



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Patologia Molecular**

**Estudo dos miRNAs na resposta imune células dendríticas murinas à  
infecção por *Cryptococcus neoformans***

**Fabián Andrés Hurtado Erazo, BSc.**

**Brasília-DF**  
**Fevereiro de 2017**

**FABIÁN ANDRÉS HURTADO ERAZO, BSc.**

**Estudo dos miRNAs na resposta imune células dendríticas murinas à  
infecção por *Cryptococcus neoformans***

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-  
Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade  
de Medicina da Universidade de Brasília, como  
parte dos requisitos necessários para a obtenção do  
Título de Mestre em Patologia Molecular.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca  
Coorientadora: Dra. Lorena da Silveira Derengowski**

**Brasília-DF  
Fevereiro de 2017**

## AGRADECIMIENTOS

Primeiramente, meus agradecimentos se destinam à minha família que nunca saiu do meu lado, mesmo quando eu mudei para o Brasil. Especialmente, agradeço à minha mãe, irmãos, sobrinhos e avó por sempre terem acreditado em meus caminhos e por serem minha base nos momentos difíceis que passei longe deles. A custas da imensurável saudade que sentimos nasceu este trabalho, que hoje dedico a vocês. Foi mais um sonho realizado e agradeço por tanto amor e apoio de vocês.

Agradeço ao meu orientador, professor Márcio Poças, que, pela confiança que teve em mim, permitiu que eu realizasse esse sonho e me abriu portas para conhecer pessoas sem as quais este trabalho não teria sido possível.

À professora Lorena Derengowski, agradeço por ter me acolhido como co-orientadora e por ter me ajudado a direcionar e delinear minha pesquisa.

Dedico um agradecimento especial à professora Ildinete Silva-Pereira por me permitir fazer parte de seu laboratório, pela confiança que dedicou à mim e pelas inúmeras orientações que me fizeram chegar mais perto do pesquisador que sonho em ser e que expandiu meus sonhos de continuar.

Agradeço às pessoas do meu laboratório, em especial ao Marco e ao André pelo tempo que dedicaram a me ajudar em meus experimentos e ao Jhones, por me ajudar com as correções de português.

Agradeço à professora Patrícia e aos professores André e Hugo pelos momentos em que pude contar com vocês e por todos os aprendizados decorrentes desses encontros.

Ao Laboratório LIA pelo uso das instalações, em especial ao Rafael pela grande ajuda nos experimentos.

Agradeço, com especial carinho, à família que me permitiu formar no Brasil. À Beatriz, que abriu suas portas para mim no momento de minha chegada; a Osmel, César e Harry tanto pelos momentos de descontração e confidencialidade quanto pelas trocas e aprendizados que compartilhamos; e à Marina *quien estuvo conmigo durante el curso de este sueño, brindandome su compañía, amor y cariño en todo momento, siendo un gran soporte en los momentos de dificultad, los cuales me ayudó a superar. A ella siempre le estaré agradecido.*

Agradeço àqueles amigos que a UnB me presenteou, João Heitor, Otávio e Jhones, que ajudaram a me sentir um pouco mais “em casa” no Brasil, que se propuseram a me ajudar em muitos momentos, não só com relação aos meus experimentos, mas com as dificuldades que enfrentei aqui.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, por me receber com tanto acolhimento e tornar possível a subida de mais um degrau em minha vida.

Pelo apoio financeiro, sem o qual eu não teria estado aqui, agradeço ao CNPq, a FAP-DF e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação (DPP).

## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>x</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Criptococose .....	2
1.2. <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	4
1.3. Resposta imune a <i>Cryptococcus</i> .....	6
1.4. Ativação e biogênese de microRNAs .....	9
1.5. Participação de miRNAs na resposta imune a infecções por patógenos microbianos .....	12
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Objetivo geral .....	15
3.2. Objetivos específicos .....	15
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. <i>C. neoformans</i> : manutenção e cultivo e preparo do inóculo .....	16
4.2. Animais.....	16
4.3. Obtenção de células dendríticas.....	16
4.4. Ensaio de interação patógeno-hospedeiro .....	17
4.5. Análise de expressão de miRNAs por <i>RT-qPCR array</i> .....	18
4.5.1. Extração de RNA.....	18
4.5.2. Sínteses de cDNA.....	18
4.5.3. Quantificação de acúmulo de miRNAs por <i>RT-qPCR array</i> .....	19

4.6. Validação do acúmulo de miRNA por meio da técnica de RT-qPCR.....	19
4.6.1. Sínteses de cDNA.....	19
4.6.2. Quantificação dos miRNAs por RT-qPCR .....	20
4.7. Avaliação do modelo de transfecção de inibidores de miRNAs em células dendríticas .....	20
4.7.1. Avaliação da citotoxicidade dos componentes do ensaio de transfecção de anti-miRs em células dendríticas.....	21
4.7.2. Avaliação da eficiência de transfecção .....	22
4.7.3. Avaliação da capacidade de fagocitose de leveduras de <i>C. neoformans</i> por BMDCs .....	23
4.7.4. Avaliação da capacidade fungicida de células BMDCs.....	23
4.7.5. Dosagem de Citocinas secretadas por BMDCs infectadas por <i>C. neoformans</i> .....	24
4.7.6. Análise por citometria de fluxo da expressão de MHCII em BMDCs infectadas por <i>C. neoformans</i> .....	24
4.8. Análises estatísticas .....	26
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
5.1. Caracterização do padrão de expressão de miRNAs de células dendríticas em resposta à infecção por <i>C. neoformans</i> .....	28
5.2. Validação dos resultados do <i>qPCR array</i> por RT-qPCR com o emprego de sondas TaqMan® .....	33
5.3. Análise dos efeitos da transfecção de inibidores de miRNAs em células dendríticas .....	35
5.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos componentes da transfecção de anti-miRs em células dendríticas .....	36
5.3.2. Determinação da eficiência da transfecção de inibidores de miRNAs em BMDCs .....	37
5.3.3. Avaliação do efeito da inibição do miR-155 na capacidade de fagocitose de <i>C. neoformans</i> por BMDCs .....	38

5.3.4. Avaliação do efeito da inibição do miR-155 no controle da infecção de BMDCs por <i>C. neoformans</i> .....	41
5.3.5. Avaliação do efeito da inibição do miR-155 sobre a secreção de citocinas pelas BMDCs em resposta à infecção por <i>C. neoformans</i> .....	42
5.3.6. Avaliação do efeito da inibição de miR-155 sobre a expressão de MHCII em BMDCs em resposta à infecção por <i>C. neoformans</i> .....	45
<b>VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>49</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortes por doenças infecciosas no nível mundial. ....	3
Figura 2. Distribuição geográfica de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> na América Central e América do Sul. ....	5
Figura 3. Infecção por <i>C. neoformans</i> e resposta imune do hospedeiro mediada por células dendríticas.....	9
Figura 4. Mecanismo de biogênese de miRNAs e ativação da expressão via TLR. ....	11
Figura 5. Estratégia de seleção para análise da expressão de MHCII de BMDCs CD11c <sup>+</sup> .25	
Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL do RNA total de BMDCs infectadas com <i>C. neoformans</i> por 24 h.....	28
Figura 7. Representação gráfica do padrão de expressão de miRNAs em BMDCs após infecção com <i>C. neoformans</i> . ....	32
Figura 8. Representação gráfica do acúmulo de miRNAs em BMDCs infectadas por <i>C. neoformans</i> (TaqMan miRNA Assay).....	34
Figura 9. Avaliação da viabilidade das BMDCs após tratamento com os componentes da transfecção de anti-miRs. ....	36
Figura 10. Eficiência da transfecção de inibidores de miRNAs em BMDCs.....	38
Figura 11. Avaliação da capacidade de fagocitose de <i>C. neoformans</i> pelas BMDCs após a inibição do miR-155. ....	40
Figura 12. Avaliação da capacidade de contenção de <i>C. neoformans</i> pelas BMDCs após a inibição do miR-155. ....	42
Figura 13. Avaliação da secreção de citocinas pelas BMDCs após inibição de miR-155 e infecção por <i>C. neoformans</i> .....	44
Figura 14. Análise da expressão de MHCII em BMDCs após a inibição de miR-155 em resposta a infecção por <i>C. neoformans</i> . ....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. miRNAs selecionados para a validação dos resultados do <i>RT-qPCR array</i> . ....	20
Tabela 2. Componentes do kit de transfecção empregados na avaliação da citotoxicidade em BMDCs.....	22
Tabela 3. Valores de Ct do painel de controles endógenos do <i>RT-qPCR array</i> .....	29
Tabela 4. Análise da reprodutibilidade do <i>RT-qPCR array</i> . ....	30
Tabela 5. miRNAs modulados em BMDCs infectadas por <i>C. neoformans</i> . ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida

**Anti-miR** – Inibidores de miRNAs

**BMDC** – Células dendríticas derivadas de medula óssea

**C3** – Componente 3 do complemento

**CLR** – Receptores de lecitina tipo C

**CR** – Receptores do complemento

**cDNA** – DNA complementar

**Ct** – Threshold cycle

**dNTP** – deoxirribonucleotídeos fosfato

**g** - gravidades

**GXM** – Glicoronoxilomanana

**GalXM** – Galactoxilomanana

**Fc-γR** - Receptores Fc-γ

**h** – hora/horas

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**HMGA2** - High-mobility group AT-hook 2

**IFNγ** – Interferon gama

**IL** - interleucina

**IRAK4** - Interleukin-1 receptor-associated kinase 4

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MFI** - Média da Intensidade de Fluorescência

**MHCII** - Complexo Maior de Histocompatibilidade II

**min** – minuto/minutos

**mM, nM** – milimolar, nanomolar

**mL** – mililitro

**miRNA, miR** – microRNAs

**miRISC** – complexo de silenciamento induzido por microRNAs

**mRNA** – RNA mensageiro

**MR** – Receptores de Manose

**ncRNA** - RNAs não-codificadores

**NFκB** - Nuclear Factor kappa-B

**ng** - nanograma

**nm** - nanômetro

**PAMPs** - Padrões moleculares associados a patógenos

**PBS** – tampão salino-fosfato

**pH** – potencial de hidrogeniônico

**pre-miRNA** - miRNA precursor

**pri-miRNA** - miRNA primário

**RT-qPCR** – transcrição reversa seguida de PCR quantitativa

**RT-qPCR array** – transcrição reversa seguida análise de microarranjo por qPCR

**rpm** – rotações por min

**s** - segundos

**SFB** – soro fetal bovino

**SNC** – Sistema nervoso central

**snRNA** – pequenos RNAs nucleares

**TLR** – receptores do tipo Toll

**TNF-α** - Tumor necroses fator α

**U** - Unidade de ação enzimática

**UV** - Ultravioleta

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

**μL** - microlitro

**°C** – grau Celsius

**%** - porcentagem

## RESUMO

O fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma infecção fúngica invasiva que pode se disseminar ao sistema nervoso central e que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos. Uma das principais células em detectar a infecção são as células dendríticas, que reconhecem e fagocitam o fungo orquestrando a resposta imune adaptativa para erradicar a infecção. A resposta imune do hospedeiro às infecções por patógenos microbianos envolve ampla reprogramação gênica, que é finamente controlada de modo a conter ou eliminar efetivamente o patógeno sem causar danos excessivos no hospedeiro. Micro-RNAs (miRNAs) são pequenos RNAs regulatórios envolvidos em mecanismos de regulação gênica e já foram detectados em diversos processos fisiológicos e patológicos controlando a estabilidade ou a taxa de tradução de RNA mensageiros (mRNA). Portanto, essas moléculas foram identificadas como um componente crucial na maquinaria da regulação gênica, afetando a produção e função das proteínas durante a homeostase ou sua perturbação. Esse estudo visou a caracterização do perfil de miRNAs expressos em células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos BALB/c (BMDCs) em resposta à infecção por *C. neoformans*. BMDCs foram co-cultivadas com a linhagem B3501 de *C. neoformans* por 24 h e tiveram RNA extraído para análise de expressão de miRNAs por *RT-qPCR array*. Os níveis de acúmulo de 29 miRNAs foram alterados nas BMDCs infectadas. Desse grupo, 22 miRNAs foram regulados positivamente e 7 miRNAs mostraram uma diminuição nos níveis de seus transcritos. Em seguida, analisou-se o papel do miR-155 nas principais funções das BMDCs em resposta à infecção por *C. neoformans*, por meio da abordagem de perda da função, mediante a transfecção de inibidores de miRNAs. Em tais experimentos, observou-se uma alteração na fagocitose e no controle intracelular do fungo pelas BMDCs quando miR-155-3p foi inibido. A análise da expressão, por citometria de fluxo, de MHCII nas BMDCs revelou um aumento na média da intensidade de fluorescência quando miR-155-5p foi inibido, sugerindo um papel na regulação desse complexo. Os resultados desse trabalho são pioneiros ao sugerir a participação de miRNAs na resposta de células dendríticas à infecção por *C. neoformans*. Estudos posteriores serão realizados visando ao aprofundamento da avaliação funcional desses miRNAs e seus respectivos mecanismos de ativação nesse modelo de infecção.

## ABSTRACT

The pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is one of the etiological agents of cryptococcosis, an invasive fungal infection that can spread to the central nervous system and mainly affects immunocompromised patients. One of the main cells in detecting the infection are dendritic cells, which recognize and phagocytose the fungus, orchestrating the adaptive immune response to eradicate the infection. The immune response to microbial pathogen infections involves extensive genetic reprogramming, which is finely controlled to contain or to effectively eliminate the pathogen without causing excessive damage to the host. Micro-RNAs (miRNAs) are small regulatory RNAs involved in gene regulation mechanisms; these molecules are observed in a wide range of physiological and pathological processes controlling either messenger RNA (mRNA) stability or translation rate. Therefore, these molecules have been identified as a crucial component in the gene regulation machinery, affecting the production and function of proteins in homeostasis and its alterations. This study focused on characterizing the profile of miRNAs expressed in bone marrow-derived dendritic cells from BALB/c mice (BMDCs) in response to *C. neoformans* infection. BMDCs were co-cultured with the B-3501 strain of *C. neoformans* for 24 hours, after which the RNA was extracted for analysis of miRNA expression by *RT-qPCR array*. The expression levels of 29 miRNAs were altered in the infected BMDCs. Out of this group, 22 miRNAs were upregulated and 7 miRNAs showed a decrease in the levels of transcripts. Subsequently, the effect of miR-155 in the main functions of BMDCs in response to *C. neoformans* infection was analyzed by a loss-of-function approach: transfection of miRNA inhibitors into BMDCs. When miR-155-3p was inhibited, a change in BMDCs phagocytosis ability and in the intracellular control of the fungus was observed. Analysis of the MHCII expression in infected BMDCs by flow cytometry revealed an increase in the Mean Fluorescence Intensity when miR-155-5p was inhibited. These results are pioneering in indicating the participation of miRNAs in the dendritic cells response to *C. neoformans* infection.

## I. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas aumentaram em incidência nas últimas duas décadas (Jiang, 2016), tornando-se uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (pacientes de HIV/AIDS, com doenças autoimunes, em quimioterapia contra o câncer e indivíduos submetidos a transplantes de órgãos). Tal população vem aumentando consideravelmente (Katragkou e Roilides, 2011; Armstrong-James e Harrison, 2012; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Datta e Hamad, 2015). Uma das causas mais relevantes da morbidade e mortalidade associada às infecções fúngicas é a pandemia do HIV, uma vez que mesmo com as terapias antirretrovirais, muitos pacientes continuam em estado de imunossupressão avançada, o que os torna suscetíveis às infecções fúngicas (Armstrong-James *et al.*, 2014; Jiang, 2016).

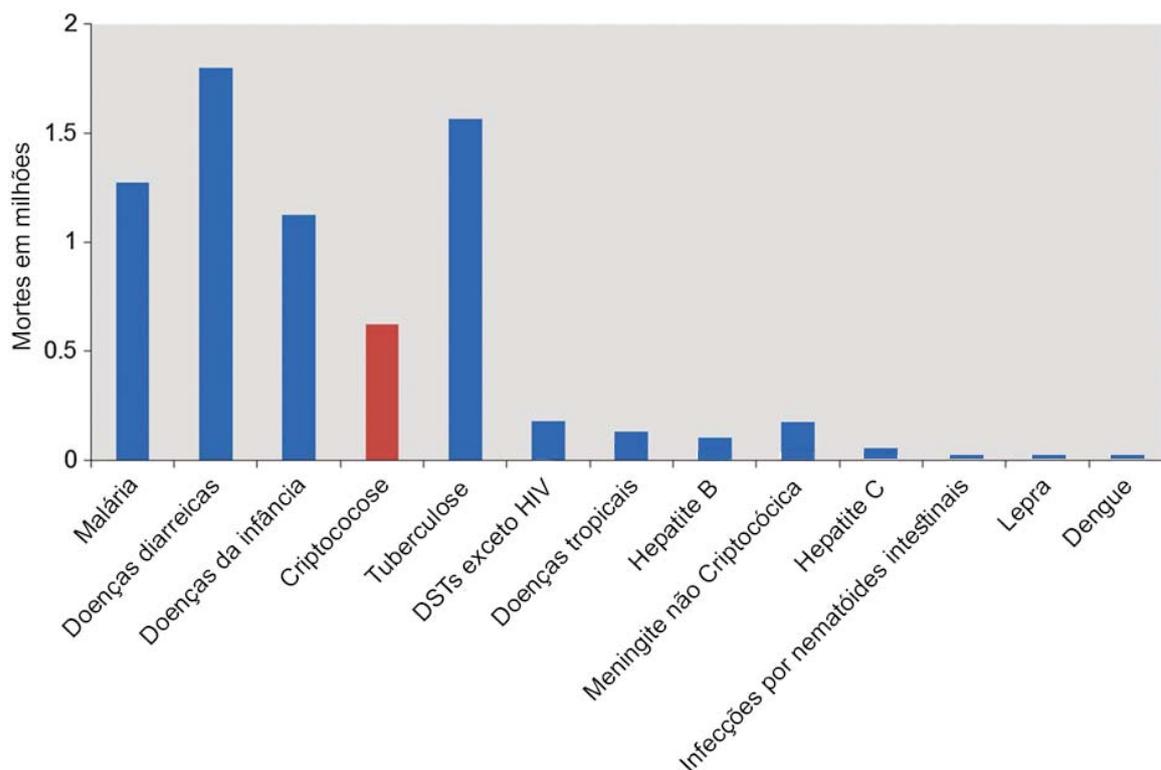
Há uma grande diversidade de espécies de fungos que afetam os seres humanos e que causam infecções, tais como *Cryptococcus* spp, *Candida* spp, *Histoplasma* spp, *Aspergillus* spp, *Paracoccidioides* spp, entre outros, que representam uma importante classe de organismos patogênicos (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Datta e Hamad, 2015). *Cryptococcus* spp está relacionado com a maior parte das mortes por infecções fúngicas associadas à infecção por HIV no mundo (Armstrong-James *et al.*, 2014). As infecções iniciam com a inalação de propágulos infectantes dos fungos, provocando uma resposta imune imediata (imunidade inata) que, posteriormente, é reforçada por uma resposta de segundo nível (imunidade adaptativa), sendo o conjunto dessas respostas orquestrado cooperativamente para eliminar a infecção (Trzeciak-Ryczek *et al.*, 2015; Jiang, 2016). Ainda assim, esses organismos têm desenvolvido diversos mecanismos de evasão, provocando um desequilíbrio na homeostase do hospedeiro (Jiang, 2016).

Esses dados incentivam o interesse científico em elucidar os mecanismos da imunopatogênese das infecções microbianas, que varia dependendo da espécie do patógeno, do local da infecção e do estado imunológico do hospedeiro (Perfect *et al.*, 2010; Trzeciak-Ryczek *et al.*, 2015; Jiang, 2016). Nessa perspectiva, a pesquisa científica torna-se essencial para o entendimento das bases moleculares da interação hospedeiro-patógeno, como também para o desenvolvimento de novas abordagens de intervenção terapêutica e descoberta de novos fármacos mais eficazes, assim como de terapias imunológicas que melhorem a resposta do hospedeiro aos patógenos (Armstrong-James *et al.*, 2014; Jiang, 2016).

## 1.1. Criptococose

A criptococose é uma infecção fúngica invasiva com diversas manifestações clínicas que ocorre no mundo todo. Essa doença pode incluir desde uma infecção cutânea até uma infecção sistêmica atingindo o sistema nervoso central (SNC), causando meningite fatal (Neuville *et al.*, 2003; Perfect *et al.*, 2010; Srikanta *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2015). Em países desenvolvidos, a incidência desse quadro é menor, ao contrário das regiões subdesenvolvidas onde a incidência e a mortalidade são altas como consequência do limitado acesso às terapias antirretrovirais e antifúngicas (Park *et al.*, 2009; Perfect *et al.*, 2010). Estima-se que ocorram aproximadamente um milhão de casos anuais de criptococose associada à infecção por HIV mundialmente. A maioria desses casos ocorre em regiões em desenvolvimento; na África subsaariana a criptococose é a causa de cerca de 60% das mortes associadas a HIV/AIDS (Figura 1) (Park *et al.*, 2009; Perfect *et al.*, 2010; Srikanta *et al.*, 2014; Maziarz e Perfect, 2016). Em contraste, nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, a mortalidade em decorrência de criptococose em pacientes com HIV é de cerca de 12%, devido à alta disponibilidade de terapias antirretrovirais e antifúngicas (Cogliati, 2013).

A criptococose é ocasionada pela inalação de leveduras dessecadas ou de esporos de fungos patogênicos do gênero *Cryptococcus* encontrados no ambiente, provocando uma infecção pulmonar primária (Botts e Hull, 2010; Leopold Wager *et al.*, 2016; Maziarz e Perfect, 2016). Em humanos é causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Maziarz e Perfect, 2016). Esses patógenos intracelulares facultativos podem proliferar-se livres em tecidos ou fluidos corporais, ou ainda dentro de células fagocíticas (revisado por: Srikanta *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Mortes por doenças infecciosas no nível mundial. Barras, número global de mortes; Barra vermelha, número de mortes por criptococose. Modificado de: Srikanta *et al.*, 2014.

Em termos ecológicos e patológicos as duas espécies apresentam grandes diferenças (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Srikanta *et al.*, 2014). *C. neoformans* é associado à maioria das infecções em humanos imunocomprometidos, apresentando distribuição mundial e no ambiente é associado a excretas de aves e ao solo (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Srikanta *et al.*, 2014). Por outro lado, *C. gattii* é responsável por infecções em humanos aparentemente imunocompetentes, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais, mas também com registro de surtos em áreas circunvizinhas na costa sudoeste Canadá e noroeste dos Estados Unidos. No ambiente, *C. gattii* é associado a espécies de árvores como *Eucalyptus camaldulensis* (Dixit *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2010; Perfect *et al.*, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2014). No nível mundial a criptococose é predominantemente causada por *C. neoformans*, aproximadamente 80% dos casos (revisado por: Kwon-Chung *et al.*, 2014).

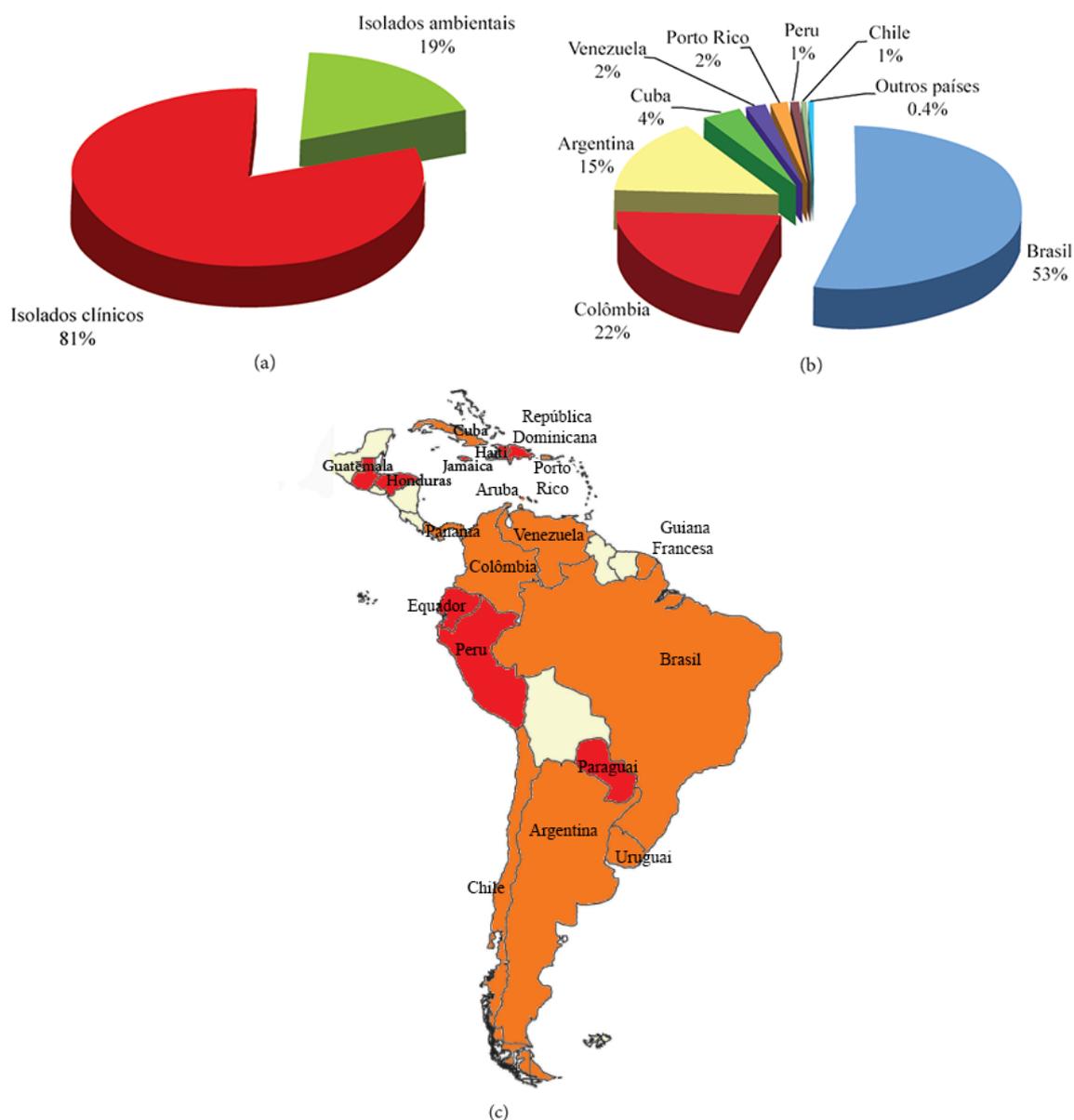
Dados da literatura indicam que a criptococose é uma importante infecção oportunista no mundo, sendo considerada um grave problema de saúde pública, particularmente em regiões que carecem de recursos médicos necessários ao seu controle

efetivo, convertendo-se em um desafio para as agências de saúde mundiais (Perfect *et al.*, 2010).

## 1.2. *Cryptococcus neoformans*

*C. neoformans* é uma levedura encapsulada com particular tropismo pelo sistema nervoso central (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012). A espécie pode ser encontrada em duas variedades, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e um híbrido (sorotipo AD). Diferentes marcadores moleculares têm permitido uma classificação filogenética mais precisa (Meyer *et al.*, 2011; Hagen *et al.*, 2015). A maioria (95%) dos casos reportados mundialmente de criptococose é causada por *C. neoformans* var. *grubii* (Rohatgi e Pirofski, 2015; Maziarz e Perfect, 2016). Na América Central e América do Sul foram reportados 10.548 isolados do complexo *Cryptococcus spp.*, 53% foram isolados no Brasil, 22% na Colômbia e 15% na Argentina; do total, 81% correspondem a isolados clínicos e 19% a fontes ambientais e veterinárias (Figura 2) (Cogliati, 2013).

O fungo desenvolveu diferentes atributos de virulência que são fatores essenciais para sua capacidade de adaptação a vários ambientes ou dentro dos hospedeiros. Dentre tais fatores, destacam-se: a cápsula de polissacarídeos, a produção de melanina associada à parede celular e a capacidade de crescimento a 37 °C. Assim, o fungo ocupa com sucesso uma grande variedade de habitats, protegendo-se contra as adversidades ambientais como radiação UV, temperatura, e os mecanismos imunes dos hospedeiros (revisado por: Kwon-Chung *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Distribuição geográfica de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na América Central e América do Sul.

**A.** Porcentagem de isolados clínicos (n = 8950) e ambientais (n = 1958). **B.** Porcentagem de distribuição geográfica de isolados em diferentes países de América Central e América do Sul. **C.** Mapa da distribuição geográfica dos isolados na América Central e América do Sul; isolados clínicos foram reportados nos países em vermelho, enquanto que isolados clínicos e ambientais foram reportados nos países em laranja. **Modificado de: Cogliati, 2013.**

O fator de virulência mais bem caracterizado em *C. neoformans* é a cápsula de polissacarídeos, uma estrutura que envolve o fungo e que está ancorada à parede celular. É composta essencialmente por glicoronoxilomanana (GXM, aproximadamente 90% da massa total) e galactoxilomanana (GalXM); há ainda pequenas quantidades de manoproteínas (Zaragoza *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). Os dois componentes principais da cápsula estão

envolvidos na alteração da resposta imune do hospedeiro, influenciando a patogênese do fungo (García-Rodas *et al.*, 2014). No ambiente, a cápsula protege o fungo de condições de estresse como a desidratação (Zaragoza *et al.*, 2009). Estudos indicam que o tamanho da cápsula é variável e pode aumentar durante a infecção ou por estímulos ambientais, sendo essa variação associada ao nível de síntese de moléculas de GXM (Yoneda e Doering, 2008; García-Rodas *et al.*, 2014). A importância da cápsula na virulência de *C. neoformans* foi evidenciada a partir do estudo de mutantes acapsulares, que não provocam a doença em modelos murinos de infecção (Zaragoza *et al.*, 2009).

Na interação com o hospedeiro, a cápsula de polissacarídeos confere propriedades que melhoram a capacidade do fungo de colonizar o hospedeiro e desenvolver a doença. Interfere com a fagocitose por macrófagos e células dendríticas, evitando a morte e a apresentação de antígenos pelos fagócitos. Quando no interior de fagócito, a cápsula protege o fungo das espécies reativas de oxigênio geradas no contexto da resposta do hospedeiro (Monari *et al.*, 2006; Zaragoza *et al.*, 2009). Ademais, a GXM apresenta propriedades imunomoduladoras, sendo que em monócitos e macrófagos reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 12 (IL-12) propiciando a evasão do sistema imune e a sobrevivência do fungo (Monari *et al.*, 2006).

### **1.3. Resposta imune a *Cryptococcus***

A infecção naturalmente ocorre pela inalação de leveduras dessecadas ou esporos do ambiente que se alojam nos pulmões e, em condições normais, são eliminados pelo sistema imune do hospedeiro. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, se a infecção não é erradicada ou é reativada, o fungo pode invadir o SNC causando meningoencefalite (Giles *et al.*, 2009; Kronstad *et al.*, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 2014; Leopold Wager *et al.*, 2016). A infecção nos pulmões desencadeia uma resposta imune inflamatória, que envolve a participação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos e a produção de citocinas como o TNF- $\alpha$ , Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e a IL-12, associadas à resposta Th1, visando à erradicação da infecção. Contrariamente, uma resposta não protetora envolve um insuficiente recrutamento de macrófagos e células dendríticas, com a produção de citocinas do tipo Th2, como a IL-4 (Guillot *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009). Na maioria dos casos, o fungo não erradicado pode entrar em um estado de latência nos pulmões,

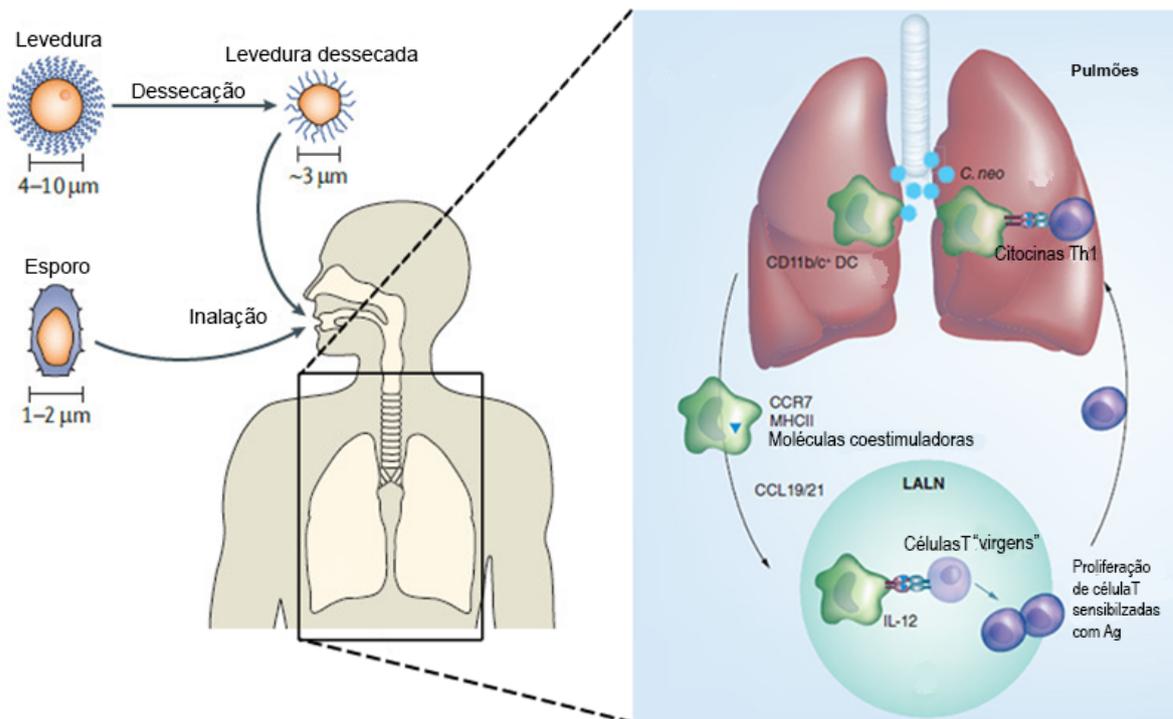
formando granulomas, sem levar a evolução da doença (revisado por: Rohatgi e Pirofski, 2015).

Uma vez nos pulmões do hospedeiro, *C. neoformans* é fagocitado principalmente por macrófagos alveolares e células dendríticas. Nesse processo, é indispensável a participação das proteínas do sistema complemento, levando à deposição do componente 3 do complemento (C3) na cápsula do fungo, como um importante mediador da fagocitose (Rohatgi e Pirofski, 2015). As leveduras opsonizadas são reconhecidas pelos receptores do complemento (CR) CR1, CR3 e CR4, presentes na superfície dos fagócitos (Zaragoza *et al.*, 2003; Mershon-Shier *et al.*, 2011). A fagocitose pode ainda ser mediada pelos receptores Fc- $\gamma$  (Fc- $\gamma$ R) dos macrófagos e de células dendríticas, por meio da interação com leveduras opsonizadas por anticorpos (Netski e Kozel, 2002; Zaragoza *et al.*, 2009). Além destes mecanismos, os fagócitos possuem receptores de manoproteínas que contribuem para a fagocitose do fungo (Dan *et al.*, 2008).

Após a ativação dos macrófagos alveolares e posterior fagocitose do fungo no fagossoma, é iniciada a fusão com vesículas lisossomais, gerando o fagolisossomo. Nessa estrutura, as moléculas antimicrobianas, o pH ácido e a limitação dos nutrientes contribuem para a morte do patógeno. Além disso, são secretadas citocinas e quimiocinas que promovem o recrutamento de outras células do sistema imune e a proliferação de células T, desencadeando uma resposta do tipo Th1 efetiva para a eliminação da infecção em hospedeiros imunocompetentes (Mcquiston e Williamson, 2012). Não obstante, tem-se evidências de que o fungo é capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de macrófagos, bem como de promover sua exocitose não lítica, sendo ainda capaz de se disseminar até o cérebro no interior de monócitos, causando a meningite (Feldmesser *et al.*, 2000; Alvarez e Casadevall, 2006; Charlier *et al.*, 2009; Nicola *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstram o papel fundamental das células dendríticas na resposta imune contra *C. neoformans*, por meio de detecção, fagocitose, apresentação de antígenos às células T e morte do patógeno (Kelly *et al.*, 2005; Wozniak *et al.*, 2006; Wozniak e Levitz, 2008; Hole *et al.*, 2012). Devido à presença da cápsula, a opsonização pelo sistema complemento ou por anticorpos é requerida para a fagocitose do fungo por células dendríticas, envolvendo receptores CRs e Fc- $\gamma$ Rs (Kelly *et al.*, 2005; Rohatgi e Pirofski, 2015). Adicionalmente, as células dendríticas expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs) na superfície celular ou no compartimento endossomal,

como receptores tipo Toll (TLRs), receptores de lecitina tipo C (CLRs) e receptores de manose (MR), que mediam o reconhecimento de um grupo de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Ramirez-Ortiz e Means, 2012). Há evidências de que os MRs das células dendríticas participem no reconhecimento de resíduos de manose da parede celular de *C. neoformans*. Os receptores TLR2 e Dectina-2 (CLR) reconhecem, respectivamente, moléculas de mananas e  $\alpha$ -mananas presentes na cápsula do fungo, enquanto TLR9, presente no lisossomo, reconhece o DNA e parece ser o receptor essencial para a ativação da resposta anti-criptococose (Mansour *et al.*, 2002; Syme *et al.*, 2002; Biondo *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2008; Ramirez-Ortiz e Means, 2012; Eastman *et al.*, 2015). Após o reconhecimento do fungo pelos PRRs, as células dendríticas o fagocitam em compartimentos endosomais que se fusionam com o lisossomo, onde o patógeno é degradado e processado para a apresentação às células T de antígenos associados ao complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MCHII). Nesse processo, também ocorre a liberação de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-23; essas, em conjunto, levam à indução de uma resposta imune adaptativa do tipo Th1, necessária à eliminação do patógeno (Figura 3) (Mansour *et al.*, 2006; Kleinschek *et al.*, 2009; Hole *et al.*, 2012; Rohatgi e Pirofski, 2015).



**Figura 3.** Infecção por *C. neoformans* e resposta imune do hospedeiro mediada por células dendríticas.

LALN, Nódulos linfáticos associados a pulmão. **Adaptado de: Kronstad *et al.*, 2011 e Eastman *et al.*, 2015.**

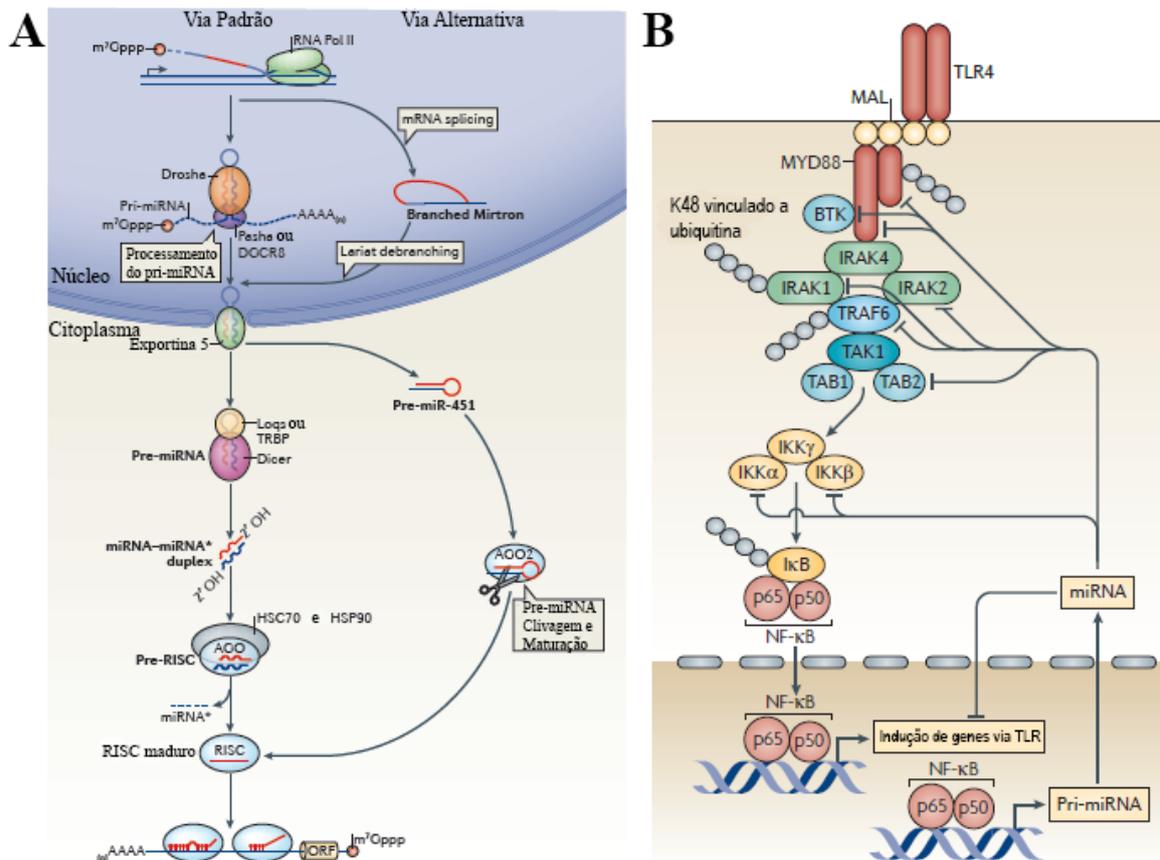
#### 1.4. Ativação e biogênese de microRNAs

A resposta do hospedeiro à infecção microbiana é um processo amplamente estudado e caracteriza-se por mudanças na expressão gênica, tanto do hospedeiro como do patógeno (Lee *et al.*, 2014; Siddle *et al.*, 2015). Entretanto, esse processo deve ser extremamente controlado, de modo a conter ou eliminar efetivamente o patógeno sem causar danos excessivos ao hospedeiro (Mehta e Baltimore, 2016). Dados recentes vêm apontando os RNAs não-codificadores (ncRNAs) como reguladores centrais no controle de diversos processos biológicos, incluindo a regulação da resposta imune inata e da adaptativa (Bi *et al.*, 2009; Mehta e Baltimore, 2016). Dentre as diversas famílias de ncRNAs regulatórios, podemos destacar os microRNAs (miRNAs), moléculas de pequenos RNAs evolutivamente conservadas, de tamanho entre 18-22 nucleotídeos e que atuam na regulação pós-transcricional da expressão de genes (Mehta e Baltimore, 2016). O mecanismo regulatório dos miRNAs em células animais envolve a hibridação por complementariedade imperfeita de bases à sequência 3'-UTR (*untranslated region*) dos RNA mensageiros alvos (mRNA), promovendo a repressão traducional e a concomitante degradação desses mRNAs (Mehta e

Baltimore, 2016). Essas pequenas moléculas foram descritas inicialmente em na regulação negativa de RNAs mensageiros durante o desenvolvimento embrionário de *Caenorhabditis elegans*; por meio de interação RNA-RNA (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993).

Recentemente se propôs que a ativação da expressão de miRNAs na resposta imune às infecções microbianas esteja vinculada ao reconhecimento dos patógenos pelos TLRs. Tal reconhecimento inicia uma via de transdução de sinal que culmina com o aumento da expressão de genes dependentes do fator de transcrição NFκB (*nuclear factor kappa B*); esses genes são requeridos a uma resposta pro-inflamatória. Não obstante, o NFκB ativa a transcrição de miRNAs que se ligam à região 3'-UTR do mRNA de genes de citocinas e de moléculas adaptadoras da via de sinalização ativada pelo TLR, inibindo assim a síntese de tais proteínas. Esse mecanismo atua por *feedback* negativo de modo a prevenir uma resposta inflamatória excessiva, que poderia causar danos teciduais ao hospedeiro (Figura 4 A) (O'Neill *et al.*, 2011; Eulalio *et al.*, 2012).

Em mamíferos, o processo de biogênese de miRNAs acontece por diferentes mecanismos e apresenta diversas etapas de processamento. Na via canônica da biogênese, a ativação da transcrição de miRNAs pela RNA polimerase II gera um transcrito primário longo (pri-miRNA) que apresenta estruturas secundárias em forma de grampos (*hairpins*), cap 5' (7-metilguanossina) e cauda poli(A) na extremidade 3'. O transcrito primário é reconhecido e processado pelo complexo microprocessador formado pela ribonuclease Drosha (enzima RNase do tipo III) e a proteína de união ao RNA DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), gerando um miRNA precursor de aproximadamente 60 nucleotídeos, com uma estrutura em forma de grampo (pre-miRNA). O pre-miRNA é reconhecido pela exportina 5 que o transporta do núcleo ao citoplasma. No citoplasma, o pre-miRNA é processado por uma segunda enzima RNase III (Dicer) em um duplex de miRNAs maduros de 22 nucleotídeos aproximadamente; Dicer requer um cofator de união ao RNA, a proteína TAR (TRBP). Em seguida, uma das fitas do duplex miRNA maduro é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), que contém proteínas argonautas (AGO). No miRISC, essa fita é empregada como sequência guia para o reconhecimento dos mRNAs alvos, por complementariedade de bases. Esse pareamento leva à degradação do mRNA alvo, podendo também agir na repressão da tradução (Figura 4 B) (Ameres e Zamore, 2013; Bronevetsky e Ansel, 2013; Mehta e Baltimore, 2016).



**Figura 4.** Mecanismo de biogênese de miRNAs e ativação da expressão via TLR. **A.** Mecanismo canônico de biogênese de miRNAs. **B.** Mecanismo de ativação da expressão de miRNAs via TLR. Adaptado de: O'Neill *et al.*, 2011 e Ameres e Zamore, 2013.

O complexo miRISC regula a expressão dos mRNAs alvos por diferentes mecanismos, que dependem, principalmente, do grau de complementariedade entre uma região do miRNA de 2-8 nucleotídeos (sequência *seed*) e a sequência do mRNA alvo. Quando ocorre uma complementariedade perfeita, o mRNA é clivado de forma direta pelas proteínas AGO2, provocando a uma rápida diminuição dos níveis da proteína codificada. Não obstante, esse mecanismo parece ser pouco frequente em mamíferos. Na maioria dos eventos, ocorre uma complementariedade parcial entre miRNA e mRNA que leva à repressão da tradução pelo impedimento na circularização do mRNA, desadenilação do mRNA e eliminação do CAP 5'. Tais eventos culminam com a eliminação do mRNA por processos canônicos de degradação (Filipowicz *et al.*, 2008; Ameres e Zamore, 2013; Gurtan e Sharp, 2013). A rede de regulação gênica mediada por miRNAs é complexa, uma vez que um miRNAs pode apresentar vários mRNA alvo e um mRNA pode conter diferentes regiões complementares às sequências *seed* de diversos miRNAs (Gurtan e Sharp, 2013; Mehta e Baltimore, 2016).

## 1.5. Participação de miRNAs na resposta imune a infecções por patógenos microbianos

Recentemente, vários estudos vêm relatando o envolvimento de miRNAs na resposta imune de células imunitárias frente a patógenos microbianos. Nesse contexto, um dos principais miRNAs estudado é o miR-155, que em conjunto com o miR-146 e miR-223, está envolvido na regulação da resposta inflamatória após o reconhecimento de patógenos pelos receptores do tipo Toll (Taganov *et al.*, 2006; Tili *et al.*, 2007). Experimentos com camundongos *knock-out* para miR-155 revelaram que esse é necessário à função normal da resposta imune adaptativa (Rodriguez *et al.*, 2007). Em contraste, o miR-125b foi associado à diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , uma citocina essencial na resposta imune inata, em macrófagos não ativados, e parece ter sua expressão diminuída em resposta à ativação por LPS (Tili *et al.*, 2007).

Análises de expressão de miRNAs revelaram um padrão de aumento gradual no acúmulo de miR-146a em monócitos THP-1 após a exposição a LPS por 4 h, atingindo níveis 35 vezes superiores após 24 h de exposição (Nahid *et al.*, 2009). Análises posteriores com camundongos *knock-out* para o gene que codifica esse miRNA revelaram uma menor tolerância imunológica, sendo os macrófagos dos animais hipersensíveis à exposição a LPS (Boldin *et al.*, 2011).

De modo a analisar a potencial participação dos miRNAs na regulação da resposta imune inata, Moschos *et al.* (2007) avaliaram o perfil da expressão diferencial de miRNAs maduros no pulmão de camundongos em resposta a exposição a LPS, tendo identificado 12 miRNAs (miR-21, -25, -27b, -100, 140, -142-3p, -181c, 187, -194, -214, -223, e -224) cuja expressão foi significativamente aumentada.

Estudos utilizando inibidores para o miR-346 em macrófagos THP-1 demonstraram uma elevada secreção de TNF- $\alpha$ , após a indução com LPS. Por outro lado, a transfecção desse miRNA no mesmo tipo celular resultou em hiposecreção dessa citocina, sugerindo um papel de regulador negativo para miR-346 no processo de inflamação (Semaan *et al.*, 2011). Outros miRNAs relacionados com a modulação da resposta imune são o miR-21, cuja expressão é induzida em resposta a LPS via MyD88 (Sheedy *et al.*, 2010), e o miR-223, que desempenha papel crucial na regulação da proliferação e ativação de granulócitos (Chen *et al.*, 2004).

Estudos recentes procuraram caracterizar o perfil de expressão de miRNAs em resposta a infecções causadas por fungos patogênicos. Monk *et al.* (2010) mostraram que os miR-146 e miR-155 tiveram sua expressão aumentada em macrófagos murinos em resposta à inoculação de células de *Candida albicans* mortas pelo calor. Muhammad *et al.* (2015) investigaram o perfil de expressão de miRNAs em células epiteliais respiratórias de indivíduos infetados por diferentes espécies de *Candida* spp; os autores demonstraram uma elevação substancial nos níveis do miR-16-1 e uma diminuição na expressão do miR-17-3p. Mais recentemente, em trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa, Agostinho *et al.* (2016) reportaram que o receptor Dectina-1 é o principal PRR que participa no aumento da expressão do miR-155, sugerindo que os eventos de sinalização mediados pelos PRRs são fatores importantes na regulação gênica mediada por miRNAs durante as infecções por fungos.

Tendo em vista o crescente relato da participação dos miRNAs na resposta imune a infecções por patógenos microbianos, autores como Jiang (2016) sugerem que as futuras terapias clínicas para infecções fúngicas invasivas devam incluir técnicas que visem ao aumento da capacidade de resposta das células imunes efetoras. Modulando reguladores da resposta aos patógenos como TLRs, MYD88 e miRNAs. Assim, estudos a respeito dos mecanismos da interação hospedeiro-patógeno poderiam contribuir com desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (Datta e Hamad, 2015; Jiang, 2016).

## II. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas invasivas são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos no mundo. Apesar da existência de tratamentos anti-fúngicos ativos, tem-se observado que a resposta do hospedeiro é limitada, a menos que o sistema imunológico seja plenamente funcional (Jiang, 2016).

Sabe-se que a defesa imunológica do hospedeiro mamífero é complexa e multifatorial, envolvendo mecanismos inatos e adaptativos. A resposta inata é de grande importância no controle inicial da infecção e influencia o desenvolvimento da imunidade adaptativa, quando da persistência do patógeno (Eastman *et al.*, 2015). Nesse sentido, o estudo dos mecanismos regulatórios da resposta imune é de grande interesse. Assim, a identificação de miRNAs envolvidos na interação patógeno-hospedeiro mostra-se relevante para o entendimento das bases moleculares da resposta do hospedeiro à infecção e é essencial para o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune às infecções fúngicas.

Recentemente, vários estudos têm avaliado a participação dos miRNAs na regulação da resposta imunológica. Esses trabalhos demonstram que os miRNAs podem modular vários aspectos da resposta imune, tais como a diferenciação de células imunitárias e a expressão de citocinas, sendo cruciais tanto na imunidade adaptativa quanto na imunidade inata (Bi *et al.*, 2009; Mehta e Baltimore, 2016). Embora grandes avanços venham sendo descritos quanto à identificação de miRNAs importantes na regulação da resposta imune às infecções bacterianas e virais (Bi *et al.*, 2009), muito pouco se sabe sobre o papel destes pequenos RNAs regulatórios no controle da resposta imunológica às infecções fúngicas, demonstrando assim, a importância desses estudos.

Como as células dendríticas são umas das principais células iniciadoras de uma resposta imune efetiva contra *C. neoformans*, é importante analisarmos a expressão de miRNAs destas células após interação *in vitro* com as células do fungo, visando a um melhor entendimento das bases moleculares da interação patógeno-hospedeiro. Nesse contexto, o presente estudo representa uma evolução nos trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa no modelo de interação patógeno-hospedeiro.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar o perfil de miRNAs expressos em células dendríticas murinas em resposta à infecção por *C. neoformans*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o acúmulo de miRNAs de células dendríticas em resposta à infecção por *C. neoformans*.
- Validar a expressão diferencial de miRNAs específicos por RT-qPCR.
- Padronizar o uso de inibidores específicos para o silenciamento de miRNAs no modelo de células dendríticas de medula óssea de camundongos.
- Analisar o efeito do silenciamento de miR-155 na resposta de células dendríticas à infecção por *C. neoformans*.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. *C. neoformans*: manutenção e cultivo e preparo do inóculo

A linhagem B3501-A de *C. neoformans*, var. *neoformans* (sorotipo D) foi cultivada em meio YPD líquido (extrato de levedura 1%, glicose 2%, peptona 2% pH 7,2) a 30 °C e sob 200 rotações por min (rpm) por 48 h, para posterior preparo dos estoques da cultura em glicerol 35%, os quais foram mantidos a -80 °C. Para a realização dos experimentos de interação, uma fração do estoque foi cultivada em meio YPD líquido a 30 °C sob agitação (200 rpm) por 24 h. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 1000 x g por 5 min a temperatura ambiente e em seguida lavada três vezes com tampão - salino-fosfato (PBS, Phosphate Buffered Saline). Em seguida, as leveduras foram opsonizadas em meio RPMI-1640 contendo 20% de soro fresco de camundongo a 37 °C sob agitação (150 rpm) por 30 min para os experimentos de interação parasito-hospedeiro.

### 4.2. Animais

Foram usados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem BALB/c com idade entre oito e doze semanas. Os animais foram mantidos em condições sanitárias apropriadas com fornecimento de água e ração *ad libitum*, no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O alojamento dos animais, assim como todos os procedimentos experimentais executados, está de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB DOC nº 52657/2011).

### 4.3. Obtenção de células dendríticas

No decorrer deste estudo foram utilizadas culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) de camundongos BALB/c. A obtenção de BMDCs foi realizada a partir de fêmures e tíbias de camundongos de oito a doze semanas de vida, seguindo protocolo descrito previamente (Lutz *et al.*, 1999). As células da medula óssea foram recuperadas por meio da lavagem da cavidade medular dos ossos com RPMI-1640 (Sigma-

Aldrich) em condições estéreis, utilizando-se uma agulha (0,45 x 13 mm) inserida na abertura após o corte do osso na metade de seu comprimento. A suspensão celular foi centrifugada a 300 x g por 5 min a temperatura ambiente, depois o precipitado celular foi tratado com uma solução para lise de hemácias (*Red Blood Cell Lysing Buffer*; Sigma-Aldrich) por 1 min. Em seguida foram adicionados 15 mL de meio RPMI para parar o processo de lise. Um novo ciclo de centrifugação foi realizado para a coleta e contagem das células em câmara de Neubauer, após coloração com Azul de Tripiano (Sigma) para avaliar a viabilidade celular. Em placas de petri, um total de  $2 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 10 mL de meio completo para diferenciação [RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 20 ng/mL do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF; PeproTech), 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina]. A suspensão foi mantida a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 3 dias de incubação, foram adicionados 10 mL de meio suplementado. Após seis dias, a metade do meio (10 mL) da placa de cultivo foi retirada e centrifugada (300 x g por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido em 10 mL de meio fresco suplementado para diferenciação e devolvido à placa de origem. No oitavo dia de diferenciação, o sobrenadante (contendo células não aderidas - BMDCs) foi coletado, centrifugado (300 x g por 5 min) e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de meio de experimentação (RPMI, 10% SFB) para realizar a contagem das BMDCs em câmara de Neubauer, após coloração com Azul de Tripiano. Para adesão,  $1 \times 10^6$  BMDCs foram semeadas em placas de cultura de 6 poços em 2 mL de meio RPMI + 10% de SFB por 24 h, antes dos experimentos de interação patógeno-hospedeiro.

#### **4.4. Ensaios de interação patógeno-hospedeiro**

Uma concentração de  $1 \times 10^6$  BMDCs foi submetida à interação com o fungo em uma multiplicidade de infecção de 2 leveduras de *C. neoformans* por cada BMDC no experimento (MOI=2). As células foram cultivadas em placas de 6 poços, por 24 h em 2 mL de meio RPMI com 10% de SFB e mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> previamente a extração de RNA. Como controle negativo,  $1 \times 10^6$  BMDCs permaneceram sem infecção. Os ensaios para a avaliação da fagocitose e morte intracelular do fungo foram realizados em placas de 96 poços com uma concentração de  $5 \times 10^4$  BMDCs em 100  $\mu$ L de

meio RPMI + 10% de SFB, em uma proporção de 2 leveduras do fungo por cada BMDC (MOI=2) e mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.5. Análise de expressão de miRNAs por *RT-qPCR array***

##### **4.5.1. Extração de RNA**

A extração do RNA das BMDCs, foi realizada usando-se o produto comercial “*mirVana™ miRNA isolation kit*” (ambion, Life Technologies), conforme recomendações do fabricante. Este kit utiliza uma extração orgânica, seguida da imobilização do RNA em filtros de fibra de vidro para purificar tanto RNA total, quanto pequenos RNAs de amostras de células ou tecidos (Corporation, 2011).

Após o período de interação das BMDCs com o fungo, os sobrenadantes foram coletados, as placas foram lavadas com PBS para a retirada das leveduras não internalizadas e foi adicionada a solução de lise celular; continuou-se com as posteriores etapas recomendadas no kit. Finalmente, foi separada a fração de RNA total subtraída dos pequenos RNAs e a fração enriquecida com pequenos RNAs (<200 nucleotídeos) e foram armazenadas a -20 °C.

A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria (NanoDrop 2000; Thermo Scientific) empregando-se a razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. A qualidade e integridade das amostras de RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A qualidade das amostras de pequenos RNAs foi extrapolada a partir dos RNA ribossomais da amostra de RNA total correspondente.

##### **4.5.2. Sínteses de cDNA**

Para a obtenção dos cDNA da fração enriquecida com os pequenos RNAs foi utilizado o kit de transcrição reversa *miScript II RT* (Qiagen), de acordo com orientações do fabricante. Para análise dos miRNAs maduros de cada condição foram empregados 25 ng de RNA como molde em reações de 20 µL contendo os seguintes reagentes: 4 µL do tampão *miScript HiSpec (5X)*, 2 µL de dNTPs (10X) e 2 µL do mix *miScript Reverse Transcriptase*. Em seguida, a reação de síntese de cDNA foi realizada por incubação a 37 °C por 60 min e 95 °C por 5 min para inativar a enzima. Depois as amostras foram diluídas (1:10) em água Milli-Q e armazenadas a -20 °C.

#### 4.5.3. Quantificação de acúmulo de miRNAs por RT-qPCR array

A quantificação do acúmulo dos miRNAs nas diferentes condições experimentais foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real, empregando-se a tecnologia *Immunopathology miRNA PCR Array* (SYBR® Green) da Qiagen. As placas empregadas foram MIMM-104Z, que permitem a análise simultânea de 84 miRNAs diferencialmente expressos nas condições controle e infectado. Foram preparadas misturas de reação contendo 1375 µL do *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2X)*, 275 µL do *miScript Universal Primer (10X)*, 1000 µL de água livre de RNases e 100 µL do molde de cDNA (em diluição 1:10); a cada poço da placa foram adicionados 25 µL da mistura. O equipamento utilizado foi o *StepOnePlus™* (Applied Biosystems) com o seguinte programa: etapa inicial de ativação da *HotStar Taq DNA polymerase* a 95 °C por 15 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C 15 seg, 55 °C 30 seg e 70 °C 35 seg.

A análise de acúmulo dos miRNAs foi realizada pela quantificação relativa por meio do método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001), empregando-se os controles internos constitutivos SNORD95 e SNORD96A da placa do *PCR array*. Os dados foram apresentados utilizando-se o valor de acúmulo relativamente ao controle (*Fold change*). Para os s controles assumiu-se o valor de 1.

#### 4.6. Validação do acúmulo de miRNA por meio da técnica de RT-qPCR

Visando a validar os dados obtidos no *RT-qPCR array*, alguns dos miRNAs foram escolhidos para análise empregando-se o sistema de detecção TaqMan®.

##### 4.6.1. Sínteses de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Invitrogen), seguindo-se as orientações do fabricante. As reações foram realizadas utilizando-se 10 ng de RNA da fração enriquecida com pequenos RNAs como molde, em reações de 15 µL contendo 0,15 µL de mistura de dNTPs (100 mM), 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 1,5 µL de *Reverse Transcription Buffer* (10X), 0,19 µL de inibidor de RNases (20 U/µL), 3 µL de iniciadores TaqMan® (5X). Em seguida, a reação foi realizada nas seguintes condições: 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min e 85 °C por 5 min para inativar a enzima. Depois as amostras foram armazenadas a -20 °C até seu uso na reação de RT-qPCR.

#### 4.6.2. Quantificação dos miRNAs por RT-qPCR

A quantificação do acúmulo dos miRNAs selecionados para a validação dos do *RT-qPCR array* foi realizada empregando-se o sistema de detecção TaqMan® Small RNA Assays (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo 5 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2X)*, 0,5 µL *TaqMan® Small RNA Assay (20X)* e 1 µL do molde de cDNA. O equipamento usado foi o *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) com o seguinte programa: etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s.

A análise da quantificação relativa dos miRNAs foi realizada por meio do método do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001), empregando-se o gene RNU6, um snRNA componente do spliceossomo, como controle interno constitutivo. Os dados foram apresentados utilizando-se o valor de expressão relativa ao controle (*Fold change*). Para os controles assumiu-se o valor de 1. Os miRNAs selecionados para a validação e suas sequências estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1.** miRNAs selecionados para a validação dos resultados do *RT-qPCR array*.

miRNA	Sequência
miR-132-3p	5'-UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG-3'
miR-146a-5p	5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-3'
miR-155-5p	5'-UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU-3'

#### 4.7. Avaliação do modelo de transfecção de inibidores de miRNAs em células dendríticas

Para avaliar o papel funcional dos miRNAs na interação patógeno-hospedeiro, foram realizados ensaios *in vitro* de perda da função por meio de inibidores de miRNAs específicos (anti-miRs, *mirVana™ miRNA Inhibitors*; Life Technologies). Os antimisRs são pequenas moléculas de RNA desenhadas para se acoplar especificamente, permitindo a análise funcional mediante a regulação negativa da atividade do miRNA. Como agente carreador do sistema de inibição foi usada a Lipofectamina® 3000 (Invitrogen).

O miRNA selecionado para a análise da perda da função foi o miR-155, empregando-se o anti-miR-155-5p e o anti-miR-155-3p para a inibição das fitas 5p e 3p, respectivamente, do miR-155. Como controle negativo foi utilizado o *mirVana™ miRNA Inhibitor Negative Control #1* (Ambion), uma molécula de anti-miR de sequência aleatória (*scrambled*) sem efeito na função dos miRNAs.

Os anti-miRs foram incubados com lipofectamina em meio Opti-MEM® (Gibco) por 5 min à temperatura ambiente para a formação dos complexos lipossomo-anti-miR. Para os experimentos de extração de RNA, 250 µL do complexo lipossomo-anti-miR foram adicionados a uma cultura de  $1 \times 10^6$  BMDCs em 1,75 mL de meio RPMI + 10% de SFB em placas de 6 poços. Por outro lado, para os ensaios de fagocitose e morte do fungo, por meio da contagem de células que fagocitaram o fungo e a quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU), respectivamente, foram adicionados 10 µL do complexo lipossomo-anti-miR a uma cultura de  $5 \times 10^4$  BMDCs em 90 µL de RPMI + 10% de SFB em placas de 96 poços. Em todos os experimentos de transfecção empregou-se 50 nM de anti-miR, de acordo com protocolo padronizado em nosso grupo de pesquisa (Oliveira, 2016). Controles negativos sem transfecção foram realizados. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 300 x g por 5 min à temperatura ambiente, o sobrenadante foi substituído por meio RPMI + 10% de SFB fresco e continuou-se com os experimentos de interação com o fungo opsonizado como descrito no item 4.4.

#### **4.7.1. Avaliação da citotoxicidade dos componentes do ensaio de transfecção de anti-miRs em células dendríticas**

A citotoxicidade dos componentes utilizados para a transfecção de anti-miRs nas células dendríticas foi determinada por ensaio colorimétrico empregando-se o kit *CytoTox 96®* (Promega). O kit *CytoTox 96®* avalia quantitativamente os níveis da enzima lactato desidrogenase liberada em decorrência de morte.

Os ensaios foram realizados utilizando-se 50 µL do sobrenadante de  $2 \times 10^5$  BMDCs cultivadas com cada um dos componentes do kit de transfecção (Tabela 2) em placas de 24 poços por 24 h, em condições de incubação similares às usadas nos ensaios de interação. Como controle negativo de citotoxicidade um grupo permaneceu sem tratamento (não transfectado) e como controle positivo um grupo foi tratado com a solução de lise

celular que integra o Kit (Ctrl+). Após uma diluição 1:1 do sobrenadante com meio RPMI, foram adicionados 50 µL do reagente CytoTox96 a 50 µL cada amostra; seguiu-se incubação por 30 min à temperatura ambiente. Adicionou-se então 50 µL de solução de parada. A leitura da absorbância a 490 nanômetros (nm) foi realizada depois de 1 h em um espectrofotômetro *SpectraMax M3* (Molecular Devices). Os resultados foram apresentados como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle negativo não transfetado.

**Tabela 2.** Componentes do kit de transfecção empregados na avaliação da citotoxicidade em BMDCs.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
Não Transfletado	50 µL meio Opti-MEM
Lipofectamina	50 µL meio Opti-MEM + Lipofectamina
Controle (-) anti-miR	50 µL meio Opti-MEM + Lipofectamina + anti-miR <i>scrambled</i>
Anti-miR-155-5p	50 µL meio Opti-MEM + Lipofectamina + anti-miR-155-5p
Anti-miR-155-3p	50 µL meio Opti-MEM + Lipofectamina + anti-miR-155-3p

#### 4.7.2. Avaliação da eficiência de transfecção

Empregou-se o anti-miR *Cy3™ Dye Labeled Anti-miR™ Negative Control #1* (Ambion), uma molécula da anti-miR de sequência aleatória sem efeitos sobre a função de miRNAs. Essa molécula é marcada com o fluoróforo *Cy3™* que permite a observação direta após a captação celular. A transfecção do anti-miR *Cy3™ Dye Labeled* foi realizada em experimento padrão (item 4.7). Os tempos de avaliação foram de 24 e 48 h, de modo a determinar possíveis diferenças significativas no tempo de uso. Como controle negativo foram cultivadas BMDCs sem tratamento de transfecção. Após o tempo de incubação, as células foram observadas e fotografadas em microscópio com captura de fluorescência Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microscopy). Canais para detecção da fluorescência (*Filter Ex. 540 – 552 nm*; filtro de excitação) e de PH (campo claro; *Phase contrast*) foram utilizados. As imagens foram analisadas por meio do *software ZEN* (Carl Zeiss Microscopy) e a comparação entre as micrografias de campo claro e fluorescência foi utilizada para a identificação de células positivamente transfetadas com o anti-miR *Cy3™ Dye Labeled*. Os resultados foram apresentados como porcentagem de células transfetadas nos dois tempos de avaliação.

#### **4.7.3. Avaliação da capacidade de fagocitose de leveduras de *C. neoformans* por BMDCs**

Para determinar o efeito da perda da função do miR-155 na capacidade de internalização do fungo pelas células dendríticas, foram usadas culturas de  $5 \times 10^4$  BMDCs em placas de 96 poços transfectadas ou não com anti-miR-155, como descrito no 4.7, em triplicata. Após 4 h de interação com o fungo as culturas foram lavadas com PBS para remoção de leveduras não internalizadas. Posteriormente, procedeu-se a coloração celular com o kit Panótico (Laborclin). Resumidamente, as células foram fixadas com solução de triarilmetano (0,1%). Adicionou-se então a solução de xantenos (0,1%) para a coloração do citoplasma, seguida da solução de tiazinhas (0,1%) para a marcação do núcleo. Finalmente, foi calculada a porcentagem de células que fagocitaram leveduras pela contagem de 100 células por poço, em triplicata, em análise com uso do microscópio Axio Observer GmbH (Carl Zeiss Microscopy).

#### **4.7.4. Avaliação da capacidade fungicida de células BMDCs**

Para avaliar se a perda da função do miR-155 afetaria a viabilidade intracelular de *C. neoformans*, foram utilizadas BMDCs transfectadas com anti-miR-155 em placas de 96 poços, como descrito no 4.7. Após 4 e 24 h de interação com o fungo, as culturas foram lavadas com PBS, e as células lisadas com 50  $\mu$ L de solução aquosa do detergente SDS (0,05%; Dodecil Sulfato de Sódio, Bio-Rad). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em PBS e um volume de 20  $\mu$ L foi semeado em placas com YPD sólido, incubadas a 30 °C por 48 h. Posteriormente, foi determinada a quantidade de células fúngicas viáveis pela contagem das unidades formadoras de colônias (CFU). Para a análise no tempo de 24 h, após 4 h de cultura o meio foi trocado por novo meio RPMI + 10% SFB para a eliminação da carga extracelular de *C. neoformans*. O tempo de 4 h foi definido para avaliar a capacidade de internalização do fungo pelas BMDCs. Por sua parte, o tempo de 24 h foi definido para avaliar a carga intracelular do fungo.

#### **4.7.5. Dosagem de Citocinas secretadas por BMDCs infectadas por *C. neoformans***

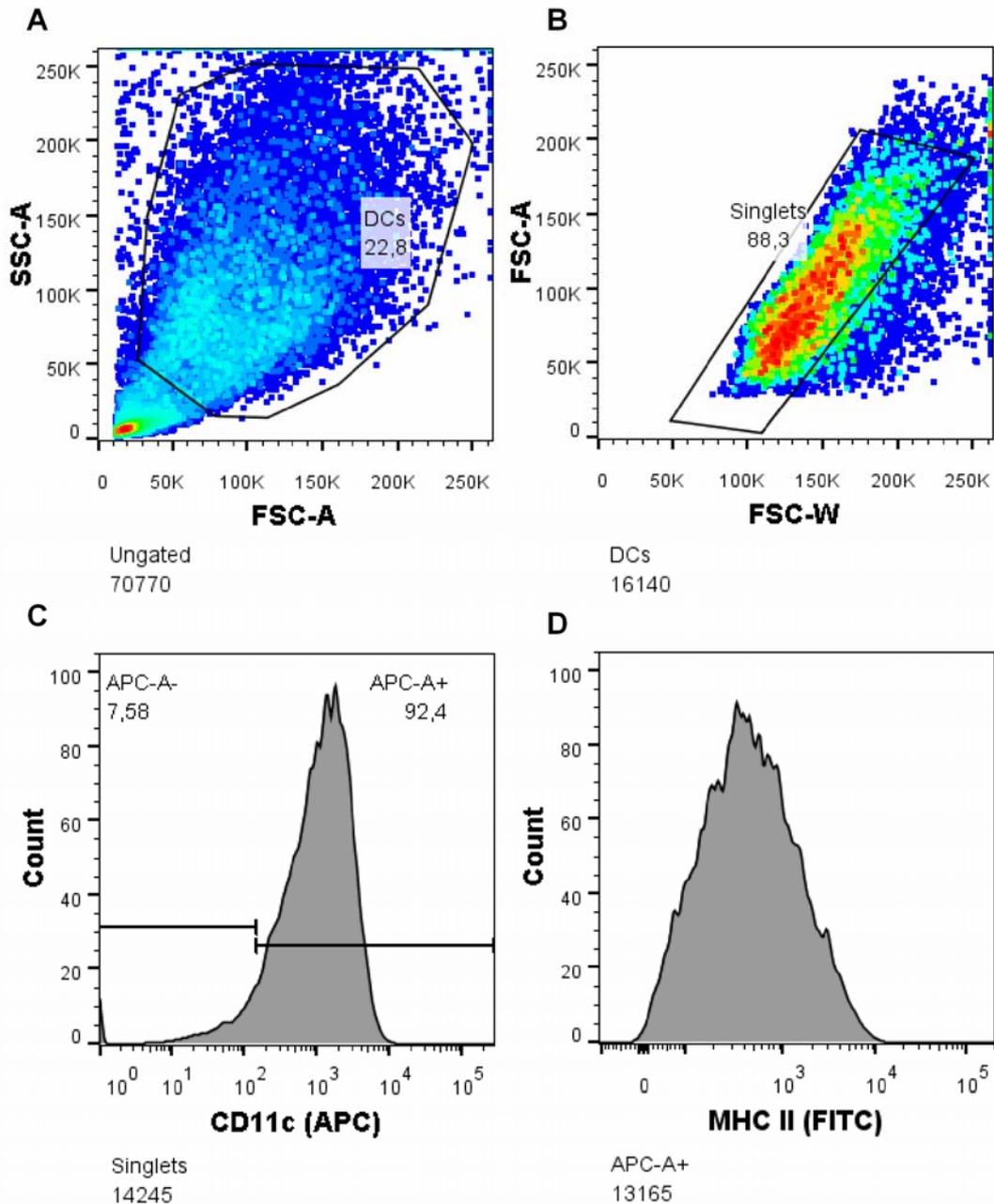
Os sobrenadantes obtidos nos experimentos de interação do fungo com as BMDCs transfectadas ou não com anti-miRs, da análise de CFU nas 24 h, foram recuperados e centrifugados a 1000 x g por 5 min, transferidos para tubos tipo eppendorf e armazenados a -80 °C. Como controle negativo, culturas de BMDCs permaneceram sem infecção e como controle positivo foi adicionado LPS (500 ng/μL) às culturas. Seguiu-se ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os níveis das citocinas Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) foram analisados por meio do kit *Ready-Set-Go!* (eBioscience) e de interleucina 10 (IL-10) com o kit BD OptEIA™, seguindo-se as recomendações dos fabricantes.

#### **4.7.6. Análise por citometria de fluxo da expressão de MHCII em BMDCs infectadas por *C. neoformans***

Para avaliar a expressão de MHCII (*Major Histocompatibility Complex II*), cerca de  $1 \times 10^6$  BMDCs transfectadas com anti-miRs ou não, foram semeadas em placas de petri de 50 mm de diâmetro, não tratadas para cultivo celular, em duplicata. As células foram então infectadas como descrito no item 4.7. Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL; Sigma), adicionado uma h antes da infecção. Após 24 h de cultura, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS aquecido para retirada do fungo não internalizado. Em seguida, as células foram soltas do fundo da placa por incubação por 20 min com o reagente TrypLE™ Express (GIBCO), e centrifugadas a 300 x g por 5 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução de bloqueio/lavagem (PBS + 2% de SFB) por 30 min para bloqueio de interações inespecíficas dos anticorpos. As células foram em seguida incubadas por 1 h com anticorpos monoclonais anti-CD11c (conjugado ao fluoróforo APC; eBioscience) e anti-MHCII (conjugado ao fluoróforo FITC; Abcam), de acordo com as recomendações do fabricante, para a detecção de células dendríticas e de antígenos MHCII, respetivamente. Também foram utilizados anticorpos isotípicos conjugados a APC ou FITC como controle de inespecificidade de marcação. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes, adquiridas no citometro de fluxo (BD FACSVerse™), e analisadas utilizando-se o *software* FlowJo versão X.

Para análise da expressão de MHCII foi utilizada a seguinte estratégia de seleção (*gating*): **i.** tamanho e granulosidade do tipo celular (SSC-A vs FSC-A; Figura 5 A). **ii.**

exclusão de *doublets*, grumos celulares, (FSC-A vs FSC-W; Figura 5 B). **iii.** seleção de BMDCs positivas para o marcador clássico de identificação desse tipo celular, CD11c<sup>+</sup> (Figura 5 C). Finalmente, foi avaliada a expressão do MHCII apenas de BMDCs CD11c<sup>+</sup> (Figura 5 D).



**Figura 5.** Estratégia de seleção para análise da expressão de MHCII de BMDCs CD11c<sup>+</sup>. Foram selecionadas BMDCs por tamanho e granulosidade (A), BMDCs após eliminação dos *doublets* (B) e BMDCs positivas para o marcador CD11c<sup>+</sup> (C), expressão de MHCII (D). Na figura é mostrada a estratégia de seleção aplicada a uma amostra de BMDCs não transfectadas e infectadas com *C. neoformans*.

#### 4.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (*one-way ANOVA*), seguida do pós-teste de Tukey no *software* GraphPad Prism versão 6.01. Como critério de significância estatística foi definido um *p-value* menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Nos gráficos, os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média (SEM) de um experimento representativo de dois ou três experimentos conduzidos em triplicatas técnicas. Os asteriscos (\*) indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo grupo controle.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

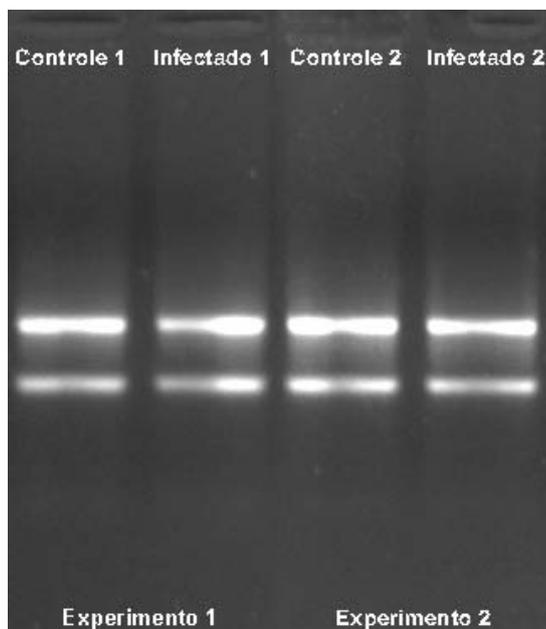
Nos últimos anos houve um acúmulo de evidências que demonstram que os miRNAs podem regular diferentes processos patofisiológicos. Consequentemente, tem sido demonstrada a participação de miRNAs na resposta de células do sistema imune - principalmente macrófagos e células dendríticas - a infecções por patógenos microbianos (Monk *et al.*, 2010; Das Gupta *et al.*, 2014; Siddle *et al.*, 2015). Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa revelaram uma clara diferença no acúmulo dos miRNAs miR-125b, miR-132, miR-146a, miR-455 e miR-155 produzidos por macrófagos após infecção por fungos patogênicos como *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Agustinho *et al.*, 2016; Oliveira, 2016). Os estudos foram aprofundados quanto o papel do miR-155 na resposta imune, identificando uma possível via de regulação positiva desse envolvendo a participação do receptor Dectina-1, um importante receptor que reconhece as  $\beta$ -glicanas da parede dos fungos (Agustinho *et al.*, 2016). No entanto, estes estudos não fizeram uma abordagem funcional da análise dos miRNAs na interação hospedeiro-patógeno.

Recentemente, diversas metodologias foram desenvolvidas para o estudo funcional dos miRNAs, de modo a melhorar o entendimento da participação dessas moléculas na resposta aos estímulos utilizados. Tais metodologias permitem modular os níveis de miRNAs específicos na célula: 1- para obter uma intensificação na função, com a inclusão de moléculas sintéticas que simulam o papel de miRNAs aumentando sua quantidade na célula; ou 2- para induzir perda da função com o uso de inibidores que se acoplam especificamente ao miRNA endógeno, regulando negativamente a sua função. Nesse contexto, mediante o uso de técnicas de *RT-qPCR array*, avaliamos o padrão de expressão de miRNAs de células dendríticas em resposta à infecção por *C. neoformans*, visando identificar pequenos RNAs regulatórios envolvidos na resposta imunológica a esse fungo. Além disso, visando aprofundar o conhecimento a respeito do papel do miR-155 na resposta da célula hospedeira a *C. neoformans*, avaliamos os efeitos da perda da função do desse miRNA no modelo de infecção *in vitro*.

### 5.1. Caracterização do padrão de expressão de miRNAs de células dendríticas em resposta à infecção por *C. neoformans*

Para determinar o padrão de expressão de miRNAs envolvidos na resposta imune à infecção fúngica, foram realizados ensaios de interação *in vitro* entre células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongo e a linhagem B3501-A de *C. neoformans* (MOI 2) por um período de 24 h. Os experimentos foram realizados em duplicata, empregando-se culturas independentes de medula óssea de 2 camundongos diferentes. O tempo de interação e a proporção células dendríticas:leveduras foram baseados em resultados preliminares com macrófagos, nos quais foi estabelecida uma diferença na expressão de miRNAs quando comparado com os controles (Derengowski *et al.*, 2015; dados não publicados).

Foram realizados dois ensaios independentes para a extração de RNA de BMDCs infectadas com o fungo e não infectadas (controle), separando-se a fração de RNA total dos pequenos RNAs. A fração enriquecida com os pequenos RNAs (<200 nucleotídeos) foi empregada para as análises de expressão de miRNAs. A qualidade das amostras de pequenos RNAs foi inferida a partir da determinação da qualidade e integridade do RNA total avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 6).



**Figura 6.** Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL do RNA total de BMDCs infectadas com *C. neoformans* por 24 h.

Em seguida, foram analisados os níveis de 84 miRNAs descritos na literatura científica como apresentando papel importante na regulação da resposta imune. Empregou-se a técnica *RT-qPCR array*, comparando-se BMDCs infectadas em um tempo de interação de 24 h com células controle não infectadas. Para a normalização e análise dos resultados, o *RT-qPCR array* apresenta um painel de 5 snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) e 1 snRNA (*small nuclear RNA*) empregados como controles de níveis de expressão estáveis em diferentes tecidos e células. Desses, foram selecionados como controles endógenos os snoRNAs SNORD95 e SNORD96A do painel, por apresentarem menores diferenças nos valores dos Ct entre os grupos (*Threshold cycle*; Tabela 3). Na Tabela 4 são apresentados os dados da reprodutibilidade dos experimentos medidos a partir dos Ct dos controles positivos. Os controles do *RT-qPCR array* não revelaram a presença de contaminação com DNA genômico (Tabela 4). Os miRNAs foram considerados como regulados positivamente quando apresentavam um *fold regulation*  $\geq 2$  e regulados negativamente com um *fold regulation*  $\leq -2$  quando comparado com o controle.

**Tabela 3.** Valores de Ct do painel de controles endógenos do *RT-qPCR array*.

Controle endógeno	<i>Threshold cycle (Ct)</i>			
	Experimento 1		Experimento 2	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
SNORD61	28,94	27,93	26,92	32,92
SNORD68	29,95	29,96	27,96	28,96
SNORD72	29,96	28,94	29,95	30,97
<b>SNORD95*</b>	<b>23,92</b>	<b>23,92</b>	<b>23,92</b>	<b>25,92</b>
<b>SNORD96A*</b>	<b>22,27</b>	<b>22,92</b>	<b>23,92</b>	<b>23,92</b>
RNU6B	25,26	25,94	26,93	31,93

\* Controles endógenos selecionados para a normalização dos dados de expressão de miRNAs.

**Tabela 4.** Análise da reprodutibilidade do *RT-qPCR array*.

	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Média Ct*</b>	<b>SD**</b>
<b>Controle</b>				
Média Ct (PPC)	22,06	23,28	<b>22,67</b>	<b>0,86</b>
SD réplicas técnicas	0,4	0,49	0,45	--
Ct controle (GDC)	35	35	--	--
<b>Infectado</b>				
Média Ct (PPC)	23,35	23,32	<b>23,34</b>	<b>0,02</b>
SD réplicas técnicas	0,58	0,54	0,56	--
Ct controle (GDC)	35	35	--	--

\* Média dos experimentos biológicos independentes

\*\* Desvio padrão dos experimentos biológicos independentes

Ct: *Threshold cycle*

PPC: Controles positivos da PCR

GDC: Controle de contaminação com DNA

Os resultados do *RT-qPCR array* mostraram uma mudança no acúmulo de miRNAs envolvidos na resposta imune após 24 h de interação das células dendríticas com leveduras de *C. neoformans* quando comparadas com o controle não infectado. Identificou-se 22 miRNAs (26% do número total analisado) que apresentaram aumento do acúmulo de transcritos, da ordem de 2 a 150 vezes (Tabela 5 A). Observou-se ainda uma diminuição de 2 a 13 vezes no acúmulo de 7 miRNAs, 8% dos 84 miRNAs avaliados (Tabela 5 B). Tais resultados sugerem a participação desses miRNAs na resposta das BMDCs murinas a infecção por *C. neoformans*. Entretanto, a alteração do padrão de expressão desses miRNAs após a infecção deverá ser confirmada com experimentos posteriores independentes visando à validação estatística.

**Tabela 5.** miRNAs modulados em BMDCs infectadas por *C. neoformans*.

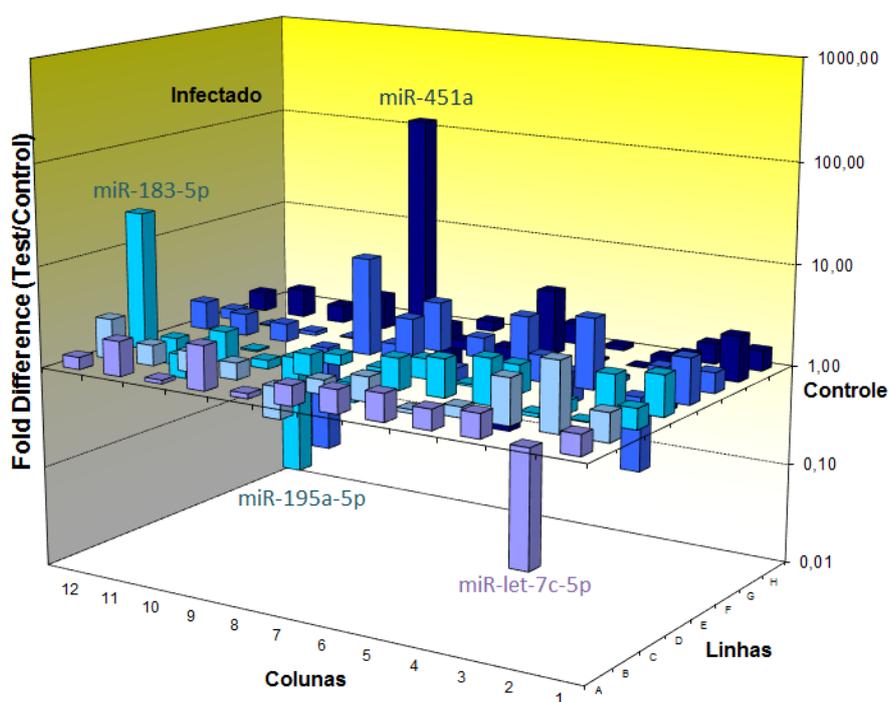
<b>A. miRNAs regulados positivamente após infecção</b>			
<b>miRNAs</b>	<b>Fold regulation</b>	<b>miRNAs</b>	<b>Fold regulation</b>
mmu-miR-125a-5p	2,742	mmu-miR-185-5p	2,1373
mmu-miR-126a-3p	2,2103	mmu-miR-200a-3p	2,7932
mmu-miR-132-3p	4,7357	mmu-miR-205-5p	4,8848
mmu-miR-134-5p	2,7957	mmu-miR-21a-5p	2,6421
mmu-miR-146b-5p	2,4927	mmu-miR-210-3p	9,0982
mmu-miR-150-5p	2,8128	mmu-miR-298-5p	2,9925
mmu-miR-152-3p	2,3735	mmu-miR-29b-3p	3,064
mmu-miR-155-5p	2,0513	mmu-miR-320-3p	2,7789
mmu-miR-181a-5p	2,0008	mmu-miR-34c-5p	4,2709
mmu-miR-183-5p	23,1563	mmu-miR-451a	151,2112
mmu-miR-184-3p	2,4877	mmu-miR-493-3p	2,1646

<b>B. miRNAs regulados negativamente após infecção</b>			
<b>miRNAs</b>	<b>Fold regulation</b>	<b>miRNAs</b>	<b>Fold regulation</b>
mmu-let-7c-5p	-13,4367	mmu-miR-214-3p	-10,9447
mmu-miR-142a-3p	-2,0668	mmu-miR-28c	-2,0621
mmu-miR-195a-5p	-13,8857	mmu-miR-383-5p	-7,3578
mmu-miR-203-3p	-5,2165		

Na Figura 7 nota-se clara diferença no acúmulo dos miR-451 e miR-183 nas BMDCs após a infecção, sugerindo uma possível participação desses na resposta do hospedeiro a *C. neoformans*. Essa hipótese é plausível face aos dados de Rosenberger *et al.* (2012), que verificaram que o miR-451 foi induzido em células dendríticas mielóides de pulmão e baço de camundongo após infecção com o vírus da influenza H1N1, estando relacionado a um *feedback* negativo para modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias. O aumento no acúmulo desse miRNA poderia inibir a ativação das células dendríticas em resposta à infecção, representando uma estratégia para a evasão do fungo da resposta imune do hospedeiro. Já se demonstrou que a cápsula do *C. neoformans* tem propriedades imuno-moduladoras que interferem na maturação e ativação das células dendríticas (Vecchiarelli *et al.*, 2003; Grijpstra *et al.*, 2009); é possível que tal imuno-modulação envolva a expressão diferencial de miRNAs como o miR-451. Por outro lado, o miR-183 foi descrito como um componente do *cluster* de miRNAs miR-183C, formado por miR-183-96-182, que regula

negativamente o fator de transcrição Foxo1 em células Th17, aumentado a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-22, em doenças autoimunes (Ichiyama *et al.*, 2016). A participação desse miRNA ainda não foi descrita na resposta imune de células dendríticas a patógenos; não obstante, sua indução, evidenciada na Figura 7, poderia indicar um papel na resposta de BMDCs à infecção com *C. neoformans*, ao mediar um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Como miR-451 e miR-183 apresentam função antagônica na resposta imune, de acordo com dados da literatura científica, e ambos se mostraram aumentados em nossos experimentos, são necessários estudos adicionais para esclarecer a participação desses miRNAs na resposta das células dendríticas aos patógenos.



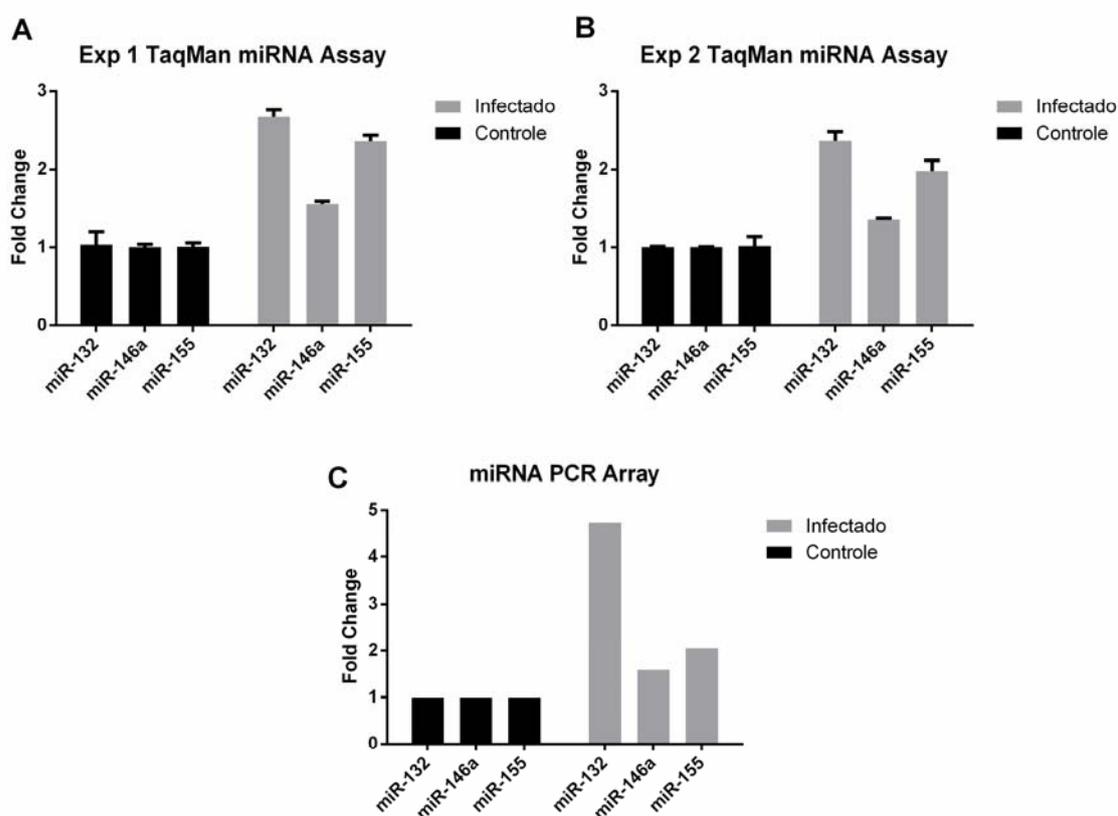
**Figura 7.** Representação gráfica do padrão de expressão de miRNAs em BMDCs após infecção com *C. neoformans*. Resultados do *RT-qPCR array* obtidos de dois experimentos independentes comparando o padrão de expressão de miRNAs em BMDCs sem infecção e BMDCs infectadas com *C. neoformans* após 24 h.

A Figura 7 evidencia ainda a diminuição no acúmulo dos miR-195a e miR-let-7c. Em particular, miR-let7c tem sido envolvido na polarização de macrófagos do tipo M2; atuando como um regulador negativo da resposta inflamatória (Banerjee *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Os resultados obtidos sugerem uma similar atuação desse miRNA nas BMDCs,

dado que, após a infecção do fungo uma resposta pro-inflamatória é fundamental para sua eliminação, sendo necessária a diminuição desses miRNA. Por outro lado, miR-195a parece estar relacionado a inibição da proliferação celular em câncer (Pushpavalli *et al.*, 2011); no entanto, não há informações quanto a sua modulação em resposta a infecção por patógenos. Desse modo, a investigação da regulação negativa em resposta à infecção por *C. neoformans* representa uma interessante perspectiva aberta por esse trabalho.

## **5.2. Validação dos resultados do *qPCR* array por RT-*qPCR* com o emprego de sondas TaqMan®**

Para validar os resultados de expressão de miRNA obtidos no *RT-qPCR* array, empregou-se os miR-132-3p, miR-146a-5p e miR-155-5p para a análise de expressão individual por RT-*qPCR* por meio do sistema TaqMan®. Diversas publicações relacionam esses miRNAs à resposta de células do sistema imune de mamíferos a bactérias e vírus (Taganov *et al.*, 2006; Tili *et al.*, 2007; Nahid *et al.*, 2009; Schulte *et al.*, 2013; Staedel e Darfeuille, 2013) e, mais recentemente, a fungos patogênicos (Monk *et al.*, 2010; Das Gupta *et al.*, 2014; Agostinho *et al.*, 2016). A tecnologia TaqMan® revelou um incremento no acúmulo do miR-132 e miR-155 nos experimentos de interação hospedeiro-patógeno (*Fold change*  $\geq 2$ ). Em contraste, miR-146a não apresentou acúmulo (*Fold change*  $\leq 2$ ) (Figura 8 A e B). Esses dados foram condizentes em dois experimentos biológicos independentes e validam o padrão observado no *RT-qPCR* array (Figura 8 C).



**Figura 8.** Representação gráfica do acúmulo de miRNAs em BMDCs infectadas por *C. neoformans* (*TaqMan miRNA Assay*).

**A.** Níveis de acúmulo dos miRNAs miR-132-3p, miR-146a-5p e miR-155-5p no (experimento 1). **B.** Níveis de acúmulo dos miRNAs miR-132-3p, miR-146a-5p e miR-155-5p (experimento 2). **C.** Níveis de acúmulo dos miRNAs miR-132-3p, miR-146a-5p e miR-155-5p avaliados por *RT-qPCR array* (experimentos 1 e 2). As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas técnicas.

Estudos emergentes têm demonstrado a regulação positiva de miR-132, miR-146a e miR-155 durante a ativação de células dendríticas e na resposta de macrófagos murinos a fungos patogênicos como *C. albicans* e *A. fumigatus*, sugerindo um papel importante na regulação da função desses tipos celulares (Ceppi *et al.*, 2009; Monk *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015; Agostinho *et al.*, 2016). Em contraste, nossos resultados, obtidos por duas tecnologias distintas, não apontam um aumento no transcrito do miR-146a (*fold change* = 1,46 - *TaqMan* e 1,59 - *RT-qPCR array*). No entanto, o acúmulo de miR-132 e miR-155 é compatível com os experimentos descritos na literatura científica e pode ser correlacionado a um controle da resposta à infecção por fungos. miR-132 foi mencionado como um importante regulador negativo do IRAK4 (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4*), molécula envolvida na resposta imune sinalizada por TLRs em monócitos THP-1, limitando uma resposta

inflamatória descontrolada frente a bactérias (Nahid *et al.*, 2013). Por outro lado, miR-155 foi descrito em células dendríticas como um regulador da resposta inflamatória, por meio da via de sinalização *Toll-like receptor/Interleukin 1* (TLR/IL-1), controlando os níveis de TAB2 (*TGF-Beta Activated Kinase 1/MAP3K7 Binding Protein 2*), uma importante molécula de transdução de sinal (Ceppi *et al.*, 2009). Deste modo, tais miRNAs participariam na resposta imune frente a patógenos, de modo a controlar a magnitude e duração da inflamação que, de outra forma, poderia causar danos teciduais ao hospedeiro.

### **5.3. Análise dos efeitos da transfecção de inibidores de miRNAs em células dendríticas**

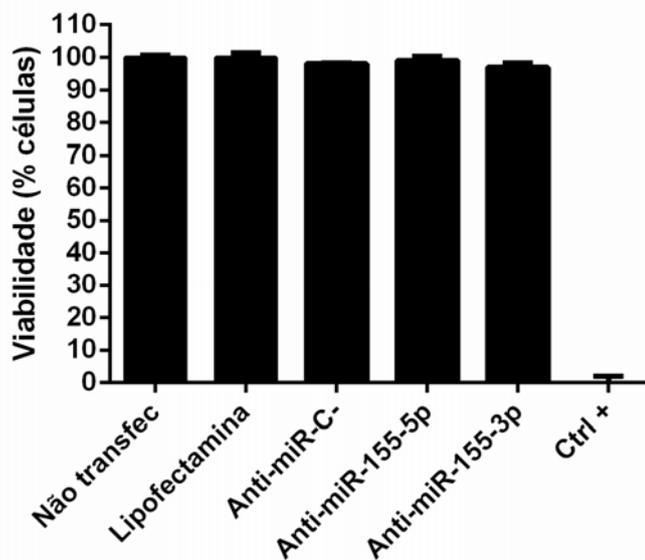
Com o objetivo de avaliar a função dos miRNAs na resposta imune de células dendríticas a *C. neoformans*, foram executados ensaios de perda da função mediante o uso de inibidores de miRNAs. Estes anti-miRs são oligonucleotídeos sintéticos de sequência antiparalela e que hibridam especificamente ao miRNA maduro, diminuindo sua disponibilidade para a montagem no complexo RISC, limitando assim sua função (Zhang *et al.*, 2013; Santulli, 2015). Para estes ensaios foi selecionado o miR-155, devido a: 1- sua importância na função do sistema imune (Rodriguez *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009; Teng e Papavasiliou, 2009; Yao *et al.*, 2012), participando na resposta imune inata e adaptativa a patógenos microbianos (O'connell *et al.*, 2007; Oertli *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2013; Schulte *et al.*, 2013), 2- seu papel na função das células dendríticas (Rodriguez *et al.*, 2007; Ceppi *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011; Lind *et al.*, 2015). Além disso, o miR-155 é um miRNA de grande interesse para nosso grupo, já que o mesmo parece desempenhar uma função relevante na resposta imunológica de fagócitos a outros fungos patogênicos, tais como *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Agustinho *et al.*, 2016; Oliveira, 2016). Ademais, nossos resultados revelaram uma regulação positiva desse miRNA nas BMDCs após 24 de interação com *C. neoformans* (Tabela 5), dado inédito na literatura científica.

Para se analisar os efeitos funcionais da expressão de miR-155 em células dendríticas em resposta à infecção com *C. neoformans*, foram transfectados, com o uso de complexos lipossomos-anti-miRs, inibidores de miRNAs anti-miR-155-5p e anti-miR-155-3p para bloquear as duas fitas desse miRNA em BMDCs. A resposta foi comparada com BMDCs transfectadas com um anti-miR de sequência aleatória (*scrambled*), como controle negativo. A concentração dos anti-miRs (50 nM) e da lipofectamine® para formação dos

complexos, assim como o tempo de interação foram baseados no modelo de transfecção padronizado em nosso grupo (Oliveira, 2016). Células não tratadas foram usadas como controle de resposta normal ao fungo.

### 5.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos componentes da transfecção de anti-miRs em células dendríticas

Inicialmente, foram realizados experimentos para determinar se os componentes do sistema de transfecção apresentavam algum efeito citotóxico nas BMDCs, alterando sua viabilidade. O kit *CytoTox 96*® foi usado para medir os níveis da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura das BMDCs tratadas isoladamente com cada um dos componentes da transfecção por 24 h, e estabelecer a porcentagem de células viáveis após tratamento. Os resultados foram comparados com BMDCs sem tratamento de transfecção e com um grupo tratado apenas com a solução de lise celular (controle positivo). Esse experimento evidenciou que a viabilidade das células dendríticas não foi afetada quando comparada com as células sem tratamento de transfecção (Figura 9).

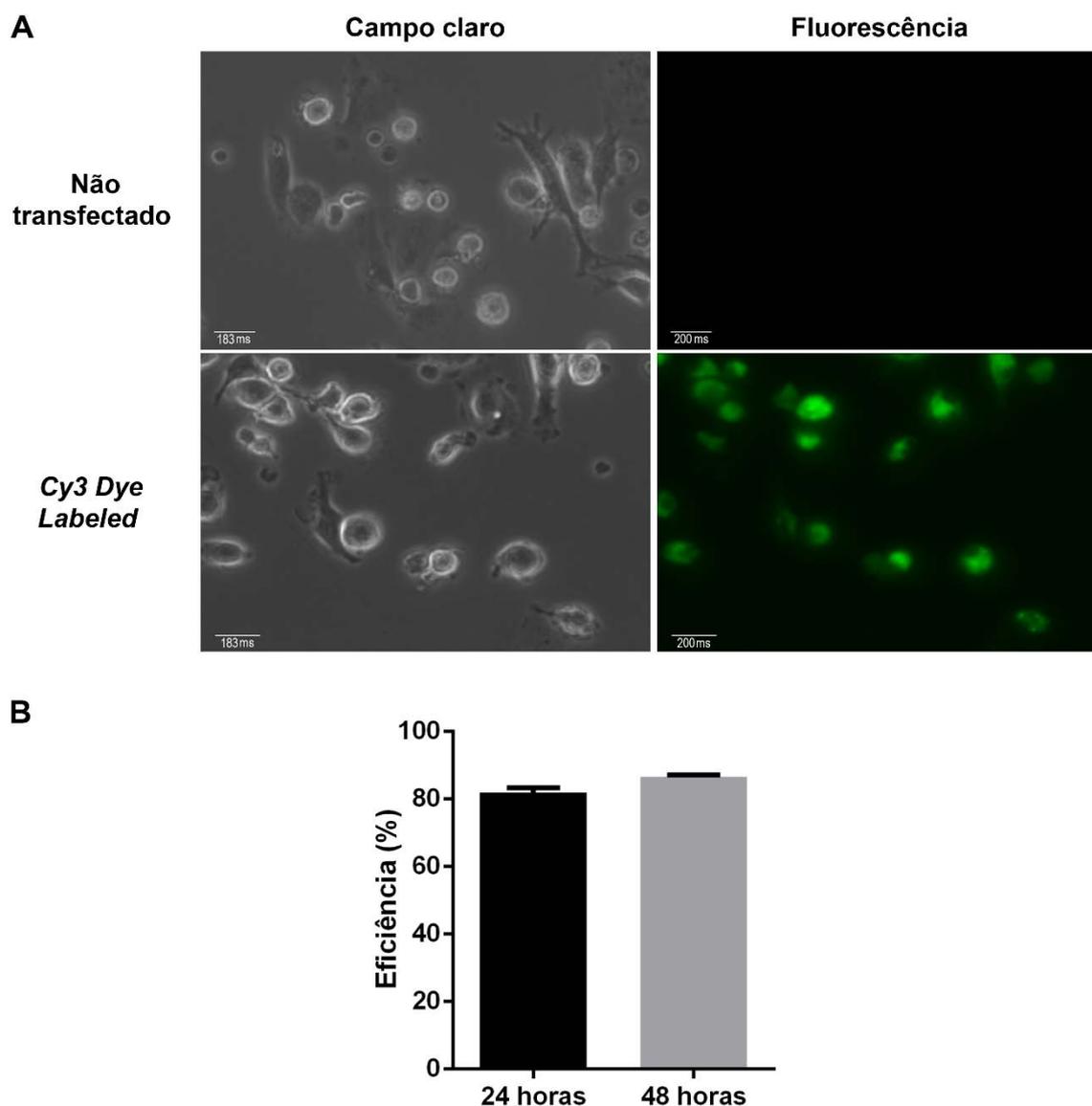


**Figura 9.** Avaliação da viabilidade das BMDCs após tratamento com os componentes da transfecção de anti-miRs.

As células foram transfectadas com o anti-miR-155-5 e anti-miR-155-3p. Controles correspondem a células não transfectadas, células tratadas apenas com lipofectamina, células transfectadas com o anti-miR-C- (*scrambled*) e células tratadas apenas com a solução de lise.

### **5.3.2. Determinação da eficiência da transfecção de inibidores de miRNAs em BMDCs**

Para avaliar a eficiência da transfecção de anti-miRs em células dendríticas, foi transfectado o anti-miR *Cy3™ Dye Labeled Anti-miR™ Negative Control #1* em uma concentração de 50 nM. Essa molécula apresenta uma sequência de nucleotídeos aleatória (*scrambled*) marcada com o fluoróforo Cy3™ para detecção por microscopia de fluorescência nas células efetivamente transfectadas. Como esperado, se obtiveram elevadas porcentagens de células positivamente marcadas após 24 e 48 h de tratamento com o anti-miR marcado com fluorescência. Como controle foram usadas BMDCs sem tratamento de transfecção, as quais não apresentaram autofluorescência (Figura 10 A). Em 24 h de transfecção obteve-se 81,9% de eficiência, enquanto para 48 h não houve grande alteração desse valor (86,5%, Figura 10 B). Esses resultados permitiram determinar o tempo de 24 h como ideal para uso da lipofectamina no tratamento da transfecção.



**Figura 10.** Eficiência da transfecção de inibidores de miRNAs em BMDCs.

**A.** Fotomicrografias de campo claro (esquerda) e fluorescência (direita) de BMDCs não transfetadas (acima) e transfetadas com anti-miR-Cy3 *Dye labeled* (abaixo), indicando o tempo de captura da imagem e a barra da escala de 20  $\mu$ m. Imagens representativas de um experimento nas 24 h. **B.** Porcentagem da eficiência da transfecção do anti-miR-Cy3 *Dye labeled* após 24 e 48 h de tratamento. Médias de dois experimentos independentes.

### 5.3.3. Avaliação do efeito da inibição do miR-155 na capacidade de fagocitose de *C. neoformans* por BMDCs

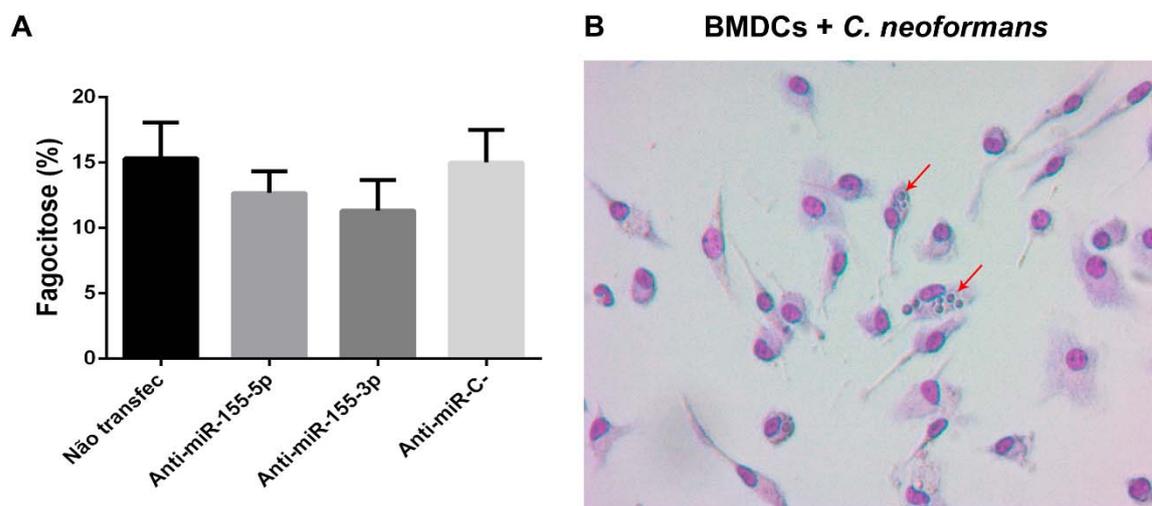
Os resultados da viabilidade das BMDCs após tratamento, e da eficiência da transfecção de inibidores de miRNAs, demonstraram que o uso de anti-miRs não altera a viabilidade das BMDCs e podem ser obtidas altas porcentagens de células efetivamente

transfectadas depois de 24 h de tratamento com os complexos lipossomo-anti-miR, viabilizando os experimentos de avaliação do efeito na perda de função dos miRNAs em células dendríticas. Assim, foi investigado o efeito da inibição do miR-155 na capacidade de internalização do fungo pelas células dendríticas. Para esse fim, BMDCs foram transfectadas com o anti-miR-155-5p e anti-miR-155-3p separadamente para inibição das duas fitas do miR-155; posteriormente, as células transfectadas e sem tratamento foram infectadas com *C. neoformans* por 4 h. Após o período de infecção, as BMDCs foram lavadas e coradas com o kit Panótico para contagem das células que fagocitaram o fungo.

Observou-se uma baixa taxa de fagocitose do fungo pelas células sem transfecção, assim como pelas células tratadas com o controle negativo do anti-miR (*scrambled*), indicando que o sistema empregado para a transfecção de inibidores de miRNAs não afeta a capacidade de fagocitose das BMDCs (Figura 11 A). Uma possível explicação para a baixa taxa de fagocitose é que a linhagem B3501 de *C. neoformans* apresenta uma cápsula composta de polissacarídeos (GXM e GalXM) que limita a ligação de alguns receptores de superfície dos fagócitos (como TLRs e receptores lectina tipo C) com componentes da parede celular do fungo ( $\beta$ -glicanas ou mananas), dificultando o reconhecimento do patógeno e a posterior fagocitose (Taborda e Casadevall, 2002; Kelly *et al.*, 2005; Ramirez-Ortiz e Means, 2012). Em consequência, as linhagens capsulares de *C. neoformans* requerem ser opsonizadas com componentes do sistema complemento, presente no soro do camundongo, ou anticorpos anti-capsulares otimizando a fagocitose (Taborda e Casadevall, 2002; Kelly *et al.*, 2005). Apesar de o uso de anticorpos monoclonais, como o 18B7, levar a maiores taxas de fagocitose do fungo por diferentes células do sistema imune (Taborda e Casadevall, 2002; Zaragoza *et al.*, 2003), foi definido o uso de soro de camundongo para a opsonização do fungo nesse trabalho procurando-se reproduzir um curso normal de infecção. Além disso, há a possibilidade dos anticorpos modularem um padrão diferente de miRNAs, uma vez que a fagocitose mediada pelo complemento e aquela mediada por anticorpos agem por meio de diferentes receptores: receptores do complemento e receptores Fc, respectivamente (Blander, 2007; Wozniak e Levitz, 2008). Futuramente, pretende-se avaliar experimentalmente essa hipótese de modulação diferencial.

Os resultados também revelaram uma modesta inibição na fagocitose do fungo quando as BMDCs foram tratadas com os anti-miR-155-5p e anti-miR-155-3p, que não foi significativa quando comparada com o anti-miR controle (Figura 11). As BMDCs tratadas

com o anti-miR-155-3p mostraram uma tendência a diminuir a porcentagem da fagocitose por comparação com todos os outros grupos, sugerindo, ainda o resultado não seja estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), uma possível participação da fita 3p no reconhecimento do fungo e ativação das células dendríticas. Entretanto, para a confirmação dessa hipótese são necessários outros experimentos aumentando as replicatas e variando o tempo de infecção e o MOI. Crescentes relatos na literatura apontam para a relevância biológica da fita 3p, anteriormente denominada fita passageira ou miRNA\*, participando na regulação da expressão de diferentes mRNAs alvos (Yang *et al.*, 2011; Marco *et al.*, 2012).



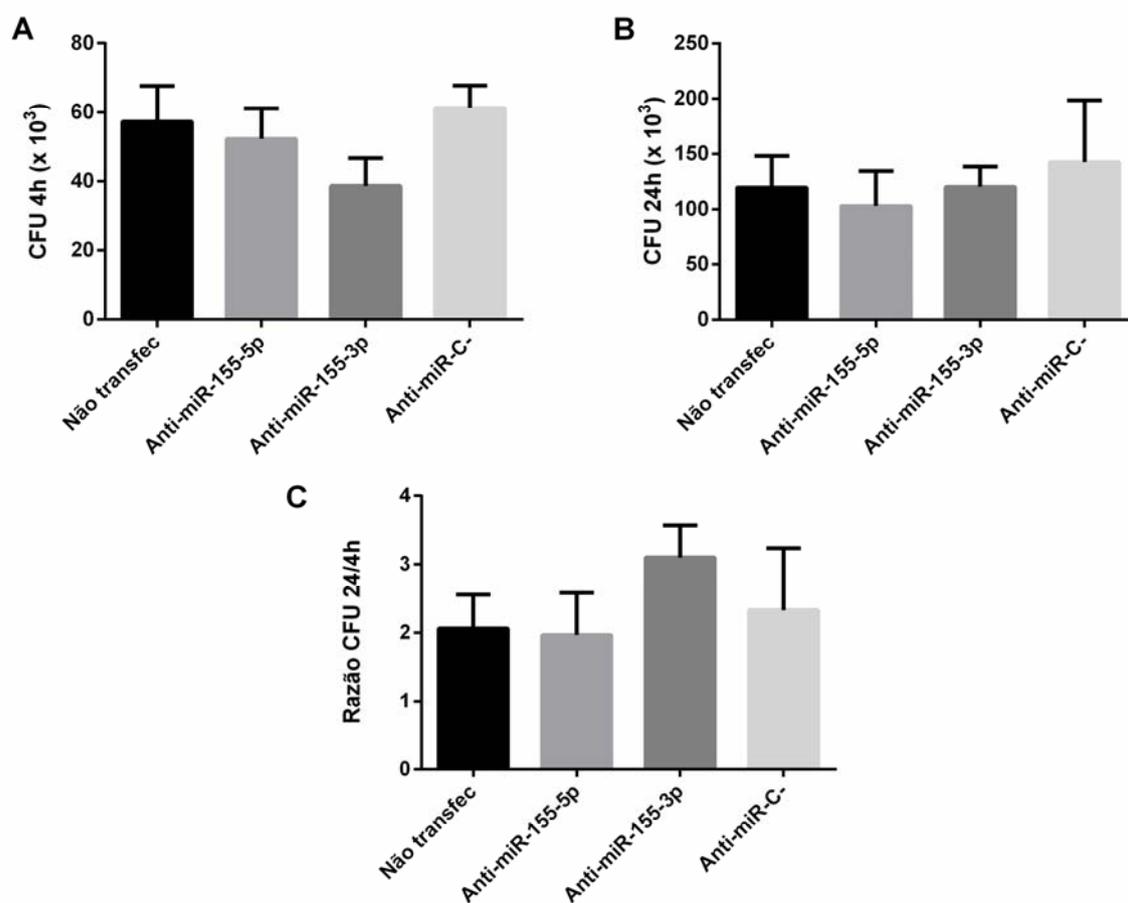
**Figura 11.** Avaliação da capacidade de fagocitose de *C. neoformans* pelas BMDCs após a inibição do miR-155.

As células foram transfectadas com o anti-miR-155-5p e anti-miR-155-3p para a inibição da função das duas fitas do miR-155 separadamente. Controles representam células não transfectadas e células transfectadas com o anti-miR *scrambled*. **A.** BMDCs infectadas por 4 h com *C. neoformans* (MOI 2) previamente opsonizado com 20% de soro de camundongo. Os resultados são apresentados como médias da porcentagem de células que fagocitaram o fungo  $\pm$  SEM de triplicatas técnicas. Experimento representativo de 3 experimentos independentes. **B.** BMDCs infectadas com o *C. neoformans* e coradas com o kit Panótico. As setas indicam células apresentando fungos fagocitados (imagem representativa). Aumento: 40x.

#### 5.3.4. Avaliação do efeito da inibição do miR-155 no controle da infecção de BMDCs por *C. neoformans*

Para avaliar o efeito da inibição do miR-155 sobre a viabilidade de *C. neoformans* após fagocitose, BMDCs foram transfectadas com os inibidores miR-155-5p e miR-155-3p, tomando-se como controles células não transfectadas e células transfectadas como o anti-miR (*scramble*, controle negativo) por 24 h. Após esse período, as células foram infectadas com o fungo por 4 e 24 h. Ao final dos tempos de infecção, as BMDCs foram lavadas e lisadas para a contagem das unidades formadoras de colônias. Após 4 h de infecção, os resultados mostraram um padrão diferente de internalização do fungo entre os grupos experimentais (Figura 12 A). As BMDCs tratadas com o anti-miR-3p apresentaram uma menor quantidade de células fúngicas recuperadas após 4 h de infecção, o que pode ser explicado por um prejuízo na fagocitose gerado pelo tratamento com o anti-miR. Tal resultado é compatível com o padrão observado na avaliação da atividade de fagocitose do fungo pelas BMDCs com os mesmos tratamentos (Figura 11 A), dando suporte a uma possível participação do mir-155-3p na resposta das células dendríticas ao *C. neoformans*.

Devido a diferenças na internalização do fungo pelas BMDCs nos diferentes tratamentos, considerou-se uma CFU relativa, obtida a partir da razão CFU 24 h/CFU 4 h. Essa normalização dos dados permite a comparação na capacidade de contenção do fungo pelas BMDCs entre os grupos de tratamento. Nos dados de CFU relativa, observou-se uma razão maior no grupo de células tratadas com o anti-miR155-3p (Figura 12 C). Ainda que não seja estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), tal diferença pode sugerir um efeito negativo do tratamento sobre a capacidade das BMDCs tornarem inviáveis as leveduras de *C. neoformans*. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de que, nesse grupo experimental, tenha havido maior proliferação das leveduras no interior dos fagossomos. Não obstante, são necessárias mais repetições experimentais para avaliar possíveis diferenças significativas entre os tratamentos. Na literatura, poucos estudos abordam o papel funcional do miR-155-3p. Dado que nossos resultados sugerem uma participação desse miRNA na resposta a *C. neoformans*, são necessárias futuras investigações para determinar a potencial importância da fita 3p do miR-155 na resposta imune a fungos patogênicos.



**Figura 12.** Avaliação da capacidade de contenção de *C. neoformans* pelas BMDCs após a inibição do miR-155.

As células foram transfectadas com o anti-miR-155-5p e anti-miR-155-3p para a inibição da função das duas fitas do miR-155. Controles representam células não transfectadas e células transfectadas com o anti-miR *scrambled*. BMDCs foram infectadas por 4 e 24 h com *C. neoformans* (MOI 2) previamente opsonizado com 20% de soro de camundongo. Após a infecção, as BMDCs foram lavadas, lisadas com solução de SDS (0,05%), semeadas em meio YPD e incubadas a 30 °C por 48 h. **A.** Contagem de CFU após 4 h de infecção. **B.** Contagem de CFU após 24 h de infecção. **C.** Razão entre os valores de CFU nos dois tempos de infecção (24h/4h). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SEM de triplicatas técnicas. Experimento representativo de dois experimentos independentes.

### 5.3.5. Avaliação do efeito da inibição do miR-155 sobre a secreção de citocinas pelas BMDCs em resposta à infecção por *C. neoformans*

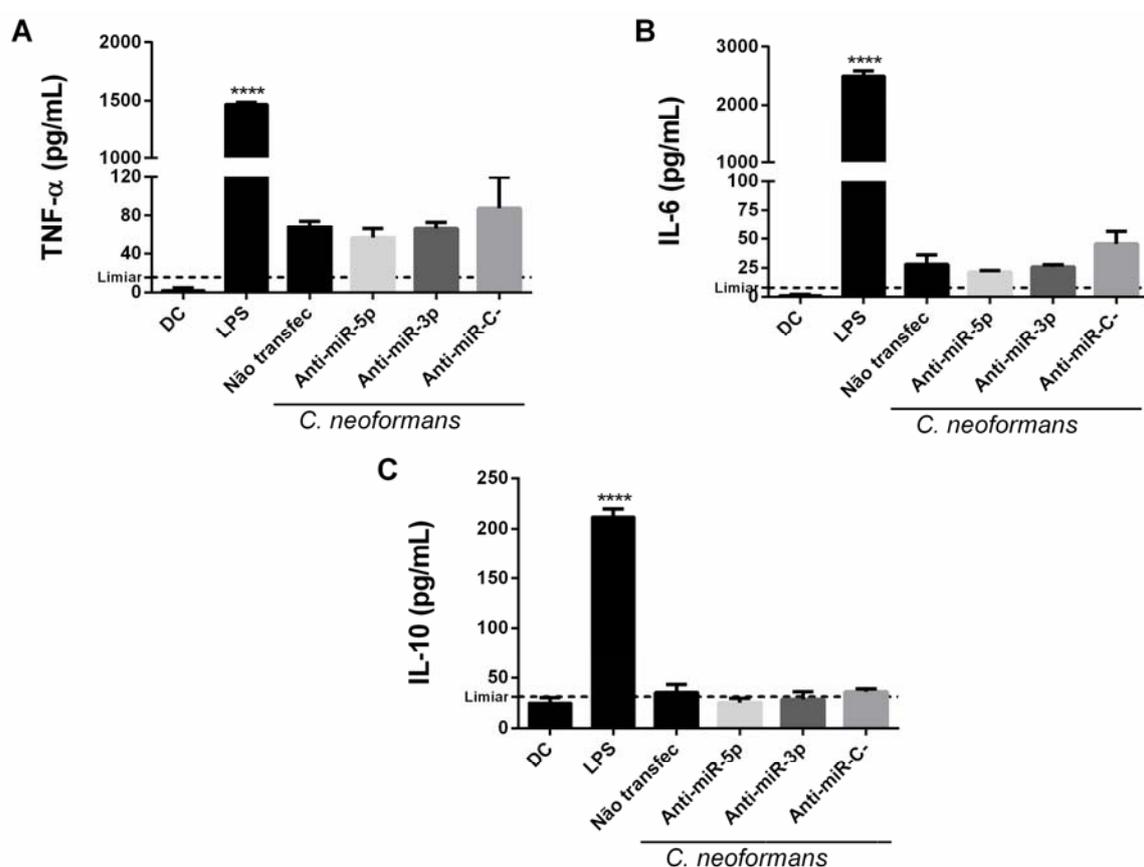
O papel das células dendríticas na resposta às infecções fúngicas, além de fagocitar e conter o crescimento dos patógenos, essas células atuam na modulação a resposta imune mediante a secreção de citocinas que contribuem com o recrutamento de outras células visando a eliminar a infecção. Para analisar a possível participação dos miRNAs nesse

processo, avaliou-se o efeito da inibição do miR-155 sobre a secreção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 durante a resposta das células dendríticas à infecção por *C. neoformans*. Para isso, BMDCs foram transfectadas com o anti-miR-155-5p, anti-miR-155-3p e anti-miR *scrambled* (controle negativo). Células não infectadas, estimuladas ou não com LPS, foram utilizadas como controles. Posteriormente, as BMDCs tratadas com os anti-miRs foram infectadas por 24 h com o fungo. Após o período de infecção, os sobrenadantes das culturas foram recuperados para a dosagem das citocinas por ELISA.

De acordo com os resultados, as células estimuladas com LPS apresentaram níveis maiores de secreção das três citocinas estudadas, reiterando a capacidade das células em responder à infecção. Em comparação às células controle não transfectadas e não infectadas, as BMDCs infectadas com o fungo secretaram mais citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6; não foi observada diferença na secreção de IL-10 (Figura 13). Tal perfil de secreção de citocinas é associado a uma resposta protetora contra *C. neoformans* (Bauman *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2011; Murdock *et al.*, 2014). No entanto, ao comparar os grupos das BMDCs transfectadas com o grupo não transfectado não se observou efeito da inibição do miR-155 (Figura 13). Tais dados são contrastantes com relatos da literatura científica que apontam para miR-155 como um repressor da expressão de citocinas pró-inflamatórias em fagócitos em resposta ao estímulo com LPS ou à infecção por bactérias (Taganov *et al.*, 2006; Ceppi *et al.*, 2009; O'connell *et al.*, 2010; Hocès De La Guardia *et al.*, 2013).

Em células dendríticas humanas sensibilizadas com LPS, os estudos pioneiros usando inibidores de miR-155 revelaram uma regulação positiva dos genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, indicando papel inibitório do miR-155 sobre a resposta inflamatória (Ceppi *et al.*, 2009). Resultados compatíveis foram obtidos com células dendríticas após a inibição de miR-155 e em resposta à infecção por *Helicobacter pylori* (Hocès De La Guardia *et al.*, 2013). Não obstante, estudos com macrófagos têm relatado um efeito regulador positivo de miR-155, incrementando a tradução do mRNA de TNF- $\alpha$  em resposta a LPS (Bala *et al.*, 2011). Estudos com macrófagos não ativados demonstraram que a região 3'UTR (*untranslated region*) do gene de TNF- $\alpha$  gera uma auto-repressão da tradução do mensageiro, que é abolida mediante a ligação de miR-155. Assim, em macrófagos ativados, o aumento da transcrição de miR-155 induz um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  (Alam e O'Neill, 2011; Bala *et al.*, 2011). No entanto, nessas publicações, os

tempos de interação com os patógenos ou as moléculas ativadoras são inferiores a 24 h, avaliando assim uma fase inicial da maturação das células, durante a qual a expressão de citocinas pró-inflamatórias é transitória (Huang *et al.*, 2001; Ceppi *et al.*, 2009). Neste aspecto, os estudos são contraditórios, mas sugerem efeitos tanto pró-inflamatórios como anti-inflamatórios para miR-155 que provavelmente contribui para o ajuste fino da inflamação mediada por TNF- $\alpha$ . Assim, faz-se necessário o estudo do efeito da inibição de miR-155 sobre a resposta de BMDCs a períodos precoces de infecção por *C. neoformans*.



**Figura 13.** Avaliação da secreção de citocinas pelas BMDCs após inibição de miR-155 e infecção por *C. neoformans*.

As células foram transfectadas com anti-miR-155-5p e anti-miR-155-3p para inibição da função das duas fitas do miR-155. Células não transfectadas e não infectadas (DC), células não transfectadas, porém ativadas com LPS (500 ng/mL) e células transfectadas com o anti-miR *scrambled* foram utilizadas como controles. Posteriormente, alguns grupos foram infectados com *C. neoformans* (MOI 2) previamente opsonizado com 20% de soro de camundongo. Após 24 h de infecção, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a dosagem de citocinas: **A.** Níveis de TNF- $\alpha$ , **B.** Níveis de IL-6 e **C.** Níveis de IL-10. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SEM de triplicatas técnicas. Experimento representativo de dois experimentos independentes.

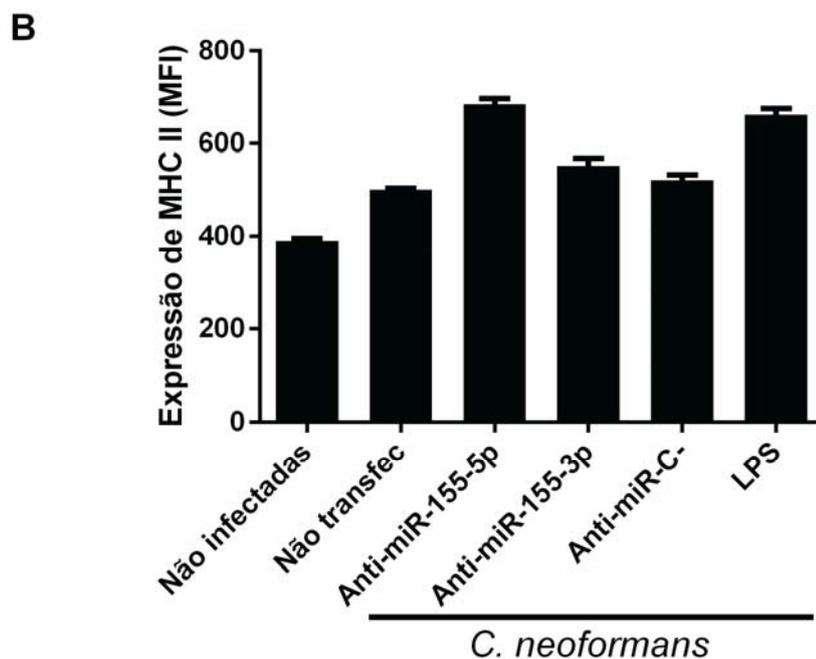
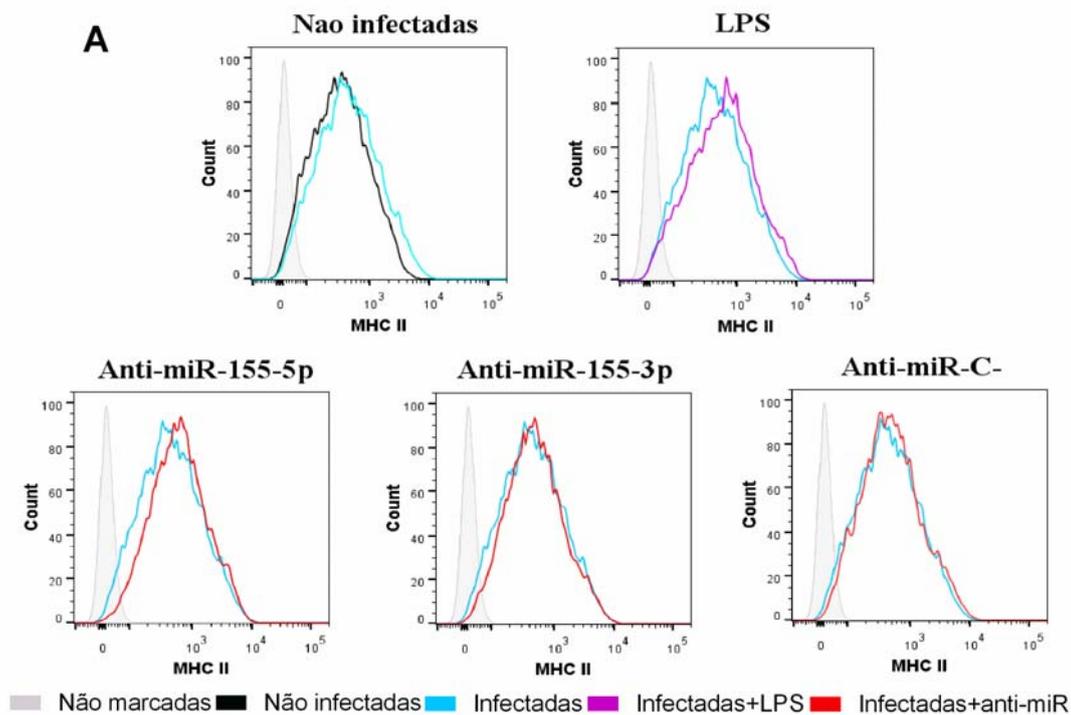
### 5.3.6. Avaliação do efeito da inibição de miR-155 sobre a expressão de MHCII em BMDCs em resposta à infecção por *C. neoformans*

Em resposta às infecções microbianas, as células dendríticas em estado imaturo fagocitam os patógenos e iniciam sua maturação, relacionada à expressão aumentada de MHCII, de moléculas co-estimuladoras e aumento da secreção de citocinas (Merad e Manz, 2009; Ramirez-Ortiz e Means, 2012). Nesse processo, uma das principais funções das células dendríticas é apresentar os antígenos dos patógenos, associados ao MHCII, às células T para sua ativação (Ramirez-Ortiz e Means, 2012). Dunand-Sauthier *et al.* (2011) relataram que miR-155 é necessário para uma eficiente maturação das células dendríticas e está envolvido na capacidade das células de promover a ativação das células T. Assim, procedemos à análise, por meio de citometria de fluxo, da expressão de MHCII em BMDCs tratadas com anti-miR-155 e infectadas por *C. neoformans*. Inicialmente, as células foram transfectadas com o anti-miR-155-5p, anti-miR-155-3p e o anti-miR *scrambled*. Como controles do experimento, BMDCs permaneceram sem tratamento e foram sensibilizadas ou não com LPS. Posteriormente, as células foram infectadas com *C. neoformans* por 24 h; um grupo não infectado foi usado como controle. Por fim, as BMDCs foram marcadas ou não com anticorpos anti-CD11c e anti-MHCII para análise por citometria de fluxo. Uma análise inicial dos resultados mostrou diferença na intensidade de expressão, evidenciada por um deslocamento à direita do histograma (Figura 14 A). O mesmo padrão foi observado para os grupos controle ativado com LPS e o grupo tratado com anti-miR-155, em comparação ao grupo infectado e ao grupo tratado com anti-miR *scrambled*. Por esse motivo, foi realizada uma análise da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) entre os grupos, para determinar se o tratamento com os anti-miRs afetava o nível de expressão do MHCII nas BMDCs infectadas.

A partir da Figura 14 B, observa-se que o grupo de células não infectadas apresentou uma MFI menor quando comparada com os demais grupos, demonstrando assim um nível basal de expressão de MHCII. Não foram observadas diferenças relevantes na MFI entre os grupos não transfectado e o tratado com o anti-miR-*scrambled*, indicando que o sistema carreador dos inibidores não afeta a expressão do MHCII. Por outro lado, obteve-se uma MFI superior nas BMDCs tratadas com anti-miR-155-5p em comparação com o grupo tratado com anti-miR-*scrambled*, sugerindo uma possível participação de miR-155-5p na modulação da expressão do MHCII nas BMDCs infectadas com o fungo (Figura 14 B). Não

obstante, são necessárias repetições independentes do experimento que permitam estabelecer se estatisticamente há uma diferença na modulação da expressão do MHCII em células dendríticas em resposta à infecção.

Diferentes estudos vêm demonstrando evidências da importância de miR-155 na função de células dendríticas (Dunand-Sauthier *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2011; Dunand-Sauthier *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). No entanto, o papel funcional de miR-155 na expressão do MHCII, em propagar ou suprimir a resposta imune adaptativa é ainda controverso. Estudos pioneiros empregando camundongos *knock-out* para miR-155, não evidenciaram alterações na expressão do MHCII em BMDCs estimuladas com LPS em comparação com animais de genótipo selvagem (Rodriguez *et al.*, 2007). Do mesmo modo, os resultados publicados por Lu *et al.* (2011) não indicaram diferenças na expressão do MHCII de células dendríticas transfectadas com sondas para silenciar o miR-155, tampouco em BMDCs de camundongos miR-155<sup>-/-</sup>. Contrariamente, Dunand-Sauthier *et al.* (2011) encontraram um padrão alterado na expressão de MHCII em células dendríticas de camundongos miR-155<sup>-/-</sup>: posteriormente à sensibilização das células com LPS foi atenuada a expressão do MHCII e observou-se uma redução significativa de moléculas co-estimuladoras como CD40 e CD86. Resultados similares foram obtidos no estudo de BMDCs de camundongos miR-155<sup>-/-</sup> quando as células foram ativadas com lisado de células tumorais (EO771), obtendo uma diminuição na expressão de MHCII e das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 (Wang *et al.*, 2016). Esses resultados são contrastantes com os encontrados nesse trabalho, no qual se observou um nível de expressão maior do MHCII nas BMDCs tratadas com o anti-miR-155-5p sugerindo uma possível participação na modulação negativa da expressão do MHCII (Figura 14).



**Figura 14.** Análise da expressão de MHCII em BMDCs após a inibição de miR-155 em resposta a infecção por *C. neoformans*.

**A.** Representação em histograma da expressão de MHCII de BMDCs CD11c<sup>+</sup> não marcadas com anticorpo anti-MHCII e sem tratamento (não marcadas); marcadas, não infectadas e sem tratamento (não infectadas); marcadas, infectadas e sem tratamento (infectadas); marcadas, infectadas e ativadas com LPS (infectadas + LPS); marcadas, infectadas e tratadas com anti-miRs (infectadas + anti-miRs). **B.** Expressão de MHCII de BMDCs CD11c<sup>+</sup> representada em unidades arbitrárias da Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI). Os resultados são apresentados como médias ± SEM de duplicatas técnicas.

Nossos resultados são respaldados por um estudo publicado por Mao *et al.* (2011) que conclui que a expressão de miR-155 em células dendríticas ativadas poderia estar envolvida na repressão de genes indispensáveis para a apresentação de antígenos e estimulação das células T. Desse modo, miR-155 poderia representar parte de um sistema de regulação negativa que teria sido evolutivamente selecionado por conter a magnitude da resposta imune adaptativa e proteger o hospedeiro de patologias autoimunes. Os mesmos autores postulam uma hipótese dose-dependente, na qual um nível limiar de expressão de miR-155 deveria ser mantido nas células dendríticas de modo a gerar uma resposta imune mediada por células T efetiva contra os patógenos (Mao *et al.*, 2011). Em comparação aos estudos com camundongos mutantes miR-155<sup>-/-</sup>, em nosso modelo de estudo as BMDCs foram tratadas com inibidores para uma das ou outra das fitas de miR-155 em cada experimento. Assim, sempre uma das fitas encontrava-se funcional, podendo ter algum efeito na modulação da expressão do MHCII. Cabe-se ressaltar, porém, que apenas muito recentemente estudos com inibidores de 3p surgiram na literatura, visto que essa fita era até então considerada não funcional. Ainda, exemplos da funcionalidade de fitas 3p são escassos na literatura científica. Esta questão deve ser abordada em etapas futuras do estudo, por meio de abordagens de perda e de ganho de função, com o objetivo de esclarecer a participação de miR-155 na apresentação de antígenos pelas células dendríticas em resposta à infecção por fungos.

## VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse estudo foi mostrada a modulação da expressão de 29 miRNAs em BMDCs após a infecção por *C. neoformans*. Dentre esse conjunto de miRs, 22 apresentaram regulação positiva e 7 apresentaram regulação negativa. Considerando os níveis de indução, destacamos o aumento no acúmulo de miR-451 e miR-183 após a infecção, indicando a possível participação desses miRNAs na resposta de BMDCs à infecção por *C. neoformans*. Tais resultados justificam o aprofundamento dos estudos visando à identificação da função desses miRNAs e seus respectivos mecanismos de ativação nesse modelo de infecção.

Tendo em vista a importância regulatória em uma grande diversidade de processos biológicos, como amplamente descrito na literatura para o miR-155, trabalhos anteriores e em andamento em nosso grupo têm avaliado a participação desse miRNA na resposta de macrófagos a patógenos fúngicos. Assim, nesse trabalho buscamos avaliar o papel funcional desse miRNA em BMDCs infectadas por *C. neoformans*, mesmo que esse não tenha apresentado o maior nível de modulação de expressão dentre os miRNAs analisados.

Nesse sentido, avaliamos o papel do miR-155 na resposta de BMDCs à infecção por *C. neoformans* por meio experimentos de perda de função. Observamos que a inibição do miR-155-3p levou a uma redução no número de leveduras fagocitadas e no controle intracelular do fungo pelas BMDCs, sugerindo uma participação desse miRNA no reconhecimento do fungo e na ativação das BMDCs. No entanto, a inibição do miR-155-5p e -3p nas BMDCs infectadas não provocou diferenças na produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Além disso, observou-se um aumento na expressão do MHCII nas BMDCs infectadas quando o miR-155-5p foi inibido, sugerindo um possível envolvimento desse miRNA na regulação negativa da expressão do MHCII em resposta à infecção.

Estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel do miR-155-3p na resposta das BMDCs ao fungo (processos de fagocitose e morte intracelular) e do miR-155-5p na apresentação de antígenos pelas BMDCs em resposta à infecção por *C. neoformans*. Igualmente importante será avaliarmos os níveis de transcritos alvos desses miRNAs (155-5p, e -3p), para um maior entendimento de seu papel no contexto da resposta imune de BMDCs à infecção por *C. neoformans*.

Diante dos resultados obtidos até o momento, nossas perspectivas de aprofundamento do estudo são:

**i**, avaliar o acúmulo de importantes genes alvos de alguns miRNAs que se mostraram modulados diferencialmente nesse trabalho;

**ii**, esclarecer o papel dos miRNAs com uma modulação mais pronunciada, com uso de técnicas para análise funcional, tanto perda como ganho da função. Nesse sentido, é de interesse determinar se o aumento nos níveis de miR-451 poderia estar associado ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora ou a um mecanismo que propiciaria a evasão e adaptação do patógeno;

**iii**, analisar a possível participação desses miRNAs nas principais funções das células dendríticas, como fagocitose e controle do fungo, produção de citocinas, e apresentação de antígenos.

**iv**, avaliar a modulação de miRNAs, bem como seu mecanismo de ativação envolvendo a participação dos PRRs, em diferentes tempos de infecção, assim como a cinética dos níveis de produção de diferentes citocinas e expressão do MHCII, bem como de outras moléculas como CD 40, CD 80, CD83 e CD86.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTINHO, D. P. et al. Dectin-1 is required for miR155 upregulation in murine macrophages in response to *Candida albicans*. **Virulence**, p. 1-12, Jun 13 2016. ISSN 2150-5594.

ALAM, M. M.; O'NEILL, L. A. MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 9, p. 2482-5, Sep 2011. ISSN 0014-2980.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161-2165, 2006. ISSN 0960-9822.

AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 475-488, 2013. ISSN 1471-0072.

ARMSTRONG-JAMES, D.; HARRISON, T. S. Immunotherapy for fungal infections. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 4, p. 434-439, 2012. ISSN 1369-5274.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120-127, 2014. ISSN 0966-842X.

ARORA, S. et al. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1915-1926, 2011. ISSN 0019-9567.

BALA, S. et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1436-1444, 2011. ISSN 0021-9258.

BANERJEE, S. et al. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6542-6549, 2013. ISSN 0022-1767.

BAUMAN, S. K.; HUFFNAGLE, G. B.; MURPHY, J. W. Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anticryptococcal cell-mediated immune response. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 68-74, 2003. ISSN 0019-9567.

BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. **J Cell Physiol**, v. 218, n. 3, p. 467-72, Mar 2009. ISSN 0021-9541.

BIONDO, C. et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. **European journal of immunology**, v. 35, n. 3, p. 870-878, 2005. ISSN 1521-4141.

BLANDER, J. M. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 2, p. 290-299, 2007. ISSN 1462-5822.

BOLDIN, M. P. et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. **J Exp Med**, v. 208, n. 6, p. 1189-201, Jun 6 2011. ISSN 0022-1007.

BOTTS, M. R.; HULL, C. M. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 437-442, 2010. ISSN 1369-5274.

BRONEVETSKY, Y.; ANSEL, K. M. Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. **Immunological reviews**, v. 253, n. 1, p. 304-316, 2013. ISSN 1600-065X.

CEPPI, M. et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2735-2740, 2009. ISSN 0027-8424.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 1, p. 120-127, 2009. ISSN 0019-9567.

CHEN, C. Z. et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 83-6, Jan 2 2004. ISSN 0036-8075.

CHENG, P.-Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284-4294, 2009. ISSN 0019-9567.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, 2013.

CORPORATION, L. T. **Protocol mirVana™ miRNA Isolation Kit**. California 2011.

DAN, J. M. et al. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2362-2367, 2008. ISSN 0019-9567.

DAS GUPTA, M. et al. Aspergillus fumigatus induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 5-6, p. 592-6, Jul 2014. ISSN 1438-4221.

DATTA, K.; HAMAD, M. Immunotherapy of fungal infections. **Immunological investigations**, v. 44, n. 8, p. 738-776, 2015. ISSN 0882-0139.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, 2009. ISSN 1687-708X.

DU, L. et al. Systemic review of published reports on primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent patients. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 19-25, 2015. ISSN 0301-486X.

DUNAND-SAUTHIER, I. et al. Repression of arginase-2 expression in dendritic cells by microRNA-155 is critical for promoting T cell proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1690-1700, 2014. ISSN 0022-1767.

DUNAND-SAUTHIER, I. et al. Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. **Blood**, v. 117, n. 17, p. 4490-4500, 2011. ISSN 0006-4971.

EASTMAN, A. J.; OSTERHOLZER, J. J.; OLSZEWSKI, M. A. Role of dendritic cell-pathogen interactions in the immune response to pulmonary cryptococcal infection. **Future Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 1837-57, 2015. ISSN 1746-0913.

EULALIO, A.; SCHULTE, L.; VOGEL, J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. **RNA Biol**, v. 9, n. 6, p. 742-50, Jun 2012. ISSN 1547-6286.

FELDMESSER, M. et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225-4237, 2000. ISSN 0019-9567.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 2, p. 102-114, 2008. ISSN 1471-0056.

GARCÍA-RODAS, R. et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e00945-14, 2014. ISSN 2150-7511.

GILES, S. S. et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491-3500, 2009. ISSN 0019-9567.

GRIJPSTRA, J. et al. The *Cryptococcus neoformans* cap10 and cap59 mutant strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 142-150, 2009. ISSN 0928-8244.

GUILLOT, L. et al. Enhanced pulmonary innate immune responsiveness to *Cryptococcus neoformans* is associated with resistance to progressive infection. **Infection and Immunity**, 2008. ISSN 0019-9567.

GURTAN, A. M.; SHARP, P. A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 19, p. 3582-3600, 2013. ISSN 0022-2836.

HAGEN, F. et al. Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach. **Medical mycology**, v. 48, n. 3, p. 528-531, 2010. ISSN 1369-3786.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16-48, 2015. ISSN 1087-1845.

HARRIS, J. F. et al. Small RNA-mediated regulation of host-pathogen interactions. **Virulence**, v. 4, n. 8, p. 785-795, 2013. ISSN 2150-5594.

HOCÈS DE LA GUARDIA, A. et al. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 236, 2013. ISSN 1664-302X.

HOLE, C. R. et al. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Scientific reports**, v. 2, p. 739, 2012. ISSN 2045-2322.

HUANG, Q. et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 870-875, 2001. ISSN 0036-8075.

ICHIYAMA, K. et al. The microRNA-183-96-182 cluster promotes T helper 17 cell pathogenicity by negatively regulating transcription factor Foxo1 expression. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1284-1298, 2016. ISSN 1074-7613.

JIANG, S. Immunity Against Fungal Infections. **Immunology and Immunogenetics Insights**, v. 8, p. 3, 2016. ISSN 1178-6345.

KATRAGKOU, A.; ROILIDES, E. Best practice in treating infants and children with proven, probable or suspected invasive fungal infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 3, p. 225-229, 2011. ISSN 0951-7375.

KELLY, R. M. et al. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 592-598, 2005. ISSN 0019-9567.

KLEINSCHEK, M. A. et al. Administration of IL-23 engages innate and adaptive immune mechanisms during fungal infection. **International immunology**, p. dxp117, 2009. ISSN 0953-8178.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011. ISSN 1740-1526.

KUMAR, P. et al. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 5, p. 597-602, 2011. ISSN 0959-440X.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014. ISSN 2157-1422.

LEE, M. N. et al. Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells. **Science**, v. 343, n. 6175, p. 1246980, Mar 7 2014. ISSN 0036-8075.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993. ISSN 0092-8674.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 105, 2016. ISSN 1664-302x.

LIND, E. F. et al. miR-155 upregulation in dendritic cells is sufficient to break tolerance in vivo by negatively regulating SHIP1. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 10, p. 4632-4640, 2015. ISSN 0022-1767.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023.

LU, C. et al. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. **Blood**, v. 117, n. 16, p. 4293-4303, 2011. ISSN 0006-4971.

LU, L.-F. et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 80-91, 2009. ISSN 1074-7613.

LUTZ, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999. ISSN 0022-1759.

MANSOUR, M. K.; LATZ, E.; LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3053-3061, 2006. ISSN 0022-1767.

MANSOUR, M. K.; SCHLESINGER, L. S.; LEVITZ, S. M. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 6, p. 2872-2879, 2002. ISSN 0022-1767.

MAO, C.-P. et al. In vivo microRNA-155 expression influences antigen-specific T cell-mediated immune responses generated by DNA vaccination. **Cell & bioscience**, v. 1, n. 1, p. 3, 2011. ISSN 2045-3701.

MARCO, A. et al. MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. **Silence**, v. 3, n. 1, p. 8, 2012. ISSN 1758-907X.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016. ISSN 0891-5520.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2012. ISSN 1341-321X.

MEHTA, A.; BALTIMORE, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 5, p. 279-94, Apr 28 2016. ISSN 1474-1733.

MERAD, M.; MANZ, M. G. Dendritic cell homeostasis. **Blood**, v. 113, n. 15, p. 3418-3427, 2009. ISSN 0006-4971.

MERSHON-SHIER, K. L. et al. In vitro C3 deposition on *Cryptococcus* capsule occurs via multiple complement activation pathways. **Molecular immunology**, v. 48, n. 15, p. 2009-2018, 2011. ISSN 0161-5890.

MEYER, M. et al. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex, p 327–357. **Heitman J, Kozel T, Kwon-Chung J, Perfect J, Casadevall, editors, Cryptococcus: from human pathogen to model yeast. ASM Press, Washington, DC, 2011.**

MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 537-542, 2006. ISSN 1567-1364.

MONK, C. E.; HUTVAGNER, G.; ARTHUR, J. S. C. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. **PLoS one**, v. 5, n. 10, p. e13669, 2010. ISSN 1932-6203.

MOSCHOS, S. A. et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. **BMC Genomics**, v. 8, p. 240, Jul 17 2007. ISSN 1471-2164.

MUHAMMAD, S. A. et al. MicroRNA Expression Profiling of Human Respiratory Epithelium Affected by Invasive *Candida* Infection. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136454, 2015. ISSN 1932-6203.

MURDOCK, B. J. et al. Early or late IL-10 blockade enhances Th1 and Th17 effector responses and promotes fungal clearance in mice with cryptococcal lung infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 8, p. 4107-4116, 2014. ISSN 0022-1767.

NAHID, M. A. et al. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. **J Biol Chem**, v. 284, n. 50, p. 34590-9, Dec 11 2009. ISSN 0021-9258.

NAHID, M. A. et al. Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1250-1263, 2013. ISSN 0022-1767.

NAKAMURA, K. et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 4067-4074, 2008. ISSN 0022-1767.

NETSKI, D.; KOZEL, T. R. Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity. **Infection and immunity**, v. 70, n. 6, p. 2812-2819, 2002. ISSN 0019-9567.

NEUVILLE, S. et al. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. **Clinical infectious diseases**, v. 36, n. 3, p. 337-347, 2003. ISSN 1058-4838.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, p. e00103-12, 2012. ISSN 2150-7511.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **MBio**, v. 2, n. 4, p. e00167-11, 2011. ISSN 2150-7511.

O'CONNELL, R. M. et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 607-619, 2010. ISSN 1074-7613.

O'CONNELL, R. M. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1604-1609, 2007. ISSN 0027-8424.

O'NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 163-175, 2011. ISSN 1474-1733.

OERTLI, M. et al. MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 7, p. 3578-3586, 2011. ISSN 0022-1767.

OLIVEIRA, M. A. D. **Estudo da participação de microRNAs na regulação da resposta imune inata de macrófagos murinos à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***. 2016.

74 (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009. ISSN 0269-9370.

PARK, H. et al. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 5, p. 2831-2841, 2015. ISSN 0021-9258.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010. ISSN 1058-4838.

PUSHPAVALLI, S. et al. Effect of Benzothiazole based conjugates in causing apoptosis by Regulating p53, PTEN and MAP Kinase proteins affecting miR-195a and miR-101-1. **Cancer cell international**, v. 11, n. 1, p. 36, 2011. ISSN 1475-2867.

RAMIREZ-ORTIZ, Z. G.; MEANS, T. K. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 635-646, 2012. ISSN 2150-5594.

RODRIGUEZ, A. et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 608-11, Apr 27 2007. ISSN 0036-8075.

ROHATGI, S.; PIROFSKI, L.-A. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. **Future microbiology**, v. 10, n. 4, p. 565-581, 2015. ISSN 1746-0913.

ROSENBERGER, C. M. et al. miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. **J Immunol**, v. 189, n. 12, p. 5965-75, Dec 15 2012. ISSN 0022-1767.

SANTULLI, G. **MicroRNA: Medical Evidence**. Springer, 2015.

SCHULTE, L. N.; WESTERMANN, A. J.; VOGEL, J. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. 542-553, 2013. ISSN 0305-1048.

SEMAAN, N. et al. miR-346 controls release of TNF-alpha protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetrapirolin stabilization. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19827, 2011. ISSN 1932-6203.

SHEEDY, F. J. et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 141-7, Feb 2010. ISSN 1529-2908.

SIDDLE, K. J. et al. bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and their isomiRs. **PLoS Genet**, v. 11, n. 3, p. e1005064, Mar 2015. ISSN 1553-7390.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Current fungal infection reports**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012. ISSN 1936-3761.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014. ISSN 1097-0061.

STAEDL, C.; DARFEUILLE, F. MicroRNAs and bacterial infection. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 9, p. 1496-1507, 2013. ISSN 1462-5822.

SYME, R. M. et al. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc $\gamma$  receptor II for presentation to T lymphocytes. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 5972-5981, 2002. ISSN 0019-9567.

TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 791-802, 2002. ISSN 1074-7613.

TAGANOV, K. D. et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 33, p. 12481-6, Aug 15 2006. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

TENG, G.; PAPAVALIIOU, F. N. Shhh! silencing by microRNA-155. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1517, p. 631-637, 2009. ISSN 0962-8436.

TILI, E. et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5082-9, Oct 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767.

TRZECIAK-RYCZEK, A.; TOKARZ-DEPTUŁA, B.; DEPTUŁA, W. Antifungal immunity in selected fungal infections. **Postepy Hig. Med. Dosw**, v. 69, p. 469-474, 2015.

VECCHIARELLI, A. et al. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 3, p. 370-378, 2003. ISSN 0741-5400.

WANG, J. et al. microRNA-155 deficiency impairs dendritic cell function in breast cancer. **OncoImmunology**, v. 5, n. 11, p. e1232223, 2016. ISSN 2162-402X.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-862, 1993. ISSN 0092-8674.

WOZNIAK, K. L.; LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4764-4771, 2008. ISSN 0019-9567.

WOZNIAK, K. L.; VYAS, J. M.; LEVITZ, S. M. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 7, p. 3817-3824, 2006. ISSN 0019-9567.

YANG, J.-S. et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. **Rna**, v. 17, n. 2, p. 312-326, 2011. ISSN 1355-8382.

YAO, R. et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46082, 2012. ISSN 1932-6203.

YONEDA, A.; DOERING, T. L. Regulation of *Cryptococcus neoformans* capsule size is mediated at the polymer level. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 3, p. 546-549, 2008. ISSN 1535-9778.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009. ISSN 0065-2164.

ZARAGOZA, O.; TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **European journal of immunology**, v. 33, n. 7, p. 1957-1967, 2003. ISSN 1521-4141.

ZHANG, H.; SHYKIND, B.; SUN, T. Approaches to manipulating microRNAs in neurogenesis. **Frontiers in neuroscience**, v. 6, p. 196, 2013. ISSN 1662-453X.

ZHANG, W. et al. Polycomb-mediated loss of microRNA let-7c determines inflammatory macrophage polarization via PAK1-dependent NF- $\kappa$ B pathway. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 287-297, 2015. ISSN 1350-9047.

ZHANG, Y. et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 6, p. 2489-2500, 2009. ISSN 0002-9440.