesser, M., Springer, J., Breitschopf, T., Schlossnagel, H., Schmitt, A.-L., Kurzai, O., Hünninger, K., Einsele, H., and Löffler, J. (2014). *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 592–596.
- Desjardins, C.A., Champion, M.D., Holder, J.W., Muszewska, A., Goldberg, J., Bailão, A.M., Brigido, M.M., Ferreira, M.E. da S., Garcia, A.M., Grynberg, M., et al. (2011). Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing Paracoccidioidomycosis. *PLoS Genetics* 7, e1002345.
- dos Santos, W.A. dos, Silva, B.M. da, Passos, E.D., Zandonade, E., and Falqueto, A. (2003). Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 19, 245–253.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Methods* 4, 721–726.
- Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3627–3632.
- Elcombe, S.E., Naqvi, S., Van Den Bosch, M.W.M., MacKenzie, K.F., Cianfanelli, F., Brown, G.D., and Arthur, J.S.C. (2013). Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes the Induction of Regulatory Macrophage Markers. *PLoS ONE* 8, e60086.
- Faraoni, I., Antonetti, F.R., Cardone, J., and Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792, 497–505.
- Ferriotti, C., Loures, F.V., Frank de Araújo, E., Costa, T.A. da, and Calich, V.L.G. (2013). 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* 8, e54845.
- Ferreira, K.S., Bastos, K.R., Russo, M., and Almeida, S.R. (2007). Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and Pulmonary Dendritic Cells Induces Interleukin-10 Production and Toll-Like Receptor-2 Expression: Possible Mechanisms of Susceptibility. *The Journal of Infectious Diseases* 196, 1108–1115.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2008). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 19, 92–105.
- Głobińska, A., Pawelczyk, M., Kowalski, M.L. (2014). MicroRNAs and the immune response to respiratory virus infections. *Expert Review of Clinical Immunology*. 7, 963-971
- Graff, J.W., Dickson, A.M., Clay, G., McCaffrey, A.P., and Wilson, M.E. (2012). Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes. *Journal of Biological Chemistry* 287, 21816–21825.
- Griffiths-Jones, S., Hui, J.H.L., Marco, A., and Ronshaugen, M. (2011). MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Reports* 12, 172–177.

- Gurtan, A.M., and Sharp, P.A. (2013). The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks. *Journal of Molecular Biology* 425, 3582–3600.
- Hebeler-Barbosa, F., Montenegro, M.R., and Bagagli, E. (2003). Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Medical Mycology* 41, 89–96.
- Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z., and Cao, X. (2009). MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *The Journal of Immunology* 183, 2150–2158.
- Jin, H.Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A.V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S.R., Macauley, M.S., Rickert, R.C., and Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Frontiers in Genetics* 6.
- Kanetsuna, F. and Carbonell, L.M. (1969). Cell Wall Glucans of the Yeast and Mycelial Forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bacteriology*. 101, 675-680
- Kang, S.-M., Choi, J.-W., Hong, S.-H., and Lee, H.-J. (2013). Up-Regulation of microRNA* Strands by Their Target Transcripts. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 13231–13240.
- Kashino, S.S., Calich, V.L.G., Burger, E., and Singer-Vermes, L.M. (1985). In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* 92, 173–178.
- Kashino, S.S., dos Anjos Fazioli, R., Moscardi-Bacchi, M., Franco, M., Singer-Vermes, L.M., Burger, E., and Calich, V.L.G. (1995). Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 130, 131–140.
- Kerr, I.B., Da Costa, S.C.G., Schaffer, G.V., Lagrange, P.H. (1993) *Paracoccidioidomycosis* in silica-treated rats. *Immunol Lett* 7, 129-33
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 126–139.
- Kong, H., Yin, F., He, F., Omran, A., Li, L., Wu, T., Wang, Y., and Peng, J. (2015). The Effect of miR-132, miR-146a, and miR-155 on MRP8/TLR4-Induced Astrocyte-Related Inflammation. *Journal of Molecular Neuroscience* 57, 28–37.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 42, D68–D73.
- Kurokawa, C.S., Lopes, C.R., Sugizaki, M.F., Kuramae, E.E., Franco, M.F., and Peraçoli, M.T. (2005). Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47, 257–262.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology* 12, 735–739.

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854
- Linossi, E.M., Babon, J.J., Hilton, D.J., and Nicholson, S.E. (2013). Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24, 241–248.
- Liu, M., Roth, A., Yu, M., Morris, R., Bersani, F., Rivera, M.N., Lu, J., Shioda, T., Vasudevan, S., Ramaswamy, S., et al. (2013). The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes & Development* 27, 2543–2548.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Loeb, G.B., Khan, A.A., Canner, D., Hiatt, J.B., Shendure, J., Darnell, R.B., Leslie, C.S., and Rudensky, A.Y. (2012). Transcriptome-wide miR-155 Binding Map Reveals Widespread Noncanonical MicroRNA Targeting. *Molecular Cell* 48, 760–770.
- Lopera, D., Naranjo, T.W., Cruz, O.G., Restrepo, A., Cano, L.E., and Lenzi, H.L. (2011). Structural and Topographic Dynamics of Pulmonary Histopathology and Local Cytokine Profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia-Infected Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1232.
- Lu, L.-F., and Liston, A. (2009). MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* 127, 291–298.
- Lu, L.-F., Thai, T.-H., Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Tanaka, K., Loeb, G.B., Lee, H., Yoshimura, A., Rajewsky, K., et al. (2009). Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein. *Immunity* 30, 80–91.
- Lu, L.-F., Gasteiger, G., Yu, I.-S., Chaudhry, A., Hsin, J.-P., Lu, Y., Bos, P.D., Lin, L.-L., Zawislak, C.L., Cho, S., et al. (2015). A Single miRNA-mRNA Interaction Affects the Immune Response in a Context- and Cell-Type-Specific Manner. *Immunity* 43, 52–64.
- Martinez, R. (2015). EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57, 11–20.
- Matute, D.R. (2005). Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. *Molecular Biology and Evolution* 23, 65–73.
- Maudet, C., Mano, M., and Eulalio, A. (2014). MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Letters* 588, 4140–4147.
- McCoy, C.E., Sheedy, F.J., Qualls, J.E., Doyle, S.L., Quinn, S.R., Murray, P.J., and O'Neill, L.A.J. (2010). IL-10 Inhibits miR-155 Induction by Toll-like Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 285, 20492–20498.
- McEwen, J.G., Bedoya, V., Patiño, M.M., Salazar, M.E., and Restrepo, A.M. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 25, 165–175.

- Monk, C.E., Hutvagner, G., and Arthur, J.S.C. (2010). Regulation of miRNA Transcription in Macrophages in Response to *Candida albicans*. *PLoS ONE* 5, e13669.
- Mycko, M.P., Cichalewska, M., Cwiklinska, H., and Selmaj, K.W. (2015). miR-155-3p Drives the Development of Autoimmune Demyelination by Regulation of Heat Shock Protein 40. *Journal of Neuroscience* 35, 16504–16515.
- Nahid, M.A., Yao, B., Dominguez-Gutierrez, P.R., Kesavalu, L., Satoh, M., and Chan, E.K.L. (2013). Regulation of TLR2-Mediated Tolerance and Cross-Tolerance through IRAK4 Modulation by miR-132 and miR-212. *The Journal of Immunology* 190, 1250–1263.
- O’Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., and Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 1604–1609.
- O’Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7113–7118.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3’ UTR evolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 354–363.
- Patiño, M.M., Burgos, L.C., and Restrepo, A. (1984). Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology* 22, 509–511.
- Perry, M.M., Moschos, S.A., Williams, A.E., Shepherd, N.J, Larner-Svensson, H.M. and Lindsay, M.A. (2008). Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the interleukin-1 β induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of Immunology*. 180(8), 5689-5698.
- Phiwpan, K., Guo, J., Zhang, W., Hu, T., Boruah, B.M., Zhang, J., and Zhou, X. (2015). A Novel Transgenic Mouse Line for Tracing MicroRNA-155-5p Activity In Vivo. *PLOS ONE* 10, e0128198.
- Pimentel, F., Bonilla, P., Ravishankar, Y.G., Contag, A., Gopal, N., LaCour, S., Lee, T., and Niemz, A. (2015). Technology in MicroRNA Profiling Circulating MicroRNAs as Noninvasive Cancer Biomarkers in Breast Cancer. *Journal of Laboratory Automation* 20, 574–588.
- Pina, A., Bernardino, S., and Calich, V.L.G. (2008). Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Journal of Leukocyte Biology* 83, 1088–1099.
- Prado, M., Silva, M.B. da, Laurenti, R., Travassos, L.R., and Taborda, C.P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 513–521.
- Restrepo, A., McEwen, J.G., and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical Mycology* 39, 233–241.

- Restrepo, A., Cano, L.E., and Gonzalez, Á. (2015). THE POWER OF THE SMALL: THE EXAMPLE OF *Paracoccidioides brasiliensis* CONIDIA. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57, 5–10.
- Ricci, G., Mota, F.T., Wakamatsu, A., Serafim, R.C., Borra, R.C., and Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology* 42, 379–383.
- Richini-Pereira, V.B., Bosco, S. de M.G., Theodoro, R.C., Macoris, S.A. da G., and Bagagli, E. (2009). Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 636–643.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Research* 35, 5944–5953.
- Rodrigues de Farias, M., Anuska Zeni Condas, L., Garcia Ribeiro, M., de Moraes Gimenes Bosco, S., Dominguez Muro, M., Werner, J., Cordeiro Theodoro, R., Bagagli, E., Alencar Marques, S., and Franco, M. (2011). Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. *Mycopathologia* 172, 147–152.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research* 14, 1902–1910.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., et al. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science* 316, 608–611.
- Rom, S., Rom, I., Passiatore, G., Pacifici, M., Radhakrishnan, S., Del Valle, L., Pina-Oviedo, S., Khalili, K., Eletto, D., and Peruzzi, F. (2010). CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. *The FASEB Journal* 24, 2292–2300.
- Rüegger, S., and Großhans, H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 436–446.
- Sambrook, J, Russel, DW. 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. ed. 3. Cold Spring Harbor, New York.
- San-Blas, G. and San-Blas, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathologia*. 62, 77-86
- Schug, J., McKenna, L.B., Walton, G., Hand, N., Mukherjee, S., Essuman, K., Shi, Z., Gao, Y., Markley, K., Nakagawa, M., et al. (2013). Dynamic recruitment of microRNAs to their mRNA targets in the regenerating liver. *BMC Genomics* 14, 264.
- Schulte, L.N., Westermann, A.J., and Vogel, J. (2013). Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing. *Nucleic Acids Research* 41, 542–553.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Telles Filho, F. de Q., Mendes, R.P., Colombo, A.L., and Moretti, M.L. (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 297–310.

- Siqueira, I.M., Fraga, C.L.F., Amaral, A.C., Souza, A.C.O., Jerônimo, M.S., Correa, J.R., Magalhães, K.G., Inácio, C.A., Ribeiro, A.M., Burguel, P.H., et al. (2016). Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Medical Mycology* 54, 177–188.
- Slezak-Prochazka, I., Kluiver, J., de Jong, D., Kortman, G., Halsema, N., Poppema, S., Kroesen, B.-J., and van den Berg, A. (2013). Cellular Localization and Processing of Primary Transcripts of Exonic MicroRNAs. *PLoS ONE* 8, e76647.
- Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Büchse, T., and Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Experimental Hematology* 31, 1170–1181.
- Søskilde, R., Newie, I., Persson, H., Borg, Å., and Rovira, C. (2015). Passenger strand loading in overexpression experiments using microRNA mimics. *RNA Biology* 12, 787–791.
- de Souza Silva, C., Tavares, A.H., Sousa Jeronimo, M., Soares de Lima, Y., da Silveira Derengowski, L., Lorenzetti Bocca, A., and Silva-Pereira, I. (2015). 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* 2015, 1–14.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., and Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* 3, 1.
- Svoboda, P. (2015). A toolbox for miRNA analysis. *FEBS Letters* 589, 1694–1701.
- Tam, W. (2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* 274, 157–167.
- Tavares, A.H., Fernandes, L., Bocca, A.L., Silva-Pereira, I., and Felipe, M.S. (2015). Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. *Fungal Genetics and Biology* 81, 98–109.
- Teixeira, M.D.M., Theodoro, R.C., Oliveira, F.F.M.D., Machado, G.C., Hahn, R.C., Bagagli, E., San-Blas, G., and Felipe, M.S.S. (2013a). *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Medical Mycology* 1–10.
- Teixeira, M. d. M., Theodoro, R.C., Derengowski, L. d. S., Nicola, A.M., Bagagli, E., and Felipe, M.S. (2013b). Molecular and Morphological Data Support the Existence of a Sexual Cycle in Species of the Genus *Paracoccidioides*. *Eukaryotic Cell* 12, 380–389.
- Teixeira, M.M., Theodoro, R.C., de Carvalho, M.J.A., Fernandes, L., Paes, H.C., Hahn, R.C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G., and Felipe, M.S.S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52, 273–283.
- Terçarioli, G., Bagagli, E., Reis, G., Theodoro, R., Bosco, S., Macoris, S., and Richini-Pereira, V. (2007). Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* 7, 92.

- Theodoro, R.C., Teixeira, M. de M., Felipe, M.S.S., Paduan, K. dos S., Ribolla, P.M., San-Blas, G., and Bagagli, E. (2012). Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS ONE* 7, e37694.
- Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., Cosyinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M. et al. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *The Journal of Immunology*. 179, 5082-5089.
- Torres, I., García, A.M., Hernández, O., González, A., McEwen, J.G., Restrepo, A., and Arango, M. (2010). Presence and expression of the mating type locus in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Fungal Genetics and Biology* 47, 373–380.
- Truesdell, S.S., Mortensen, R.D., Seo, M., Schroeder, J.C., Lee, J.H., LeTonqueze, O., and Vasudevan, S. (2012). MicroRNA-mediated mRNA Translation Activation in Quiescent Cells and Oocytes Involves Recruitment of a Nuclear microRNP. *Scientific Reports* 2.
- Untereiner, W.A., Scott, J.A., Naveau, F.A, Singler, L., Bachewich, J. and Angus, A. (2004). The *Ajellomycetaceae*, a new family of vertebrate-associated *Onygenales*. *Mycologia*. 96(4), 812-821
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* 318, 1931–1934.
- Wang, J., Yang, K., Zhou, L., MinhaoWu, Wu, Y., Zhu, M., Lai, X., Chen, T., Feng, L., Li, M., et al. (2013). MicroRNA-155 Promotes Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria by Targeting Rheb. *PLoS Pathogens* 9, e1003697.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell*. 75, 855-862.
- Wu, J., Ma, C., Wang, H., Wu, S., Xue, G., Shi, X., Song, Z. and Wei, L. (2015). A MyD88–JAK1–STAT1 complex directly induces SOCS-1 expression in macrophages infected with Group A *Streptococcus*. *Cellular & Molecular Immunology*. 12, 373-383.
- Yang, J.-S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* 17, 312–326.
- Zhai, A., Qian, J., Kao, W., Li, A., Li, Y., He, J., Zhang, Q., Song, W., Fu, Y., Wu, J., et al. (2013). Borna disease virus encoded phosphoprotein inhibits host innate immunity by regulating miR-155. *Antiviral Research* 98, 66–75.
- Zhang, H., Shykind, B., and Sun, T. (2013). Approaches to manipulating microRNAs in neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience* 6.
- Zhou, H., Huang, X., Cui, H., Lou, X., Tang, Y., Chen, S., Wu, L. and Shen, N. (2010). miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood Journal*. 116, 5885-5894.
- Zhou, A., Li, S., Wu, J., Khan, F.A., and Zhang, S. (2014). Interplay between microRNAs and host pathogen recognition receptors (PRRs) signaling pathways in response to viral infection. *Virus Research* 184, 1–6.

APÊNDICE

Tabelas com valores de quantificação relativa obtidos para todos os experimentos independentes realizados.

Tabela 3. Quantificação relativa de microRNAs de macrófagos peritoneais murinos de A/J após interação com leveduras de Pb18 por seis horas. Resultados obtidos por RT-qPCR com sondas Taqman® para três experimentos independentes.

miRNA	Quantificação Relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
miR 125b-5p	2,45	2,62	2,55
miR 132-3p	2,77	1,77	3,07
miR 146a-5p	2,17	4,88	2,09
miR 155-5p	8,10	14,56	5,23
miR 155-3p	34,27	227,24	58,65
miR 455-3p	3,43	3,89	2,21
Pri-miR 155	22,90	16,68	11,18

Tabela 4. Quantificação relativa de microRNAs de macrófagos peritoneais murinos de B10.a após interação com leveduras de Pb18 por seis horas. Resultados obtidos por RT-qPCR com sondas Taqman® para três experimentos independentes.

miRNA	Quantificação Relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
miR 125b-5p	5,38	1,94	2,31
miR 132-3p	8,93	4,77	5,72
miR 146a-5p	4,09	3,69	2,31
miR 155-5p	174,53	8,79	2,60
miR 155-3p	898,29	104,00	18,58
miR 455-3p	4,93	2,35	1,67

Tabela 5. Quantificação relativa de mRNAs alvos de miR-155-5p em macrófagos peritoneais murinos de A/J após interação com leveduras de Pb18 por seis horas c. Resultados obtidos por RT-qPCR com SybrGreen® para três experimentos independentes.

Gene	Quantificação Relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
<i>Tnf-α</i>	3,92	73,69	7,78
<i>Ship1</i>	0,00	0,48	0,07
<i>Socs1</i>	8,85	23,06	8,11
<i>Socs3</i>	63,99	22,40	5,77

Tabela 6. Quantificação relativa de miR-155-5p de BMDM C57Bl/6 após interação com leveduras de Pb18 por seis horas. Resultados obtidos por RT-qPCR com sondas Taqman® para dois experimentos independentes.

Grupo	Quantificação Relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) miR-155-5p	
	Exp. 1	Exp.2
WT	6,40	1,40
Dec	15,85	3,48
TLR4	27,37	2,07

WT: Selvagem;

Dec: *Knockout* Receptor de Dectina-1;

TLR4: *Knockout* TLR4