

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

Caracterização das bases moleculares da
suscetibilidade imunológica à infecção por
Candida albicans.

Daniel Paiva Agostinho

Brasília – DF
2015

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

Daniel Paiva Agostinho

Caracterização das bases moleculares da
suscetibilidade imunológica à infecção por
Candida albicans.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Patologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Ildinete Silva-Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco
Tavares

Brasília – DF
2015

Agradecimentos

Gostaria de agradecer....

... às agências de fomento à pesquisa pelo suporte financeiro fornecido no decorrer desta tese de doutorado. Eu agradeço à FAP-DF, pelo financiamento deste projeto por meio do Projeto Probnex, ao CNPq, pela bolsa de doutorado, e à CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

... também ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular e todos os seus membros.

... ao professor Karl Kuchler pela oportunidade de trabalhar, além de todo seu grupo, que além de colegas, foram amigos. Entre eles: Sabrina Jenull, Saren Tasçian, Michael Tscherner, Florian Zwolanek, Narakorn Khunweeraphong e especialmente Valentina Stolz.

... ao amigo Fritz Sedlaceck que tanto me ajudou e ensinou, e ainda ensina e ajuda em tudo relacionado a sequenciamento e arquearia.

... ao irmão que eu ganhei em Viena, Thiago Machado Mello de Sousa.

... ao grupo do Laboratório da professora Ildinete, pelo apoio e colaboração.

... aos demais colegas, técnicos, amigos, colaboradores do Laboratório de Biologia molecular.

... aos amigos-irmãos, Wilson, Demétrius, Marciano, Thompson e Gil, que ajudaram com a parte de manter a sanidade.

... a todos os demais, que participaram de alguma forma destes anos de doutorado, mas que não foram mencionados ainda.

E acima de tudo, gostaria à professora Ildinete Silva Pereira, que me proporcionou total acolhimento e amizade dentro de seu grupo, além da oportunidade e todo suporte que um aluno poderia desejar para a realização deste trabalho.

Resumo

O fungo comensal *Candida albicans* pode causar doenças infecciosas sistêmicas letais em pacientes imunossuprimidos. Um dos principais mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro e virulência é a mudança para a forma de hifa. Macrófagos e monócitos são as células do sistema imune inato que formam a primeira linha de defesa contra a infecção de *C. albicans*, e essas células reconhecem patógenos através de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR). A ativação desses PRRs induz uma cascata de sinalização que culmina na produção de citocinas específicas, que orquestram a resposta imune. Micro RNAs (miRNAs) são considerados uma parte essencial da resposta imune a diversos patógenos, geralmente regulando a intensidade dessa resposta. miRNAs se ligam a sequências específicas de seus mRNAs alvo, geralmente silenciando-os através de degradação ou repressão traducional. Esse estudo focou em analisar os padrões moleculares de suscetibilidade à *C. albicans*, investigando as diferenças em expressão gênica em resposta a *C. albicans* em duas linhagens de *Mus musculus*, uma suscetível e outra resistente a esse fungo. Macrófagos derivados de medula óssea dessas duas linhagens (DBA/2J e BALB/c, respectivamente) foram co-cultivados com *C. albicans* e seus RNAs totais foram extraídos e sequenciados por RNA-seq. As análises preliminares dos dados de RNA-seq validam a qualidade das sequências obtidas e asseguram seu uso nas etapas subsequentes, voltadas à caracterização comparativa do transcrito diferencial entre as linhagens suscetível e resistente de camundongo. Para tal, as etapas subsequentes envolverão a análise da expressão diferencial de genes e sua validação por qRT-PCR, bem como a interpretação destes dados com base nos genes expressos diferencialmente, como uma ferramenta para o melhor entendimento das bases moleculares da suscetibilidade a este patógeno de grande interesse médico. Assim, estas próximas análises determinarão genes diferencialmente expressos e que são chave na resposta imune durante a infecção de *C. albicans*.

Neste trabalho, também avaliamos o impacto da morfologia de *C. albicans* sobre a modulação da expressão de miRNAs em células do hospedeiro. Assim, a modulação da expressão de nove diferentes miRNAs relacionados à resposta imune foi avaliada a partir da interação de macrófagos primários derivados de medula expostos a leveduras e hifas de *C. albicans* foi investigada. Neste estudo, foi mostrado que as diferentes tipos celulares deste fungo induzem padrões distintos de expressão de miRNAs em macrófagos. Além disso, esses dados mostram que a indução de miR155 por hifas em BMDMs é controlada no nível transcricional durante a fase inicial da interação patógeno-hospedeiro. É interessante ressaltar que o receptor Dectina-1 é um importante PRR que orquestra a expressão de miR155 de maneira dependente de Syk. Esses resultados sugerem que eventos de sinalização mediados por PRRs são importantes na regulação de miRNAs durante infecções

fúngicas e descreve pela primeira vez a provável e principal via de sinalização envolvida nesse processo.

Palavras-chave: Candida albicans, immune response, miRNA

Abstract

The commensal fungal pathogen *Candida albicans* can cause lethal systemic infections in immunocompromised patients. One of the main mechanisms of host immune evasion and virulence is the switch to hyphal growth morphologies. Macrophages and monocytes are the innate immune cells that represent the first line of defense against *C. albicans* infection, and they recognise pathogens via Pattern Recognition Receptors (PRRs). Activation of these receptors induces a signalling pathway that culminates in specific cytokine production, that orchestrates the immune response. Micro RNAs (miRNAs) are considered an essential part of the immune response to a wide variety of pathogens, generally regulating the intensity of this response. miRNAs bind to specific sequences of target mRNAs, thus generally silencing these targets through mRNA degradation or translational repression. This study focused on analyzing the molecular patterns of susceptibility to *C. albicans* by investigating the differences in gene expression response of two mouse strains, one susceptible and the other resistant to this fungus. Bone marrow-derived macrophages from these strains (DBA/2J and BALB/c, respectively) were co-cultured with *C. albicans* and their total RNA were extracted and sequenced by RNA-seq. Preliminary analysis of the RNA-seq data validated the quality of obtained sequences and support their use in subsequent steps of comparative characterization of differential transcriptome between resistant and susceptible strains. The next steps will involve the analyses of differentially expressed genes, and their validation by qRT-PCR, as well as interpretation of these data, as a tool for understanding the molecular bases of susceptibility of this medically important pathogen. The next analyses analysis will determine differentially expressed genes which are key to the immune response during the infection by *C. albicans*.

In this work we also analyzed the impact of *C. albicans* cell morphology upon the modulation of the host miRNA expression. Modulation of the expression of nine different immune response-related miRNAs in primary murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs) exposed to either yeast or hyphal forms of *C. albicans* was investigated. Different growth morphologies were shown to induce distinct miRNA expression patterns in BMDMs. Moreover, our data show that hyphal induction of miR155 in BMDMs is tightly regulated at the transcriptional level during early stages of the host-pathogen interaction. Interestingly, our data suggest that the C-Type lectin receptor Dectin-1 is a major PRR that orchestrates miR155 up regulation in a Syk-dependent manner. These results suggest that PRR-mediated signaling events are key drivers of miRNA-mediated gene regulation during fungal pathogenesis and describe for the first time the signaling pathway likely to be the most important in this process.

Keywords: *Candida albicans*, immune response, miRNA

Lista de Abreviaturas e Glossário

Akt – A sigla se refere à linhagem de camundongo em que essa proteína foi descoberta. É conhecida também como PKB (Protein kinase B)

BMDM – Bone marrow-derived macrophage (Macrófago derivado de medula óssea)

CLR – C-type Lectin receptor

DMSO –Dimethyl Sulfoxide. Forte solvente orgânico

dNTP – deoxy-Nucleoside Triphosphate

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

Fold Change – Expressão relativa do gene alvo em relação ao controle do experimento

GFP – Green fluorescent protein. Proteína com absorção na faixa do UV (~380nm) e emissão máxima a 448 nm.

GW5074 – Inibidor de Raf-1

HIV – Human immunodeficiency virus

HPV – Human papillomavirus

IL – Inteleukin

INF – Interferon

IRAK – Interleukin-1 receptor-associated kinase

MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein -1 (Também chamado CCL2)

miRISC - miRNA-induced silencing complex

miRNA ou miR – microRNA

MOI – Multiplicity of infection – Proporção de células de patógeno x hospedeiro

mRNA – RNA mensageiro

MTL – Mating type *loci*

NGS – Next-generation sequencing (Sequenciamento de nova geração), também chamado *high throughput sequencing*.

PBMC – Peripheral blood mononuclear cell

PBS -Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fostato). Tampão de pH próximo ao fisiológico comumente usado em procedimentos com células de mamíferos.

PPAR- δ – Peroxisome proliferator-activator receptor delta.

pre-miRNA ou pre-miR – Estrutura de RNA em hairpin originada do processamento do pri-miRNA por DROSHA.

pri-miRNA ou pri-miR – miRNA primário, após a transcrição do gene de origem

PRR – Pattern Recognition Receptor (Receptor de reconhecimento de padrão)

qRT-PCR – Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

R406 - Inibidor de Syk

Raf-1 – Sigla oriunda do primeiro gene descoberto dessa família, V-RAF (Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)

RPM – Rotações por minuto

rRNA – RNA Ribossômico

SFB – Soro fetal Bovino

SNP – Single nucleotide polymorphism

snRNA – small nuclear RNA

Syk - Spleen tyrosine kinase

TAB2 – TGF-Beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2

TAK – Tat-associated kinase

TGF – Transforming growth factor

TNF – Tumor necrosis factor

TRAF – TNF receptor associated factor

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
Lista de Abreviaturas e Glossário	8
SUMÁRIO	10
TABELA DE FIGURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Candida albicans</i>	13
1.2 Contexto social e médico da infecção por <i>Candida</i>	13
1.3 Morfologia	14
1.4 Parede celular fúngica	17
1.5 A interação patógeno-hospedeiro	18
1.6 Suscetibilidade à <i>C. albicans</i>	23
1.7 Análise transcritômica por RNA-seq	25
1.8 MicroRNAs (miRNAs).....	27
1.9 A resposta à <i>C. albicans</i> por micro-RNAs	29
2.OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivos Gerais	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 <i>Candida albicans</i>	35
3.1.1 Meios de cultura	35
3.1.2 Cultivo do fungo	35
3.1.3 Curva de Crescimento.....	36
3.1.4 Preparação do fungo para interação com macrófagos	36
3.1.5 Preparação de hifas de <i>C. albicans</i>	36
3.1.6 Morte de <i>C. albicans</i> pelo calor.....	36
3.1.7 Morte de <i>C. albicans</i> por radiação Ultra-violeta (UV).....	37

3.1.8 Marcação das células para Citometria de Fluxo	37
3.2 Cultura de células de mamíferos	37
3.2.1 Animais.....	37
3.2.2 Meios de cultura utilizados	38
3.2.3 Preparação de macrófagos obtidos da medula óssea (BMDMs).....	38
3.2.4 Preparação do sobrenadante de cultura de L929	39
3.2.5 Ensaio de interação BMDMs – <i>C. albicans</i>	39
3.2.6 Ensaio de Fagocitose por citometria de fluxo	40
3.2.7 ELISA	40
3.2.8 Microscopia confocal de interação	40
3.2.9 Produção de vídeo de interação por microscopia em tempo real	41
3.2.10 Infecção sistêmica com <i>Candida albicans</i>	41
3.2.11 Curva de sobrevivência de camundongos à infecção sistêmica.....	42
3.3 Métodos em RNA	42
3.3.1 Extração de RNA.....	42
3.3.2 Síntese de cDNA.....	43
3.3.3 qRT-PCR em tempo real.....	43
3.3.4 Preparação de bibliotecas para RNA-seq.....	44
3.3.5 Sequenciamento	44
3.3.6 Análise dos dados de RNA-seq	45
4. RESULTADOS	47
4.1 Caracterização do transcrito de macrófagos murinos em resposta à infecção por <i>C. albicans</i>, por meio do sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq).	47
4.2 Padrão da resposta de microRNAs (miRNAs) em macrófagos co-cultivados com <i>Candida albicans</i>.	61
5. DISCUSSÃO	73
5.1 Caracterização das bases moleculares da suscetibilidade a <i>C. albicans</i>	73
5.2 Padrão de modulação da expressão de miRNAs em macrófagos murinos expostos à <i>C. albicans</i>.....	77
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS, PRINCIPAIS RESULTADOS E PERSPECTIVAS.....	82
7. BIBLIOGRAFIA.....	84

Tabela de figuras

Figura 1.1 – Morfologias de <i>C. albicans</i>	16
Figura 1.2 – Modelo da parede celular de <i>C. albicans</i>	18
Figura 1.3 – Principais PRRs relacionados à defesa à <i>C. albicans</i>	21
Figura 1.4 – Modelo de experimento de RNA-seq.....	27
Figura 1.5 – Modelo de funcionamento de miRNAs.....	29
Figura 4.1 – Curva de crescimento de <i>C. albicans</i>	48
Figura 4.2 - Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo de BMDMs incubados com <i>C. albicans</i>	50
Figura 4.3 – Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo de BMDMs incubados com <i>C. albicans</i>	51
Figura 4.4 – Interação de BMDMs com <i>C. albicans</i> por microscopia confocal.....	52
Figura 4.5 – Níveis de expressão de TNF- α de BMDMs incubados com <i>C. albicans</i>	53
Figura 4.6 – Curva de sobrevivência de camundongos infectados <i>in vivo</i> com <i>C. albicans</i>	54
Figura 4.7 – Níveis de qualidade dos RNAs para sequenciamento.....	56
Figura 4.8 – Pipeline de análise do sequenciamento.....	57
Figura 4.9 – Mapeamento das bibliotecas sequenciadas.....	60
Figura 4.10 – Secreção de citocinas por BMDMs incubados com <i>C. albicans</i> morta pelo calor.....	62
Figura 4.11 - Indução da expressão de miRNAs por <i>C. albicans</i> morta pelo calor em BMDMs.....	63
Figura 4.12 – Indução da expressão de miRNAs por <i>C. albicans</i> morta pelo calor em BMDMs.....	64
Figura 4.13 – Indução de transcrição de pri-miR155 por <i>C. albicans</i> morta pelo calor em BMDMs.....	66
Figura 4.14 – Indução da expressão de TNF- α por <i>C. albicans</i> morta por UV.....	67
Figura 4.15 – Indução de miRNAs em BMDMs por <i>C. albicans</i> morta por UV.....	68
Figura 4.16 – Identificação de PRRs responsáveis pela indução de miR155 em resposta a <i>C. albicans</i>	69
Figura 4.17 – Indução da expressão de miR155 por β -glicana.....	70
Figura 4.18 – Efeito dos inibidores de Raf-1 e Syk sobre a expressão de miR155.....	71
Figura 4.19 – Modelo de ativação de miR155 em resposta a <i>C. albicans</i>	72

1. Introdução

1.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo comensal diplóide que geralmente se apresenta como um membro benigno da microbiota epitelial e das mucosas em seres humanos. Esse fungo pode causar doenças localizadas na região da mucosa (Odds et al., 1988) e, por exemplo, 75% das mulheres sofrerão uma infecção vulvovaginal (Vulvovaginite) ao menos uma vez na vida (Sobel, 1997). Pacientes imunossuprimidos, pacientes com AIDS e portadores de câncer de boca apresentam suscetibilidade a infecções esofágicas por *C. albicans* (Ruhnke, 2002). Pacientes com queimaduras graves e bebês nascidos de forma prematura também estão vulneráveis a afecções de pele causadas por este fungo. Em pacientes imunossuprimidos, como aqueles em Unidades de tratamento intensivo, em alguns casos de pacientes com AIDS, pacientes com cancer ou transplantados, este fungo pode desenvolver infecção da corrente sanguínea, denominada Candidemia. Candidemia é uma infecção sistêmica, espalhar-se para os demais órgãos, gerando altas taxas de mortalidade (Horn et al., 2009).

1.2 Contexto social e médico da infecção por *Candida*

As doenças fúngicas vem tornando-se cada vez mais um problema grave no âmbito da saúde pública no mundo todo. Esta questão se agrava com o aumento das doenças que comprometem o sistema imune como aquelas em decorrência de infecções pelo HIV e pela imunossupressão de pacientes transplantados. Em particular, a infecção por *Candida albicans* mostra-se um grande problema de saúde pública no Brasil, mas também um excelente modelo para o estudo das demais doenças fúngicas. Esse organismo é amplamente relatado na literatura, e está entre os modelos fúngicos cujos mecanismos celulares são melhor conhecidos pela comunidade científica (Da Matta et al., 2010; Nucci et al., 2010).

Este fungo é um dos principais agentes etiológicos nas infecções fúngicas invasivas (Marr et al., 2002). A candidemia apresenta altas taxas de incidência, sendo a quarta infecção sistêmica de origem nosocomial mais comum nos Estados Unidos e a micose invasiva mais comum (Pappas, 2006; Pappas et al., 2003). Segundo estudo realizado no ano de 2006 no Hospital das Clínicas de São Paulo, 3,5% dos casos de culturas de sangue positivas para algum microorganismo eram devido a *Candida* spp.. As taxas de letalidade podem variar. Gudlaugsson e colaboradores afirmam que esta oscila entre 15% e 30% em adultos e entre 10% e 15% em crianças e neonatos, conforme estudo realizado em hospitais

dos Estados Unidos entre 1997 e 2001 (Gudlaugsson et al., 2003). Pappas (2006) afirma que essa taxa pode chegar a 47%.

Nos Estados Unidos, espécies de *Candida* são a quarta causa mais comum de doenças infecciosas adquiridas em hospitais, tendo um custo estimado de US\$ 1 bilhão ao sistema de saúde (Cowen and Steinbach, 2008; Miller et al., 2001). Mais de 90% dos casos de infecção invasiva por *Candida* são atribuídas a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller and Diekema, 2007, 2010). Dentro do gênero *Candida*, mais da metade dos casos eram devido a *C. albicans* (52,6%) (Motta et al., 2010). Essa eficácia na patogenicidade de *C. albicans* é devido a vários fatores, como a expressão de fatores que medeiam a aderência a células epiteliais (Zhu and Filler, 2010), a secreção de enzimas hidrolíticas que induzem danos às células do hospedeiro (Naglik et al., 2004), a capacidade de produzir biofilmes que são resistentes a drogas antifúngicas (d'Enfert, 2006), a adaptação a estresse metabólico durante a infecção (Brown et al., 2007; Hube, 2006), a mudança fenotípica entre estados (branco e opaco) com expressões gênicas diferentes (Soll, 2004) e a capacidade de transitar entre morfologias de levedura e crescimento filamentosos (Dimorfismo) (Kumamoto and Vines, 2005; Whiteway and Oberholzer, 2004).

1.3 Morfologia

O sucesso de *C. albicans* não somente como patógeno, mas também como fungo comensal, depende em grande parte de sua plasticidade morfológica, genética e fisiológica. Fenômenos epigenéticos podem resultar em mudanças entre dois estados fenotipicamente diferentes, chamados branco e opaco. Essa nomenclatura se deve ao fato das colônias de *C. albicans* crescidas em meio sólido assumirem a coloração branca, ou roxa. (Soll, 2004). Essas células diferem no que se refere à morfologia celular e da colônia, metabolismo, nichos dentro do hospedeiro e interação com o sistema imune (Lohse and Johnson, 2009). Cada tipo celular permanece por várias gerações, e embora a mudança entre estes pareça estocástica, alguns eventos ambientais podem aumentar a frequência da mudança (Alby and Bennett, 2009).

C. albicans apresenta dois Mating-types distintos a e α , e os genes relacionados aos dois tipos sexuais estão em *loci* no cromossomo 5 denominados MTL a ou MTL α , respectivamente (Hull and Johnson, 1999). Já foi observado tanto em laboratório quanto em hospedeiros mamíferos o cruzamento (mating) entre diplóide MTL a e MTL α para formar um tetraplóide a/α (Dumitru et al., 2007; Hull et al., 2000; Magee and Magee, 2000). Essa célula

tetraplóide geralmente sofre perda cromossômica, retornando eventualmente ao estado diplóide (Forche et al., 2008). A mudança fenotípica branco-opaco regula os eventos de *mating*, uma vez que apenas as células do estado opaco são capazes de gerar um *mating* eficiente e, a mudança para esse estado requer homozigose de MTL (Miller and Johnson, 2002).

Uma característica marcante de *C. albicans* é sua capacidade de crescer em ao menos três morfologias diferentes, tanto na forma unicelular de levedura, quanto na morfologia filamentosa de hifa ou pseudohifa (ver figura 1.1). Pseudohifa consolidou-se como um tipo celular morfologicamente distinto da forma hifa por apresentar constrições nos septos que separam as células, que também são mais largas do que as hifas (Sudbery et al., 2004). As diferenças entre as duas formas, hifa e pseudohifa, também existem no que se refere à organização do ciclo celular (Berman, 2006). A forma de hifa também apresenta uma estrutura celular única, chamada *Spitzenkörper*, que se localiza na ponta da hifa e medeia o crescimento direcional da sua estrutura (Virag and Harris, 2006). Estes diferentes tipos celulares também diferenciam-se no que se refere ao processo infeccioso. A plasticidade morfológica de *C. albicans* é um importante fator de virulência, e a forma de hifa apresenta a propriedade de invadir células endoteliais e epiteliais e de causar dano por meio da produção e secreção de enzimas hidrolíticas (Dalle et al., 2010; Filler and Sheppard, 2006; Phan et al., 2007; Zhu and Filler, 2010). Estudos *in vitro* mostram que a forma de hifa tem um poder de penetração em tecidos epiteliais muito maior que as demais (Dalle et al., 2010). Além do que, quando leveduras são fagocitadas por macrófagos, a mudança para a forma de hifa permite seu escape do fagócito (Jimenez-Lopez and Lorenz, 2013; Uwamahoro et al., 2014). No modelo murino de candidemia, órgãos infectados após inóculo intra-venoso apresentam a forma de hifa (Lionakis et al., 2011), enquanto biópsia em pacientes humanos mostram que apenas essa forma é encontrada em tecido epitelial (mucosa) (Scherwitz, 1982).

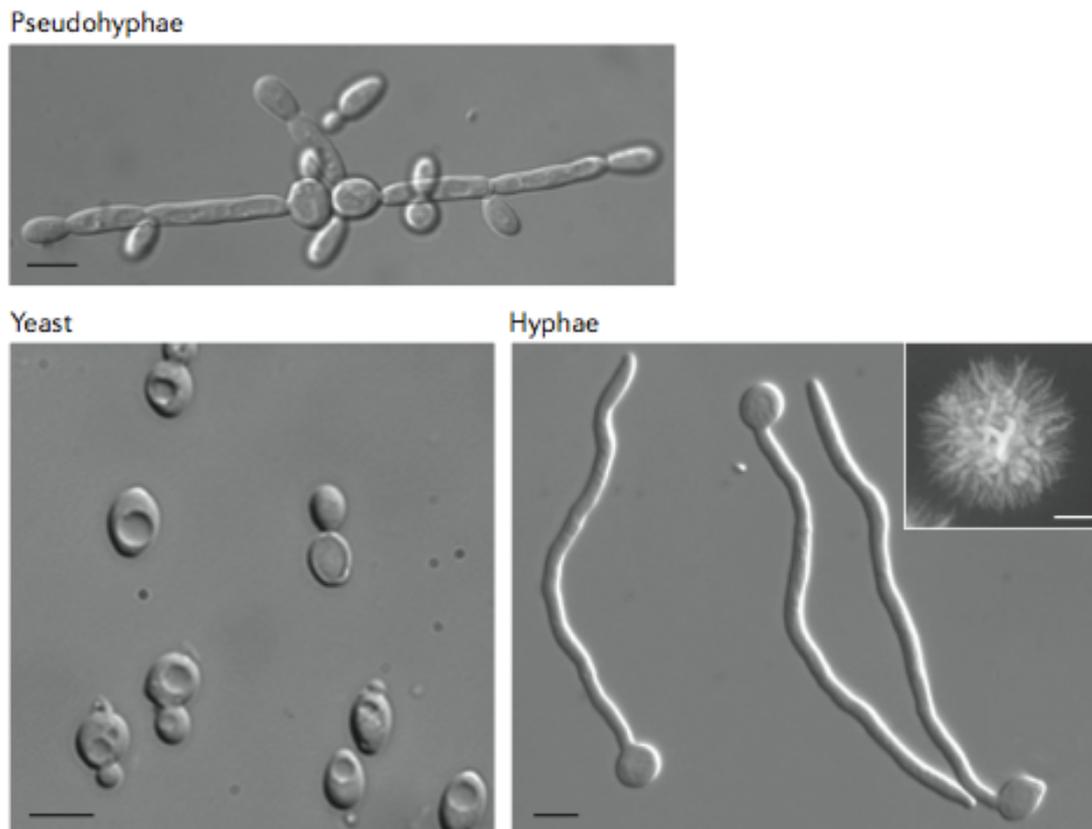


Figura 1.1 – Morfologias de *C. albicans*
 Morfologia de levedura, hifa e pseudohifa. Acima à esquerda é possível ver o painel com pseudohifas, abaixo à esquerda as leveduras, e à direita hifas. O inserto no painel de hifas mostra uma colônia de hifas crescidas por cinco dias em meio indutor. A escala em cada painel representa 5µm. A barra de escala na figura da colônia em forma de hifa representa 1mm. Figura retirada de (Sudbery, 2011).

De uma forma geral, a plasticidade morfológica é em si um importante atributo de virulência. Mutantes que não possuem a capacidade de morfogênese, apresentam reduzida patogenicidade. Mutantes que crescem exclusivamente na forma de levedura são avirulentos em modelo murino de candidemia (Leberer et al., 2001; Lo et al., 1997; Rocha et al., 2001). É interessante ressaltar que também são menos virulentos vários mutantes que crescem exclusivamente na forma de hifa (Bahn et al., 2003; Braun et al., 2000; Braun et al., 2001; Laprade et al., 2002; Murad et al., 2001). Isso sugere que ambas as formas são importantes para a virulência do fungo. Enquanto o crescimento filamentososo é importante na penetração dos tecidos e na evasão do sistema imunológico, a forma de levedura é importante na disseminação na fase inicial da infecção (Saville et al., 2003).

A forma de hifa é ainda mais implicada como mecanismo de virulência por expressar vários fatores de virulência, como adesinas e proteases. É interessante ressaltar que vários genes expressos durante a transição da forma de levedura para hifa não são importantes para morfogênese, mas são importantes para virulência (Kadosh and Johnson, 2005; Kumamoto and Vines, 2005; Nantel et al., 2002). Como exemplo, há a expressão de

proteases aspárticas (Felk et al., 2002; Naglik et al., 2003), assim como as adesinas HWP1 (Hyphal wall protein 1) e ALS3 (Agglutinin-like sequence) (Fu et al., 2002; Sundstrom et al., 2002).

O fungo *C. albicans* é bem adaptado ao hospedeiro humano, e transita da forma de levedura para hifa estimulada por uma grande diversidade de fatores. Por exemplo, ocorre a transição para hifa devido a pH neutro (Buffo et al., 1984), soro (Taschdjian et al., 1960), taxas de CO₂ equivalentes à da corrente sanguínea (cerca de 5%) (Mardon et al., 1969) e na presença de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) (Simonetti et al., 1974). Geralmente a hifa necessita de temperatura de 37°C para se formar, exceto em condições de hipoxia, em que essa formação ocorre a 25°C. A combinação de soro e temperatura a 37°C é extremamente propícia para a geração de tubo germinativo (estrutura que dará origem à hifa) (Sudbery, 2011).

Essa mudança morfológica também é controlada pela interação com outros elementos da microbiota na qual a levedura de *C. albicans* está inserida, inclusive pela interação com outras células de *C. albicans* (Shareck and Belhumeur, 2011). As leveduras de *C. albicans* podem detectar a densidade de outras células da mesma espécie por meio de um sofisticado mecanismo de *quorum sensing* baseado na produção de farnesol, que é secretado no ambiente pelas leveduras e inibe a formação de hifas (Hornby et al., 2001). Entretanto, outro produto de *quorum sensing* produzido por leveduras em crescimento, o tyrosol, induz a formação de tubos germinativos, demonstrando que um fino balanço existe na interação entre esses tipos celulares para controlar a mudança morfológica na colônia (Chen et al., 2004).

1.4 Parede celular fúngica

A parede celular de *C. albicans* é composta por vários elementos específicos, e tem um papel importante no direcionamento da resposta imune do hospedeiro (Netea et al., 2008a). Trata-se de uma estrutura dinâmica e organizada, que determina tanto a viabilidade como a morfologia do fungo. A estrutura da parede de *C. albicans* é composta de um esqueleto de fibras do polissacarídeo β -(1,3)-glicana, covalentemente ligados entre si. Esse esqueleto liga-se a moléculas de β -(1,6)-glicana e quitina (um polímero de GlcNAc), e esses polissacarídeos formam pontes de hidrogênio entre si, formando uma verdadeira nuvem de microfibras, que se estruturam como uma verdadeira armadura. Essa rede de polissacarídeos, por sua vez, forma um arcabouço para o ancoramento de proteínas da parede (Gantner et al., 2005). A maior classe dessas proteínas são as GPI-CWPs (Glycosylphosphatidylinositol (GPI) – anchor dependant cell wall protein), que são bastante

glicosiladas, sobretudo com polissacarídeos de manose (principalmente O-mananas). Tais carboidratos chegam a representar 90% da massa dessas proteínas (Ernst and Prill, 2001). A presença de mananas na parede externa é marcante em *C. albicans*, e essas mananas podem ser do tipo O-mananas ou N-mananas. As O-mananas são formadas em geral por cadeias curtas e lineares de uma a cinco manoses ligadas normalmente por ligações do tipo α -(1,2), e são as mais comumente ligadas às proteínas GPI-CWPs. As N-mananas são compostas por um núcleo de oito manoses e duas moléculas de GlcNAc, e apresentam várias ramificações, cada uma apresentando até 150 moléculas de manose ligadas por ligações α -(1,6), e cadeias laterais de α -(1,2) e α -(1,3)-manoses e fosfomananas (Cutler, 2001). Um esquema da parede celular de *C. albicans* pode ser visto na figura 1.2.

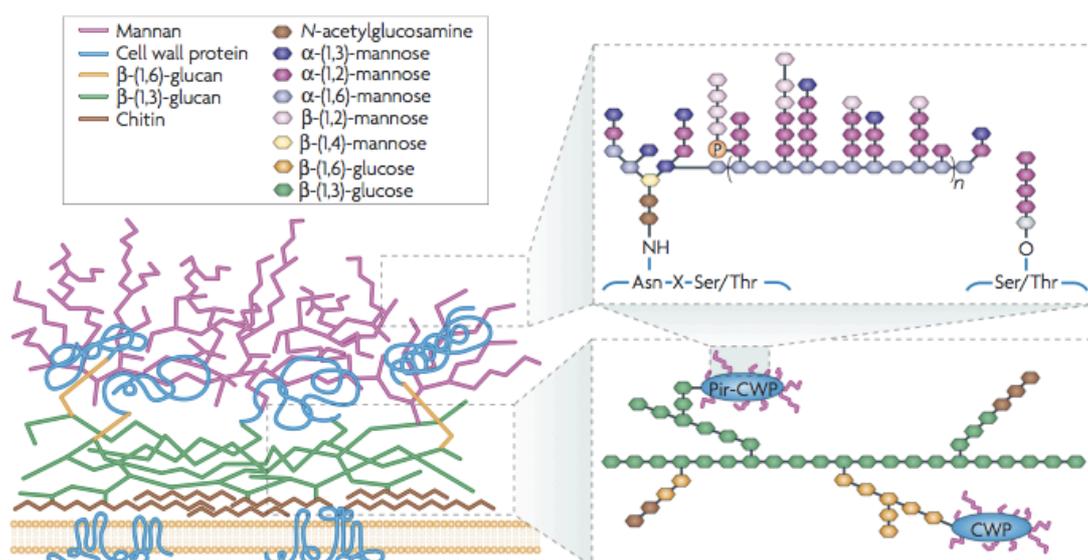


Figura 1.2 – Modelo da parede celular de *C. albicans*

Figura esquemática dos componente moleculares formadores da parede celular de *C. albicans* e sua distribuição. Figura retirada de (Netea et al., 2008a)

1.5 A interação patógeno-hospedeiro

O sistema imunológico é essencial para a sobrevivência do hospedeiro, e consiste de uma grande variedade de células e proteínas. O papel do sistema imune relaciona-se com a homeostase geral do organismo e ao longo da evolução foi recrutado para a defesa contra patógenos. Neste sentido, este sistema é central na homeostase celular, tendo um papel no reconhecimento de células tumorais, de células com defeitos, bem como, é responsável pela reestruturação de tecidos lesionados. A resposta imunológica deve ser altamente controlada, pois sua exacerbação pode ser extremamente danosa ao organismo, enquanto sua ineficiente ativação pode estar à base de muitos processos patológicos. Uma resposta descontrolada do sistema imunológico pode causar um dano maior do que o necessário em resposta a um patógeno, ou mesmo a elementos próprios, como nos casos de doenças auto-imunes (Iranzo and Villoslada, 2014; Martin, 2014; Nikoopour and Singh,

2014). O sistema imunológico de mamíferos é em geral dividido em duas grandes classificações, o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa em resposta a sinais não próprios ou de perigo oriundos de invasões de tecidos por micróbios ou dano tecidual. É cada vez mais claro que cada órgão do corpo utiliza um rol próprio de células e moléculas para coordenar a imunidade local. As células que executam as tarefas da imunidade inata são várias e não consistem apenas de “células imunes profissionais”, mas também de células não imunes, como as células epiteliais (Hato and Dagher, 2014). Os elementos inatos constitutivos do sistema imunológico de mamíferos incluem barreiras físico-químicas, coletinas, sistema complemento e anticorpos naturais que opsonizam as células fúngicas, facilitando a destruição dos patógenos pelos fagócitos, como neutrófilos, macrófagos/monócitos e as células dendríticas (Medzhitov et al., 1997; Romani, 2004). O sistema imune inato reconhece desvios de homeostase fisiológica causados por estímulos infecciosos ou não. Ao contrário do que se pensava anteriormente, algumas características que eram consideradas próprias do sistema imune adaptativo, são atualmente atribuídas ao sistema inato, como por exemplo células com capacidade de alterar o limiar de ativação de seus receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptor* – PRRs), controlando assim sua própria intensidade dentro do processo inflamatório. Outro exemplo é que células pré-estimuladas com um determinado estímulo apresentaram tempo de reação menor do que células sem esse pré-estímulo (Ifrim et al., 2014; Martin, 2014). O sistema imune inato também tem a função de modular o funcionamento do sistema imune adaptativo em resposta ao patógeno. O sistema imune adaptativo, a seu turno, irá modelar o sistema inato tornando-o mais efetivo no combate a esse patógeno. Isso ocorre não somente através da liberação de citocinas, mas também por meio da apresentação de antígenos (Liu and Nussenzweig, 2010). Células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas, podem apresentar antígenos pertencentes ao patógeno a linfócitos T *naïve* (imaturos), instruindo assim a modulação do sistema imune adaptativo (Ni and O'Neill, 1997).

O sistema imune adaptativo, por sua vez, recebeu esse nome pela propriedade de resposta adaptada a uma grande variedade de antígenos e pela habilidade de manter células de memória, uma vez que um determinado antígeno tenha sido reconhecido. Uma resposta imune adaptativa, no entanto, demora vários dias para ser formada, de modo que uma ação sinérgica destes dois sistemas se faz necessária. Em algumas enfermidades, há uma clara dominância de uma ou outra subpopulação de linfócitos T CD4+ (Th1, Th2, Th17), e a falha na ativação da subpopulação apropriada pode ocasionar danos profundos a tecidos e órgãos do hospedeiro. A diferenciação do precursor em Th1, Th2 ou Th17 é dirigida principalmente pelas citocinas produzidas por células do sistema imunológico inato logo após a infecção (Maldonado-Lopez and Moser, 2001; Medzhitov et al., 1997).

A primeira etapa no estabelecimento de uma resposta efetiva a *C. albicans* é o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune inato do hospedeiro. O processo de reconhecimento de antígenos depende dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR, pattern recognition receptors), que reconhecem moléculas estruturais não variantes comuns a um grande número de patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, pathogen associated molecular patterns) (Medzhitov and Janeway, 2002). Vários elementos e PRRs da resposta imune inata estão envolvidos no reconhecimento à *C. albicans*, outros fungos, bem como, os demais patógenos. Entre estes, os componentes do sistema complemento C3 e C5, o receptor de complemento 3 (CR3), os receptores Toll-like (TLRs) 2, TLR4, TLR7 e TLR9; os receptores de lecitina tipo-C (CLRs) Dectina-1, Dectina-2, o receptor de Manose (MR), DC-SIGN e Mincle (ver figura 1.1.2), são os principais elementos a reconhecer PAMPs como manana, β -glicana, RNA e DNA. Vários desses PRRs são indispensáveis na resposta à *C. albicans*. As células mais importantes no reconhecimento de *C. albicans* durante uma infecção na corrente sanguínea são os monócitos circulantes, e macrófagos nos órgãos contaminados. Essa interação entre PRRs dessas células e PAMPs desencadeia vias de sinalização celular, que disparam a expressão de genes cujos produtos são citocinas que induzem a maturação de células dendríticas e posteriormente levam à modulação da resposta imune adaptativa, além do recrutamento de neutrófilos. *C. albicans* também ativa o complexo inflamassoma em macrófagos, tanto via Nlrp3/Caspase-1, quanto pela via não canônica Caspase-8, ambas implicando na produção de IL-1 β por via da ativação de Dectina-1 por β -glicanas, de forma dependente de Syk (figura 1.3) (Brown, 2011; Gringhuis et al., 2012).

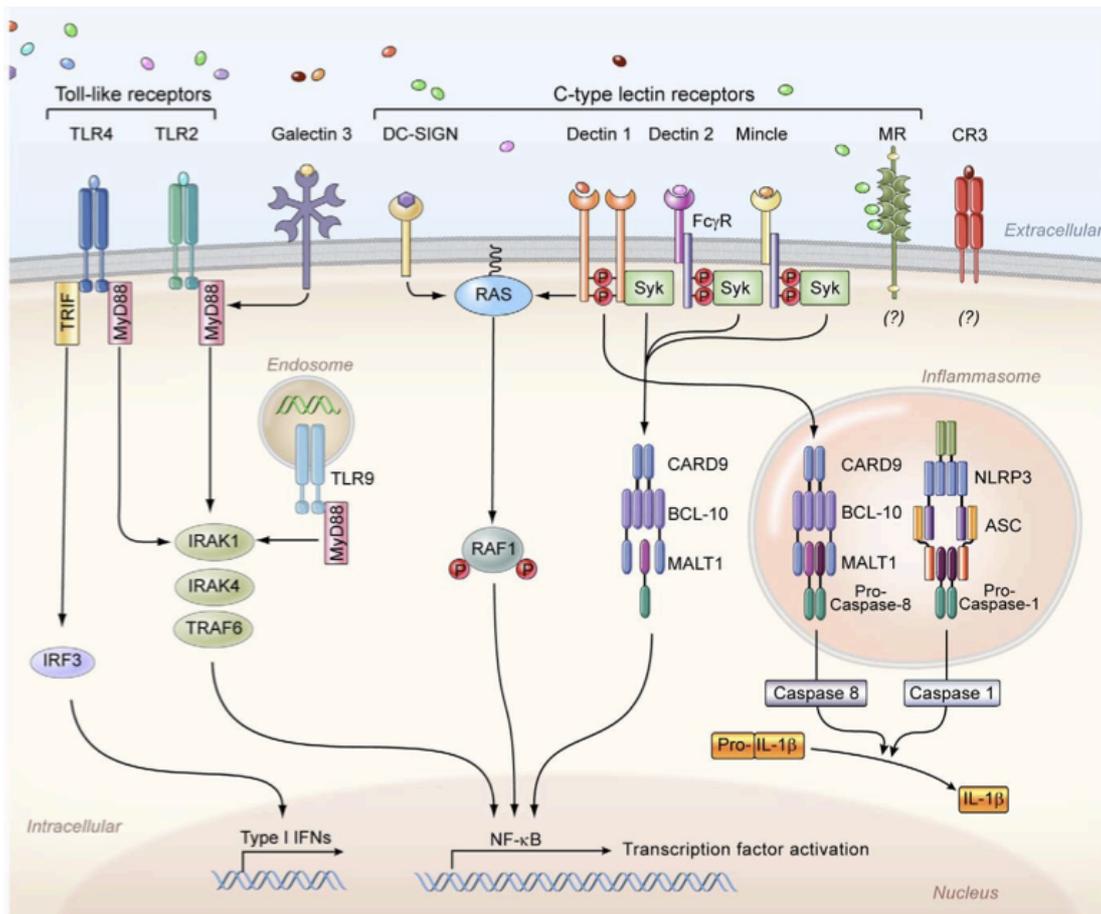


Figura 1.3 – Principais PRRs relacionados à defesa à *C. albicans*

PRRs (Pattern recognition receptors) envolvidos na identificação e resposta imune inata a *C. albicans*. Retirado de (Lionakis and Netea, 2013).

Os TLRs foram primeiramente encontrados em *Drosophila*, e posteriormente em mamíferos (Lemaitre et al., 1996). Eles possuem um domínio extracelular com sequências repetitivas ricas em leucina implicadas no reconhecimento dos PAMPs, e outro domínio citoplasmático Toll/receptor IL-1 (TIR) responsável pela transdução de sinal (Rock et al., 1998). A ligação e reconhecimento de um ligante de TLR, e a subsequente transdução de sinal por meio de diferentes moléculas adaptadoras Myd88/TIRAP e TRAM/TRIF ativa uma cascata de quinases, seguida pela translocação para o núcleo de fatores de transcrição como NFκB, AP-1 e IRF3, e a produção de uma gama de citocinas e quimiocinas (Akira et al., 2006).

Entre os TLRs, alguns dos mais importantes na resposta à *C. albicans* são TLR2, TLR4 e TLR9 (Bellocchio et al., 2004; Jouault et al., 2003; Netea et al., 2002; Villamon et al., 2004). TLR2 reconhece fosfolipomananas da parede celular de *C. albicans* (Jouault et al., 2003), enquanto TLR1 e TLR6, dois receptores que sabidamente formam heterodímeros com TLR2, recentemente foram mostrados desempenhando um papel na resposta à candidemia em modelo murino (Netea et al., 2008b). TLR4 reconhece mananas da parede celular de fungos como *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Tada et al., 2002), além de O-

mananas, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α (Netea et al., 2006). Ambos TLR2 e TLR4 são importantes na resposta a esse patógeno, e a sua deficiência está relacionada à suscetibilidade à *C. albicans* (Bellocchio et al., 2004; Netea et al., 2010; Netea et al., 2004b; Netea et al., 2002). TLR7 reconhece RNA fúngico no autofagossomo, que é requerido para a expressão de IFN β e está associado à infecção prolongada por *C. glabrata* (Bourgeois et al., 2011). O receptor TLR9 é capaz de reconhecer ilhas CpG não metiladas de sequências de DNA, que são raríssimas em mamíferos e características de patógenos, e portanto o DNA de *C. albicans*, induzindo a expressão de citocinas em células dendríticas (Miyazato et al., 2009).

Além dos TLRs, os CLR são importantes na resposta à *C. albicans*. Membros dessa família incluem os receptores de manose (MR), Dectina-1, Dectina-2, DC-SIGN, Mincle, e o receptor lectina ligante de manose circulante (não preso à membrana da célula) (MBL – mannose-binding lectin) (Zelensky and Gready, 2005) e, estão envolvidos no reconhecimento de polissacarídeos tanto de patógenos como de ligantes internos (Ip et al., 2009). O receptor MR está envolvido no reconhecimento de *C. albicans* em macrófagos tanto de humanos como de camundongos (Marodi et al., 1991), e liga-se a N-mananas da parede celular de *C. albicans* (Netea et al., 2006). Sua ativação induz uma resposta protetora do tipo Th17 contra esse fungo (van de Veerdonk et al., 2009), enquanto é importante na sinalização que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias (Heinsbroek et al., 2008). DC-SIGN e Mincle reconhecem também estruturas de manana, e estão presentes basicamente em células dendríticas maduras (Cambi et al., 2003; Cambi et al., 2008; Wells et al., 2008). Galectina-3 está presente basicamente em macrófagos, e reconhece β -manosídeos, agindo em colaboração com TLR2 (Jawhara et al., 2008; Jouault et al., 2006). O receptor Dectina-2 reconhece estruturas de manana na parede de fungos (McGreal et al., 2006), e vem também sendo descrito como fundamental na modulação da resposta imune adaptativa através da indução de uma resposta do tipo Th17 (Saijo et al., 2010).

O receptor Dectina-1 é capaz de interagir com β -(1,3)-glicana induzindo vários eventos celulares, como a explosão respiratória, fagocitose e endocitose, produção de metabólitos do ácido araquidônico, maturação de células dendríticas e produção de várias citocinas e quimiocinas (Brown, 2006). Para que ocorram estes eventos, em alguns casos basta a interação com Dectina-1, porém em outros é necessário que ocorra a ligação também com os TLRs associados à proteína adaptadora MyD88 (Brown, 2006; Dennehy et al., 2008). A sinalização por Dectina-1 ocorre via Syk e a molécula adaptadora CARD9, e essa via é capaz de induzir IL-2 e IL10 em células dendríticas. Essa via tem um papel importante na imunidade a *C. albicans*, induzindo uma resposta adaptativa do tipo Th17 (LeibundGut-Landmann et al., 2007) A ativação de Dectina-1 também induz uma via independente de Syk, mas dependente de Raf-1. Essa via modula a ação da via Syk-dependente sobre NF κ B, promovendo o sequestro de umas de suas sub-unidades, RelB

para a forma inativa p65-ReiB (Gringhuis et al., 2009). Dectina-1 é também fundamental para o processo de fagocitose de células de *C. albicans* por macrófagos (Mansour et al., 2013).

Desta forma, os PRRs são importantes tanto para a indução de uma resposta imune eficiente, como também podem atuar na internalização do fungo pelos fagócitos podendo levar a um mecanismo de escape dos efeitos microbicidas destas células da imunidade inata.

Em contraste com os PAMPs, existem outros elementos que podem ativar células do sistema imune inato. Os damage-associated molecular patterns (DAMPs) são moléculas derivadas de células próprias do hospedeiro e podem iniciar ou perpetuar uma resposta imune em resposta a trauma, isquemia e dano tecidual, tanto na presença como na ausência de um patógeno (Tang et al., 2012).

1.6 Suscetibilidade à *C. albicans*

A suscetibilidade a uma doença causada por um patógeno pode ser devida por exemplo à falha no funcionamento de qualquer dos componentes descritos como centrais na resposta imune inata. Por exemplo, a falta de expressão de um ou mais genes e/ou o funcionamento impróprio de uma ou mais proteínas, importantes na resposta inata podem estar à base da suscetibilidade. Alguns polimorfismos de genes chave da resposta imunológica já foram associados à suscetibilidade a *C. albicans* em pacientes humanos. Por exemplo, um polimorfismo no gene de Dectina-1 resultou em falta de reconhecimento de β -glicanas e conseqüente baixa na produção de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-17. Isso resultou em um fenótipo que foi relacionado a infecções vulvovaginais recorrentes e colonização oral e gastrointestinal por *C. albicans* (Ferwerda et al., 2009; Plantinga et al., 2009). Outro polimorfismo do mesmo receptor foi associado a candidíase orofaríngea recorrente (Plantinga et al., 2010).

Diversos polimorfismos no receptor TLR1 resultaram na produção deficiente de citocinas. Embora TLR1 não seja considerado um dos principais receptores no reconhecimento de *C. albicans*, ou de fungos de uma maneira geral, TLR2 pode se dimerizar com TLR1 quando está ativado, de forma a ativar sua sinalização. Essa baixa produção de citocinas resultou em suscetibilidade à candidemia (Plantinga et al., 2012b). Em outro estudo, um polimorfismo em TLR3 foi associada com Candidíase mucocutânea crônica devido a uma deficiente sinalização via este receptor (Nahum et al., 2011).

Não apenas modificações nas sequências de receptores resultaram em maior suscetibilidade à *C. albicans*, mas também polimorfismos em genes de citocinas ou de componentes de suas vias de sinalização. Por exemplo, SNPs (single nucleotide

Polimorphisms) no gene da proteína pró-inflamatória IL-12 foi associada à Candidemia persistente, uma vez que resultou em reduzida produção de IFN γ produzida pelo hospedeiro em resposta à *C. albicans* (Johnson et al., 2012). Nesse mesmo estudo, um SNP no gene da citocina anti-inflamatória IL-10 foi também associado à candidemia persistente, devido agora a uma alta significativa na produção desta citocina (Johnson et al., 2012). Considerando citocina pró-inflamatória, IL-4, um SNP no gene resultou em candidíase vulvovaginal recorrente devido aos altos níveis de IL-4 vaginal produzido e reduzidos níveis de MBLs (Babula et al., 2005). Em outro estudo, vários SNPs resultaram em candidíase disseminada crônica, embora os mecanismos desse evento não tenham sido desvendados (Choi et al., 2003). Deficiências tanto na produção de IL-17, quanto do receptor de IL-17 (IL-17RA), resultaram na perda de função desta citocina, e conseqüentemente em candidíase mucocutânea crônica nos pacientes estudados (Minegishi et al., 2006; Puel et al., 2011). Deficiências na produção do gene de IL12 resultaram na perda de função dessa citocina e do receptor de IL-23 (IL-23R), além da diminuição na produção de INF γ e IL-17 decorrentes da interação com *C. albicans*. Disso resultou uma maior suscetibilidade à infecção por *C. albicans* e outros patógenos (Glocker et al., 2009).

Um longo polimorfismo no gene de NLRP3, um importante componente do complexo inflamassoma, e portanto da resposta a *C. albicans*, resultou no fenótipo de Candidíase vulvovaginal recorrente devido a uma produção deficiente da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Lev-Sagie et al., 2009). A deficiência em outro componente do inflamassoma, CARD9, resultou em diminuição na produção de IL-17 induzida por *C. albicans*, e conseqüente suscetibilidade à infecção da mucosa por esse fungo (Puel et al., 2011).

Mutações no componente da via de sinalização de diversas vias de TLRs, STAT1, resultou em candidíase mucocutânea crônica em diversos pacientes devido a uma diminuição na produção de INF γ , IL-17 e IL-22 em resposta a *C. albicans* (Nahum et al., 2011; van de Veerdonk et al., 2011). Mutações em outro componente da via de TLRs, STAT3, resultou numa baixa dessas mesmas citocinas, além de uma super produção na resposta de IgE à *C. albicans*, e suscetibilidade à infecção por este fungo (Holland et al., 2007; Minegishi et al., 2007).

O modelo murino de infecção sistêmica por *C. albicans*, no qual tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, é utilizado de forma bem sucedida no estudo da interação fungo-hospedeiro, bem como dos fatores que regulam a suscetibilidade à infecção (Lionakis et al., 2011). Vários estudos foram realizados sobre esse modelo, que permite o uso de deleções e criações de mutantes para a melhor compreensão da função de diversos genes.

O papel dos PRRs na suscetibilidade às infecções fúngicas é controverso (Calich et al., 2008). Em *C. albicans*, a ligação do fungo com o TLR2 leva a produção de citocinas anti-inflamatórias aumentando a susceptibilidade do hospedeiro (Netea et al., 2004a). Além disso,

camundongos deficientes neste receptor, demonstraram ser mais suscetíveis à infecção com este patógeno, devido a menores produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (Villamon et al., 2004). No entanto, em outro estudo, camundongos deficientes em TLR2 também mostraram-se mais resistentes à infecção com *C. albicans*, como resultado de menores níveis de IL-10 e maior produção de IL-12 e INF γ (Bellocchio et al., 2004).

1.7 Análise transcritômica por RNA-seq

A partir de 2004, surgiram técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS – Next Generation Sequencing), as quais permitem que megabases de DNA sejam sequenciados a um menor custo e em questão de poucos dias (Shendure and Ji, 2008; Steinberg et al., 2008). Como consequência, vimos o surgimento de novas alternativas de potencial inquestionável em uma ampla gama de metodologias associadas ao NGS, tendo revolucionado uma infinidade de áreas da biologia. Dentre tais metodologias, as análises transcritômicas em larga escala apresentaram os mais relevantes aprimoramentos e estão dentre as técnicas que mais revolucionam as diversas áreas do conhecimento científico. Assim, uma das aplicações mais surpreendentes do NGS consiste no sequenciamento em larga escala de RNA, denominado mRNA-Seq ou simplesmente RNA-seq, que apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade na caracterização de transcritomas complexos (Cloonan and Grimmond, 2008). O NGS apresenta uma série de vantagens sobre as metodologias utilizadas anteriormente, como a detecção confiável de transcritos de baixa abundância, a necessidade de menores quantidades de RNA, detecção de splicing alternativo, detecção de modificações pós-transcricionais, detecção de fusões gênicas, e a observação de mutações/SNPs, além da capacidade de detectar diferenças de expressão entre duas ou mais condições experimentais (Maher et al., 2009).

Desta forma, o RNA-seq é indubitavelmente o primeiro método que permite a avaliação em larga escala de um transcritoma inteiro de uma forma quantitativa (Shendure and Ji, 2008). Através da comparação dos resultados do RNA-seq com a metodologia RT-PCR em tempo real (qPCR), ficou demonstrada uma grande concordância entre os resultados das duas técnicas (Marioni et al., 2008).

Em contraste com experimentos de DNA-seq, RNA-seq concerne apenas sequências de RNA (Chu and Corey, 2012). Em geral, pesquisadores estão interessados em análise transcritômica a partir de determinadas condições experimentais, ou seja, análise de diferença de expressão de mRNAs. Entretanto, essa técnica também permite a avaliação de outros tipos de RNAs, como rRNA, tRNAs, miRNAs e outros (Ingolia et al., 2012). O objetivo do pesquisador ao idealizar o experimento determinará as etapas de um experimento deste tipo (Alberti et al., 2014). Uma vez que o RNA de uma determinada condição experimental for obtido deve se proceder com a preparação de biblioteca (Wang et al., 2009). Existem duas técnicas mais utilizadas para esse fim. A seleção positiva de mRNAs dentro de

um *pool* de RNAs totais, por meio de esferas ligadas covalentemente a oligonucleotídeos de poli(T), que se ligam à cauda poli-A dos mRNAs. Um dos principais problemas dessa metodologia é que apenas os mRNAs contendo cauda poli(A)⁺ serão analisados, sendo todas as outras sub-populações de RNA celular perdidas (Mortazavi et al., 2008). Outra forma é a seleção negativa de rRNAs dentro da amostra de RNA total, também chamada de depleção de rRNA. Essa técnica usa sondas específicas para as sequências de rRNA do organismo de interesse, deixando todas as demais subpopulações de RNA na amostra a ser sequenciada (Li et al., 2013a). Essas metodologias de preparação de biblioteca são necessárias pois rRNA pode ser encontrado em grande quantidade na célula, e o sequenciamento sem a retirada apropriada dessa subpopulação reduziria drasticamente a cobertura dos RNAs de interesse (Zhao et al., 2014). O restante da preparação das bibliotecas inclui conversão do RNA em cDNA, fragmentação e escolha de tamanho apropriado das sequências, ligação de adaptadores e código de barras, amplificação por PCR (PCR em ponte, no caso de bibliotecas geradas com tecnologias Illumina) e o sequenciamento em si (Dunham and Friesen, 2013; Wang et al., 2009).

Uma vez sequenciadas, é obtida uma biblioteca com todas as reads ou sequências dos fragmentos que foram sequenciados, assim como os dados de qualidade de cada nucleotídeo sequenciado (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998). Em geral a análise dos dados se inicia com a retirada das sequências ou fragmento de sequências de um valor mínimo de confiança. As sequências são então mapeadas em um genoma de referência, as *reads* mapeadas são atribuídas aos respectivos genes ou outra região de interesse, como exons ou regiões intergênicas, conforme ocorreu o mapeamento e a análise de expressão diferencial entre as condições analisadas (Garber et al., 2011). Várias metodologias podem ser utilizadas para a análise de expressão diferencial de genes. Estudos mais recentes sugerem que métodos utilizando distribuição binomial negativa, como edgeR, DESeq, são mais adequados para análise de experimentos com replicatas biológicas do que métodos baseados em distribuição de Poisson (Bullard et al., 2010; Marioni et al., 2008). Muitos estudos comparando os diversos métodos de análise estatística de expressão de genes diferencial a partir de dados de RNA-seq estão disponíveis para que se possa escolher o mais apropriado (Anders and Huber, 2010; Anders et al., 2013; Sonesson and Delorenzi, 2013). Detalhes do procedimento de preparação de biblioteca, sequenciamento e mapeamento podem ser vistos na figura 1.4.

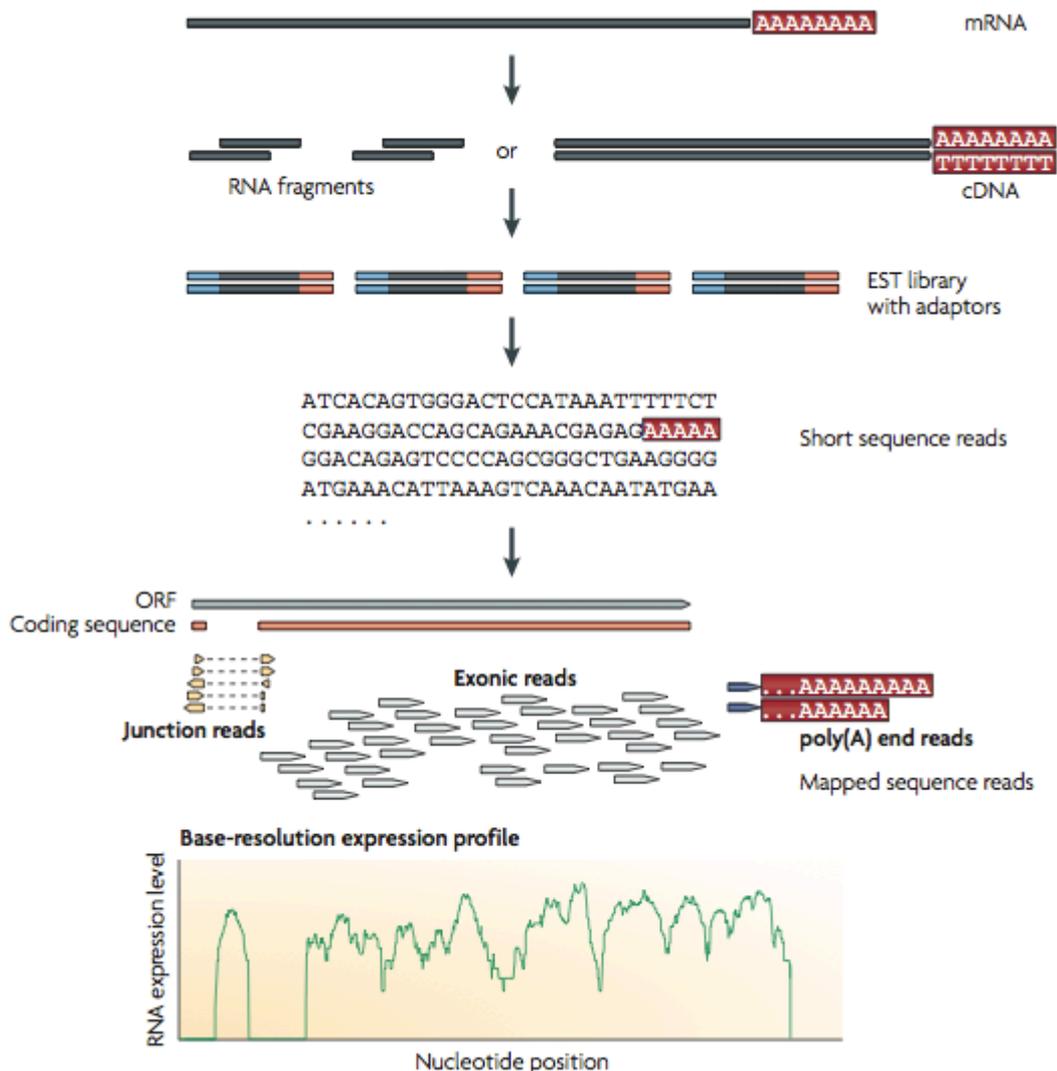


Figura 1.4 – Modelo de experimento de RNA-seq

Modelo de experimento de RNA-seq. No modelo, mRNA são selecionados do pool de RNA total pelo método de enriquecimento de cauda poli-A. As sequências são fragmentadas e os fragmentos de um tamanho específico são ligados a adaptadores e sequenciados. As *reads* obtidas são então sequenciadas em um genoma de referência. As *reads* mapeadas então são contadas para cada gene e a análise de expressão diferencial é realizada. Retirado de (Wang et al., 2009).

1.8 MicroRNAs (miRNAs)

Os miRNAs são uma grande classe de RNAs com tamanho de 21 nucleotídeos que agem regulando uma grande gama de processos biológicos em metazoários e plantas (Bartel, 2009). Em mamíferos, estima-se que eles regulem cerca de aproximadamente 60% de todos os genes codificadores de proteínas e eles estão envolvidos em praticamente todos os processos biológicos e várias patologias (Carthew and Sontheimer, 2009; Friedman et al., 2009).

miRNAs são processados a partir de moléculas precursoras (pri-miRNA) que são transcritas pela enzima RNA polimerase II de genes independentes, ou de introns de genes codificadores de proteínas (Carthew and Sontheimer, 2009; Kim et al., 2009). Os pri-miRNAs se dobram em uma estrutura de grampo (hairpin) e passam a ser substrato de duas enzimas da família das RNA Polimerases III, Drosha e Dicer. A clivagem por Drosha gera uma estrutura de cerca de 70 nucleotídeos que recebe o nome de pre-miRNA, que mantém a estrutura em forma de grampo. O pre-miRNA é então exportado do núcleo para o citoplasma pela proteína Exportina-5. No citoplasma, essa molécula é clivada por Dicer, gerando dois fragmentos miRNA/miRNA* de aproximadamente 20 nucleotídeos cada. Uma dessas fitas, que é o miRNA maduro, é incorporada no complexo miRISC (miRNA-induced silencing complex). A outra fita, denominada miRNA*, é geralmente liberada no citoplasma e degradada. Todavia, em alguns casos a fita miRNA* pode ser incorporada no complexo miRISC e desempenhar funções como miRNA (Nakagawa et al., 2010; Okamura et al., 2009; Viswanathan et al., 2008).

A maioria de miRNAs de animais, se alinha de forma imperfeita na sequência 3'-UTR do mRNA de seus alvos, e inibe a síntese de proteínas seja por repressão de tradução, seja promovendo a deadenilação desses mRNAs e sua consequente degradação (Chekulaeva and Filipowicz, 2009; Eulalio et al., 2009; Fabian et al., 2010). miRNAs apresentam uma região denominada *seed* de 6-7 nucleotídeos (em geral do nucleotídeo 2 a 9), e o perfeito alinhamento dessa sequência é primordial para eficaz ação do miRNA (Bartel, 2009). O mecanismo de biogênese e ação de miRNAs pode ser visto na figura 1.5.

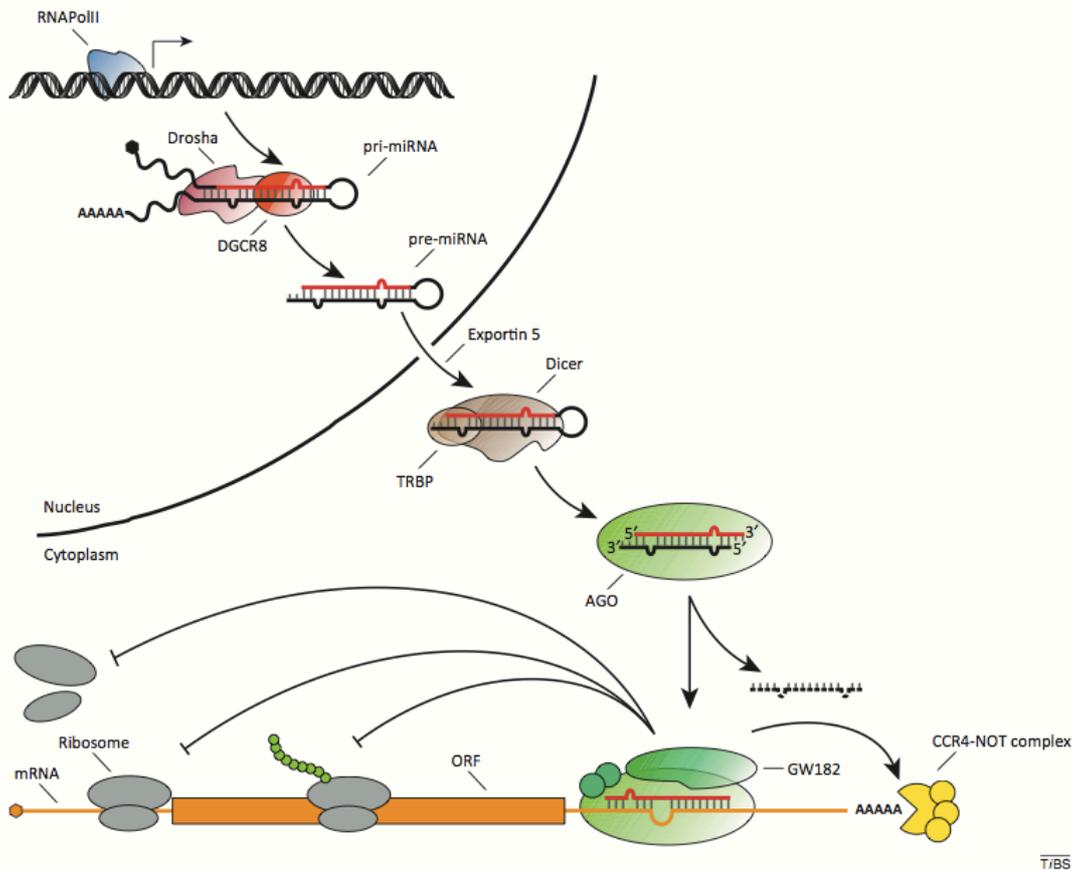


Figura 1.5 – Modelo de funcionamento de miRNAs
 Biogênese e ação de miRNAs. Retirado de (Ruegger and Grosshans, 2012).

1.9 A resposta à *C. albicans* por micro-RNAs

Embora estejam envolvidos no mais diversos processos biológicos, os miRNAs foram relatados também como importantes elementos na resposta aos mais diversos patógenos, como vírus, bactérias, fungos e protozoários (como revisado em (Bronevetsky and Ansel, 2013; Gottwein, 2013; Lee, 2014; Lieber and Haas, 2011; Maudet et al., 2014; Zhou et al., 2014)). Esses miRNAs podem apresentar diferentes funções sobre a resposta imunológica, dependendo do contexto da infecção, podendo ter ação anti- ou pró-inflamatória.

Para esse trabalho, foram selecionados alguns miRNAs que respondessem aos seguintes critérios:

- Já ter sido demonstrado como sendo produzido em resposta a algum patógeno.

- Ter como alvos elementos da via de sinalização de PRRs ou seus produtos finais.

Tabela 1.1 – Lista de miRNAs envolvidos na resposta imune utilizados nesse trabalho. A tabela mostra as moléculas alvo validadas experimentalmente de cada miRNA que apresentam papel na resposta imunológica. A tabela mostra também os organismos para os quais cada um dos miRNAs analisados já foi descrito experimentalmente com acúmulo diferencial como parte da resposta em células imune inatas. Em negrito aparecem microorganismos do reino *Fungi*.

miRNA	Alvos	Descrito na resposta a
miR-125b	TNF α	Bactéria
miR-132	p300, IRAK4	Bactéria, <i>A. fumigatus</i>
miR-145	Tirap	LPS
miR-146a	IRAK1, IRAK2, TRAF6, TAB2, Notch1, MCP-2	Vírus, bactéria, <i>C. albicans</i>
miR-155	IKK ϵ ; FADD; RIPK1; TAB2 ; SHIP1	Vírus, bactéria, fungos (<i>C. albicans</i>)
miR-199a	IKK β	Platelmintos
miR-221	TNF α	Protozoário
miR-223	NLRP3; IKK α , CXCL2, CCL3, IL6, STAT3	Bactéria
miR-346	BTK	LPS
miR-455	Não definido	LPS, <i>C. albicans</i>
miR-466l	INF- α ; IL10 (estabilizadora)	Vírus
miR-9	NF κ B, PPAR δ	Vírus Bactéria

Dessa forma, miRNAs foram selecionados: miR9, miR125b, miR132, miR145, miR146a, miR155, miR199, miR221, miR223, miR346, miR455 e miR466l. Os miRNAs, geralmente, tem sua produção induzida pelo reconhecimento do patógeno pelo macrófago, de modo que regulam a resposta ao atuar diretamente sobre elementos dessa via de sinalização. Em regra, eles possuem um efeito anti-inflamatório, reduzindo os níveis de mediadores da resposta imunológica forçando um *feedback* negativo.

Por exemplo, miR9 é induzido pelos vírus HPV, HIV e o vírus da Síndrome Respiratória e reprodutiva suíno (J et al., 2013; Liu et al., 2014; Swaminathan and Kelleher, 2014). miR9 também é induzido por *Helicobacter pylori* e Lipopolissacarídeos de parede de *Escherichia coli* (LPS) de uma maneira Myd88 dependente (Bazzoni et al., 2009; Lario et al., 2012). Esse miRNA demonstrou ter ação reguladora sobre o processo inflamatório em macrófagos ao inibir o receptor nuclear Peroxissome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) em macrófagos (Thulin et al., 2013). Foi demonstrado também que miR9 é capaz

de controlar diretamente os efeitos de NF κ B, regulando o processo inflamatório em monócitos (Bazzoni et al., 2009).

Foi demonstrado, igualmente, que macrófagos interagindo com lipomananas de *Mycobacterium tuberculosis* acumulam miR125b (Rajaram et al., 2011). Esse miRNA também é induzido por LPS e enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (Dilda et al., 2012). miR125b tem como alvo direto a região 3'-UTR do mRNA de TNF α (Tili et al., 2007).

Já miR132 é sabidamente induzido por fungos e bactérias (Das Gupta et al., 2014; Yu et al., 2014). Foi mostrado também que miR132 pode ser induzido em monócitos periféricos humanos (PBMC), e tem como alvo o mediador da resposta de TLRs IRAK4 (Nahid et al., 2013). Esse miRNA tem como alvo direto o complexo co-ativador p300, que auxilia NF κ B a alterar a expressão de seus genes alvo após ativação de PRRs (Lagos et al., 2010).

O miRNA miR145, a seu turno, tem como alvo direto a molécula adaptadora TIRAP, que juntamente com MyD88, são importantes na sinalização de várias vias de TLRs, tendo assim uma ação anti-inflamatória (Starczynowski et al., 2010). Em macrófagos estimulados com LPS induziram a expressão de miR145 de forma dependente de Interferons do tipo I (IFN-I). miR145, por sua vez, diminui os níveis do silenciador de IL10, *Histone Deacetylase 11* (HDAC11). Dessa forma, miR145 demonstrou um forte papel regulatório sobre a resposta de TLR4 (Lin et al., 2013). A ausência desse miRNA já foi relatada como associada a doenças auto-imunes (Gandhi et al., 2013; Wang et al., 2013b).

Foi mostrado que miR146 pode ser induzido por bactérias e fungos (Yu et al., 2014) miR146a é induzido por meio da sinalização por TLR através da ativação de NF κ B, e tem como alvo direto *TGF- β activated kinase 1/ MAP3K7 binding protein 2* (TAB2), inibindo a ativação de TAK1, e por consequência, NF κ B e MAPK, demonstrando um efeito anti-inflamatório (Taganov et al., 2006).. Ele pode também afetar diretamente os elementos da via de sinalização de TLRs IRAK1, IRAK2 e TRAF-6, formando assim um *loop* de *feedback* negativo (Hou et al., 2009). Em resposta a IL1b em células epiteliais de pulmão, os níveis de miR146a aumentaram, causando uma imediata diminuição da citocinas IL8 e RANTES, que mostraram-se como seus alvos diretos (Perry et al., 2008). miR146a também demonstrou ter como alvo direto a citocina pró-inflamatória MCP-2 em células microgliais e macrófagos estimulados com HIV (Rom et al., 2010). Em células dendríticas estimuladas por agonistas de TLR9, miR146a reprime a expressão da citocina pró-inflamatória IL12p70 ao reduzir os níveis do seu alvo direto Notch1 (Bai et al., 2012). Os níveis de miR146a mostraram-se elevados também em BMDMs estimulados por leveduras de *C. albicans* mortas pelo calor (Monk et al., 2010).

O miRNA miR155 é sabidamente induzido por uma grande variedade de organismos, como vírus, bactérias e fungos (Bandyopadhyay et al., 2014; Das Gupta et al., 2014; Koch et al., 2012; Kumar et al., 2012; Pareek et al., 2014).. Ele tem sua expressão induzida através da ativação de TLR por LPS na linhagem celular THP-1 de monócitos humanos. Os fatores de transcrição NF κ B e AP-1 estão envolvidos nessa indução (Taganov et al., 2006). A ativação de outros TLRs, como TLR3 e 9, além do TLR4, foram responsáveis pela estimulação da expressão de miR155 em macrófagos primários de camundongos de forma dependente de AP-1 (O'Connell et al., 2009). A infecção de BMDMs com a bactéria gram-negativa *Helicobacter pylori* também resultou em uma superprodução de miR155 de uma forma NF κ B dependente (Koch et al., 2012). Estimulação de células mesangiais com Interferon- γ (INF γ) e TNF α induziram a expressão de miR155 de forma dependente de TAB2 e NF κ B. E o miR155 produzido, por sua vez, afetou de forma direta TAB2, que é uma importante molécula na sinalização do processo inflamatório (Imaizumi et al., 2010). miR155 também mostrou-se capaz de afetar os mRNAs de TAB2 em células mielóides (Ceppi et al., 2009). miR155 também afeta a atividade da quinase Akt alterando a expressão do seu alvo Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 (SHIP1) (O'Connell et al., 2009), e ele também tem como alvo Fas-associated death domain protein (FADD), assim como I κ B kinase epsilon (IKKe), e o receptor (TNFR superfamily)-interacting serine-threonine kinase 1 (Ripk1) (Tili et al., 2007).

miR199 já foi mostrado sendo produzido na resposta tardia a *Schistosoma japonicum* em fígado de camundongos (Cai et al., 2013). Esse miRNA também foi demonstrado como tendo função anti-inflamatória em células de câncer de ovário em humanos em resposta à via de sinalização de TLRs dependentes de Myd88 e NF κ B. Esse efeito se dá pela redução da expressão de seu alvo direto, I κ B kinase β (IKK β) (Chen et al., 2008).

miR221, assim como o miR125b, pode se ligar à porção 3'-UTR do mRNA de TNF α durante a tolerância a LPS (El Gazzar and McCall, 2010). Foi demonstrado também que miR221 tem um efeito regulatório sobre o processo inflamatório em células epiteliais em resposta à infecção a *Cryptosporidium parvum* (Gong et al., 2011). miR221 também aparenta ter importância no controle do ciclo celular de mastócitos (Mayoral et al., 2009).

miR223 tem também um efeito anti-inflamatório em macrófagos no tecido adiposo em resposta à obesidade (Zhuang et al., 2012). miR223 foi relatado sendo superexpresso em tecido de glândula mamária de bovinos expostos a *Streptococcus uberis* (Naeem et al., 2012). É sabido que miR223 tem como alvos diretos as quimiocinas CXCL2, CCL3 e IL6 em células mielóides. Essas quimiocinas são importantes no recrutamento de neutrófilos. Camundongos deficientes em miR223 mostraram-se suscetíveis a tuberculose devido à migração exacerbada de neutrófilos para o pulmão e decorrente processo inflamatório induzido por neutrófilos. Dessa forma esse miRNA mostrou-se importante no controle da

tuberculose (Dorhoi et al., 2013). Já foi demonstrado que em resposta à ativação de TLR2 e 4 em macrófagos murinos, há uma diminuição da expressão de miR223 e consequente aumento de um de seus alvos diretos, *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), uma importante molécula de sinalização de TLRs. O aumento de STAT3 e diminuição de miR223 por sua vez resultou no aumento de citocinas pró-inflamatórias IL6 e IL1 β , mas não TNF α . IL6, por sua vez, resultou em nova redução de miR223, formando assim um *feedback* positivo da resposta a TLRs 2 e 4 (Chen et al., 2012).

miR346 mostrou ter efeito sobre a liberação de TNF α em macrófagos por meio do controle de seu alvo direto, *Bruton Tyrosine kinase* (Btk), que regula a estabilidade do mRNA de TNF α em artrite reumatóide, apresentando assim função anti-inflamatória. miR346 apresentou efeito semelhante quando transfectado em monócitos humanos THP-1 estimulados com LPS (Semaan et al., 2011). miR346 também regula os níveis da citocina pró-inflamatória IL18 em fibroblastos de pacientes com artrite reumatóide estimulados com LPS por meio do controle de Btk (Alsaleh et al., 2009).

Embora ainda não se tenha uma ideia muito clara da função de miR455 no contexto da resposta imune, foi demonstrado que esse miRNA é induzido em macrófagos estimulados por LPS (Warg et al., 2012) e leveduras de *C. albicans* mortas pelo calor de uma forma dependente de NF κ B (Monk et al., 2010).

miR466l apresenta uma importante função anti-inflamatória em macrófagos à medida que o aumento de sua expressão resulta no aumento concomitante de expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 em resposta à ativação de TLRs. miR466l obtém esse efeito ao ligar-se à porção 3'-UTR do mRNA de IL-10 e estabilizá-lo, uma vez que assim ele antagoniza os efeitos de Tristetrapolin, uma proteína de ligação a RNA (RBP – RNA binding protein) que induz a degradação desse mRNA (Ma et al., 2010). Foi demonstrado também que em macrófagos e células dendríticas estimulados com vírus, miR466l pode ligar-se à porção 3'-UTR do mRNA de IFN- α induzindo sua degradação, e comprometendo a resposta inata antiviral (Li et al., 2012).

Embora a resposta imune à *C. albicans* seja estudada já há bastante tempo, e vários de seus mecanismos tenham sido elucidados, no que concerne à expressão de miRNAs como resposta a esse patógeno a literatura ainda não é tão vasta. Macrófagos murinos incubados com LPS ou leveduras de *C. albicans* mortas pelo calor resultaram na superexpressão dos miRNAs miR125b, miR146a, miR155 e miR455 (Monk et al., 2010).

2.Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

- Analisar as diferenças em expressão gênica e genéticas, tanto do patógeno quanto do hospedeiro, que expliquem a suscetibilidade à *C. albicans*.
- Compreender as diferenças de expressão de microRNAs em macrófagos primários de camundongos expostos a diferentes morfologias de *C. albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e testar linhagens de camundongos suscetível e resistente à *C. albicans*
- Identificar os tempos de interação adequados entre macrófago e células de *C. albicans* para obtenção de amostras de RNA para RNA-seq
- Realizar experimento de interação entre macrófagos e células de *C. albicans*. Obter RNA do patógeno e do hospedeiro para sequenciamento.
- Análise dos dados de sequenciamento e análise de expressão diferencial entre as linhagens de camundongo suscetível e resistente.
- Avaliação de miRNAs relacionados a resposta imune diferencialmente expressos em macrófagos co-cultivados com diferentes morfologias de *C. albicans*.
- Identificação dos mecanismos de regulação de miR155.

3. Material e Métodos

3.1 *Candida albicans*

3.1.1 Meios de cultura

1x YPD líquido

- 10g/L Extrato de levedura (Difco ou Sigma)
- 20g/L Bacto-peptona (BD)
- 2% (m/v) Glicose (Sigma)

O extrato de levedura e a Bacto-peptona foram dissolvidos em água destilada e autoclavados. A glicose foi dissolvida em água destilada (Solução de estoque 20%) e autoclavada, e então adicionada ao meio YP estéril para obtenção da concentração final de 2%.

2x YPD sólido

- 20g/L Extrato de levedura (Difco ou Sigma)
- Bacto-peptona (BD)
- 4% (m/v) Glicose (Sigma)

O extrato de levedura e a Bacto-peptona foram dissolvidos em 200mL de água destilada e autoclavados. Então, 50mL de solução estoque de glicose 20% e 250mL de solução 4% de ágar autoclavada (m/v), derretida em forno de microondas, foram misturadas e vertidas em placas de Petri.

3.1.2 Cultivo do fungo

Para todos os ensaios fúngicos, foram utilizadas células da linhagem *Candida albicans* SC5314 (Gillum et al., 1984), ou células de *C. albicans* expressando o gene da

proteína verde fluorescente (GFP), gentilmente fornecida pelo professor Karl Kuchler. Uma pequena quantidade do estoque congelado do fungo foi cultivado em placa contendo meio YPD sólido por ao menos vinte e quatro horas a 30°C. Um pré-inóculo de 10mL em meio YPD líquido foi preparado a partir de uma colônia de *C. albicans* obtida dessa placa de cultivo e crescido a 30°C 150 RPM por 5 horas. A OD₆₀₀ desse pré-inóculo foi mensurada e o volume para inóculo foi calculado. Um volume desse pré-inóculo foi adicionado ao volume desejado de cultura em YPD líquido e crescido durante a noite a 30°C e 150 RPM para a concentração final desejada.

3.1.3 Curva de Crescimento

Um pré-inóculo de 10mL em meio YPD líquido foi preparado a partir de uma colônia de *C. albicans* obtida de placa de cultivo em meio YPD sólido. Após 5 horas de incubação do pré-inóculo a 30°C e 150 RPM, a OD₆₀₀ foi mensurada em espectrofotômetro e o pré-inóculo foi inoculado em meio YPD líquido para OD₆₀₀ final de 0,3 em 20 mL. Uma alíquota foi então retirada nos tempos utilizados e a OD₆₀₀ mensurada e plotada.

3.1.4 Preparação do fungo para interação com macrófagos

Aproximadamente 40mL da solução de cultura de *C. albicans* obtida durante a noite no item 3.1.2 (OD₆₀₀ ~ 1) foram centrifugados em tubo Falcon a 1200g por 5 minutos à temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 30mL de solução PBS estéril (repetida duas vezes). O *pellet* formado por massa fúngica lavada foi então ressuscitada em 10mL de PBS estéril e contada contadores de células automático (Luna ou CASY). Para ensaios de infecção *in vitro*, suspensões do fungo foram diluídas em meio de ensaio de interação (item 3.2.2) pré-aquecido a 37°C em uma concentração de células adequada ao MOI (multiplicidade de infecção – é a proporção de células de patógeno por hospedeiro) desejado. Como controle, unidades formadoras de colônia (CFU) foram determinadas em cultivo em placas com YPD sólido.

3.1.5 Preparação de hifas de *C. albicans*

A solução de células na morfologia de hifa foi obtida incubando 5x10⁶ células obtidas conforme item 3.1.2 em tubo Falcon de 50mL contendo 10mL de meio RPMI complementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma) pré-aquecido a 37°C. Essa solução foi incubada a 37°C e 150 RPM por três horas. Ao fim da incubação a morfologia foi confirmada por microscopia ótica. A concentração do inóculo de hifas corresponde ao número de células de levedura que foram utilizadas para a diferenciação.

3.1.6 Morte de *C. albicans* pelo calor

Células obtidas nos itens 3.1.2 (leveduras) ou na seção 3.1.5 (hifas) foram mortas por incubação por três horas a 65°C em banho maria. Após incubação, a morte das células foi testada por cultivo em placa de Petri contendo YPD sólido.

3.1.7 Morte de *C. albicans* por radiação Ultra-violeta (UV)

Células mortas por UV foram obtidas incubando as células oriundas dos itens 3.1.2 (leveduras) ou na seção 3.1.5 (hifas) em placas de Petri expostas à radiação UV dentro de um fluxo laminar por 30 minutos (lâmpada Phillips ultra-violeta 15W). Após a incubação, a morte das células foi testada por cultivo em placa de Petri contendo YPD sólido.

3.1.8 Marcação das células para Citometria de Fluxo

Cerca de 20mL de suspensão de células de *C. albicans* obtidas no item 3.1.2 ($OD_{600} \sim 1$) foram centrifugados a 1200g por cinco minutos (temperatura ambiente). O *pellet* resultante foi lavado duas vezes mais em 30mL de solução PBS estéril conforme as condições acima. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 1mL de tampão HEPES 100mM pH7,5 estéril.

Para marcação das células, 900µL dessa solução de células foram incubadas com 100µL de uma solução de estoque do corante Alexa488 (Life Technologies) por uma hora a 30°C e 150 RPM no escuro. Como controle negativo, 1mL da mesma suspensão de células foi incubada nas mesmas condições, sem o corante.

Após a marcação, as células foram centrifugadas a 1200g por cinco minutos e temperatura ambiente e lavadas 3 vezes com 100µL do tampão HEPES. As células foram então contadas em contador automático de células (CASY counter) e ressuspensas em tampão PBS na concentração desejada para ensaios de interação.

3.2 Cultura de células de mamíferos

3.2.1 Animais

Foram utilizados para esse trabalho camundongos das linhagens C57Bl/6, DAB/2J, A/J e BALB/c com idade entre oito e doze semanas. Os animais utilizados no Brasil foram mantidos nos Biotérios da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) e do Instituto de Ciências Biológicas (IB), ambos da Universidade de Brasília (UnB). O alojamento dos animais, assim como todos os procedimentos experimentais neles executados, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (UnB DOC nº 52657/2011). Os animais utilizados no MFPL em Viena, Áustria, foram obtidos da Veterinärmedizinische Universität Wien (Universidade de medicina veterinária de Viena), protocolo BMBWK-66.009/0057-II/10b/2010.

3.2.2 Meios de cultura utilizados

Para os ensaios com células de mamífero, foi utilizado meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) rico em glicose com L-glutamina e bicarbonato de sódio. O conteúdo de uma embalagem (pó) foi complementado com 5,95g de HEPES e o volume ajustado para 1L com água destilada. O meio foi então ajustado para pH 7,2 e filtrado com filtro Milipore de 0,22µm. Por fim, foi adicionado 25mg de gentamicina por litro de meio em solução de estoque.

Meio de diferenciação de macrófagos

- 50% RPMI
- 30% Sobrenadante de cultura de Fibroblastos L929
- 20% Soro fetal bovino

Meio para ensaios de interação com BMDMs

- 85% RPMI
- 5% Sobrenadante de cultura de Fibroblastos L929
- 10% Soro fetal bovino

PBS – Phosphate buffered saline

- 8,0g/L NaCl
- 0,2g/L KCl
- 1,44g/L Na₂HPO₄
- 0,24g/L KH₂PO₄
- Completar 1L água destilada e ajustar o pH para 7,4.

3.2.3 Preparação de macrófagos obtidos da medula óssea (BMDMs)

BMDMs foram obtidos de camundongos entre oito e doze semanas (ver item 3.2.1) conforme adaptação de (Bourgeois et al., 2009). Basicamente, fêmures e tíbias foram obtidos de camundongos e esterilizados em etanol 70% por três minutos. Em fluxo laminar, os ossos foram abertos e o conteúdo das medulas foi lavado com seringa de 20mL, agulhas 27Gx3/4 e RPMI gelado. As células foram então centrifugadas a 300g por sete minutos a 4°C

e o pellet ressuspenso e incubado em 0,5mL/perna de tampão de lise de hemácias (8,3g/L NH₄Cl em 0,01M Tampão Tris-HCl pH7,0) por três minutos. O tampão foi então diluído em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, as células foram contadas em contador de células automático e a suspensão de células foi centrifugada novamente a 300g por sete minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em meio de congelamento (90% soro fetal bovino e 10% DMSO) e alíquotas contendo 6x10⁶ células de medula foram preparadas e congeladas primeiramente a -80°C por dois dias, e nitrogênio líquido indefinidamente.

Para preparação de BMDMs, uma ou mais alíquotas com 6x10⁶ células obtidas de medula óssea foram descongeladas e ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. A suspensão foi então centrifugada a 300g por sete minutos e 4°C, e o *pellet* ressuspenso em meio de diferenciação de macrófagos (ver item 3.2.2). Cada alíquota foi ressuspenso em 20mL de meio de diferenciação e cada 10mL aplicados em uma placa de Petri. Cada placa foi mantida por oito dias em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂, sendo suplementada com 10mL de meio de diferenciação no quarto dia. No último dia, as células foram ressuspendidas usando PBS gelado, centrifugadas a 300g por sete minutos e 4°C, e o pellet ressuspenso em 5-10mL de meio de ensaio de interação (item 3.2.2). As células foram então contadas e incubadas nas placas destinadas para o ensaio de interação. As células foram então mantidas na placa em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂ por vinte e quatro horas antes do ensaio.

3.2.4 Preparação do sobrenadante de cultura de L929

O fibroblastos L929 (ATCC CCL1) foram mantidos congelados em nitrogênio líquido. Para cultivo, uma alíquota é descongelada e diluída em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Essa suspensão foi então centrifugada a 300g por sete minutos e 4°C e o *pellet* ressuspendido em 20mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Essa suspensão foi então cultivada a 37°C em estufa úmida e 5% CO₂ em garrafa de cultura (Falcon) de 150cm². Após atingir 100% de confluência, o meio foi retirado e cerca de 100mL de meio RPMI sem suplementação foi adicionado. As células foram crescidas nessas condições por sete dias e então o sobrenadante da cultura foi coletado e filtrado em filtros Milipore de 0,22µm. O sobrenadante de cultura foi então alíquotado e congelado para uso posterior.

3.2.5 Ensaios de interação BMDMs – *C. albicans*

Macrófagos obtidos no item 3.2.4 tiveram seu meio de cultura aspirado e tiveram novo meio contendo ou não *C. albicans* na concentração desejada (item 3.1.4 ou 3.1.5). Após a adição do meio, as células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ em estufa úmida até o tempo de coleta. Para incubação com β-glicana, Zymosan depleted (Invivogen) foi utilizada em uma concentração final de 100µg/mL.

3.2.6 Ensaio de Fagocitose por citometria de fluxo

Placas de cultura de 6 poços com cerca de 5×10^5 macrófagos obtidos no item 3.2.3 foram incubado com leveduras de *C. albicans* marcadas com Alexa488 ou não (ver item 3.1.8) nos tempos selecionados. Ao fim do tempo de interação, o processo de fagocitose foi parado colocando-se as placas em gelo dentro de uma câmara fria a 4°C. As placas foram então lavadas rapidamente em PBS para retirada de leveduras não aderentes. Após, cada poço foi incubado em 500µL de Trypan Blue a 4°C a fim de quelar qualquer sinal de leveduras não fagocitadas. As células foram então novamente lavadas três vezes em PBS e após a última lavagem, as células foram coletadas no próprio PBS utilizando um cell scraper do tipo Rubber Policeman. As células foram coletadas em tubos eppendorf de 1,5mL e centrifugadas a 300g por sete minutos à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de fixação para citometria de fluxo (Solução em PBS com 1% soro fetal bovino e 4% paraformaldeído). Essas células podem ser armazenados por até sete dias em tubos eppendorf opacos a 4°C. Essa suspensão de macrófagos fixados foi utilizada para mensuração dos nível de fagocitose em cada tempo, e as leveduras marcadas com Alexa488 ou não foram utilizadas para calibração da máquina. A taxa de fagocitose foi mensurada utilizando o canal de FITC (mesmo utilizado para Alexa488, Absorção 495nm, Emissão 519nm) em aparelho FACS Calibur (BD Biosciences) e análise foi feita no *software* FlowJo versão 8.8.7 (Tree Star, Inc.). Leveduras marcadas ou não foram utilizadas como controle, assim como macrófagos não infectados. Duas replicatas técnicas independentes foram utilizadas para esse experimento.

3.2.7 ELISA

Os sobrenadantes de cultura foram aspirados, em seguida foram centrifugados a 1200g por cinco minutos para retirada de leveduras, e os sobrenadantes estocados a -80°C. Posteriormente foram descongelados e homogeneizados em vórtex para dosagem de citocinas por ELISA. Os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α), interleucinas 6, 12 (IL6), e MCP-1 (CCL2) foram analisados com o kit de ELISA Ready-SET-Go! (Ebioscience). As diferenças entre os grupos foram aferidas utilizando-se Análise de Variância simples (One-way ANOVA) ajustada por Correção de Bonferroni ou Análise de Variância bifatorial (two-way ANOVA), conforme o experimento. Foram considerados dados com diferenças significativas aqueles com valor de $p \leq 0,05$.

3.2.8 Microscopia confocal de interação

Os macrófagos foram diferenciados conforme item 3.2.3 e cultivados em uma lâmina com oito câmaras (Chamber slide – Lab Tek). Cerca de 5×10^4 macrófagos foram cultivados por câmara. Em seguida, o meio foi substituído por RPMI suplementado com 10% soro fetal

Bovino contendo células de *C. albicans* para uma concentração final de um MOI de 2. A lâmina foi incubada a 37°C, 5% CO₂ em câmara úmida, e após os tempos determinados de interação, o meio foi aspirado e as células lavadas três vezes em PBS pré-aquecido. As células foram então fixadas em imersão em tampão de fixação (Paraformaldeído 4% em PBS) por no mínimo vinte minutos à temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas três vezes em PBS (temperatura ambiente, cinco minutos por lavagem) e imersas em 200µL de metanol 100% gelado por trinta minutos para permeabilização das células. Em seguida as células foram lavada em PBS três vezes e incubadas em solução de DAPI 300nM em PBS por cinco minutos. As células foram então lavadas três vezes em PBS (temperatura ambiente, cinco minutos por lavagem) e incubadas com anticorpos IgG anti-β-tubulina de camundongo marcados com Alexa568 (Solução estoque 200µg/mL - Santa Cruz Biotechnologies) diluídos 1:10.000 em PBS por duas horas a 4°C. Após, as células foram lavadas três vezes em PBS (temperatura ambiente, cinco minutos por lavagem) e deixadas imersas em PBS. As microfotografias foram realizadas em um microscópio confocal Zeiss LSM 710 com objetiva de 40x. Canais para visualização de FITC (para detecção de GFP), Alexa568 (para detecção de β-tubulina) e de DAPI foram utilizados. O *software* utilizado para visualização das imagens no microscópio foi VisiVlew 2.1.4. A manipulação das fotos foi realizada em ImageJ.

3.2.9 Produção de vídeo de interação por microscopia em tempo real

Macrófagos Raw 264.7 (ATCC TIB-71) foram descongelados e cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino em garrafa de 75cm² a 37°C e 5% CO₂ em câmara úmida até atingirem 80% de confluência. Eles foram então coletados e 5x10⁴ foram cultivados por câmara em uma lâmina com oito câmaras (Chamber slide – Lab Tek) com RPMI suplementado com 2% soro fetal bovino. Previamente ao ensaio de interação, o meio foi aspirado e substituído por meio DMEM sem Phenol Red (Sigma) suplementado com 5% soro fetal bovino e 10⁵ leveduras de *C. albicans* SC5314 expressando GFP. A lâmina foi então colocada na câmara úmida aquecida a 37°C com 5%CO₂ de um microscópio Olympus Cell^R para realização das microfotografias. Os campos foram selecionados e o *software* do microscópio (Olympus Xcellance versão 1.1 em Windows XP) foi ajustado para fotografar cada campo a cada cinco minutos, no modo campo claro e com filtro para FITC (para detecção de GFP). O mesmo *software* foi utilizado para a confecção do filme a seguir.

3.2.10 Infecção sistêmica com *Candida albicans*

Para ensaios *in vivo*, as suspensões de células foram diluídas à concentração desejada em PBS estéril, e recontadas em contador automático de células. Em seguida, os camundongos foram pesados e 50µL de suspensão de células foi injetada pela veia da cauda com seringa de insulina de 1mL. Foi utilizado mecanismo para imobilização do

camundongo durante a aplicação da injeção. Animais controle receberam o mesmo volume do inóculo em PBS.

3.2.11 Curva de sobrevivência de camundongos à infecção sistêmica

Após restabelecimento, os animais foram então reinstalados no Biotério e checados diariamente. Animais considerados moribundos foram sacrificados por deslocamento cervical, e considerados como mortos no dia posterior. Os animais foram monitorados por trinta dias. Vinte e três animais DBA/2J e vinte e um BALB/c machos de oito semanas de idade foram utilizados para obtenção de curva de sobrevivência. Foram utilizados os testes de Logrank (Mantel-Cox) e de Gehan-Breslow-Wilcoxon para análise estatística dos resultados, considerando dados com diferenças significativas aqueles com valor de $p \leq 0,05$.

3.3 Métodos em RNA

3.3.1 Extração de RNA

O RNA utilizado para sequenciamento foi obtido da seguinte forma: após transcórrer o período dos ensaios de interação entre *C. albicans* e BMDMs, o sobrenadante da cultura foi coletado e as células lavadas três vezes com PBS pré-aquecido a 37°C para a retirada de leveduras de não internalizadas. Para extração do RNA, foi utilizado o kit “SV Total Isolation Kit” (Promega). A extração foi executada conforme instruções do fabricante. O *pellet* final foi eluído 50µL de água MiliQ pré-aquecida a 65°C.

A concentração final de RNA foi mensurada por espectrofotômetro Nanodrop (Peqlab). A qualidade do RNA foi medida utilizando um RNA 6000 Nano Chip (Agilent) em um 2100 Bioanalyzer (Agilent).

O RNA utilizado para análise de miRNAs foi obtido da seguinte forma: após transcórrer o período dos ensaios de interação entre *C. albicans* e BMDMs, o sobrenadante da cultura foi coletado e as células lavadas três vezes com PBS pré-aquecido a 37°C para a retirada de células de não internalizadas. Para extração do RNA, foi utilizado o kit “MirVana” (Invitrogen). A extração foi executada conforme instruções do fabricante. Duas frações foram obtidas pelo uso do kit, uma fração com pequenos RNAs (até aproximadamente 100bp), e outra com grandes RNAs (>~100bp). A eluição final foi realizada com 100µL de água MiliQ pré-aquecida a 95°C para ambas as frações.

As concentrações finais foram obtidas por espectrofotômetro Nanodrop (Peqlab). A qualidade dos RNA da fração de grandes RNAs foi obtida por avaliação em gel de agarose

1,0% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A qualidade da fração de pequenos RNAs foi extrapolada a partir da amostra equivalente de grandes RNAs.

As amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.3.2 Síntese de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1µg de RNA total de cada amostra, ou da fração enriquecida de grandes RNAs, no caso de amostras obtidas utilizando o kit MirVana (ver item 3.3.1). A essa quantidade de RNA total foi adicionado 1µg do iniciador OligodT₁₈ e a mistura foi incubada a 70°C por dez minutos, seguido de resfriamento imediato por incubação no gelo por cerca de um minuto. À amostra foi adicionado o MIX, para um volume final de 25µL, contendo os seguintes reagentes em suas concentrações finais: tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8mM; 0,4mM dNTPs; 40U RNase Out (Invitrogen). Em seguida, a reação de polimerização foi realizada por incubação a 42°C por dois minutos, sendo adicionado ao sistema 400U da enzima transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen) e incubando-se a 42°C por mais uma hora. A seguir, a enzima foi inativada por aquecimento a 70°C por vinte minutos e imediatamente resfriada em gelo. As amostras foram então diluídas em água MiliQ para uso em reação de qRT-PCR (diluições 1:2 a 1:5).

Para a síntese de cDNA de miRNAs foram utilizados 10ng de RNA da fração de pequenos RNAs por amostra de acordo com o protocolo Taqman (Life Technologies). Os produtos da reação não foram diluídos para posterior uso em qRT-PCR.

3.3.3 qRT-PCR em tempo real

Alíquotas dos cDNAs produzidos foram submetidas à reação de amplificação em tempo real em volume final de 10µL, contendo: 5µL de SyBr Green Master Mix (Applied Biosystems); 0,2µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*). Foram utilizados como controle interno os *primers* que amplificam os mRNAs que codificam a proteína ribossomal RPS9 e GAPDH. As condições de ciclagem foram as programadas conforme recomendado para o reagente SyBr Green Fast e consiste das seguintes etapas: aquecimento a 50°C por dois minutos; 95°C por cinco minutos; 95°C por três segundos; 60°C por trinta segundos e repetir as duas últimas etapas quarenta vezes. A curva de dissociação foi construída com as seguintes etapas: 95°C por quinze minutos; 60°C por uma hora; 95°C por quinze minutos.

Para análise de expressão de miRNAs, foi utilizado kit de Taqman específico para cada gene conforme a especificação do fabricante (Life Technologies). O pequeno RNA nuclear (snRNA) U6 foi utilizado como controle endógeno.

Todas as amplificações foram feitas nos equipamentos 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ou realplex mastercycler (Eppendorf). Os resultados foram comparados utilizando-se o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak and Schmittgen, 2001). Os níveis de expressão de transcritos foi calculada utilizando os valores de ΔCt das amostras e testada quanto à expressão diferencial utilizando One-way ANOVA com pós teste de Tukey no *software* GraphPad Prism versão 5.00 para Mac, San Diego, California, USA, www.graphpad.com. Um p-value de 0,05 ou menor definiu significância estatística. Os resultados foram representados utilizando a valor de expressão relativa ao controle (Fold Change), onde os controles foram considerados com valor de 1.

3.3.4 Preparação de bibliotecas para RNA-seq

As amostras foram enviadas para preparação de biblioteca e sequenciamento na CSF NGS Unit (Viena, Áustria) (www.csf.ac.at). As amostras foram tratadas primeiramente com kit para depleção de rRNA “Ribozero rRNA removal kit (Human/Mouse/Rat)” (Epicentre). A preparação da biblioteca foi realizada utilizando o kit “NEBNext mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina” (NEB). Preparação das amostras e ligação de adaptadores foi realizada com o kit “TruSeq RNA Sample Prep kit v2” (Illumina).

3.3.5 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras de RNA (RNA-seq) foi realizado nas dependências da CSF NGS Unit (Viena, Áustria) (www.csf.ac.at). Foi utilizado um aparelho Illumina HiSeqV4 (Illumina) e as reads geradas eram em formato Paired-end com 125bp. Cada condição experimental foi produzida com três replicatas biológicas. Oito lanes foram utilizados para o sequenciamento, com seis ou sete amostras por lane, conforme tabela 3.1. As amostras de RNA de *C. albicans* apenas foram sequenciadas apenas em uma lane para cada replicata biológica e o material aplicado para sequenciamento (cDNA) corresponderam a 50% do material de *M. musculus* aplicado.

Tabela 3.1 – Distribuição das amostras a serem sequenciadas no chip de sequenciamento. As amostras foram distribuídas em oito canaletas (lanes) de forma que cada amostra contendo RNA de *M. musculus* fosse sequenciada em duas lanes diferentes a fim de evitar viés de sequenciamento. A nomenclatura das amostras é composta por três elementos, a primeira letra indica a linhagem de camundongo analisada (B para BALB/c e D para DBA/2J), e dois números, onde o primeiro indica a replicata biológica analisada e o segundo indica o tempo de interação analisado (0 para 0 minutos, 1 para 45 minutos, 2 para 60 minutos e 3 para 90 minutos). Por exemplo, a amostra D2.3 representa a amostra de macrófagos obtidos de camundongo DBA/2J do pool 2 (segunda replicata) interagindo por 90 minutos com *C. albicans*. As amostras contendo material de *C. albicans* apenas foram sequenciadas apenas uma vez, e o material (cDNA) aplicado na lane corresponde a metade do material de RNA de camundongo aplicado.

Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8
B1.0	B1.0	B1.1	B1.1	B1.2	B1.2	B1.3	B1.3
B2.0	B2.0	B2.1	B2.1	B2.2	B2.2	B2.3	B2.3
B3.0	B3.0	B3.1	B3.1	B3.2	B3.2	B3.3	B3.3
D1.0	D1.0	D1.1	D1.1	D1.2	D1.2	D1.3	D1.3
D2.0	D2.0	D2.1	D2.1	D2.2	D2.2	D2.3	D2.3
D3.0	D3.0	D3.1	D3.1	D3.2	D3.2	D3.3	D3.3
		Ca1			Ca2		Ca3

3.3.6 Análise dos dados de RNA-seq

Os arquivos contendo os dados do sequenciamento foram recebidos em formato BAM. Os arquivos foram convertidos em formato Fastq utilizando o *software* Picard Tools (<http://picard.sourceforge.net>), e a qualidade das sequências e presença de adaptadores foram analisadas pelo FastQC (Andrews, 2010). Os adaptadores identificados pelo programa FastQC, e as bases ou reads com phred score menor do que 20 foram extirpadas da bibliotecas utilizando-se Cutadapt (Martin, 2011). Uma vez que algumas reads são extirpadas completamente, os pares formados pelo sequenciamento Paired-end devem ser reformados. Esse reparamento das reads foi realizado pela ferramenta NGM Interleave (Sedlazeck et al., 2013), e os arquivos Fastq com os Paired-ends foram novamente separados utilizando um script em Perl. As bibliotecas foram então mapeadas utilizando dois *softwares* de mapeamento diferentes, NextGenMap versão 0.4.12 (Sedlazeck et al., 2013), e TopHat2 versão 2.0.13 (Kim et al., 2013). Como referência para o mapeamento, foi utilizado

um arquivo com o genomas do Assembly 22 da linhagem SC5314 de *Candida albicans* (Muzzey et al., 2013) concatenado com o genoma Grc.m38 de *Mus musculus* (Cunningham et al., 2015). A ferramenta SAMtools (Li et al., 2009) foi utilizada na conversão de formatos SAM para BAM, reorganização das reads (sorting) e indexação. A contagem de reads por gene foi realizada utilizando o *software* featureCounts (Liao et al., 2014), usando um limiar mínimo de qualidade de mapeamento (mapping quality) (Li et al., 2008) de 20, quando aplicável. Visualizações do mapeamento foram realizadas utilizando o *software* de visualização Integrative Genome Viewer (IGV) (Thorvaldsdottir et al., 2013). A análise de expressão diferencial de genes foi realizada utilizando dois pacotes para R diferentes disponíveis no repositório Bioconductor (Gentleman et al., 2004), edgeR versão 3.8.5 (Robinson et al., 2010) e DESeq versão 1.18.0 (Anders and Huber, 2010). Para ambos os *softwares*, o limiar para expressão diferencial foi um p-value ajustado de 0,1 (Benjamini and Hochberg, 1995). Para identificação dos GO terms (Ashburner et al., 2000) dos genes diferencialmente expressos foi utilizado a ferramenta Biomart (Kinsella et al., 2011).

Para avaliação das taxas de reads mapeadas em *loci* de rRNA, foi utilizado o mapeador NextGenMap versão 0.4.12 (Sedlazeck et al., 2013) usando um limiar mínimo de identidade de 90%. A referência usada para o mapeamento foi arquivo fasta contendo todas as sequências do genoma de *Candida albicans* e camundongo (*Mus musculus*) obtidos nos bancos de dados Candida Genome Database (Binkley et al., 2014) e UCSC (Kuhn et al., 2013) respectivamente. As versões dos genomas utilizados para esse fim foram o Assembly 22 de SC5314 de *C. albicans* (Muzzey et al., 2013) e mm9 de camundongo (Flicek et al., 2014).

O cálculo da cobertura do transcrito e do genoma foi realizado usando dados do genoma Grc.m38.p1 de camundongo. O tamanho do transcrito foi estipulado em 61.400.000 pares de bases. O genoma 3.480.528.190 pares de bases (Flicek et al., 2012).

4. Resultados

4.1 Caracterização do transcrito de macrófagos murinos em resposta à infecção por *C. albicans*, por meio do sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq).

Neste estudo procurou-se caracterizar o transcrito de modelos murinos de suscetibilidade e resistência à infecção por *Candida albicans*. Macrófagos diferenciados à partir da medula óssea de camundongos de linhagens suscetível ou resistente a este patógeno foram obtidos e ensaios de interação *ex vivo* foram realizados visando caracterizar a modulação da expressão gênica, por meio de metodologias de sequenciamento de alto desempenho (RNA-seq).

Uma primeira tentativa foi realizada com as linhagens A/J como suscetíveis, e BALB/c como resistentes (Ashman, 1998; Ashman et al., 1996; Mullick et al., 2004; Peltz et al., 2011; Radovanovic et al., 2011a; Tuite et al., 2005). Todavia, problemas decorrentes do sequenciamento, tais como alta contaminação das bibliotecas com rRNA ocorrem, de forma que novos experimentos foram realizados.

Para a realização destes novo experimentos, houve a participação do grupo do professor Karl Kuchler da Medical University of Vienna durante um período de meu doutorado Sanduíche. O grupo do professor Kuchler tem experiência não somente na realização do experimento de RNA-seq no contexto da interação patógeno-hospedeiro, mas também na prática da análise concomitante do transcrito do patógeno e do hospedeiro durante essa interação (Tierney et al., 2012).

Primeiramente, a fim de estabelecer os tempos de interação, primeiramente foi analisado o crescimento do fungo. Sabidamente, *C. albicans* é um fungo de crescimento rápido, e o tempo de interação com macrófagos ou outros tipos celulares deve ser escolhido cuidadosamente, buscando um tempo de interação compatível com a sobrevivência das células do hospedeiro.

Uma curva de crescimento foi realizada a partir de um pré-inóculo preparado conforme descrito na sessão Material e Métodos. Duas replicatas foram realizadas em dias diferentes a partir de diferentes colônias. A velocidade de duplicação média obtida foi de 74

minutos (tempos de 69 e 79 minutos para cada replicata, respectivamente), conforme mostrado na figura 4.1.

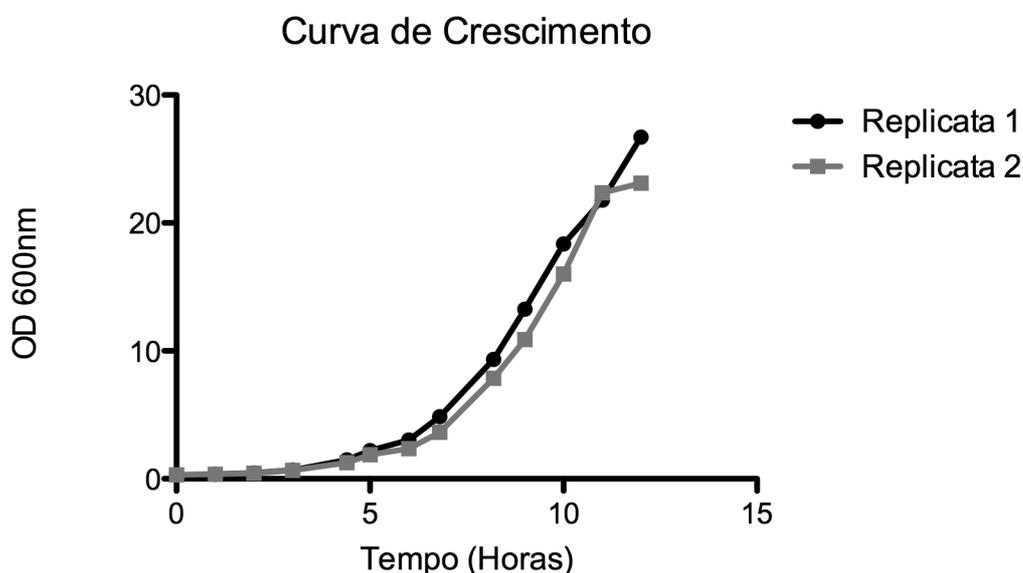


Figura 4.1 – Curva de crescimento de *C. albicans*

Curva de crescimento de *C. albicans* em YPD líquido a 30°C e 150 RPM. Duas culturas independentes foram crescidas em dias separados, na mesmas condições.

Considerando o rápido crescimento apresentado pelas células de *C. albicans*, e o fato de que macrófagos primários apresentaram uma alta mortalidade quando crescidos em co-cultura com leveduras deste fungo (dados não mostrados), foi realizado um ensaio de interação em tempo real para observar-se o comportamento de ambos. Assim, 5×10^4 macrófagos RAW 264.7 foram incubados em uma lâmina com câmaras e incubados por até duas horas e meia com leveduras de *C. albicans* SC5314 expressando GFP em um MOI de 2. A interação foi então realizada a 37°C dentro da câmara úmida de um microscópio Olympus Cell^R. O experimento produziu filmes que mostram a interação desses macrófagos com as células de *C. albicans* durante esse período (ANEXO 1). Nesses filmes é possível observar que os macrófagos começam a fagocitar rapidamente as células do fungo, ao mesmo tempo que ocorre o rápido desenvolvimento de hifas de *C. albicans*. Após cerca de duas horas de interação, é possível observar que as hifas perfuram os macrófagos, causando a morte dessas células. Dessa forma, ficou estabelecido que experimentos de interação de macrófagos com células vivas de *C. albicans* não devem durar mais do que o período de duas horas, nas condições descritas nesse trabalho.

Uma vez definido o tempo máximo de interação de duas horas, procurou-se definir quais seriam os tempos de interação que seriam utilizados para o novo experimento visando a análise transcritômica por RNA-seq. Para tanto, procurou-se observar o tempo de fagocitose de *C. albicans* pelos macrófagos. Sabidamente, a internalização das células do patógeno é importante para a ativação de expressão de genes relativos à resposta imune à *C. albicans* (Lorenz et al., 2004). Para estabelecer a partir de qual momento a fagocitose atinge o seu máximo, foi realizado um ensaio de fagocitose em que macrófagos de três linhagens de camundongos, duas resistentes à *C. albicans* (BALB/c e C57Bl/6) e uma suscetível (A/J) interagiram com células do patógeno coradas com Alexa488. O ensaio examinou os tempos de 30, 45 e 60 minutos de interação. O processo de fagocitose foi interrompido nos tempos determinados, pela diminuição da temperatura de incubação a 4°C, e as leveduras não internalizadas foram lavadas e a fluorescência (corante Alexa488) foi extinta com o corante Trypan Blue. Os macrófagos foram então fixados e analisados por citometria de fluxo para determinar a proporção de macrófagos com células internalizadas. Esse experimento foi realizado em duplicata. A figura 4.2 mostra essas proporções para cada tempo, 0, 30, 45 e 60 minutos (4.2 A-D). A figura 4.3 mostra os mesmos dados na forma de um gráfico de barras. É possível observar que com 30 minutos de interação, a proporção de macrófagos com pelo menos uma célula de *C. albicans* internalizada já é bastante próximo do máximo de fagocitose encontrado após 60 minutos de interação. É possível afirmar, portanto, que após 30 minutos de interação já ocorre formação de fagossomos. É possível, portanto, que já haja sinalização específica estimulada pelo processo de fagocitose de leveduras de *C. albicans*.

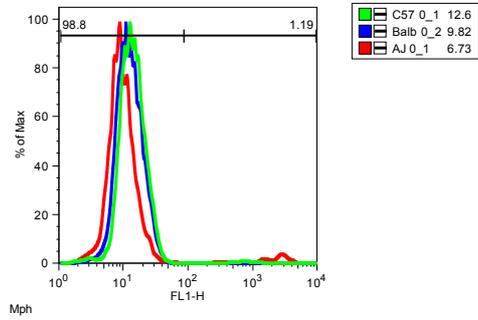
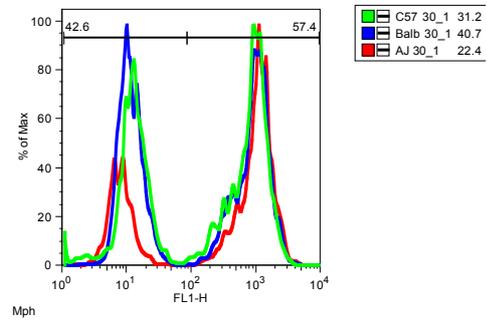
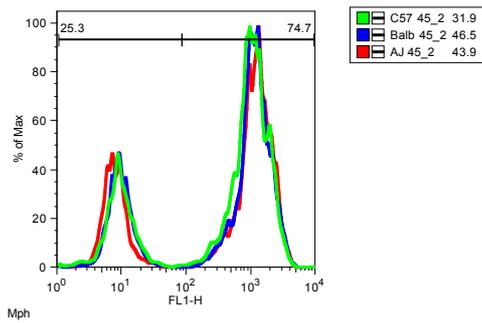
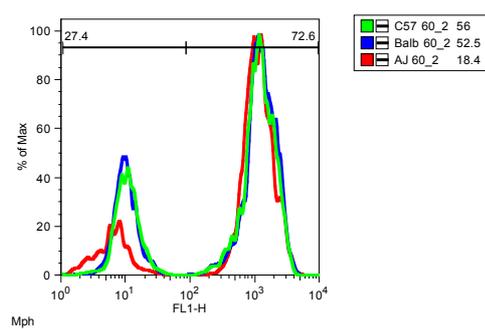
A**B****C****D**

Figura 4.2 - Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo de BMDMs incubados com *C. albicans*

Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo. Cada gráfico representa a porcentagem de macrófagos de três linhagens de camundongos, A/J (vermelho), BALB/c (azul) e C57BI/6 (verde) com células de *C. albicans* internalizadas. Cada gráfico representa um tempo de interação diferente, 0 minutos (A), 30 minutos (B), 45 minutos (C) e 60 minutos (D).

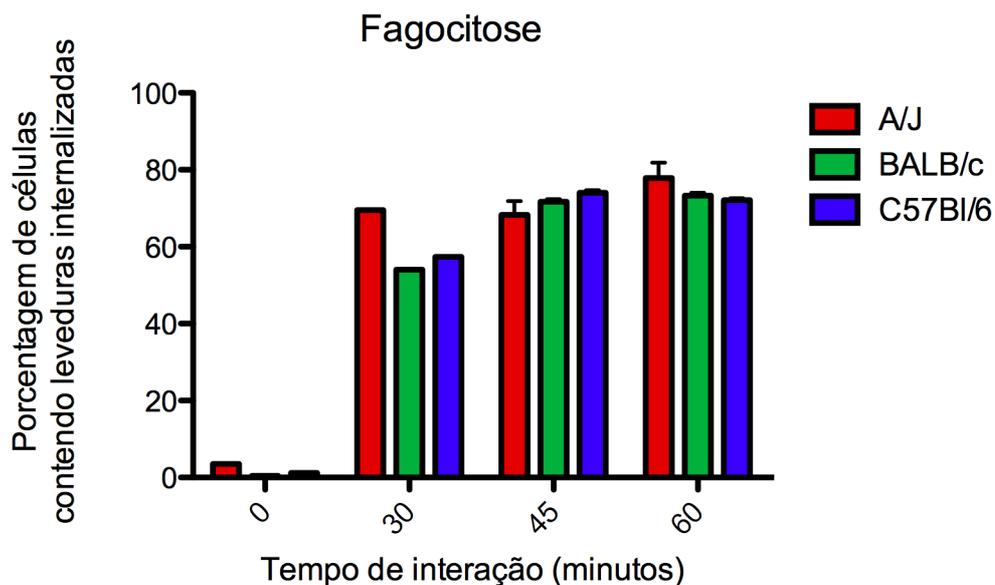


Figura 4.3 – Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo de BMDMs incubados com *C. albicans*

Quantificação do ensaio de fagocitose por citometria de fluxo. Cada barra representa a porcentagem de macrófagos de cada uma de três linhagens de camundongos, A/J (vermelho), BALB/c (azul) e C57Bl/6 (verde) com células de *C. albicans* internalizadas. Cada ponto do eixo X representa um tempo de interação diferente, 0 minutos, 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos.

Para confirmar a ocorrência de fagocitose, conforme observado por citometria de fluxo, foi realizado um ensaio de interação de BMDMs com os mesmos tempos, 0, 30, 45 e 60 minutos, e as células analisadas por microscopia confocal. Aproximadamente 5×10^5 macrófagos das linhagens A/J, BALB/c e C57Bl/6 foram adicionados em lâminas com câmaras individualizadas, e expostas à células de *C. albicans* pelos tempos determinados. Ao fim desses períodos, as células foram fixadas, permeabilizadas com metanol e tratadas com anticorpos marcados (ver item 3.2.8 da metodologia). Por fim, as lâminas foram analisadas por microscopia confocal. É possível observar nas microfotografias que, de fato, a maioria dos macrófagos já apresenta algumas células de *C. albicans* fagocitadas à partir de 30 minutos de interação (figura 4.4). Isso confirma, os resultados anteriores, segundo os quais após 30 minutos um índice de fagocitose elevado e similar ao observado para tempos maiores de interação (60 minutos), também foram reproduzidos neste experimento empregando a interação de outra linhagem celular de macrófagos (BMDMs) com leveduras de *C. albicans*.

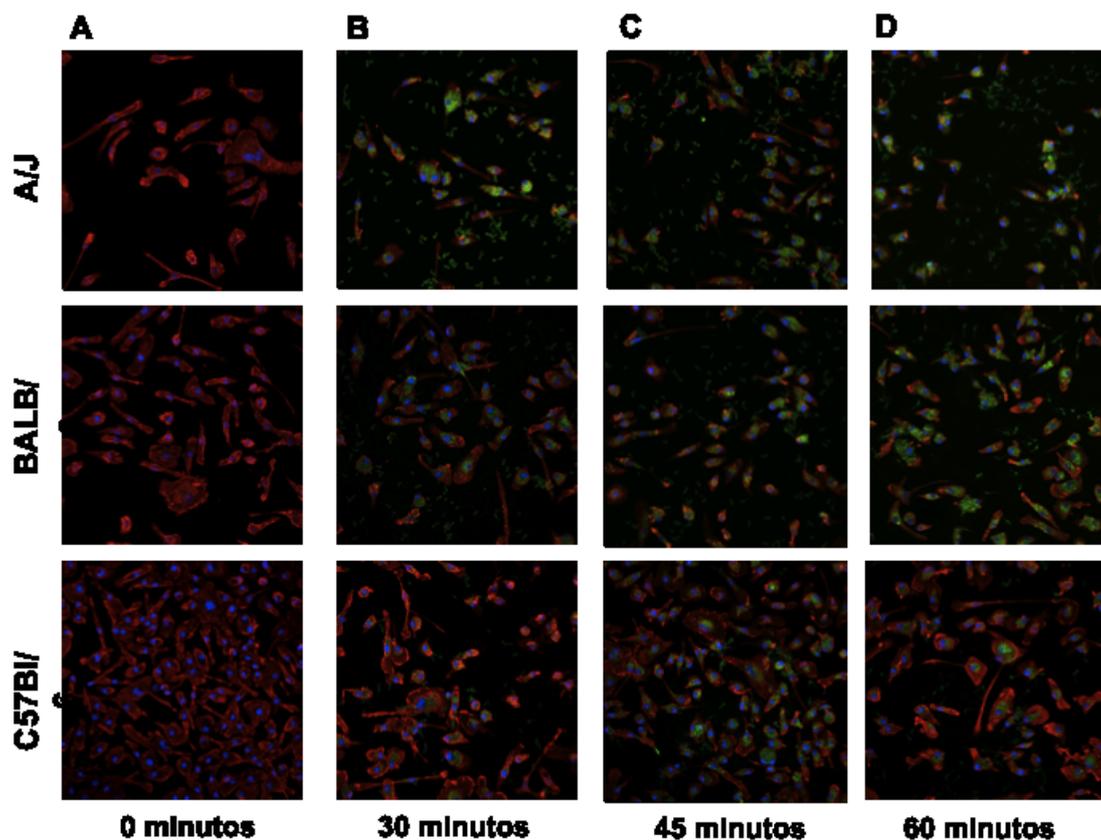


Figura 4.4 – Interação de BMDMs com *C. albicans* por microscopia confocal

Microfotografias (400x) da interação de macrófagos (BMDM) de camundongos de três linhagens diferentes, A/J, BALB/C e C57Bl/6, realizadas em microscópio confocal (Zeiss LSM710). Cerca de 5×10^4 macrófagos foram co-cultivados por diferentes tempos com leveduras de *C. albicans* SC5314 expressando GFP (MOI 2). As colunas representam os diferentes tempos 0 minutos (A), 30 minutos (B), 45 minutos (C) e 60 minutos (D). As fileiras representam as linhagens A/J (primeira fileira), BALB/c. (segunda fileira) e C57Bl/6 (terceira fileira). Marcação em verde representa GFP produzido pelas células de *C. albicans*, em azul a marcação em DAPI (marcação para núcleo), e em vermelho a marcação para β -tubulina (anticorpos marcados com Alexa568 – Santa Cruz Biotechnoloiges).

Para identificar quais tempos analisados até o seguinte momento são os mais adequados para a realização de uma análise transcritômica dessa interação, foi escolhido um gene bem caracterizado da resposta de macrófagos à *C. albicans*, e sua expressão foi analisada nos tempos determinados. O gene da citocina pró-inflamatória $TNF\alpha$ foi escolhido por ser um importante marcador da resposta a *C. albicans*. Cerca de 10^6 macrófagos foram co-cultivados com leveduras de *C. albicans* (MOI 2) por 0, 30, 45, 60 e 90 minutos. O RNA total foi extraído e o níveis de expressão de $TNF\alpha$ foi mensurado por qRT-PCR (figura 4.5).

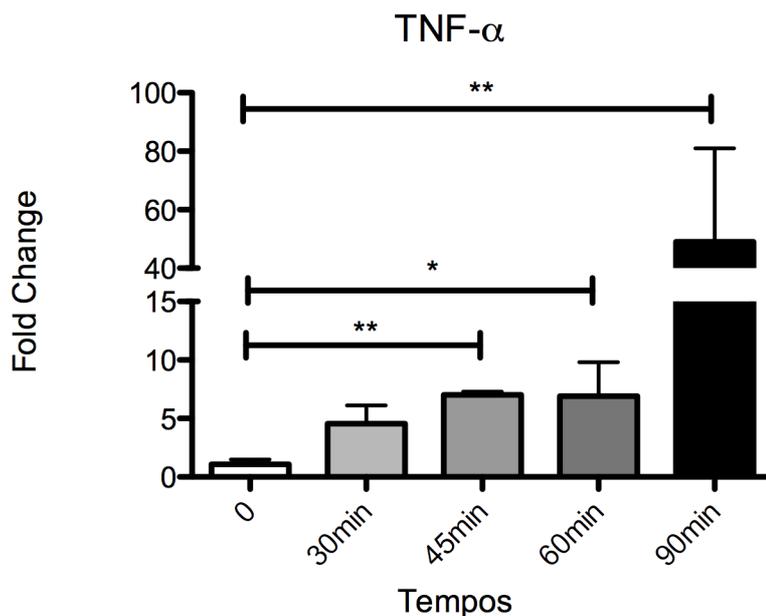


Figura 4.5 – Níveis de expressão de TNF- α de BMDMs incubados com *C. albicans*

Níveis de expressão de TNF α em macrófagos (BMDMs) obtidos a partir de camundongos BALB/c incubados com leveduras de *C. albicans*. A incubação foi realizada por 0, 30, 45, 60 e 90 minutos com um MOI de 2. Análise estatística foi realizada One-way ANOVA e pós-teste de Tukey (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005). O experimento foi realizado em triplicata técnica.

É possível observar que com 30 minutos já ocorre um aumento nos níveis do transcrito TNF α , embora não significativo estatisticamente. Com 45 minutos já é possível observar um aumento consistente estatisticamente de expressão de TNF α , que se consolida com 60 minutos, e com 90 minutos atinge os níveis mais altos.

Com base nesses resultados, foram escolhidos como os tempos de interação para o experimento de análise transcritômica por RNA-seq os tempos de 0, 45, 60 e 90 minutos. Devido a problemas técnicos, todavia, camundongos da linhagem A/J se tornaram indisponíveis nesse momento do trabalho. Em busca de uma nova alternativa de linhagem suscetível, uma busca na literatura mostrou a linhagem DBA/2J como uma alternativa para substituição de linhagem A/J, suscetível à *C. albicans*. Para comprovar que os camundongos DBA/2J disponíveis demonstravam suscetibilidade à *C. albicans*, uma infecção *in vivo* foi realizada. Três diferentes concentrações de leveduras foram inoculadas pela via intravenosa (veia da cauda) dos camundongos. As três concentrações mostraram-se diferentes estatisticamente, demonstrando que DBA/2J é suscetível à *C. albicans* em comparação com BALB/c (figura 4.6). Dessa forma, a linhagem murina DBA/2J foi selecionada como a linhagem suscetível para ensaio de interação com fins de análises transcritômicas por RNA-seq.

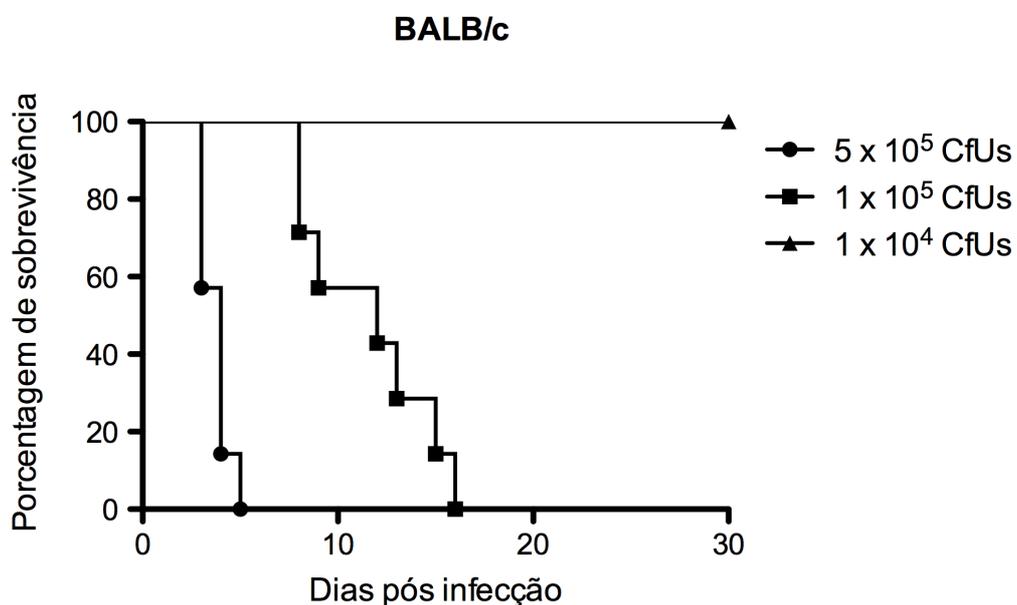
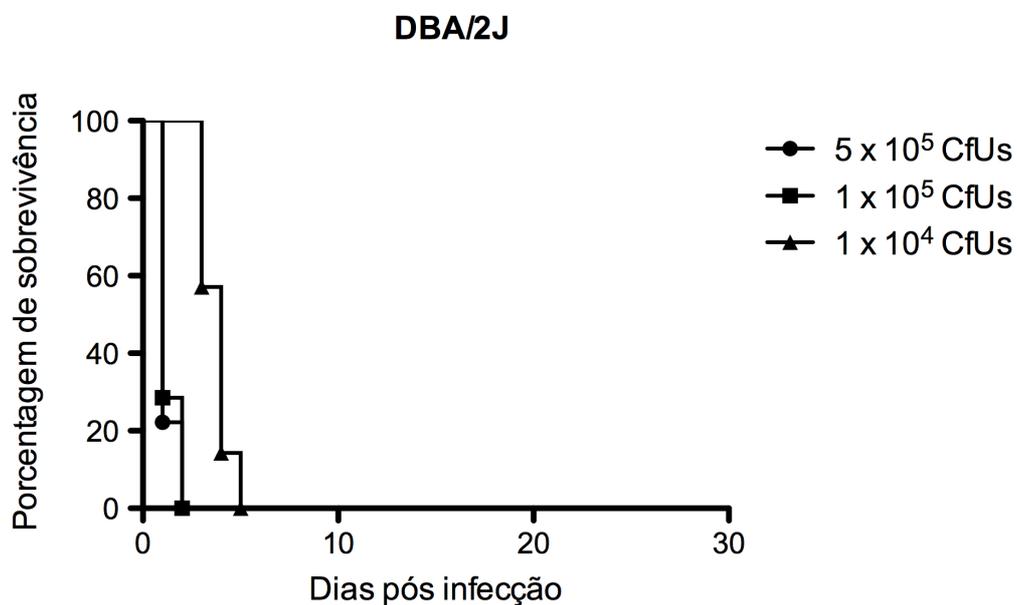


Figura 4.6 – Curva de sobrevivência de camundongos infectados *in vivo* com *C. albicans*

Curva de sobrevivência das linhagens DBA/2J e BALB/c. 23 indivíduos DBA/2J e 21 BALB/c machos com idade de 8 semanas foram inoculados intravenosamente via veia da cauda com 5×10^5 , 1×10^5 e 1×10^4 leveduras de *C. albicans* SC5314. Análise estatística dos dados foram realizadas utilizando-se os testes de Logrank (Mantel-Cox) e de Gehan-Breslow-Wilcoxon. O valor p foi inferior a 0,05 para todas as concentrações cheçadas.

Uma vez escolhidas as duas linhagens para a análise transcritômica, um ensaio foi realizado para extração de RNA total dos macrófagos das duas linhagens para posterior sequenciamento. Os camundongos foram divididos em três diferentes grupos que formariam as triplicatas biológicas do experimento. Camundongos de cada um dos três grupos tiveram a medula extraídas e as células obtidas foram submetidas a um protocolo de diferenciação para macrófagos primários (conforme item 3.2.3 da metodologia) separadamente para cada uma dessas replicatas biológicas. Cerca de 2×10^6 macrófagos de cada linhagem para cada condição experimental foram co-cultivados com 4×10^6 leveduras de *C. albicans* (MOI 2) por 0, 45, 60 e 90 minutos. O RNA total de cada uma das amostras foi extraído conforme item 3.3.1, quantificado e teve sua qualidade aferida pela plataforma Bioanalyzer. O resultado de cada uma das amostras pode ser visto na tabela 4.1. As amostras contendo RNA de *C. albicans* apenas foram omitidas da tabela, pois o kit empregado nas análises realizadas no Bioanalyzer é específico para RNA de mamíferos, produzindo resultados imprecisos para RNA de fungo, a despeito de sua qualidade. O eletroferograma das amostras pode ser visto na figura 4.7, e mostra também que o RNA apresenta suficiente qualidade para sequenciamento.

Tabela 4.1 – Análise de integridade das amostras de RNA por Bioanalyzer (Agilent) das amostras de RNA de ensaio de interação entre 2×10^6 BMDMs das linhagens BALB/c e DBA/2J e *C. albicans* com MOI 2. O valor de RIN representa o valor do index de qualidade padrão do método (RNA integrity number). O experimento foi realizado em triplicata biológica. As amostras contendo RNA de *C. albicans* apenas foram omitidas da tabela.

Amostra	RIN	Amostra	RIN
Balb1 0min	9,5	DBA1 0min	8,5
Balb1 45min	9,5	DBA1 45min	7,3
Balb1 60min	9,5	DBA1 60min	9,0
Balb1 90min	9,4	DBA1 90min	7,4
Balb2 0min	9,4	DBA2 0min	8,8
Balb2 45min	9,2	DBA2 45min	8,7
Balb2 60min	8,4	DBA2 60min	8,9
Balb2 90min	9,4	DBA2 90min	8,7
Balb3 0min	9,6	DBA3 0min	8,6
Balb3 45min	9,6	DBA3 45min	8,6
Balb3 60min	9,7	DBA3 60min	8,6
Balb3 90min	9,4	DBA3 90min	8,6

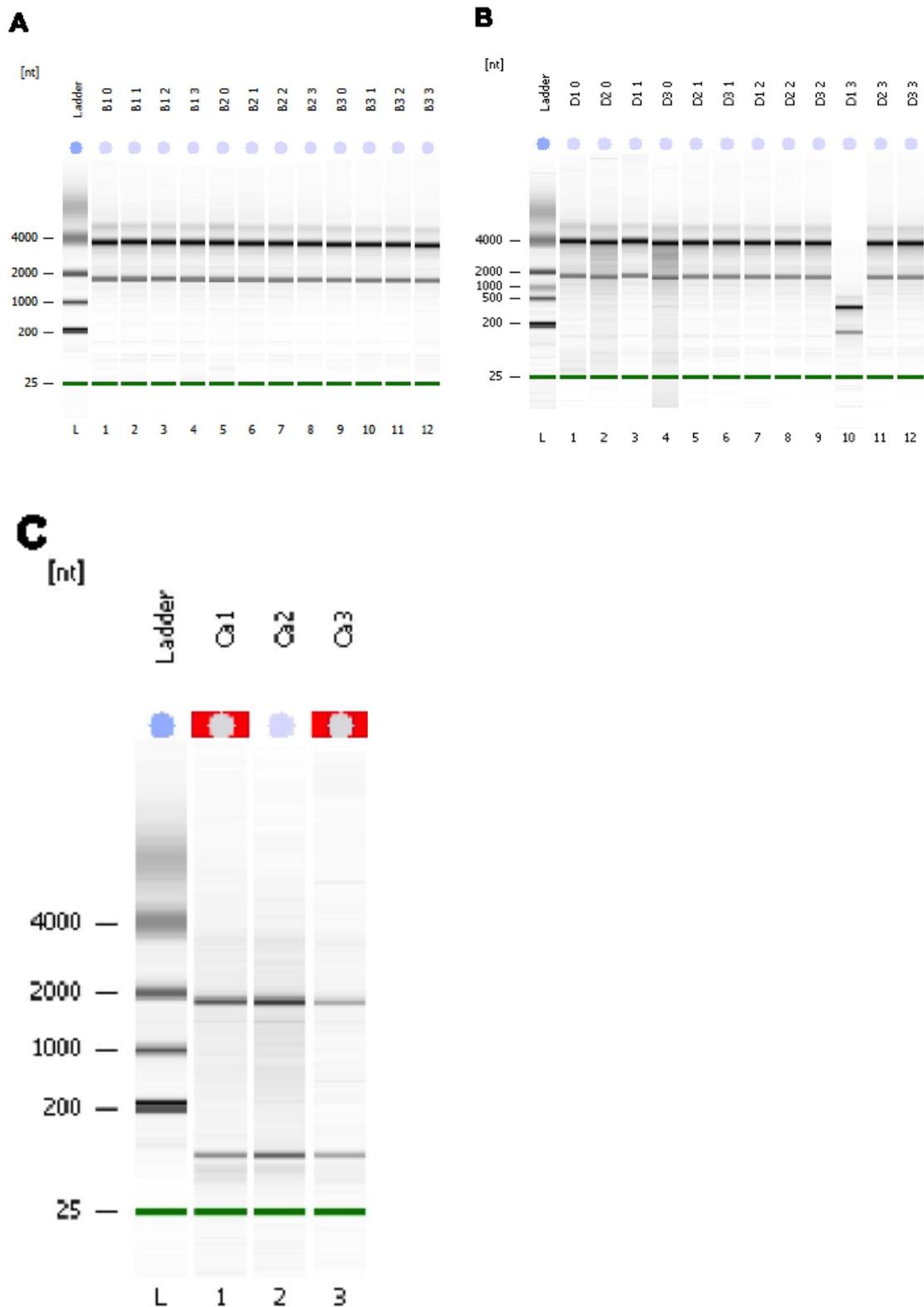


Figura 4.7 – Níveis de qualidade dos RNAs para sequenciamento

Eletoferograma gerado por Bioanalyzer (Agilent) das amostras de RNA de ensaio de interação entre 2×10^6 BMDMs das linhagens BALB/c(A), DBA/2J(B) e *C. albicans* com MOI 2, além de *C. albicans* apenas (C). O experimento foi realizado em triplicata biológica.

O RNA extraído foi então enviado para preparação de biblioteca e sequenciamento, conforme descrito nos itens 3.3.4 e 3.3.5 da metodologia. Os arquivos recebidos da

instituição de sequenciamento CSF, em Viena, foram analisados conforme a *pipeline* mostrado na figura 4.8, e no item 3.3.6 da metodologia. Resumidamente, as bibliotecas foram convertidas em um formato apropriado e a qualidade dos dados foram analisadas. Sequências contendo baixa qualidade ou adaptadores do sequenciamento foram excluídas e as sequências restantes foram mapeadas nos genomas de referência (*C. albicans* e *Mus musculus*), no arquivo com a concatenação dessas duas referências, ou nas sequências dos *loci* de rRNA. Para o mapeamento, foram utilizados dois diferentes *softwares* NextGenMap e Tophat2. Uma vez que as bibliotecas foram mapeadas na referência de interesse, o número de reads mapeando em cada gene foi calculado usando o *software* featureCounts. A expressão diferencial de genes foi calculada usando dois diferentes pacotes para R, DESeq e edgeR. A anotação dos genes conforme GO term (Ashburner et al., 2000) foi realizada utilizando a ferramenta Biomart.

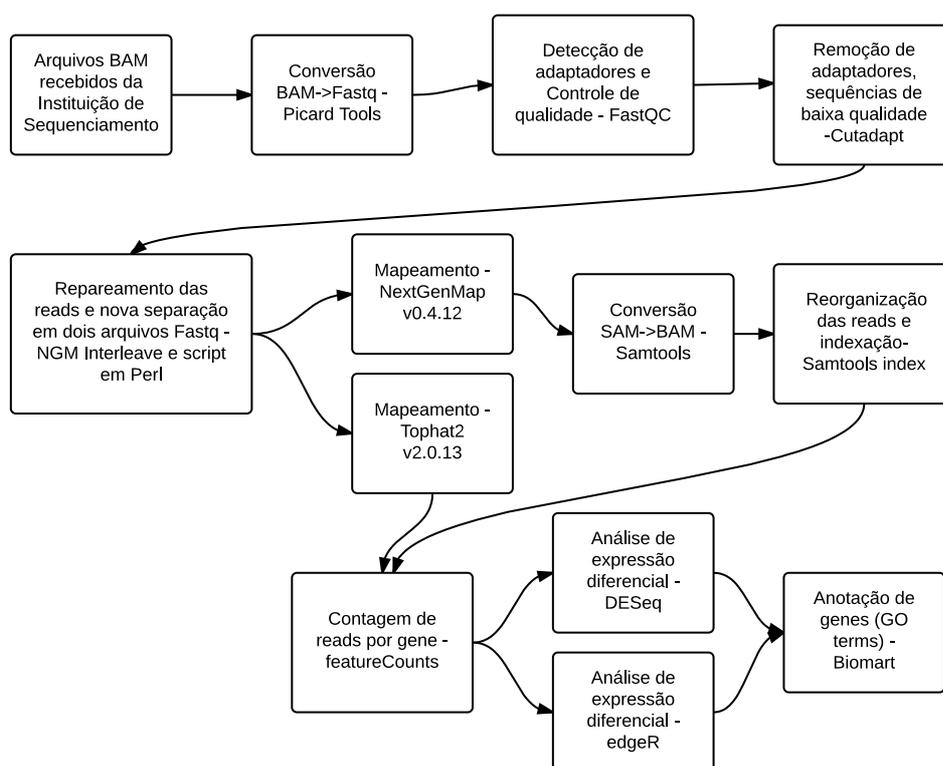


Figura 4.8 – Pipeline de análise do sequenciamento

Pipeline de análise dos dados do sequenciamento. Detalhes podem ser encontrados no item 3.3.6.

Tabela 4.2 – Resumo do mapeamento das bibliotecas usando como referência um construto composto da concatenação do genoma do camundongo Grc.m38 (ENSEMBL) com o genoma de *C. albicans* assembly 22 da linhagem SC5314 (terceira e quarta colunas), ou usando os *loci* de rRNA de camundongo (quinta coluna). As análises de cobertura do transcrito e do genoma também podem ser vistas.

Amostras	Total de reads	% de reads mapeadas	% de reads mapeadas no genoma do camundongo	% de reads mapeadas em <i>loci</i> de rRNA
Balb1 0min	148.605.570	88,83	88,79	1,38
Balb2 0min	142.370.746	85,97	85,65	1,27
Balb3 0min	315.957.746	86,52	86,43	1,09
Dbal1 0min	135.514.716	46,54	45,35	0,85
Dbal2 0min	135.080.322	90,31	86,68	0,74
Dbal3 0min	141.613.568	88,34	79,30	0,89
Balb1 45min	123.660.779	87,12	80,29	4,36
Balb2 45min	112.590.678	83,49	75,79	3,23
Balb3 45min	116.764.704	82,20	56,14	5,99
Dbal1 45min	150.041.574	89,54	82,60	2,78
Dbal2 45min	125.263.340	78,40	71,72	3,20
Dbal3 45min	125.470.108	90,02	73,94	3,19
Balb1 60min	168.783.672	92,47	92,45	4,93
Balb2 60min	163.212.912	91,25	91,24	4,95
Balb3 60min	151.393.964	84,41	84,40	3,91
Dbal1 60min	132.872.212	77,37	74,64	4,97
Dbal2 60min	118.149.100	84,53	80,68	3,19
Dbal3 60min	115.967.840	88,11	83,02	3,77
Balb1 90min	151.215.782	82,16	74,80	6,04
Balb2 90min	162.975.170	85,87	81,05	5,51
Balb3 90min	189.905.998	84,42	79,62	10,04
Dbal1 90min	201.082.730	81,40	75,01	4,64
Dbal2 90min	200.895.488	84,14	76,92	5,02
Dbal3 90min	181976218	84,93	79,18	3,95

O resumo dos processo de mapeamento utilizando o *software* NextGenMap e o genoma de *Mus musculus* e de *C. albicans* concatenados como referência para o mapeamento pode ser visto na tabela 4.2. Na primeira coluna é possível avaliar as amostras indicadas pela linhagem do camundongo, número da replicata e o tempo de interação. Na segunda coluna o número total de *reads* geradas para uma dada biblioteca após processamento para retirada de adaptadores e sequências de baixa qualidade (conforme figura 4.8). A terceira coluna mostra a porcentagem de *reads* que mapearam no genoma de *M. musculus* e *C. albicans* concatenados. A quinta coluna mostra a porcentagem desses *reads* que mapearam exclusivamente em genes de *M. musculus* dentro do universo do

genoma concatenado das duas espécies. A quinta coluna mostra a porcentagem de reads que mapearam em *loci* de rRNA com identidade de sequência superior a 90%.

Os próximos passos envolvem a análise dos mapeamentos utilizando Tophat2, assim como o mapeamento usando o genoma e as sequências genômicas de rRNA de *C. albicans* como referência. Em seguida a análise de expressão diferencial de genes para os dois organismos, conforme figura 4.8, e validação desses resultados por qRT-PCR.

A figura 4.9 mostra o resultados dos mapeamentos realizados utilizando NextGenMap e usando-se como referência os genomas de *M. musculus* e *C. albicans* concatenados. Os três graficos mostram as bibliotecas das amostras de BALB/c (fig. 4.9 A), DBA/2J (fig. 4.9 B) e *C. albicans* apenas (fig. 4.9 C), assim como a proporção de reads que mapearam no genoma concatenado das duas espécies, e contra apenas o genoma de *M. musculus* (verde) ou o genoma de *C. albicans* o genoma.

Estas análises encontram-se em andamento e serão concluídos para a confecção e publicação do artigo científico referente a esta parte do trabalho.

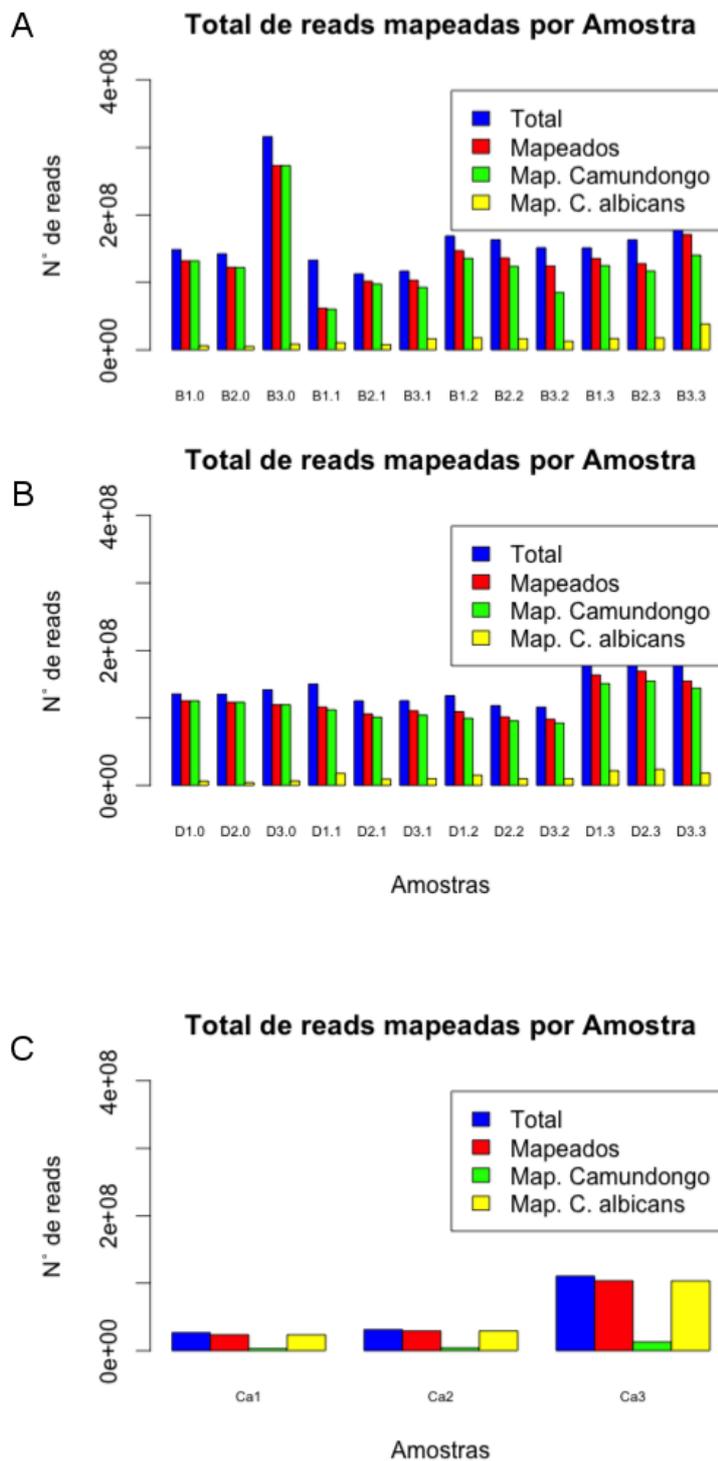


Figura 4.9 – Mapeamento das bibliotecas sequenciadas
 Mapeamento das bibliotecas de BALB/c (A), DBA/2J (B) e *C. albicans* apenas(C). Os gráficos mostram o total de reads usadas para o mapeamento (azul), o número de reads que mapearam no genoma concatenado de *Mus musculus* GRC.m38 (ENSMBL) com *C. albicans* assembly 22 da linhagem SC5314 (vermelho), o número de reads mapeadas que mapearam exclusivamente no genoma do camundongo (verde) e o número de reads que mapearam exclusivamente no genoma de *C. albicans*. A identificação das amostras se refere à linhagem, replicata e o tempo (ex. B1.3 É a replicata 1 para o tempo analisado 3 (90 minutos de interação)).

4.2 Padrão da resposta de microRNAs (miRNAs) em macrófagos co-cultivados com *Candida albicans*.

Nesse estudo foi investigado o perfil de expressão de alguns miRNAs relevantes do ponto de vista da resposta imune em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) estimulados com células de *Candida albicans* de diferentes morfologias. Para um *screening* inicial, BMDMs de camundongos BALB/c com entre oito e doze semanas foram isolados e incubados tanto com leveduras ou hifas usando uma multiplicidade de infecção de 2, por 8 ou 16 horas. O RNA então foi extraído para mensuração dos níveis de miRNA e mRNAs, enquanto o sobrenadante foi coletado para mensuração de citocinas por ELISA. Esses experimentos foram realizados em triplicata, em que cada replicata foi formada por um grupo diferente de camundongos.

Com o intuito de verificar se os macrófagos originavam uma resposta imunológica apropriada, os níveis das citocinas TNF α , Interleucina 10 (IL-10), MCP-1 e Interleucina 6 (IL-6) no sobrenadante de cultura foram checados por ELISA (Blasi et al., 1994; Netea et al., 2004b; Sarazin et al., 2010). Os níveis de TNF α nos sobrenadantes de cultura não mostraram nenhuma diferença significativa após 8 horas de incubação tanto com leveduras, como com hifas. Mas após 16 horas, os níveis dessa citocina demonstraram um significativo aumento nos macrófagos incubados com hifa apenas (Figura 4.10 A). Os níveis da citocina anti-inflamatória IL10 mostraram uma redução significativa nos níveis basais após incubação com hifas após 8 e 16 horas, mas não após incubação com leveduras (Figura 4.10 B). A citocina pró-inflamatória MCP-1 não demonstrou alterações significativas em nenhuma das condições analisadas Figura 4.10 C). A citocina pró-inflamatória IL6 mostrou aumentos significativo nos sobrenadantes de macrófagos incubados com hifa apenas, após 16 horas de incubação (Figura 4.10 D). Esses resultados confirmam que os BMDMs responderam adequadamente ao estímulo causado por *C. albicans*.

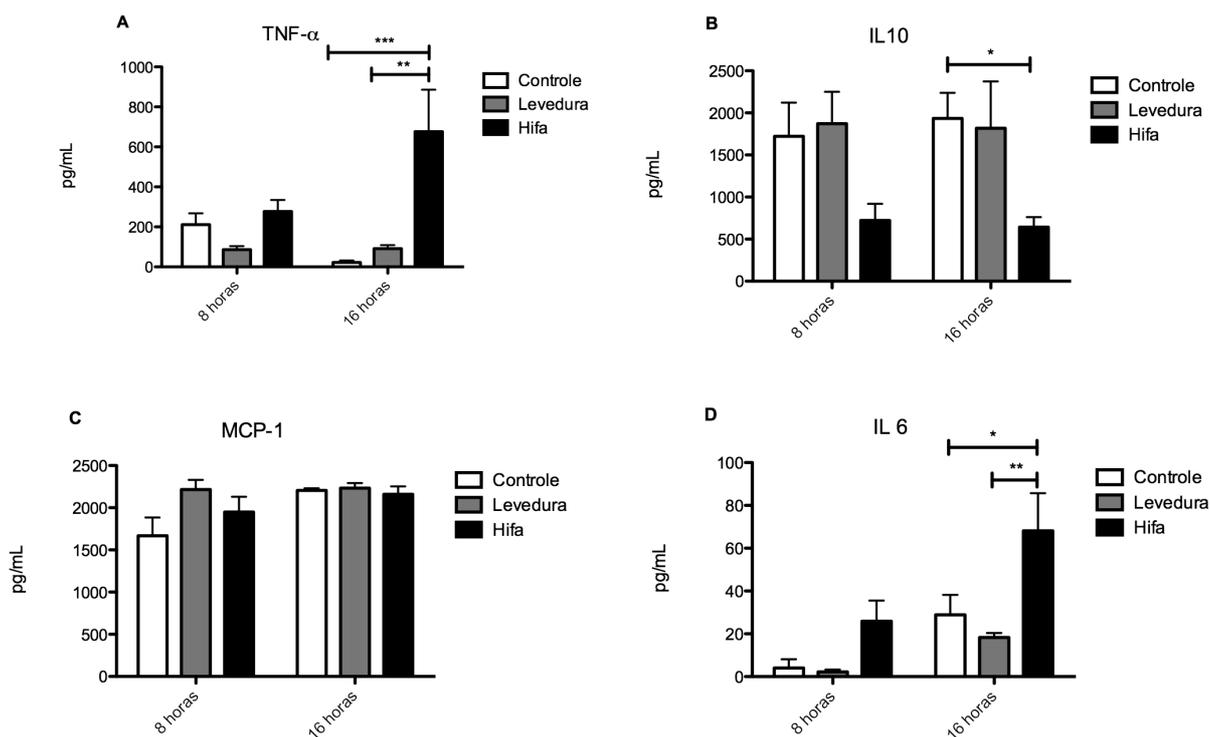


Figura 4.10 – Secreção de citocinas por BMDMs incubados com *C. albicans* morta pelo calor

Citocinas secretadas por BMDMs da linhagem BALB/c incubados ou não com leveduras ou hifas mortas pelo calor com um MOI de 2 por 8 ou 16 horas. As citocinas (A) TNF α , (B) IL10, (C) MCP-1 e (D) IL6 foram mensuradas ELISA no sobrenadante de cultura das células. A análise estatística foi realizada usando Two-way ANOVA e pós-teste de Buonferroni. (*) representa p-value < 0.05.

Os níveis de expressão de miR125b, miR132, miR145, miR146a, miR155 e miR455 foram testados usando sondas Taqman (Life Technologies) seguindo a descrição do experimento acima. Tanto miR125b e miR132 mostraram um aumento de expressão quando os macrófagos foram expostos a hifas mortas pelo calor tanto por 8 quanto 16 horas, mas não quando expostos a leveduras nas mesmas condições (Figura 4.11 A e B). Apesar de que após 16 horas, macrófagos apresentaram uma tendência de aumento não significativa quando expostos a leveduras (Figura 4.11 A). Após 8 horas de incubação, o acúmulo de ambos miR125b e miR132 eram significativamente maiores em hifas do que em leveduras, enquanto que após 16 horas apenas para miR132 era maior (Figura 4.11 A e B). miR146a e miR155 estavam aumentados em macrófagos expostos a leveduras e hifas após 8 horas, mas após 16 horas apenas miR146a permaneceu acima dos níveis dos controles (Figuras 4.11 C e 4.13 A). Em ambos os tempos, a acumulação de miR146a foi significativamente maior para macrófagos expostos a hifas do que para aqueles expostos a leveduras (Figura 4.11 C). miR455 também mostrou um acúmulo maior em macrófagos expostos a hifas do que naqueles expostos a leveduras ou ao controle após 8 horas, mas não após 16 horas. A estimulação com leveduras não resultou em nenhum aumento de acúmulo após ambos os

tempos estudados (Figura 4.11 E). miR145 não mostrou nenhuma alteração significativa nas condições estudadas (Figura 4.11 D).

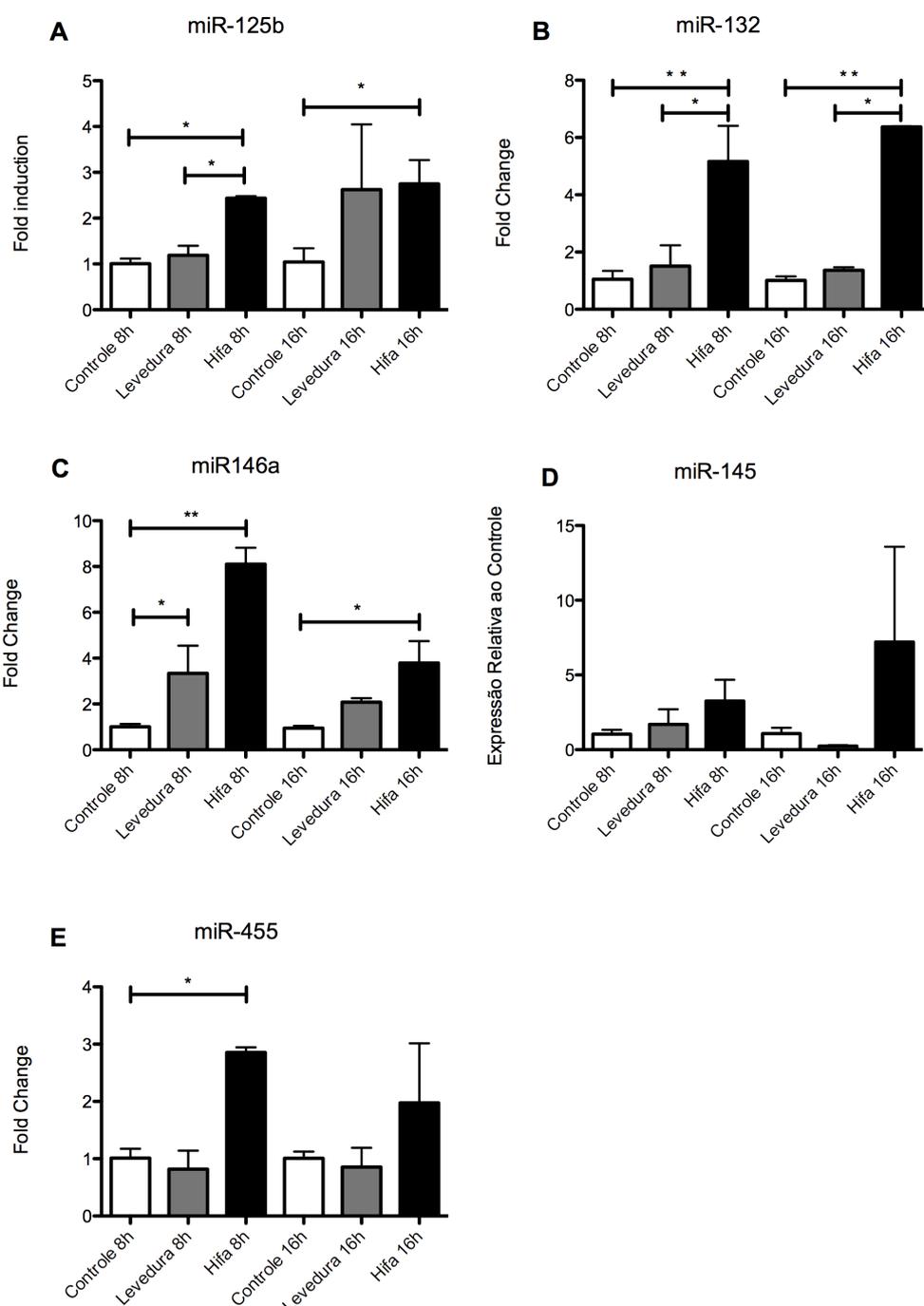


Figura 4.11 - Indução da expressão de miRNAs por *C. albicans* morta pelo calor em BMDMs

Expressão de (A) miR125b, (B) miR132, (C) miR146a, (D) miR145 e (E) miR455 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos BALB/c incubados com leveduras ou hifas de *C. albicans* mortas pelo calor por 8 ou 16 horas com um MOI de 2. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o

Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

Após analisar esses resultados, foi decidido investigar a expressão de outros miRNAs relacionados à resposta imune utilizando condições similares. Macrófagos (BMDMs) de camundongos BALB/c foram incubados com leveduras e hifas de *C. albicans* com um MOI de 2. Uma vez que o experimento anterior demonstrou que o tempo de 8 horas mostrou os maiores níveis de expressão para a maioria dos miRNAs, apenas esse tempo de incubação foi selecionado para esse experimento. Dessa forma, a regulação da expressão dos miRNAs miR9, miR199, miR221, miR223, miR346 e miR466l foram analisadas em resposta a *C. albicans*. miR9 mostrou aumento de expressão em macrófagos expostos tanto a leveduras quanto a hifas, mas a expressão em macrófagos expostos a hifas esse aumento foi significativamente maior (Figura 4.12 A). Os miRNAs miR199, miR221 e miR223 mostraram um aumento significativo da expressão em macrófagos expostos a hifas, mas não a leveduras (Figura 4.12 B, C e D). miR346 e miR466l não foram detectados pelos métodos utilizados (dados não mostrados).

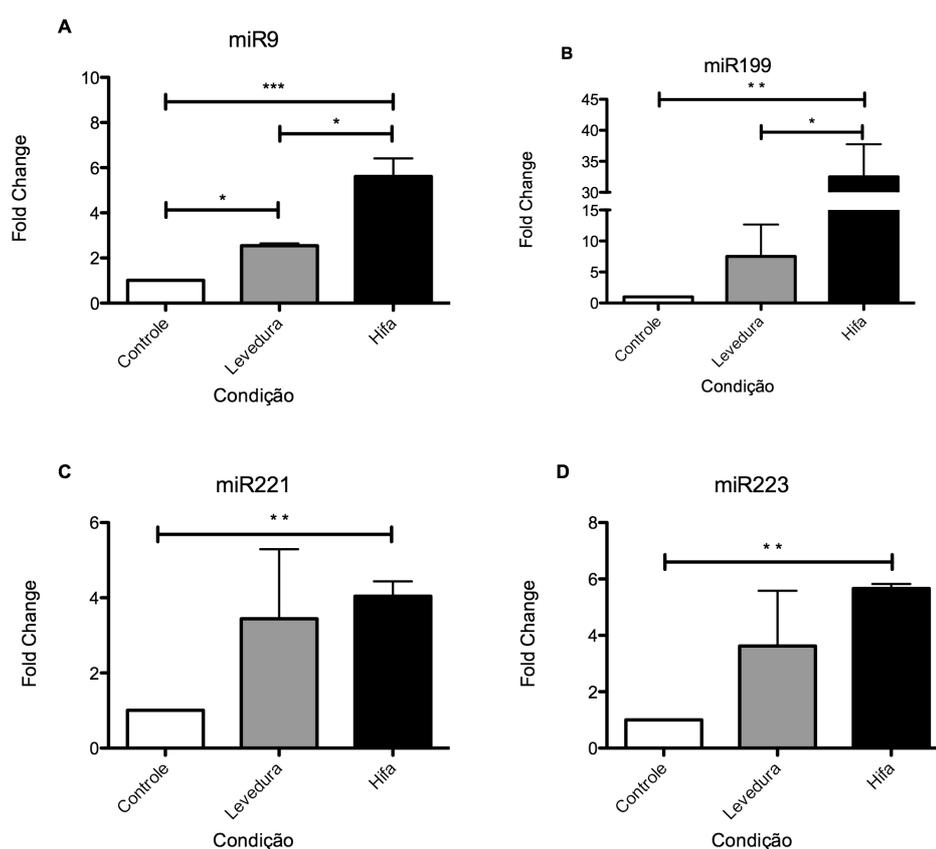


Figura 4.12 – Indução da expressão de miRNAs por *C. albicans* morta pelo calor em BMDMs

Expressão de (A) miR9, (B) miR199, (C) miR221 e (D) miR223 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos BALB/c incubados ou não com leveduras ou hifas de *C. albicans* mortas pelo calor por 8 horas com um MOI de 2. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life

Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o ΔC_t das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

miR155 apresentou expressão aumentada após incubação tanto com hifas, quanto com leveduras de *C. albicans* após 8 horas de incubação, mas essa expressão regressou aos níveis equivalentes ao controle não estimulado após incubação por 16 horas (Figura 4.13 A). A fim de melhor compreender o funcionamento do mecanismo de regulação de miR155, os níveis de pri-miR155 foram avaliados. Desta forma, procurou-se analisar se a diferença de acúmulo deste miRNA se deve ao fato de um aumento na transcrição, ou uma diminuição da degradação do miRNA maduro. Esse pri-miR155 é o produto transcricional do gene “miR155 Host Gene” (MIR155HG), também conhecido como B-Cell integration Cluster (BIC) (Lagos-Quintana et al., 2002; Tam, 2001), antes de seu processamento por DROSHA. Pelos resultados obtidos, é possível verificar que o aumento da acumulação de pri-miR155 segue o mesmo padrão de expressão que o miR155 maduro. Após 8 horas de incubação tanto com leveduras, quanto com hifas, pri-miR155 apresentou aumento de expressão em ambas as condições. E após 16 horas, ele apresentava maior expressão apenas quando incubado com hifas (Figura 4.13 B). Esses resultados sugerem que a regulação da transcrição deste gene desempenha um papel importante no aumento da acumulação de miR155 maduro em um instante inicial da infecção. No entanto, em um período mais tardio da interação, os níveis de pri-miR155 continuam elevados, enquanto os níveis do miR155 maduro retornam a níveis equivalentes ao controle não estimulado com *C. albicans*. Isso pode sugerir que a degradação do miR155 maduro pode ser um processo importante na regulação deste miRNA neste estágio da infecção.

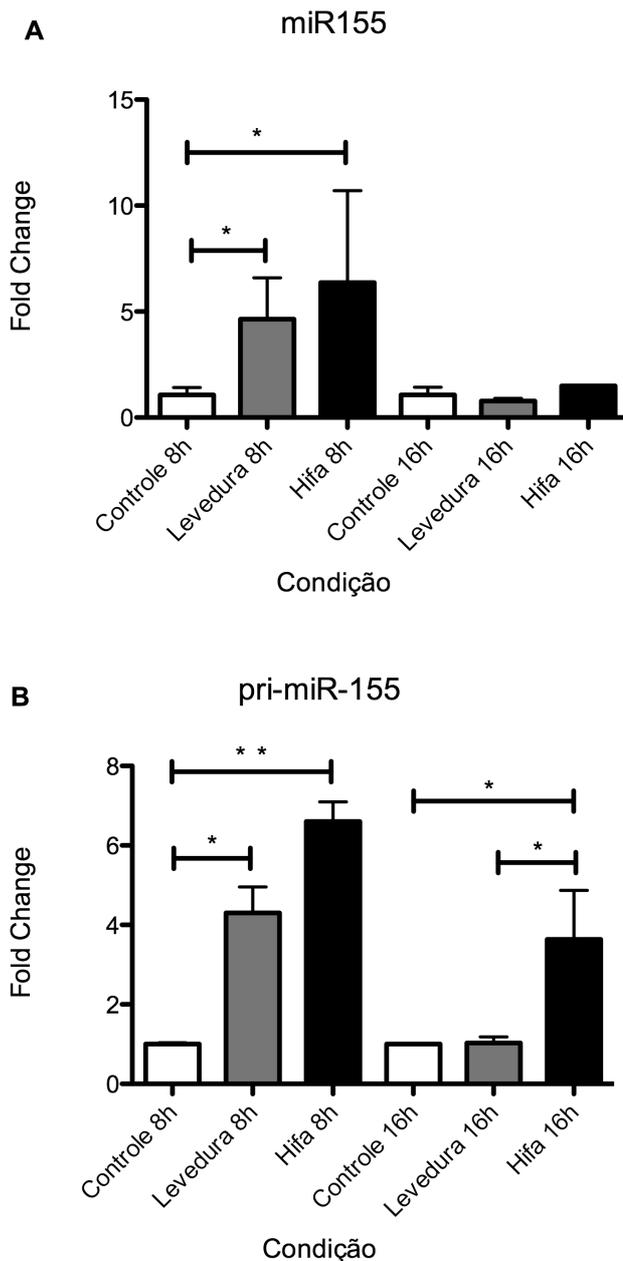


Figura 4.13 – Indução de transcrição de pri-miR155 por *C. albicans* morta pelo calor em BMDMs

Expressão de (A) miR155 e (B) pri-miR155 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos BALB/c incubados ou não com leveduras ou hifas de *C. albicans* mortas pelo calor por 8 ou 16 horas com um MOI de 2. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

Sabidamente, o processo de morte pelo calor pode alterar a estrutura da parede celular fúngica, expondo elementos da parede interna que geralmente não interagem com os macrófagos *in vivo* (Gow et al., 2007). A fim de evitar este viés, foram realizados

experimentos utilizando macrófagos de camundongos C57Bl/6 e células de *C. albicans* mortas por radiação ultra-violeta (UV). Foi observado uma maior propensão à agregação causado pela morte por UV, comparado ao processo de morte pelo calor, e por essa razão foi utilizado um MOI de 5 ao invés de 2. As interações foram então realizadas por 4, 8 e 16 horas. Para confirmar que houve uma resposta dos macrófagos às células do patógeno, os níveis de mRNA de TNF α foram analisados em cada ponto por qRT-PCR. Os níveis de TNF α apresentaram-se significativamente mais altos após 4 horas de incubação tanto com leveduras, tanto com hifas, embora o aumento da expressão quando incubados com hifas fosse significativamente maior. Após 8 horas, os níveis do mRNA de TNF α retornaram aos níveis do controle não estimulado. Após 16 horas, os níveis de TNF α estavam novamente acima daqueles encontrados nos controles (Figura 4.14).

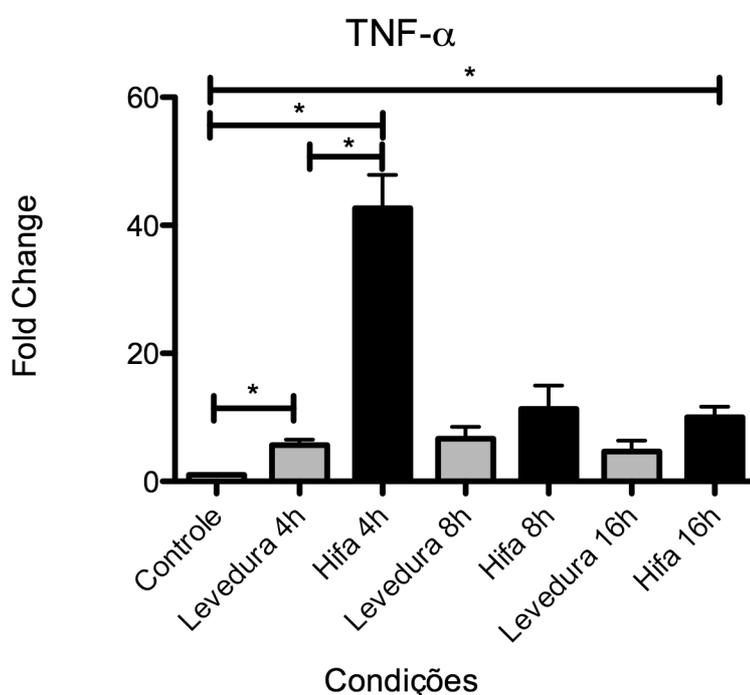


Figura 4.14 – Indução da expressão de TNF- α por *C. albicans* morta por UV

Expressão de TNF α em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos C57Bl/6 incubados ou não com leveduras ou hifas de *C. albicans* mortas por UV por 4, 8 ou 16 horas com um MOI de 5. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

Assim como observado na interação com células de *C. albicans* mortas pelo calor, BMDMs mostraram um aumento de expressão de miR132 e miR146a quando estimulados com hifas mortas por UV. Enquanto miR146a apresentou um indução quando incubado com leveduras mortas pelo calor após 16 horas, miR132 demonstrou apenas uma tendência não significativa estatisticamente (Figura 4.15 A e B). Já miR155 demonstrou um aumento de

expressão significativo apenas após incubação com hifas por 8 e 16 horas, mas não após 4 horas, ou quando incubado com leveduras (Figura 4.15 C). Tanto após 8, quanto 16 horas, os níveis de miR155 em macrófagos estimulados com hifas é maior do que daqueles estimulados com leveduras.

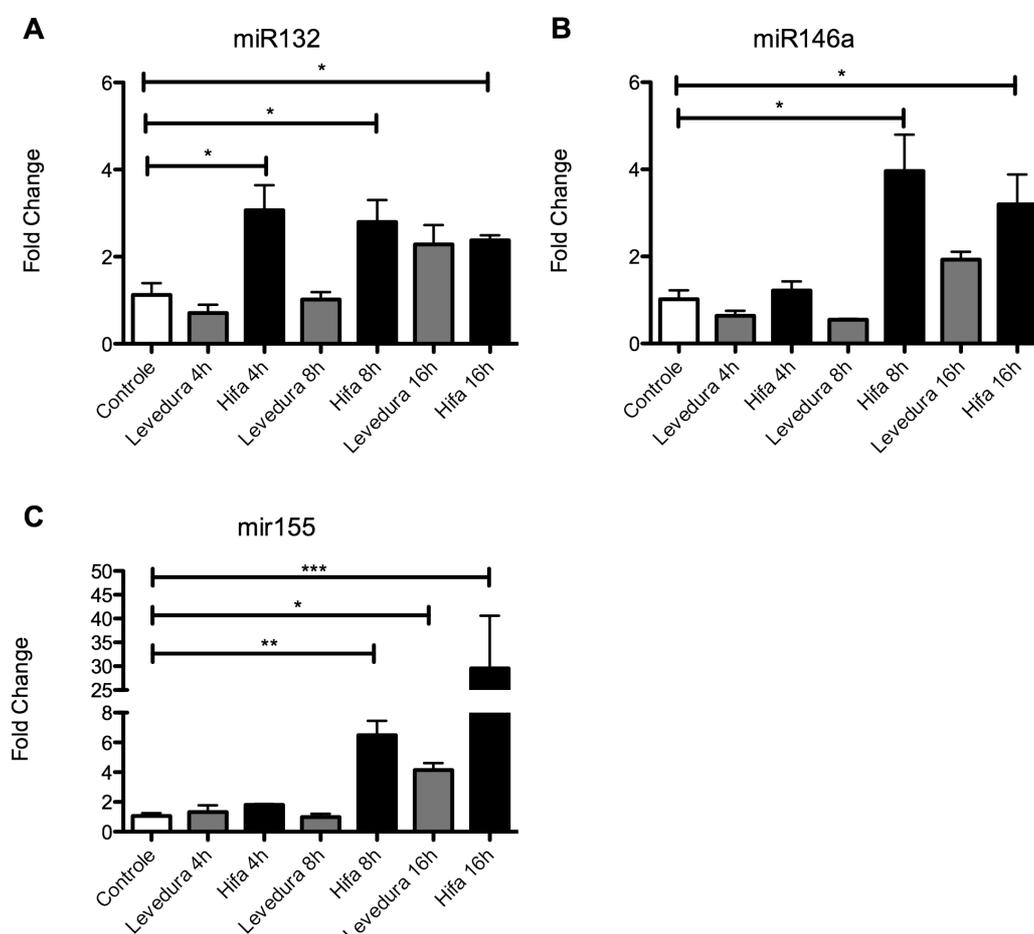


Figura 4.15 – Indução de miRNAs em BMDMs por *C. albicans* morta por UV

Expressão de (A) miR132, (B) miR146a e (C) miR155 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos C57Bl/6 incubados ou não com leveduras ou hifas de *C. albicans* mortas por UV por 4, 8 ou 16 horas com um MOI de 5. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

Com o objetivo de desvendar os mecanismos da regulação de acúmulo de miR155, foi analisada a relevância de alguns dos mais importantes receptores responsáveis pelo reconhecimento de fungos por macrófagos. Para tanto, BMDMs de camundongos apresentando deleções dos genes de *Toll-like Receptor 2* (TLR2), *Toll-like receptor 4* (TLR4), ambos TLR2 e 4, e Dectina-1 foram utilizados. Nesses experimentos, os macrófagos foram incubados com um MOI de 5 por 8 horas com hifas mortas por UV.

Como pode ser visto na figura 4.16, a ausência de TLR2 ou TLR4 não interferiu na acumulação de miR155 nessas condições, já que apresentaram aumento de expressão igual ao tipo selvagem (WT) estimulado com hifas. Todavia, a deleção concomitante de ambos os receptores, TLR2 e 4, resultou em um aumento que foi significativamente maior do que em macrófagos selvagens estimulados, ou em macrófagos com esses receptores mutados individualmente. Além disso, a deleção do gene de DEC1 aboliu completamente o acúmulo de miR155, já que esses macrófagos apresentaram níveis de expressão idênticos ao de controles não estimulados. Macrófagos não estimulados (controles) de todas essas linhagens de camundongos não mostraram nenhuma diferença entre si próprios (dados não mostrados).

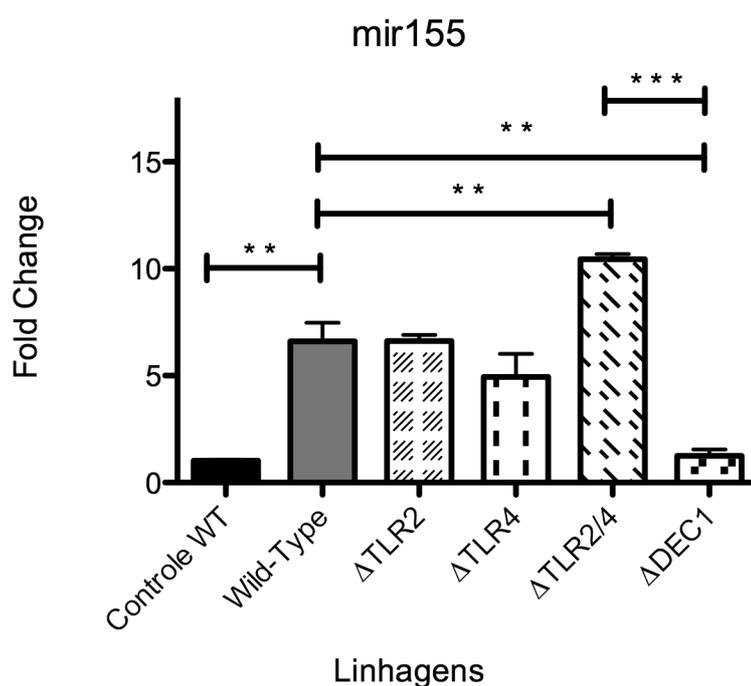


Figura 4.16 – Identificação de PRRs responsáveis pela indução de miR155 em resposta a *C. albicans*

Expressão de miR155 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos C57Bl/6 incubados ou não com hifas de *C. albicans* mortas por UV por 8 horas com um MOI de 5. As linhagens utilizadas foram Selvagem (WT), Δ TLR2, Δ TLR4, Δ TLR2/4 e Δ Dectin1. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

Para verificar se a estimulação de Dectina-1 estava realmente ativando a expressão de miR155 em BMDMs de camundongos C57Bl/6, essas células foram incubadas com um agonista específico desse receptor. BMDMs foram obtidos e incubados com 100 μ g/mL de Zymosan depleted, um reagente comercial rico em β -glicanas com a propriedade de ativar a sinalização de Dectina-1 sem ativar os demais PRRs. Após 8 horas de incubação, os BMDMs mostraram um aumento de expressão similar àquela encontrada em BMDMs co-

cultivados com hifas mortas por UV com um MOI de 5 por um período de tempo similar (Figura 4.17). Portanto, a estimulação de Dectina-1 em BMDMs, tanto utilizando β -glicanas comerciais, tanto quanto pela β -glicana presente na parede celular de *C. albicans*, resultou em um aumento significativo da expressão de miR155.

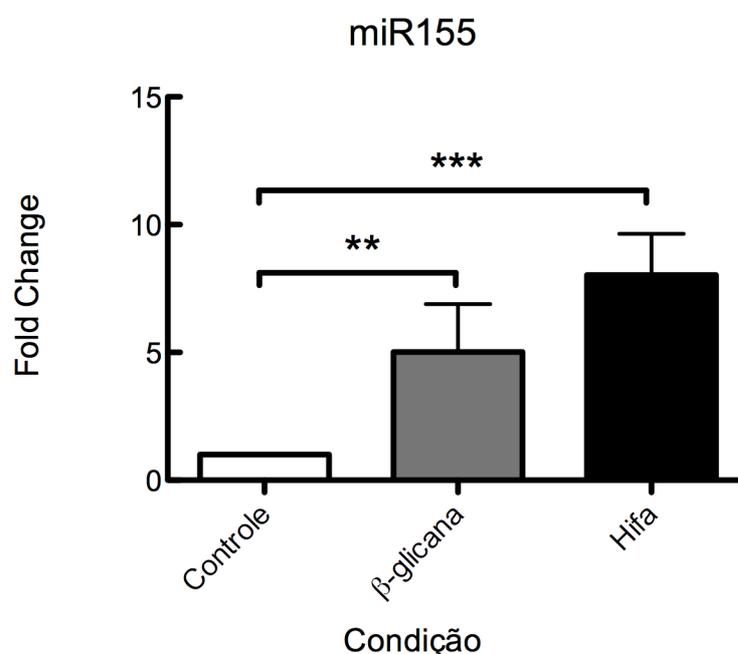


Figura 4.17 – Indução da expressão de miR155 por β -glicana

Expressão de miR155 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos C57Bl/6 incubados por 8 horas com 100 μ g/mL de Zymosan depleted (Invivogen) ou com MOI de 5 com hifas de *C. albicans* mortas por UV. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

A ativação de Dectina-1 pode induzir duas vias de sinalização diferentes, uma via dependente de Syk e outra dependente de Raf-1. Para determinar qual é a via mais importante para a expressão de miR155 em macrófagos interagindo com hifas de *C. albicans*, foi realizado um ensaio de interação usando dois diferentes inibidores dessas vias. Macrófagos do tipo selvagem (da linhagem C57Bl/6) foram incubados com GW5074, R406, ou ambos previamente ao ensaio de interação. Foi observado que as células tratadas com o inibidor de Raf-1, GW5074, tiveram os mesmos níveis de expressão que o controle não tratado estimulado com hifa de *C. albicans* (Figura 4.18). Células tratadas com o inibidor de Syk, R406, e as células tratadas com os dois inibidores, apresentaram a expressão induzida pelas hifas completamente abolidas (Figura 4.18). O tratamento com os inibidores apenas, sem estimulação com hifas, não apresentaram efeitos sobre os macrófagos.

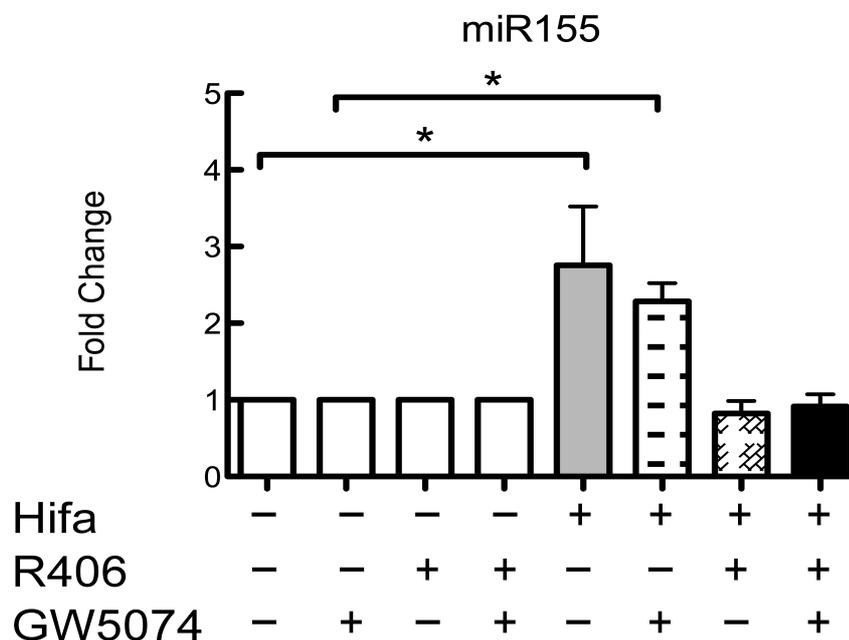


Figura 4.18 – Efeito dos inibidores de Raf-1 e Syk sobre a expressão de miR155

Expressão de miR155 em macrófagos (BMDMs) obtidos de camundongos C57Bl/6 incubados ou não com hifas de *C. albicans* mortas por UV por 8 horas com um MOI de 5. Os macrófagos foram tratados previamente com diferentes inibidores da via de Dectina-1, GW5074 (inibidor de Raf-1), R406 (inibidor de Syk), ambos ou nenhum. Os resultados representam a expressão relativa média em relação ao controle não infectado de três experimentos \pm erro padrão. Os níveis de expressão foram mensurados por qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Life Technologies). Análise estatística foi realizada utilizando o Δ Ct das amostras com um teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) representa p-value < 0.05, (**) p-value < 0.005 e (***) p-value < 0.0005.

Baseado nesses resultados, foi formulado um modelo de como *C. albicans* interage com os PRRs de macrófagos primários, produzindo uma resposta de miR155 (Figura 4.19). Nos estágios iniciais da interação, a transcrição do gene MIR155HG parece desempenhar um importante papel na regulação da acumulação de miR155, uma vez que seu transcrito, pri-miR155, também está regulado positivamente. β -Glicana exposta na parede celular de *C. albicans* interage com o receptor Dectina-1, induzindo a expressão de miR155 após 8 horas de interação. A ativação de Dectina-1 pode resultar em diferentes vias de sinalização, como aquelas desencadeadas via Syk e Raf-1. A indução de miR155 parece ser controlada especificamente por Syk, nas condições analisadas nesse trabalho. Syk também controla a expressão de genes específicos em resposta a patógenos por meio de múltiplos fatores de transcrição, como NFAT, JNK, p38, AP-1 e NF κ B (Rizzetto et al., 2012). A via específica de atuação em que Syk regula a expressão deste miRNA ainda deve ser analisada. A ativação de TLR2 e TLR4 por *C. albicans*, no entanto, aparentemente regula negativamente o acúmulo de miR155 maduro nas condições analisadas. Quando um destes receptores é

ativado, a indução da expressão deste miRNA parece ser contida. Na ausência de ambos receptores, essa expressão é ainda mais aumentada do que aquela observada nos macrófagos selvagens (WT) nas mesmas condições.

A regulação da expressão de miR155

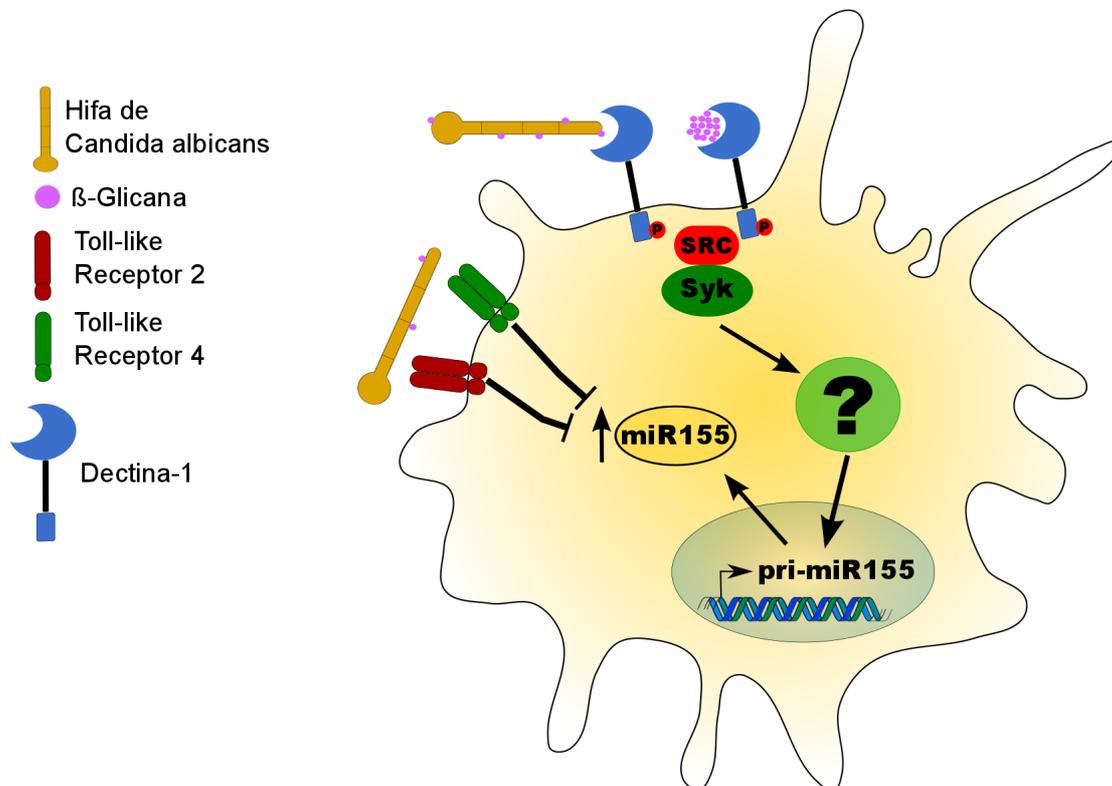


Figura 4.19 – Modelo de ativação de miR155 em resposta a *C. albicans*

Ativação de miR155 por *C. albicans*. Exposição de β -glicana na parede celular do fungo resulta na interação desta molécula com receptor Dectina-1, induzindo uma cascata de forma dependente de Syk, que resulta em aumento do acúmulo do produto do gene MIR155HG, o transcrito pri-miR155 (primary miR155). O aumento da expressão desse transcrito resulta no acúmulo de miR155 maduro. A ativação de TLR2 ou TLR4 parece possuir um efeito repressivo na acumulação deste miRNA. Essa figura foi criada usando o software gratuito Inkscape (www.inkscape.org), versão 0.48.

5. Discussão

O presente trabalho pode ser didaticamente dividido em duas partes. Um dos seus objetivos é tentar compreender as bases moleculares da suscetibilidade à infecção por *C. albicans*. Para atingir esse objetivo, linhagens murinas suscetíveis e resistentes foram selecionadas e testadas, e macrófagos primários foram obtidos e co-cultivados com células do fungo. Ao analisar as diferenças de expressão de genes entre as células dessas duas linhagens diferentes, espera-se poder encontrar genes cuja variação de expressão possa explicar o fenótipo de suscetibilidade. Concomitantemente, a diferença na expressão de genes de células do fungo também será analisada, pois da mesma forma que as linhagens suscetível e resistente de camundongos podem reagir diferentemente a um determinado estímulo, possivelmente o patógeno possa reagir ao macrófagos destas duas linhagens de forma diferente. Além disso, outro aspecto importante da resposta imunológica à *C. albicans*, é a modulação diferencial da expressão de uma classe de pequenos RNAs não-codificadores e que apresentam um papel crucial na regulação de uma plêiade de processos biológicos, os miRNAs. Recentemente, muita atenção tem sido dada a miRNAs no estudo dos mais diversos processos biológicos. A capacidade dessas moléculas em regular a expressão de outras biomoléculas como mRNAs por meio da degradação ou inibição de sua tradução torna-os eficientes agentes de regulação gênica. Acredita-se que cerca de 60% dos genes humanos sofram regulação de miRNAs (Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005). É conhecido também o fato de que *C. albicans* apresenta diferentes morfologias de crescimento, e que cada morfologia apresenta certas vantagens sobre as demais em certas condições ambientais. A forma de hifa, por exemplo, tem sido relacionada à virulência e escape de células imunológicas (Bain et al., 2014; Gow and Hube, 2012; McKenzie et al., 2010). As alternâncias morfológicas deste fungo já são alvo de estudo a fim de desenvolver novas práticas terapêuticas mais eficientes (Jacobsen et al., 2012). Portanto, este trabalho analisou a expressão diferencial de miRNAs que já eram conhecidos pela importância na resposta imunológica em macrófagos expostos a diferentes tipos celulares de *C. albicans*. Além disso, os mecanismos de regulação de miR155, um importante miRNA envolvido em uma grande diversidade de processos biológicos além da resposta imune à *C. albicans* (Elton et al., 2013; Monk et al., 2010; Seddiki et al., 2014), foi estudada neste contexto.

5.1 Caracterização das bases moleculares da suscetibilidade a *C. albicans*

Esse estudo buscou analisar diferenças transcritômicas entre duas linhagens de camundongos que apresentassem o fenótipo resistente ou suscetível à infecção por *C. albicans*, com o intuito de compreender alguns dos mecanismos que controlam essa suscetibilidade.

Diversas linhagens de camundongos apresentam perfis diferentes de suscetibilidade à *C. albicans* (Ashman et al., 1993). Linhagens como A/J, DBA/2J e CBA/CaH mostraram elevada suscetibilidade a este patógeno, enquanto outras linhagens, como C57Bl/6 e BALB/c mostraram-se comparativamente mais resistentes (Ashman et al., 1996; Peltz et al., 2011; Tuite et al., 2004). Esse padrão de resistência e suscetibilidade pode ser observado por meio de modelos de infecção sistêmica, onde podem ser avaliados a colonização de órgãos específicos por células de *C. albicans*, carga fúngica nestes órgãos, avaliação de lesão, e principalmente prolongada sobrevivência nestes modelos (Ashman et al., 1996; Mullick et al., 2006). Vários fatores foram relacionados à suscetibilidade, tanto no modelo murino quanto em pacientes humanos. Por exemplo, deficiências no sistema Complemento, um importante fator na resposta imune inata, implicam em suscetibilidade a *C. albicans* em modelos murinos (Mullick et al., 2006; Tsoni et al., 2009). Camundongos de linhagens suscetíveis apresentam, em geral, uma disregulação da resposta inflamatória, que resulta em elevado dano tecidual e consequente falha no funcionamento de órgãos e morte (Lionakis et al., 2011; Mullick et al., 2004; Mullick et al., 2006). Além disso, polimorfismos em determinados genes, especialmente genes relativos à resposta imune, mostraram ser importantes tanto no modelo murino, quanto em pacientes humanos (Plantinga et al., 2012a; Radovanovic et al., 2011b; Smeekens et al., 2013). A expressão diferencial de alguns genes também mostrou-se importante para determinação da suscetibilidade a este patógeno (Ashman et al., 1999; Barker et al., 2008; Goupil et al., 2014; Spaccapelo et al., 1995). Duas linhagens foram escolhidas *a priori*, como suscetível e resistente para fins de uso neste trabalho. Em um primeiro momento, foram escolhidas as linhagens A/J e BALB/c, respectivamente. Essas linhagens foram testadas em um modelo de infecção da corrente sanguínea por meio de inoculação intravenosa e demonstraram os perfis de suscetibilidade que eram esperados. Em um segundo momento, houve a necessidade de substituição dos camundongos A/J, e a linhagem DBA/2J foi escolhida. O perfil de suscetibilidade foi novamente testado, desta vez por um modelo de infecção mais robusto, uma vez que mais animais e diferentes concentrações de inóculo foram utilizados para infecção intravenosa. Comparativamente ao modelo resistente, a linhagem BALB/c, camundongos DBA/2J mostraram-se mais suscetíveis a *C. albicans*, consolidando-se como o modelo utilizado neste estudo.

Para fins de analisar o mecanismo molecular que controla a suscetibilidade à *C. albicans*, foi escolhido um modelo de infecção *ex vivo*, onde células do sistema imune dos camundongos de ambas as linhagens suscetível e resistente, seriam extraídas dos animais. Para tanto, macrófagos foram escolhidos, uma vez que apresentam importante função na resposta sistêmica à infecção por *C. albicans*, tanto no recrutamento de neutrófilos, como modulando a resposta imune adaptativa (MacCallum, 2009; Netea and Marodi, 2010; Vazquez-Torres and Balish, 1997). Em um primeiro momento, foram escolhidos macrófagos peritoneais elicitados com Tioglicolato como modelo de estudo. Esses macrófagos são obtidos por lavagem peritoneal alguns dias após inoculação do agente inflamatório Tioglicolato no peritônio dos animais (Schneider, 2013). Essa técnica de obtenção de

macrófagos foi primeiramente utilizada por ser a de maior acessibilidade dentro do grupo. Resultados iniciais com macrófagos peritoneais demonstraram a sua resposta a *C. albicans* como produção de citocinas pró-inflamatórias, dentro do esperado. Entretanto, vários aspectos mostraram-se inadequados para o uso destas células dentro no contexto deste nosso trabalho. A técnica de obtenção desses macrófagos demonstrava um baixo rendimento, sendo necessários muitos animais para obtenção da quantidade de células necessárias ao objetivo central do experimento. Além disso, estes macrófagos apresentavam uma alta mortalidade quando co-cultivados com células de *C. albicans* e um baixo rendimento na extração de RNA para fins de sequenciamento. Além disso, embora seja um tipo celular amplamente usado, o macrófago peritoneal apresenta-se em um estado ativado e fortemente pró-inflamatório, também conhecido como fenótipo M1 (Mills, 2012; Mills et al., 2000). Macrófagos com essas características não correspondem aos macrófagos, como os peritoneais nativos (aqueles que não foram elicitados por tioglicolato), que o fungo encontraria nos órgãos ou cavidades no curso de uma infecção sistêmica. Estes macrófagos apresentam um fenótipo menos pró-inflamatório e, conseqüentemente uma resposta ao fungo diferente da resposta dos macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato (Wang et al., 2013a). Essas características terminaram por inviabilizar o uso dessas células para este trabalho. Em substituição a estas linhagens, foram escolhidos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), induzidos por M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) produzido por fibroblastos da linhagem L929. Os macrófagos primários (BMDM), embora apresentem um perfil um pouco mais anti-inflamatório do que macrófagos residentes, esse perfil é muito mais próximo destes do que o perfil de macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato (Wang et al., 2013a). Além disso, essa metodologia apresentou melhor rendimento na obtenção de macrófagos e maior eficiência quando da extração de RNA pós experimentos de infecção. Dessa forma, ficou decidido que BMDMs seriam usados no modelo de infecção *ex vivo* para geração de RNA para sequenciamento.

Uma vez escolhida as células, os tempos de interação foram determinados com base na taxa de fagocitose e expressão de $TNF\alpha$, uma citocina pró-inflamatória importante na resposta a *C. albicans* (Miramon et al., 2013). As taxas de fagocitose encontram-se dentro do descrito para este modelo, sendo que com trinta minutos de interação, já era possível observar taxas de fagocitose próximas à máxima decorrente de maiores tempos de co-cultivo, conforme descrito na literatura (Lewis et al., 2012). A fagocitose é um fenômeno importante pois várias vias de transdução de sinal dependem da internalização da célula fúngica para serem ativadas (Bourgeois et al., 2011; Kagan et al., 2008).

Um primeiro ensaio de interação foi realizado usando BMDMs de camundongos A/J e BALB/c. Devido a um problema técnico durante a preparação da biblioteca, o RNA utilizado apresentava altas taxas de rRNA, como se não houvesse sido realizado qualquer metodologia de seleção voltada ao enriquecimento de outras populações de RNA. A análise desses dados demonstrou ser ineficiente por subestimar o que era o principal objetivo do

experimento, a caracterização da diferença de expressão gênica entre as amostras. Por exemplo, apenas sete genes diferencialmente expressos foram encontrados entre macrófagos infectados e não infectados da linhagem BALB/c. Um estudo semelhante utilizando células dendríticas interagindo com *C. albicans* resultou em mais de 700 genes diferencialmente expressos nas células dendríticas para o mesmo tempo de interação (Tierney et al., 2012). Em um estudo do grupo do professor Kuchler, ainda não publicado, e baseado na interação entre células dendríticas e *Candida glabrata*, diferença significativa de expressão ocorreu em mais de 600 genes. Essa diferença nos levou a buscar as causas desta discrepância entre nossos resultados e os demais, até concluir-se que se tratava da contaminação por rRNA. Embora seja aceito que altas taxas de rRNA reduzem a cobertura efetiva de uma determinada biblioteca (Zhao et al., 2014), ainda não há um estudo determinando se outros aspectos estatísticos podem interferir na análise de expressão diferencial de genes. Isso nos motivou a iniciar um estudo tentando avaliar como altas taxas de contaminação de rRNA em bibliotecas de RNA-seq podem afetar a análise da expressão diferencial. Resultados preliminares mostram que essas taxas de contaminação com rRNA interferem na análise de forma semelhante à degradação de RNA (Gallego Romero et al., 2014). Baseado em simulações de resultados de RNA-seq, bibliotecas com taxas de contaminação com rRNA semelhantes geraram análises mais precisas de diferença de expressão do que bibliotecas com menores taxas de contaminação, mas com valores de contaminação discrepantes. Mais análises serão realizadas, todavia, antes da conclusão deste estudo, que encontra-se em andamento.

Uma vez que pudemos utilizar os conhecimentos do grupo do prof. Dr. Karl Kuchler durante a realização de parte desta tese na forma de um doutorado sanduíche, foi decidido realizar um sequenciamento concomitante do RNA das células do patógeno e do hospedeiro, técnica conhecido como Dual RNA-seq. Vários estudos mostram que é possível ser bem sucedido no sequenciamento simultâneo de RNA de duas espécies interagindo entre si, o que permite compreender e obter informações sobre os dois organismos ao mesmo tempo, além de melhor compreender a interação entre estes (Camilios-Neto et al., 2014; Choi et al., 2014; Longo et al., 2014; Lowe et al., 2014; Tierney et al., 2012). Um estudo já foi realizado dentro do grupo do professor Kuchler, em que um experimento semelhante permitiu a criação de uma rede de regulação gênica interespecífica, que pode ser validada dentro de um modelo biológico (Tierney et al., 2012), o que nos motivou a tentar realizar experimento semelhante. Resultados preliminares do mapeamento das bibliotecas obtidas demonstraram taxas de mapeamentos usando o genoma de camundongo como referência, dentro do esperado, considerando bibliotecas eficientemente preparadas. As taxas de rRNA sequenciado dentro destas bibliotecas também foi considerada adequada dentro das previsões do kit de depleção de rRNA, que assegura a retirada de 99% das sequências de rRNA.

Foi utilizado para esse primeiro mapeamento o *software* NextGenMap (Sedlazeck et al., 2013), mas será utilizado também o *software* TopHat2 (Kim et al., 2013). Ambos haviam sido testados e comparados em outros estudos ainda não publicados realizados dentro do grupo do professor Kuchler, e os mapeadores mostraram semelhantes taxas e eficiências de mapeamento, embora o primeiro mostre-se bem mais rápido. Serão utilizados para análise de expressão diferencial dois pacotes em R, DESeq (Anders and Huber, 2010) e edgeR (Robinson et al., 2010), baseados em distribuição binomial negativa das *reads*. Em análises comparativas, ambos mostraram-se muito eficientes em prever expressão diferencial de genes de forma eficiente (Anders and Huber, 2010; Anders et al., 2013; Sonesson and Delorenzi, 2013). Testes realizados em estudo do grupo do professor Kuchler, ainda não publicados, mostraram a semelhança de resultados obtidos pelo uso dos dois métodos.

5.2 Padrão de modulação da expressão de miRNAs em macrófagos murinos expostos à *C. albicans*

Os resultados aqui descritos mostram que os miRNAs miR9, miR125b, miR132, miR146a, miR155, miR199, miR221, miR223 and miR455 podem ser induzidos no contexto da co-cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) com células de *C. albicans* mortas pelo calor. O critério de seleção para a escolha dos miRNAs estudados foi baseado no fato de terem sido descrito como superexpressos na resposta a algum patógeno, e no papel de seus alvos na sinalização de PRRs. Dessa forma, eles geralmente formam um sistema de *feedback* negativo, desempenhando um efeito anti-inflamatório enquanto regulam a resposta imunológica.

Após a ativação da resposta imune, miRNAs são induzidos e geralmente atuam como reguladores, controlando essa resposta. A maioria dos miRNAs afetam seus alvos diretamente. No contexto da infecção, esses alvos podem ser elementos chave das vias de PRRs, fatores de transcrição ou citocinas. Por exemplo, miR9, miR199, miR221 e miR223 desempenham uma atividade reguladora sobre a inflamação (Chen et al., 2008; Gong et al., 2011; Thulin et al., 2013; Zhuang et al., 2012). miR146a inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas ao atuar sobre os mRNAs de elementos da via de TLR TRAF6 e IRAK1 (Park et al., 2014; Saba et al., 2012). miR155 aparenta ter um efeito ambíguo no processo inflamatório dependendo do seu contexto, já que ele foi mostrado inibindo a inflamação (Huang et al., 2010) agindo sobre Myd88, uma importante molécula adaptadora da via de TLRs (Bandyopadhyay et al., 2014), mas também um papel pró-inflamatório em doenças inflamatórias cônicas (Kurowska-Stolarska et al., 2011).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a morfologia de hifa das células de *C. albicans* podem induzir comportamentos diferentes no acúmulo destes miRNAs, sugerindo que diferente ativação de PRRs por hifas e leveduras tem uma importância na sua regulação. No nosso conhecimento, os efeitos de hifas de *C. albicans* sobre a expressão de miRNAs em macrófagos ainda não foi estudada até a presente data. Destes miRNAs, miR155, miR146a e miR455, além de miR125a que não foi abarcado nesse trabalho, já haviam sido mostrados sendo induzidos em macrófagos por leveduras de *C. albicans* mortas pelo calor (Monk et al., 2010). Aqui foi identificado que miR146a e miR255 foram de fato induzidos pela interação dos macrófagos com leveduras mortas pelo calor. Entretanto, em nosso modelo, miR455 foi induzido apenas em interações envolvendo hifas. A interação desses macrófagos com hifas também resultou no acúmulo de outros miRNAs como miR125b e miR132, que não haviam sido mostrados em resposta à leveduras anteriormente. miR132 foi recentemente reportado como sendo expresso em macrófagos interagindo com hifas de *Aspergillus fumigatus* (Das Gupta et al., 2014), mas essa é a primeira vez que ele é reportado em resposta a *C. albicans*.

miR155 é expresso em uma grande variedade de linhagens de células hematopoiéticas, tais como Linfócitos T, B, granulócitos e monócitos (Landgraf et al., 2007). Camundongos deficientes em miR155 ou seus precursores demonstraram defeitos no desenvolvimento de linfócitos *in vivo* na resposta de linfócitos T e B (Rodriguez et al., 2007; Vigorito et al., 2007). Eles também demonstraram defeitos na função de apresentação de antígenos em células dendríticas (Rodriguez et al., 2007). Esse miRNA também é superexpresso em linfócitos T e B quando ocorre ativação do receptor de antígenos, e em macrófagos e células dendríticas quando ocorre ativação de TLRs (Ceppi et al., 2009; Haasch et al., 2002; O'Connell et al., 2009; Rodriguez et al., 2007; Taganov et al., 2006; Tili et al., 2007; Vigorito et al., 2007). Devido ao papel de miR155 nesses vários processos, sobretudo na resposta imunológica e inflamação, ele foi escolhido como foco deste estudo.

Vários mecanismos de regulação de miR155 podem ocorrer. O aumento da expressão de miR155 maduro em macrófagos estimulados com LPS pode ser tanto fruto de um aumento da transcrição do gene MIR155HG, ou o amadurecimento pós-transcricional do pri-miR155 proteína de ligação a RNA KHSRP (Ruggiero et al., 2009). Em células HeLa, a estabilidade de miR155 foi reduzida pelo aumento de *Epidermal growth factor* (EGF), aumentando assim a degradação deste miRNA (Avraham et al., 2010). O acúmulo de miR155 nos estágios iniciais dos ensaios de interação com hifas mortas pelo calor de aqui realizados parece ser baseado no aumento da transcrição do gene MIR155HG, uma vez que a expressão de pri-miR155 mostrou um perfil similar ao miR155 maduro. Em um período mais tardio (após 16 horas de interação), a abundância de miR155 maduro retornou aos níveis do controle não estimulado, enquanto a expressão de pri-miR155 permaneceu alta, sugerindo que um mecanismo de degradação deste miRNA pode estar regulando os seus níveis nesse estágio. Entretanto, macrófagos estimulados com hifas mortas por UV ao invés

daquelas mortas pelo calor mostraram um alto acúmulo de miR155 maduro. Não fica claro se essa diferença ocorreria devido à diferença na parede celular causada pelo processo de morte da hifa, ou se pela diferença de linhagens de camundongos utilizada. Para elucidar essa questão, novos experimentos deveriam ser realizados.

Já foi demonstrado que macrófagos RAW264.7 expostos a tratamento crônico com álcool mostraram uma forte correlação entre a indução de TNF α e miR155. A mesma correlação pode ser observada *in vivo* no modelo murino. O processo de aumento de expressão de miR155 envolve a ativação de NF κ B, e a superexpressão de miR155 aumentou significativamente a meia vida do mRNA de TNF α (Bala et al., 2011). Foi também demonstrado que existe uma correlação entre a expressão de miR155 e os níveis de IL1 β em um modelo humano de artrite reumatóide. miR155 aumentou a expressão dessa citocinas ao inibir seu alvo, *Suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) (Li et al., 2013b). Os dados deste trabalho mostram um aumento de ambos miR155 e TNF α após incubação com hifas mortas tanto pelo calor, quanto por UV. Embora nenhuma correlação possa ter sido obtida deste experimento, outros ensaios podem mostrar mais detalhes da relação entre TNF α e miR155. O tratamento de células mononucleares de sangue periférico humanas (hPBMC) e macrófagos imortalizados com IL10 preveniu a transcrição do gene MIR155HG de uma forma dependente de STAT3 (McCoy et al., 2010). Os resultados aqui encontrados mostram uma diminuição da produção de IL10 pelos macrófagos quando incubados com hifas, mas não leveduras. Essa diminuição pode estar envolvida no maior aumento da expressão de miR155 quando os macrófagos foram desafiados com hifas de *C. albicans*.

A fim de examinar as vias de sinalização associadas à regulação de miR155, a importância de TLRs e Dectina-1 foi analisada. Essa análise revelou que TLR2 ou 4, separadamente, não mostraram impacto nessa regulação. Entretanto, quando ambos esses TLRs estavam ausentes, um aumento de expressão significativamente maior ocorreu quando comparado ao tipo selvagem, quando esses macrófagos foram estimuladas com hifas mortas por UV. Esses resultados sugerem que essa indução por TLR pode manter a expressão de miR155 sob controle. Dessa forma, uma interação entre as vias de TLR 2 e 4 pode ocorrer, de forma que uma via pode compensar pela outra na regulação no caso da deleção de um dos receptores. Mas quando ambos estão ausentes, essa regulação não ocorre, e os níveis de miR155 sobem mais do que o encontrado no tipo selvagem. A ausência de Dectina-1, no entanto, aboliu completamente a superexpressão de miR155 causada pela interação de BMDMs com hifas, sugerindo a importância deste receptor na produção de miR155 nesse contexto. Na verdade, a sinalização por Dectina-1 é necessária para discriminação entre leveduras ou hifas pelo macrófago, e sua deficiência resulta em maior disseminação fúngica e suscetibilidade à infecção em camundongos (Cheng et al., 2011). As diferentes morfologias de *C. albicans* podem possuir diferentes papéis durante a infecção. A forma de hifa já foi relacionada à virulência, entre outras coisas, por causa da sua capacidade de esconder a β -

glicana de sua parede celular sob uma camada de mananas, impedindo o reconhecimento do fungo pelo receptor Dectina-1 (Bain et al., 2014). Apesar de que células de *C. albicans* mortas tanto por UV como pelo calor tenham uma maior exposição de β -glicana da parede celular do que células vivas (Bain et al., 2014), é conhecido que os níveis de exposição dessa molécula vari em infecções *in vivo*, dependendo do órgão infectado (Wheeler et al., 2008). Wheeler *et al.* (2008) também mostrou que determinadas drogas, como a Caspofungina, pode aumentar a exposição de β -glicana, aumentando a ativação de Dectina-1.

A acumulação de miR155 foi descrita por Monk et al. (2010) sendo induzida por leveduras de *C. albicans* mas não LPS. Esse resultado se encaixa no nosso modelo, uma vez que LPS é um agonista de TLR4 apenas, enquanto a célula de *C. albicans* ativa uma miríade de receptores no macrófago, incluindo Dectina-1.

A ativação de Dectina-1 pode resultar na ativação de duas diferentes vias de sinalização celulares, uma via dependente de Syk e outra dependente de Raf-1 (Gringhuis et al., 2009). Ambas essas vias foram relatadas sendo ativadas em macrófagos em resposta a *C. albicans* (Galan-Diez et al., 2010; Gazi et al., 2011). Para determinar qual dessas vias estava envolvida na expressão de miR155 em BMDMs estimulados com hifas de *C. albicans* foi realizado um experimento no qual essas vias foram bloqueadas individual ou simultaneamente com inibidores específicos. Quando os macrófagos foram tratados com o inibidor de Raf-1 GW5074 e estimulados com hifas de *C. albicans*, eles demonstraram o mesmo nível de expressão do controle não tratado com nenhum inibidor, mas também estimulado com hifas. Isso mostra que essa via não afeta a expressão de miR155 nesse contexto. Quando os macrófagos foram tratados com o inibidor de Syk R406, ou com ambos os inibidores, e então estimulados com hifas, eles não mostraram nenhum aumento da expressão de miR155, apresentando níveis equivalentes ao do controle não estimulado. Essas células mostraram o mesmo comportamento que os macrófagos deficientes em Dectina-1 (DEC1 *-/-*) estimulados com hifas. Isso indica que Dectina-1 é importante para a expressão de miR155 após interação com hifas de *C. albicans* e a sinalização que regula essa expressão é dependente de Syk.

Mais estudos serão necessários para definir quais outros miRNAs podem modular a resposta a macrófagos às diferentes morfologias celulares de *C. albicans* e seus mecanismos de ação. Experimentos sobre os efeitos de miR155 sobre seus genes alvo, assim como ensaios de superexpressão, transfecção e nocaute podem ajudar a determinar a influência deste miRNA no processo inflamatório. O papel específico de miR155 na resposta imunológica também demanda maiores investigações, uma vez que ele foi mostrado tendo uma ação anti- ou pró-inflamatória dependendo das condições analisadas. A indução de miR155 pela ativação de TLRs, especialmente de forma dependente dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1, foi mostrada na literatura (Imaizumi et al., 2010; O'Connell et al.,

2009; Taganov et al., 2006), mas para nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho relatando a relação entre a expressão de miR155 com a ativação do CLR Dectina-1. A ativação de Syk por Dectina-1, assim como a ativação de TLRs, pode resultar na ativação dos fatores de NF κ B e AP-1 (Dennehy et al., 2008; Fujioka et al., 2004; Toyotome et al., 2008). Para definir se a superexpressão de miR155 em macrófagos interagindo com hifas de *C. albicans* é induzida pela ativação desses fatores de transcrição de forma dependente de Dectina-1 e Syk, ou por outros fatores desta via de sinalização, permanece indeterminado.

Esse trabalho, todavia, demonstrou que a resposta de miRNAs pode variar conforme o tipo celular de *C. albicans* que o macrófago está enfrentando. Foi também demonstrado o receptor específico e qual via de sinalização ativada por ele resultou na ativação da expressão de miR155 em macrófagos estimulados com esse patógeno. Essas são importantes informações para entendimento dos mecanismos de resposta imune a esse patógeno.

6. Considerações Finais, Principais resultados e Perspectivas

Este trabalho tinha por objetivo analisar as diferenças de expressão gênica entre macrófagos primários de camundongos pertencentes a duas linhagens diferentes, uma suscetível e outra resistente à infecção por *C. albicans*. Desta forma, buscou-se tentar identificar genes ou diferenças transcritômicas que pudessem explicar o fenótipo de suscetibilidade. As linhagens de camundongo foram escolhidas e testadas quanto ao seu nível de suscetibilidade. Um modelo de estudo *ex vivo* foi elaborado, utilizando macrófagos primários obtidos a partir da diferenciação da medula óssea destes camundongos. Os moldes da interação entre estes macrófagos e as células de *C. albicans* foram estudados e definidos. Embora problemas técnicos tenham ocorrido no decorrer do primeiro experimento de sequenciamento de RNA destes macrófagos, um segundo experimento foi concebido e posto em prática para sequenciar concomitantemente o RNA de ambos patógeno e hospedeiro. Resultados preliminares mostram que o sequenciamento foi realizado com sucesso, e as sequências obtidas não mostram contaminação com rRNA, como também, demonstraram um nível de mapeamento ao genoma do camundongo como descrito na literatura, para que as análises transcritômicas sejam resolvidas. Futuramente, serão finalizados os mapeamentos ao genoma de *C. albicans* e ao banco de dados de sequências de rRNA deste patógeno. Serão realizadas também as análises desses dados para a detecção de expressão diferencial de genes entre essas duas linhagens, assim como a busca de polimorfismos gênicos entre essas duas linhagens. Esses resultados obtidos já foram responsáveis pela participação na publicação em um capítulo de livro, e serão usados para escrita de artigo científico a ser submetido posteriormente.

O dados obtidos nestes experimentos mostram que a expressão de nove miRNAs previamente selecionados devido a sua relação à resposta imunológica apresentam expressão diferencialmente alterada em macrófagos primários de camundongos co-cultivados com diferentes tipos celulares de *C. albicans*. A forma de hifa, em geral, produziu uma indução mais forte na expressão destes miRNAs, quando comparada com leveduras. Estes resultados mostraram também que a regulação de miR155 em macrófagos primários murinos estimulados com células de *C. albicans* ocorre em nível transcrional em um período inicial da interação. Foi também observado que a deleção de TLR2 e TLR4 em macrófagos primários estimulados com hifas de *C. albicans* resultou em uma indução maior do que nos macrófagos do tipo selvagem estimulados com as mesmas células. Macrófagos mutantes para apenas TLR2 ou TLR4, todavia, não apresentaram diferença do tipo selvagem nas mesmas condições. A deleção do receptor Dectina-1, entretanto, aboliu completamente essa indução de miR155 causada pela exposição de macrófagos primários às hifas de *C. albicans*. Esse efeito foi reproduzido quando houve inibição de Syk, mas não inibição de Raf-

1, indicando que provavelmente aquela via é mais importante na ativação da expressão de miR155 durante a interação. Esses dados sugerem que enquanto TLR2 e TLR4 aparentam ter um efeito regulatório sobre a indução da expressão de miR155 durante a interação com hifas de *C. albicans*, o PRR Dectina-1, por meio da ativação da via de Syk, parece ser um dos principais ativadores de miR155 nesse contexto biológico.

Esses resultados obtidos sobre a expressão de miRNAs em macrófagos primários murinos co-cultivados com células de *C. albicans* geraram um artigo científico já submetido. Futuramente, novos ensaios serão realizados para desvendar mais detalhes sobre o mecanismo de regulação de outros miRNAs que foram relatados neste trabalho, assim como outros que ainda não foram identificados na resposta à *C. albicans*.

Além disso, experimentos para compreender os efeitos de miR155 na resposta imunológica no contexto da interação de macrófagos murinos com células de *C. albicans*, e para melhor compreender seus mecanismos de regulação de expressão também estão programados.

7. Bibliografia

- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alberti, A., Belser, C., Engelen, S., Bertrand, L., Orvain, C., Brinas, L., Cruaud, C., Giraut, L., Da Silva, C., Firmo, C., *et al.* (2014). Comparison of library preparation methods reveals their impact on interpretation of metatranscriptomic data. *BMC genomics* 15, 912.
- Alby, K., and Bennett, R.J. (2009). Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* 20, 3178-3191.
- Alsaleh, G., Suffert, G., Semaan, N., Juncker, T., Frenzel, L., Gottenberg, J.E., Sibilia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2009). Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 182, 5088-5097.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11, R106.
- Anders, S., McCarthy, D.J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G.K., Huber, W., and Robinson, M.D. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature protocols* 8, 1765-1786.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Reference Source.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* 25, 25-29.
- Ashman, R.B. (1998). *Candida albicans*: pathogenesis, immunity and host defence. *Research in immunology* 149, 281-288; discussion 494-286.
- Ashman, R.B., Bolitho, E.M., and Papadimitriou, J.M. (1993). Patterns of resistance to *Candida albicans* in inbred mouse strains. *Immunology and cell biology* 71 (Pt 3), 221-225.
- Ashman, R.B., Fulurija, A., and Papadimitriou, J.M. (1996). Strain-dependent differences in host response to *Candida albicans* infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load. *Infection and immunity* 64, 1866-1869.
- Ashman, R.B., Papadimitriou, J.M., and Fulurija, A. (1999). Acute susceptibility of aged mice to infection with *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology* 48, 1095-1102.
- Avraham, R., Sas-Chen, A., Manor, O., Steinfeld, I., Shalgi, R., Tarcic, G., Bossel, N., Zeisel, A., Amit, I., Zwang, Y., *et al.* (2010). EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. *Science signaling* 3, ra43.
- Babula, O., Lazdane, G., Kroica, J., Linhares, I.M., Ledger, W.J., and Witkin, S.S. (2005). Frequency of interleukin-4 (IL-4) -589 gene polymorphism and vaginal concentrations of IL-4, nitric oxide, and mannose-binding lectin in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40, 1258-1262.
- Bahn, Y.S., Staab, J., and Sundstrom, P. (2003). Increased high-affinity phosphodiesterase PDE2 gene expression in germ tubes counteracts CAP1-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 50, 391-409.
- 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. *J Immunol* 188, 5293-5302.
- Bain, J.M., Louw, J., Lewis, L.E., Okai, B., Walls, C.A., Ballou, E.R., Walker, L.A., Reid, D., Munro, C.A., Brown, A.J., *et al.* (2014). *Candida albicans* hypha formation and mannan masking of beta-glucan inhibit macrophage phagosome maturation. *mBio* 5, e01874.
- 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 {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *The Journal of biological chemistry* 286, 1436-1444.
- Bandyopadhyay, S., Long, M.E., and Allen, L.A. (2014). Differential expression of microRNAs in *Francisella tularensis*-infected human macrophages: miR-155-dependent downregulation of MyD88 inhibits the inflammatory response. *PLoS one* 9, e109525.

Barker, K.S., Park, H., Phan, Q.T., Xu, L., Homayouni, R., Rogers, P.D., and Filler, S.G. (2008). Transcriptome profile of the vascular endothelial cell response to *Candida albicans*. *The Journal of infectious diseases* *198*, 193-202.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215-233.

Bazzoni, F., Rossato, M., Fabbri, M., Gaudiosi, D., Mirolo, M., Mori, L., Tamassia, N., Mantovani, A., Cassatella, M.A., and Locati, M. (2009). Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 5282-5287.

Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., and Romani, L. (2004). The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* *172*, 3059-3069.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*, 289-300.

Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* *9*, 595-601.

Binkley, J., Arnaud, M.B., Inglis, D.O., Skrzypek, M.S., Shah, P., Wymore, F., Binkley, G., Miyasato, S.R., Simison, M., and Sherlock, G. (2014). The *Candida* Genome Database: the new homology information page highlights protein similarity and phylogeny. *Nucleic acids research* *42*, D711-716.

Blasi, E., Pitzurra, L., Bartoli, A., Puliti, M., and Bistoni, F. (1994). Tumor necrosis factor as an autocrine and paracrine signal controlling the macrophage secretory response to *Candida albicans*. *Infection and immunity* *62*, 1199-1206.

Bourgeois, C., Majer, O., Frohner, I., and Kuchler, K. (2009). In vitro systems for studying the interaction of fungal pathogens with primary cells from the mammalian innate immune system. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *470*, 125-139.

Bourgeois, C., Majer, O., Frohner, I.E., Lesiak-Markowicz, I., Hildering, K.S., Glaser, W., Stockinger, S., Decker, T., Akira, S., Muller, M., *et al.* (2011). Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling. *J Immunol* *186*, 3104-3112.

Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X., and Johnson, A.D. (2000). Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* *156*, 31-44.

Braun, B.R., Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2001). NRG1, a repressor of filamentous growth in *C.albicans*, is down-regulated during filament induction. *The EMBO journal* *20*, 4753-4761.

Bronevetsky, Y., and Ansel, K.M. (2013). Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunological reviews* *253*, 304-316.

Brown, A.J., Odds, F.C., and Gow, N.A. (2007). Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* *10*, 307-313.

Brown, G.D. (2006). Macrophage receptors and innate immunity: insights from dectin-1. *Novartis Foundation symposium* *279*, 114-123; discussion 123-116, 216-119.

Brown, G.D. (2011). Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annual review of immunology* *29*, 1-21.

Buffo, J., Herman, M.A., and Soll, D.R. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* *85*, 21-30.

Bullard, J.H., Purdom, E., Hansen, K.D., and Dudoit, S. (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC bioinformatics* *11*, 94.

Cai, P., Piao, X., Liu, S., Hou, N., Wang, H., and Chen, Q. (2013). MicroRNA-gene expression network in murine liver during *Schistosoma japonicum* infection. *PloS one* *8*, e67037.

Calich, V.L., Pina, A., Felonato, M., Bernardino, S., Costa, T.A., and Loures, F.V. (2008). Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS immunology and medical microbiology* *53*, 1-7.

Cambi, A., Gijzen, K., de Vries I, J., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *European journal of immunology* *33*, 532-538.

Cambi, A., Netea, M.G., Mora-Montes, H.M., Gow, N.A., Hato, S.V., Lowman, D.W., Kullberg, B.J., Torensma, R., Williams, D.L., and Figdor, C.G. (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *The Journal of biological chemistry* *283*, 20590-20599.

Camilios-Neto, D., Bonato, P., Wassem, R., Tadra-Sfeir, M.Z., Brusamarello-Santos, L.C., Valdameri, G., Donatti, L., Faoro, H., Weiss, V.A., Chubatsu, L.S., *et al.* (2014). Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC genomics* *15*, 378.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642-655.

Ceppe, M., Pereira, P.M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M.A., and Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 2735-2740.

Chekulaeva, M., and Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology* *21*, 452-460.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., and Fink, G.R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 5048-5052.

Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., Song, Y., Lai, L., Han, Q., Cao, X., and Wang, Q. (2012). Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1beta production in macrophages by targeting STAT3. *PloS one* *7*, e42971.

Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A., Kelly, M.G., Fest, S., Visintin, I., Leiser, A., Schwartz, P.E., Rutherford, T., and Mor, G. (2008). Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene* *27*, 4712-4723.

Cheng, S.C., van de Veerdonk, F.L., Lenardon, M., Stoffels, M., Plantinga, T., Smeekens, S., Rizzetto, L., Mukaremera, L., Preechasuth, K., Cavalieri, D., *et al.* (2011). The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *Journal of leukocyte biology* *90*, 357-366.

Choi, E.H., Foster, C.B., Taylor, J.G., Erichsen, H.C., Chen, R.A., Walsh, T.J., Anttila, V.-J., Ruutu, T., Palotie, A., and Chanock, S.J. (2003). Association between chronic disseminated candidiasis in adult acute leukemia and common IL4 promoter haplotypes. *Journal of Infectious Diseases* *187*, 1153-1156.

Choi, Y.J., Aliota, M.T., Mayhew, G.F., Erickson, S.M., and Christensen, B.M. (2014). Dual RNA-seq of parasite and host reveals gene expression dynamics during filarial worm-mosquito interactions. *PLoS neglected tropical diseases* *8*, e2905.

Chu, Y., and Corey, D.R. (2012). RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic acid therapeutics* *22*, 271-274.

Cloonan, N., and Grimmond, S.M. (2008). Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. *Genome biology* *9*, 234.

Cowen, L.E., and Steinbach, W.J. (2008). Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic cell* *7*, 747-764.

Cunningham, F., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., *et al.* (2015). Ensembl 2015. *Nucleic acids research* *43*, D662-669.

Cutler, J.E. (2001). N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* *39 Suppl 1*, 75-86.

d'Enfert, C. (2006). Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Current drug targets* *7*, 465-470.

Da Matta, D.A., Melo, A.S., Colombo, A.L., Frade, J.P., Nucci, M., and Lott, T.J. (2010). Candidemia surveillance in Brazil: evidence for a geographical boundary defining an area exhibiting an abatement of infections by *Candida albicans* group 2 strains. *Journal of clinical microbiology* *48*, 3062-3067.

Dalle, F., Wachtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., Labruere, C., Bonnin, A., and Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular microbiology* *12*, 248-271.

Das Gupta, M., Fliesser, M., Springer, J., Breitschopf, T., Schlossnagel, H., Schmitt, A.L., Kurzai, O., Hunniger, K., Einsele, H., and Löffler, J. (2014). *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. *International journal of medical microbiology : IJMM* *304*, 592-596.

Dennehy, K.M., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, J.A., Taylor, P.R., Kerrigan, A., Tsoni, S.V., Gordon, S., Meyer-Wentrup, F., *et al.* (2008). Syk kinase is required for collaborative

cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *European journal of immunology* 38, 500-506.

Dilda, F., Gioia, G., Pisani, L., Restelli, L., Lecchi, C., Albonico, F., Bronzo, V., Mortarino, M., and Cecilian, F. (2012). *Escherichia coli* lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* enterotoxin B differentially modulate inflammatory microRNAs in bovine monocytes. *Vet J* 192, 514-516.

Dorhoi, A., Iannaccone, M., Farinacci, M., Fae, K.C., Schreiber, J., Moura-Alves, P., Nouailles, G., Mollenkopf, H.J., Oberbeck-Muller, D., Jorg, S., *et al.* (2013). MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *The Journal of clinical investigation* 123, 4836-4848.

Dumitru, R., Navarathna, D.H., Semighini, C.P., Elowsky, C.G., Dumitru, R.V., Dignard, D., Whiteway, M., Atkin, A.L., and Nickerson, K.W. (2007). In vivo and in vitro anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* 6, 465-472.

Dunham, J.P., and Friesen, M.L. (2013). A cost-effective method for high-throughput construction of illumina sequencing libraries. *Cold Spring Harbor protocols* 2013, 820-834.

El Gazzar, M., and McCall, C.E. (2010). MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance. *The Journal of biological chemistry* 285, 20940-20951.

Elton, T.S., Selemon, H., Elton, S.M., and Parinandi, N.L. (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 532, 1-12.

Ernst, J.F., and Prill, S.K. (2001). O-glycosylation. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 39 *Suppl* 1, 67-74.

Eulalio, A., Triteschler, F., and Izaurralde, E. (2009). The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 15, 1433-1442.

Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* 8, 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* 8, 175-185.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* 79, 351-379.

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H.C., Schafer, W., and Hube, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and immunity* 70, 3689-3700.

Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T.S., Willment, J.A., van Spruiel, A.B., Venselaar, H., Elbers, C.C., Johnson, M.D., Cambi, A., Huysamen, C., *et al.* (2009). Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *The New England journal of medicine* 361, 1760-1767.

Filler, S.G., and Sheppard, D.C. (2006). Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS pathogens* 2, e129.

Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., *et al.* (2014). Ensembl 2014. *Nucleic acids research* 42, D749-755.

Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., *et al.* (2012). Ensembl 2012. *Nucleic acids research* 40, D84-90.

Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J., and Bennett, R.J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS biology* 6, e110.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* 44, 61-72.

Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Scwab, G.M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., and Chiao, P.J. (2004). NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and cellular biology* 24, 7806-7819.

Galan-Diez, M., Arana, D.M., Serrano-Gomez, D., Kremer, L., Casasnovas, J.M., Ortega, M., Cuesta-Dominguez, A., Corbi, A.L., Pla, J., and Fernandez-Ruiz, E. (2010). *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infection and immunity* 78, 1426-1436.

Gallego Romero, I., Pai, A.A., Tung, J., and Gilad, Y. (2014). RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC biology* 12, 42.

Gandhi, R., Healy, B., Gholipour, T., Egorova, S., Musallam, A., Hussain, M.S., Nejad, P., Patel, B., Hei, H., Khoury, S., *et al.* (2013). Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 73, 729-740.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO journal* 24, 1277-1286.

Garber, M., Grabherr, M.G., Guttman, M., and Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature methods* 8, 469-477.

Gazi, U., Rosas, M., Singh, S., Heinsbroek, S., Haq, I., Johnson, S., Brown, G.D., Williams, D.L., Taylor, P.R., and Martinez-Pomares, L. (2011). Fungal recognition enhances mannose receptor shedding through dectin-1 engagement. *The Journal of biological chemistry* 286, 7822-7829.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5, R80.

Gillum, A.M., Tsay, E.Y., and Kirsch, D.R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Molecular & general genetics : MGG* 198, 179-182.

Glocker, E.O., Hennigs, A., Nabavi, M., Schaffer, A.A., Woellner, C., Salzer, U., Pfeifer, D., Veelken, H., Warnatz, K., Tahami, F., *et al.* (2009). A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *The New England journal of medicine* 361, 1727-1735.

Gong, A.Y., Hu, G., Zhou, R., Liu, J., Feng, Y., Soukup, G.A., and Chen, X.M. (2011). MicroRNA-221 controls expression of intercellular adhesion molecule-1 in epithelial cells in response to *Cryptosporidium parvum* infection. *International journal for parasitology* 41, 397-403.

Gottwein, E. (2013). Roles of microRNAs in the life cycles of mammalian viruses. *Current topics in microbiology and immunology* 371, 201-227.

Goupil, M., Cousineau-Cote, V., Aumont, F., Senechal, S., Gaboury, L., Hanna, Z., Jolicoeur, P., and de Repentigny, L. (2014). Defective IL-17- and IL-22-dependent mucosal host response to *Candida albicans* determines susceptibility to oral candidiasis in mice expressing the HIV-1 transgene. *BMC immunology* 15, 49.

Gow, N.A., and Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current opinion in microbiology* 15, 406-412.

Gow, N.A., Netea, M.G., Munro, C.A., Ferwerda, G., Bates, S., Mora-Montes, H.M., Walker, L., Jansen, T., Jacobs, L., Tsoni, V., *et al.* (2007). Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *The Journal of infectious diseases* 196, 1565-1571.

Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C., and Geijtenbeek, T.B. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nature immunology* 10, 203-213.

Gringhuis, S.I., Kaptein, T.M., Wevers, B.A., Theelen, B., van der Vlist, M., Boekhout, T., and Geijtenbeek, T.B. (2012). Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature immunology* 13, 246-254.

Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M., and Diekema, D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37, 1172-1177.

Haasch, D., Chen, Y.W., Reilly, R.M., Chiou, X.G., Koterski, S., Smith, M.L., Kroeger, P., McWeeny, K., Halbert, D.N., Mollison, K.W., *et al.* (2002). T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cellular immunology* 217, 78-86.

Hato, T., and Dagher, P.C. (2014). How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*.

Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Martinez, F.O., Martinez-Pomares, L., Brown, G.D., and Gordon, S. (2008). Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS pathogens* 4, e1000218.

Holland, S.M., DeLeo, F.R., Elloumi, H.Z., Hsu, A.P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A.F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M.L., *et al.* (2007). STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *The New England journal of medicine* 357, 1608-1619.

Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., Marr, K.A., Pfaller, M.A., Chang, C.H., and Webster, K.M. (2009). Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019

patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48, 1695-1703.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., and Nickerson, K.W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology* 67, 2982-2992.

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. *J Immunol* 183, 2150-2158.

Huang, R.S., Hu, G.Q., Lin, B., Lin, Z.Y., and Sun, C.C. (2010). MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 58, 961-967.

Hube, B. (2006). Infection-associated genes of *Candida albicans*. *Future microbiology* 1, 209-218.

Hull, C.M., and Johnson, A.D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285, 1271-1275.

Hull, C.M., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289, 307-310.

Ifrim, D.C., Quintin, J., Joosten, L.A., Jacobs, C., Jansen, T., Jacobs, L., Gow, N.A., Williams, D.L., van der Meer, J.W., and Netea, M.G. (2014). Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 21, 534-545.

Imaizumi, T., Tanaka, H., Tajima, A., Yokono, Y., Matsumiya, T., Yoshida, H., Tsuruga, K., Aizawa-Yashiro, T., Hayakari, R., Inoue, I., *et al.* (2010). IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce microRNA-155 which regulates TAB2/IP-10 expression in human mesangial cells. *American journal of nephrology* 32, 462-468.

Ingolia, N.T., Brar, G.A., Rouskin, S., McGeachy, A.M., and Weissman, J.S. (2012). The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nature protocols* 7, 1534-1550.

Ip, W.K., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., and Stuart, L.M. (2009). Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunological reviews* 230, 9-21.

Iranzo, J., and Villoslada, P. (2014). Autoimmunity and tumor immunology: two facets of a probabilistic immune system. *BMC systems biology* 8, 120.

J, A.H., Yoo, D., and Liu, H.C. (2013). Characterization of the microRNAome in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected macrophages. *PloS one* 8, e82054.

Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wachtler, B., Brunke, S., Naglik, J.R., and Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert review of anti-infective therapy* 10, 85-93.

Jawhara, S., Thuru, X., Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Mordon, S., Sendid, B., Desreumaux, P., and Poulain, D. (2008). Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *The Journal of infectious diseases* 197, 972-980.

Jimenez-Lopez, C., and Lorenz, M.C. (2013). Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. *PLoS pathogens* 9, e1003741.

Johnson, M.D., Plantinga, T.S., van de Vosse, E., Velez Edwards, D.R., Smith, P.B., Alexander, B.D., Yang, J.C., Kremer, D., Laird, G.M., Oosting, M., *et al.* (2012). Cytokine gene polymorphisms and the outcome of invasive candidiasis: a prospective cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54, 502-510.

Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.A., Chamailard, M., Trottein, F., and Poulain, D. (2006). Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* 177, 4679-4687.

Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., Akira, S., and Poulain, D. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *The Journal of infectious diseases* 188, 165-172.

Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2005). Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Molecular biology of the cell* 16, 2903-2912.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology* 9, 361-368.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology* *14*, R36.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 126-139.

Kinsella, R.J., Kahari, A., Haider, S., Zamora, J., Proctor, G., Spudich, G., Almeida-King, J., Staines, D., Derwent, P., Kerhornou, A., *et al.* (2011). Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. *Database : the journal of biological databases and curation* *2011*, bar030.

Koch, M., Mollenkopf, H.J., Klemm, U., and Meyer, T.F. (2012). Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, E1153-1162.

Kuhn, R.M., Haussler, D., and Kent, W.J. (2013). The UCSC genome browser and associated tools. *Briefings in bioinformatics* *14*, 144-161.

Kumamoto, C.A., and Vences, M.D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular microbiology* *7*, 1546-1554.

Kumar, R., Halder, P., Sahu, S.K., Kumar, M., Kumari, M., Jana, K., Ghosh, Z., Sharma, P., Kundu, M., and Basu, J. (2012). Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular microbiology* *14*, 1620-1631.

Kurowska-Stolarska, M., Alivernini, S., Ballantine, L.E., Asquith, D.L., Millar, N.L., Gilchrist, D.S., Reilly, J., Ierna, M., Fraser, A.R., Stolarski, B., *et al.* (2011). MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 11193-11198.

Lagos, D., Pollara, G., Henderson, S., Gratrix, F., Fabani, M., Milne, R.S., Gotch, F., and Boshoff, C. (2010). miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nature cell biology* *12*, 513-519.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB* *12*, 735-739.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., *et al.* (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* *129*, 1401-1414.

Laprade, L., Boyartchuk, V.L., Dietrich, W.F., and Winston, F. (2002). Spt3 plays opposite roles in filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and is required for *C. albicans* virulence. *Genetics* *161*, 509-519.

Lario, S., Ramirez-Lazaro, M.J., Aransay, A.M., Lozano, J.J., Montserrat, A., Casalots, A., Junquera, F., Alvarez, J., Segura, F., Campo, R., *et al.* (2012). microRNA profiling in duodenal ulcer disease caused by *Helicobacter pylori* infection in a Western population. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* *18*, E273-282.

Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y., and Schroppel, K. (2001). Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* *42*, 673-687.

Lee, H.J. (2014). Additional stories of microRNAs. *Exp Biol Med (Maywood)* *239*, 1275-1279.

LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., *et al.* (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology* *8*, 630-638.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.

Lev-Sagie, A., Prus, D., Linhares, I.M., Lavy, Y., Ledger, W.J., and Witkin, S.S. (2009). Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3 and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* *200*, 303 e301-306.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.

Lewis, L.E., Bain, J.M., Lowes, C., Gillespie, C., Rudkin, F.M., Gow, N.A., and Erwig, L.P. (2012). Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants. *PLoS pathogens* 8, e1002578.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.

Li, H., Ruan, J., and Durbin, R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome research* 18, 1851-1858.

Li, S.K., Zhou, J.W., Yim, A.K., Leung, A.K., Tsui, S.K., Chan, T.F., and Lau, T.C. (2013a). Organism-specific rRNA capture system for application in next-generation sequencing. *PloS one* 8, e74286.

Li, X., Tian, F., and Wang, F. (2013b). Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets SOCS1 and upregulates TNF-alpha and IL-1beta in PBMCs. *International journal of molecular sciences* 14, 23910-23921.

Li, Y., Fan, X., He, X., Sun, H., Zou, Z., Yuan, H., Xu, H., Wang, C., and Shi, X. (2012). MicroRNA-466l inhibits antiviral innate immune response by targeting interferon-alpha. *Cellular & molecular immunology* 9, 497-502.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.

Lieber, D., and Haas, J. (2011). Viruses and microRNAs: a toolbox for systematic analysis. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 787-801.

Lin, L., Hou, J., Ma, F., Wang, P., Liu, X., Li, N., Wang, J., Wang, Q., and Cao, X. (2013). Type I IFN inhibits innate IL-10 production in macrophages through histone deacetylase 11 by downregulating microRNA-145. *J Immunol* 191, 3896-3904.

Lionakis, M.S., Lim, J.K., Lee, C.C., and Murphy, P.M. (2011). Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J Innate Immun* 3, 180-199.

Lionakis, M.S., and Netea, M.G. (2013). *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS pathogens* 9, e1003079.

Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunological reviews* 234, 45-54.

Liu, W., Gao, G., Hu, X., Wang, Y., Schwarz, J.K., Chen, J.J., Grigsby, P.W., and Wang, X. (2014). Activation of miR-9 by human papillomavirus in cervical cancer. *Oncotarget* 5, 11620-11630.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.

Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.

Lohse, M.B., and Johnson, A.D. (2009). White-opaque switching in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* 12, 650-654.

Longo, A.V., Burrowes, P.A., and Zamudio, K.R. (2014). Genomic studies of disease-outcome in host-pathogen dynamics. *Integrative and comparative biology* 54, 427-438.

Lorenz, M.C., Bender, J.A., and Fink, G.R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic cell* 3, 1076-1087.

Lowe, R.G., Cassin, A., Grandaubert, J., Clark, B.L., Van de Wouw, A.P., Rouxel, T., and Howlett, B.J. (2014). Genomes and transcriptomes of partners in plant-fungal-interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species. *PloS one* 9, e103098.

Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L., and Cao, X. (2010). MicroRNA-466l upregulates IL-10 expression in TLR-triggered macrophages by antagonizing RNA-binding protein tristetraprolin-mediated IL-10 mRNA degradation. *J Immunol* 184, 6053-6059.

MacCallum, D.M. (2009). Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS yeast research* 9, 1111-1122.

Magee, B.B., and Magee, P.T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* 289, 310-313.

Maher, C.A., Kumar-Sinha, C., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Jing, X., Sam, L., Barrette, T., Palanisamy, N., and Chinnaiyan, A.M. (2009). Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458, 97-101.

Maldonado-Lopez, R., and Moser, M. (2001). Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Seminars in immunology* 13, 275-282.

Mansour, M.K., Tam, J.M., Khan, N.S., Seward, M., Davids, P.J., Puranam, S., Sokolovska, A., Sykes, D.B., Dagher, Z., Becker, C., *et al.* (2013). Dectin-1 activation controls maturation of beta-1,3-glucan-containing phagosomes. *The Journal of biological chemistry* 288, 16043-16054.

Mardon, D., Balish, E., and Phillips, A.W. (1969). Control of dimorphism in a biochemical variant of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* *100*, 701-707.

Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M., and Gilad, Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome research* *18*, 1509-1517.

Marodi, L., Korchak, H.M., and Johnston, R.B., Jr. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* *146*, 2783-2789.

Marr, K.A., Patterson, T., and Denning, D. (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infectious disease clinics of North America* *16*, 875-894, vi.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* *17*, pp. 10-12.

Martin, S.F. (2014). Adaptation in the innate immune system and heterologous innate immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *71*, 4115-4130.

Maudet, C., Mano, M., and Eulalio, A. (2014). MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS letters* *588*, 4140-4147.

Mayoral, R.J., Pipkin, M.E., Pachkov, M., van Nimwegen, E., Rao, A., and Monticelli, S. (2009). MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells. *J Immunol* *182*, 433-445.

McCoy, C.E., Sheedy, F.J., Qualls, J.E., Doyle, S.L., Quinn, S.R., Murray, P.J., and O'Neill, L.A. (2010). IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *The Journal of biological chemistry* *285*, 20492-20498.

McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and Taylor, P.R. (2006). The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* *16*, 422-430.

McKenzie, C.G., Koser, U., Lewis, L.E., Bain, J.M., Mora-Montes, H.M., Barker, R.N., Gow, N.A., and Erwig, L.P. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infection and immunity* *78*, 1650-1658.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* *296*, 298-300.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.

Miller, L.G., Hajjeh, R.A., and Edwards, J.E., Jr. (2001). Estimating the cost of nosocomial candidemia in the united states. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* *32*, 1110.

Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* *110*, 293-302.

Mills, C.D. (2012). M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical reviews in immunology* *32*, 463-488.

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* *164*, 6166-6173.

Minegishi, Y., Saito, M., Morio, T., Watanabe, K., Agematsu, K., Tsuchiya, S., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., *et al.* (2006). Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* *25*, 745-755.

Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Pasic, S., Stojkovic, O., *et al.* (2007). Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* *448*, 1058-1062.

Miramon, P., Kasper, L., and Hube, B. (2013). Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. *Medical microbiology and immunology* *202*, 183-195.

Miyazato, A., Nakamura, K., Yamamoto, N., Mora-Montes, H.M., Tanaka, M., Abe, Y., Tanno, D., Inden, K., Gang, X., Ishii, K., *et al.* (2009). Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infection and immunity* *77*, 3056-3064.

Monk, C.E., Hutvagner, G., and Arthur, J.S. (2010). Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. *PloS one* *5*, e13669.

Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* *5*, 621-628.

Motta, A.L., Almeida, G.M., Almeida Junior, J.N., Burattini, M.N., and Rossi, F. (2010). Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *The*

Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases 14, 441-448.

Mullick, A., Elias, M., Picard, S., Bourget, L., Jovcevski, O., Gauthier, S., Tuite, A., Harakidas, P., Bihun, C., Massie, B., *et al.* (2004). Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. *Infection and immunity* 72, 5868-5876.

Mullick, A., Leon, Z., Min-Oo, G., Berghout, J., Lo, R., Daniels, E., and Gros, P. (2006). Cardiac failure in C5-deficient A/J mice after *Candida albicans* infection. *Infection and immunity* 74, 4439-4451.

Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaiia, F., *et al.* (2001). NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *The EMBO journal* 20, 4742-4752.

Muzzey, D., Schwartz, K., Weissman, J.S., and Sherlock, G. (2013). Assembly of a phased diploid *Candida albicans* genome facilitates allele-specific measurements and provides a simple model for repeat and indel structure. *Genome biology* 14, R97.

Naeem, A., Zhong, K., Moisa, S.J., Drackley, J.K., Moyes, K.M., and Loor, J.J. (2012). Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. *Journal of dairy science* 95, 6397-6408.

Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., and Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular microbiology* 6, 915-926.

Naglik, J.R., Challacombe, S.J., and Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67, 400-428, table of contents.

Nahid, M.A., Yao, B., Dominguez-Gutierrez, P.R., Kesavalu, L., Satoh, M., and Chan, E.K. (2013). Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. *J Immunol* 190, 1250-1263.

Nahum, A., Dadi, H., Bates, A., and Roifman, C.M. (2011). The L412F variant of Toll-like receptor 3 (TLR3) is associated with cutaneous candidiasis, increased susceptibility to cytomegalovirus, and autoimmunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127, 528-531.

Nakagawa, A., Shi, Y., Kage-Nakadai, E., Mitani, S., and Xue, D. (2010). Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science* 328, 327-334.

Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A.P., Sensen, C.W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., *et al.* (2002). Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Molecular biology of the cell* 13, 3452-3465.

Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008a). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews Microbiology* 6, 67-78.

Netea, M.G., Gijzen, K., Coolen, N., Verschueren, I., Figdor, C., Van der Meer, J.W., Torensma, R., and Kullberg, B.J. (2004a). Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6, 985-989.

Netea, M.G., Gow, N.A., Joosten, L.A., Verschueren, I., van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2010). Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 48, 897-903.

Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., *et al.* (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *The Journal of clinical investigation* 116, 1642-1650.

Netea, M.G., and Marodi, L. (2010). Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends in immunology* 31, 346-353.

Netea, M.G., Suttmuller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C.A., Van der Meer, J.W., van Krieken, J.H., Hartung, T., Adema, G., and Kullberg, B.J. (2004b). Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172, 3712-3718.

Netea, M.G., van de Veerdonk, F., Verschueren, I., van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2008b). Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS immunology and medical microbiology* 52, 118-123.

Netea, M.G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2002). The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of infectious diseases* 185, 1483-1489.

Ni, K., and O'Neill, H.C. (1997). The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunology and cell biology* 75, 223-230.

Nikoopour, E., and Singh, B. (2014). Reciprocity in microbiome and immune system interactions and its implications in disease and health. *Inflammation & allergy drug targets* 13, 94-104.

Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobon, A.M., Restrepo, A., and Colombo, A.L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51, 561-570.

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 of the United States of America* 106, 7113-7118.

Odds, F.C., Webster, C.E., Mayuranathan, P., and Simmons, P.D. (1988). Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 26, 277-283.

Okamura, K., Liu, N., and Lai, E.C. (2009). Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila Argonautes*. *Molecular cell* 36, 431-444.

Pappas, P.G. (2006). Invasive candidiasis. *Infectious disease clinics of North America* 20, 485-506.

Pappas, P.G., Rex, J.H., Lee, J., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Powderly, W., Kauffman, C.A., Hyslop, N., Mangino, J.E., Chapman, S., *et al.* (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37, 634-643.

Pareek, S., Roy, S., Kumari, B., Jain, P., Banerjee, A., and Vrati, S. (2014). MiR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. *Journal of neuroinflammation* 11, 97.

Park, H., Huang, X., Lu, C., Cairo, M.S., and Zhou, X. (2014). miR-146a and miR-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting of TRAF6 and IRAK1. *The Journal of biological chemistry*.

Peltz, G., Zaas, A.K., Zheng, M., Solis, N.V., Zhang, M.X., Liu, H.H., Hu, Y., Boxx, G.M., Phan, Q.T., Dill, D., *et al.* (2011). Next-generation computational genetic analysis: multiple complement alleles control survival after *Candida albicans* infection. *Infection and immunity* 79, 4472-4479.

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 IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 180, 5689-5698.

Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews* 20, 133-163.

Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology* 36, 1-53.

Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS biology* 5, e64.

Plantinga, T.S., Hamza, O.J., Willment, J.A., Ferwerda, B., van de Geer, N.M., Verweij, P.E., Matee, M.I., Banahan, K., O'Neill L, A., Kullberg, B.J., *et al.* (2010). Genetic variation of innate immune genes in HIV-infected african patients with or without oropharyngeal candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55, 87-94.

Plantinga, T.S., Johnson, M.D., Scott, W.K., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., Perfect, J.R., Kullberg, B.J., and Netea, M.G. (2012a). Human genetic susceptibility to *Candida* infections. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 50, 785-794.

Plantinga, T.S., Johnson, M.D., Scott, W.K., van de Vosse, E., Velez Edwards, D.R., Smith, P.B., Alexander, B.D., Yang, J.C., Kremer, D., Laird, G.M., *et al.* (2012b). Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *The Journal of infectious diseases* 205, 934-943.

Plantinga, T.S., van der Velden, W.J., Ferwerda, B., van Spriël, A.B., Adema, G., Feuth, T., Donnelly, J.P., Brown, G.D., Kullberg, B.J., Blijlevens, N.M., *et al.* (2009). Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49, 724-732.

Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., *et al.* (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332, 65-68.

Radovanovic, I., Mullick, A., and Gros, P. (2011a). Genetic control of susceptibility to infection with *Candida albicans* in mice. *PLoS one* 6.

Radovanovic, I., Mullick, A., and Gros, P. (2011b). Genetic control of susceptibility to infection with *Candida albicans* in mice. *PLoS one* 6, e18957.

Rajaram, M.V., Ni, B., Morris, J.D., Brooks, M.N., Carlson, T.K., Bakthavachalu, B., Schoenberg, D.R., Torrelles, J.B., and Schlesinger, L.S. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17408-17413.

Rizzetto, L., Buschow, S.I., Beltrame, L., Figdor, C.G., Schierer, S., Schuler, G., and Cavalieri, D. (2012). The modular nature of dendritic cell responses to commensal and pathogenic fungi. *PLoS one* 7, e42430.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.

Rocha, C.R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* 12, 3631-3643.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 588-593.

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. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 2292-2300.

Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nature reviews Immunology* 4, 1-23.

Ruegger, S., and Grosshans, H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in biochemical sciences* 37, 436-446.

Ruggiero, T., Trabucchi, M., De Santa, F., Zupo, S., Harfe, B.D., McManus, M.T., Rosenfeld, M.G., Briata, P., and Gherzi, R. (2009). LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2898-2908.

Ruhnke, M. (2002). Skin and mucous membrane infections. *Candida and candidiasis* ASM Press, Washington, DC, 307-325.

Saba, R., Gushue, S., Huzarewich, R.L., Manguiat, K., Medina, S., Robertson, C., and Booth, S.A. (2012). MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS one* 7, e30832.

Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S.H., *et al.* (2010). Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32, 681-691.

Sarazin, A., Poulain, D., and Jouault, T. (2010). In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 48, 912-921.

Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J.L. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic cell* 2, 1053-1060.

Scherwitz, C. (1982). Ultrastructure of human cutaneous candidosis. *The Journal of investigative dermatology* 78, 200-205.

Schneider, M. (2013). Collecting resident or thioglycollate-elicited peritoneal macrophages. *Methods Mol Biol* 1031, 37-40.

Seddiki, N., Brezar, V., Ruffin, N., Levy, Y., and Swaminathan, S. (2014). Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology* 142, 32-38.

Sedlazeck, F.J., Rescheneder, P., and von Haeseler, A. (2013). NextGenMap: fast and accurate read mapping in highly polymorphic genomes. *Bioinformatics* 29, 2790-2791.

Semaan, N., Frenzel, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Gottenberg, J.E., Sibia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2011). miR-346 controls release of TNF-alpha protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetrarprolin stabilization. *PloS one* 6, e19827.

Shareck, J., and Belhumeur, P. (2011). Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryotic cell* 10, 1004-1012.

Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26, 1135-1145.

Simonetti, N., Strippoli, V., and Cassone, A. (1974). Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* 250, 344-346.

Smekens, S.P., van de Veerdonk, F.L., Kullberg, B.J., and Netea, M.G. (2013). Genetic susceptibility to *Candida* infections. *EMBO molecular medicine* 5, 805-813.

Sobel, J.D. (1997). Vaginitis. *The New England journal of medicine* 337, 1896-1903.

Soll, D.R. (2004). Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 10-20.

Soneson, C., and Delorenzi, M. (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC bioinformatics* 14, 91.

Spaccapelo, R., Romani, L., Tonnetti, L., Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Tognellini, R., Reed, S.G., Puccetti, P., and Bistoni, F. (1995). TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. *J Immunol* 155, 1349-1360.

Starczynowski, D.T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R.A., *et al.* (2010). Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nature medicine* 16, 49-58.

Steinberg, K.M., Okou, D.T., and Zwick, M.E. (2008). Applying rapid genome sequencing technologies to characterize pathogen genomes. *Analytical chemistry* 80, 520-528.

Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* 12, 317-324.

Sudbery, P.E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews Microbiology* 9, 737-748.

Sundstrom, P., Balish, E., and Allen, C.M. (2002). Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *The Journal of infectious diseases* 185, 521-530.

Swaminathan, S., and Kelleher, A.D. (2014). MicroRNA modulation of key targets associated with T cell exhaustion in HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 9, 464-471.

Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K., Akashi, S., *et al.* (2002). *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiology and immunology* 46, 503-512.

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12481-12486.

Tam, W. (2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* 274, 157-167.

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews* 249, 158-175.

Taschdjian, C.L., Burchall, J.J., and Kozinn, P.J. (1960). Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA journal of diseases of children* 99, 212-215.

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* 14, 178-192.

Thulin, P., Wei, T., Werngren, O., Cheung, L., Fisher, R.M., Grandner, D., Corcoran, M., and Ehrenborg, E. (2013). MicroRNA-9 regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta in human monocytes during the inflammatory response. *International journal of molecular medicine* 31, 1003-1010.

Tierney, L., Linde, J., Muller, S., Brunke, S., Molina, J.C., Hube, B., Schock, U., Guthke, R., and Kuchler, K. (2012). An Interspecies Regulatory Network Inferred from Simultaneous RNA-seq of *Candida albicans* Invading Innate Immune Cells. *Frontiers in microbiology* 3, 85.

Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A., *et al.* (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* *179*, 5082-5089.

Toyotome, T., Adachi, Y., Watanabe, A., Ochiai, E., Ohno, N., and Kamei, K. (2008). Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* beta-glucans surface-exposed during specific growth stages. *Microbial pathogenesis* *44*, 141-150.

Tsoni, S.V., Kerrigan, A.M., Marakalala, M.J., Srinivasan, N., Duffield, M., Taylor, P.R., Botto, M., Steele, C., and Brown, G.D. (2009). Complement C3 plays an essential role in the control of opportunistic fungal infections. *Infection and immunity* *77*, 3679-3685.

Tuite, A., Elias, M., Picard, S., Mullick, A., and Gros, P. (2005). Genetic control of susceptibility to *Candida albicans* in susceptible A/J and resistant C57BL/6J mice. *Genes and immunity* *6*, 672-682.

Tuite, A., Mullick, A., and Gros, P. (2004). Genetic analysis of innate immunity in resistance to *Candida albicans*. *Genes Immun* *5*, 576-587.

Uwamahoro, N., Verma-Gaur, J., Shen, H.H., Qu, Y., Lewis, R., Lu, J., Bambery, K., Masters, S.L., Vince, J.E., Naderer, T., *et al.* (2014). The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *mBio* *5*, e00003-00014.

van de Veerdonk, F.L., Marijnissen, R.J., Kullberg, B.J., Koenen, H.J., Cheng, S.C., Joosten, I., van den Berg, W.B., Williams, D.L., van der Meer, J.W., Joosten, L.A., *et al.* (2009). The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell host & microbe* *5*, 329-340.

van de Veerdonk, F.L., Plantinga, T.S., Hoischen, A., Smeekens, S.P., Joosten, L.A., Gilissen, C., Arts, P., Rosentul, D.C., Carmichael, A.J., Smits-van der Graaf, C.A., *et al.* (2011). STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *The New England journal of medicine* *365*, 54-61.

Vazquez-Torres, A., and Balish, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* *61*, 170-192.

Vigorito, E., Perks, K.L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P.P., Miska, E.A., Rodriguez, A., Bradley, A., *et al.* (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* *27*, 847-859.

Villamon, E., Gozalbo, D., Roig, P., O'Connor, J.E., Fradelizi, D., and Gil, M.L. (2004). Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *6*, 1-7.

Virag, A., and Harris, S.D. (2006). The Spitzenkorper: a molecular perspective. *Mycological research* *110*, 4-13.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* *320*, 97-100.

Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T.K., Zhao, H., Zhao, Y., Wang, Y., and Harris, D. (2013a). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC immunology* *14*, 6.

Wang, J., Zheng, S., Xin, N., Dou, C., Fu, L., Zhang, X., Chen, J., Zhang, Y., Geng, D., Xiao, C., *et al.* (2013b). Identification of novel MicroRNA signatures linked to experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis: down-regulated miR-145 promotes pathogenetic Th17 cell response. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* *8*, 1287-1302.

Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics* *10*, 57-63.

Warg, L.A., Oakes, J.L., Burton, R., Neidermyer, A.J., Rutledge, H.R., Groshong, S., Schwartz, D.A., and Yang, I.V. (2012). The role of the E2F1 transcription factor in the innate immune response to systemic LPS. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* *303*, L391-400.

Wells, C.A., Salvage-Jones, J.A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S., Murray, R.Z., Beckhouse, A.G., Lo, Y.L., Manzanero, S., Cobbold, C., *et al.* (2008). The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol* *180*, 7404-7413.

Wheeler, R.T., Kombe, D., Agarwala, S.D., and Fink, G.R. (2008). Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS pathogens* *4*, e1000227.

Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). Candida morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current opinion in microbiology* 7, 350-357.

Yu, L., Liao, Q., Chen, X., Xu, L., Zeng, X., Lv, Z., Sun, X., Zhen, H., and Wu, Z. (2014). Dynamic expression of miR-132, miR-212, and miR-146 in the brain of different hosts infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology research* 113, 91-99.

Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal* 272, 6179-6217.

Zhao, W., He, X., Hoadley, K.A., Parker, J.S., Hayes, D.N., and Perou, C.M. (2014). Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling. *BMC genomics* 15, 419.

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.

Zhu, W., and Filler, S.G. (2010). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular microbiology* 12, 273-282.

Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P.S., Shi, L., Xu, H., Li, H., Wang, G., Evans, A.R., Safe, S., *et al.* (2012). A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation* 125, 2892-2903.