

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

ANE WICHINE ACOSTA GARCIA

ANÁLISE DE miRNAs DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM MACRÓFAGOS
INFECTADOS COM *Cryptococcus neoformans*.

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE BIOMEDICINA

ANE WICHINE ACOSTA GARCIA

ANÁLISE DE miRNAs DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM MACRÓFAGOS
INFECTADOS COM *Cryptococcus neoformans*.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

PORTO ALEGRE

2013

AGRADECIMENTOS

À minha avó, Iloina, por todo amor e carinho, e por sempre torcer pelo melhor para mim. Saiba, aonde quer que estejas agora, que cada vitória da minha vida dedico a ti.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e na minha jornada em busca dos meus objetivos.

Às minhas tias avós, Nina, Kity e Alcina, pelo apoio e estímulo aos estudos, por me ensinarem desde cedo a ler e ser cada vez mais curiosa.

Ao meu irmão, JP, por todo amor e carinho de sempre.

Aos meus amigos, tanto de infância quanto mais recentes, por me aguentarem nos momentos de estresse, e por todas as gargalhadas e baladas que tornaram meus dias mais felizes.

Aos meus amigos: Marcos Kulmann, Ethi, Marcus Michels e Carlinha, por todos os momentos do dia-a-dia desde 2011, por entenderem os momentos de loucura, a saudade da família, e as situações mais adversas que a vida nos proporciona.

Às pessoas com quem tive o prazer de conviver e aprender durante os estágios da graduação, do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e do Laboratório de Virologia; principalmente Leticia Pettenuzzo, Carina Mota e Thalita Arantes.

Ao meu orientador, Charley Staats, por me acolher no laboratório, pela disponibilidade para conversar sempre que surge uma dúvida e por todo o conhecimento transmitido. Obrigada pela paciência, pelo apoio e por acreditar no meu potencial.

À professora Marilene Vainstein por me aceitar no laboratório.

À professora Lívia, pela disposição a ajudar e resolver as várias dúvidas que surgiram ao longo do trabalho.

Aos colegas e amigos Alícia, Rafa e Francine, por me auxiliarem sempre e compartilharem comigo além de conhecimento, muitas gargalhadas.

Aos demais colegas dos laboratórios 220 e 217, que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

RESUMO

A levedura *Cryptococcus neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose, acometendo principalmente pacientes que são submetidos à terapia imunossupressora devido a transplante de órgãos, quimioterapia ou doença autoimune e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida. Esta doença é adquirida através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas encontradas no ambiente, em árvores como eucaliptos, solo e excretas de pombos. O quadro clínico é caracterizado por uma infecção pulmonar primária, com a possibilidade de disseminação pelo organismo do hospedeiro, causando mais comumente meningoencefalite. A fagocitose exercida pelos macrófagos alveolares é a principal linha de defesa pulmonar do hospedeiro contra criptococose, sendo necessário que ocorra a reprogramação da expressão gênica nessas células para contenção da disseminação do patógeno. A resposta à infecção pode ser modulada por microRNAs como miR-146 e miR-155, envolvidos na regulação da imunidade inata e de ação pró-inflamatória. Através de qRT-PCR, observamos que em condições de infecção com *Cryptococcus neoformans* morto por calor, houve um aumento da expressão dos microRNAs, não observado com patógeno vivo, sugerindo uma modulação exercida pela levedura na resposta imune. Os níveis de expressão de miR-146a e miR-155 apresentaram diminuição ao longo do tempo, sugerindo uma resposta imediata de aumento da expressão que posteriormente é revertida. Análises de bioinformática sugerem uma forte modulação exercida por esses microRNAs na resposta imune, além de revelar genes alvo que sofrem correção por dois ou mais microRNAs do presente estudo. A predição de genes alvo para validação dos revelou que miR-146a e miR-155 relacionam-se a vários processos biológicos, regulando diversas vias de sinalização celulares e metabólicas. Sendo assim, observamos que tais microRNAs possuem amplo papel no funcionamento celular, mas estão intimamente ligados à resposta imune, sendo um possível alvo terapêutico para criptococose, a fim de impedir o estabelecimento da fase de infecção intracelular e proliferação da levedura.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
cDNA	DNA complementar
Dicer	Enzima nucleasse que cliva RNA dupla fita
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Drosha	Enzima RNase III
Eda	Ectodisplasina A
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucoroxilomanana
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazina)etanosulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-13	Interleucina 13
IL-33	Interleucina 33
miR-146a	MicroRNA-146 isoforma a
miR-146b	MicroRNA-146 isoforma b
miR-155	MicroRNA-155
miRNA	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro

NFκB	Fator nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
piRNA	RNA que interage com piwi
pré-miRNA	Molécula precursora do microRNA maduro
pri-miRNA	MicroRNA primário
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real associado a transcrição reversa
RISC	Complexo de indução do silenciamento do RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SNC	Sistema Nervoso Central
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTR	<i>Untranslatedregion</i> – Região não traduzida
YPD	<i>Yeast-extract/peptone/dextrose</i>

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1. Criptococose	10
1.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	11
1.3. Via de infecção	13
1.4. Macrófagos	15
1.5. MicroRNA	17
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
2. ARTIGO CIENTÍFICO	21
Resumo	22
Abstract.....	23
2.1. Introdução.....	24
2.2. Materiais e Métodos	26
2.2.1. <i>Linhagens celulares, microrganismos e cultivos</i>	26
2.2.2. <i>Interação entre macrófagos e C. neoformans</i>	26
2.2.3. <i>Extração e quantificação de RNA</i>	27
2.2.4. <i>qRT-PCR</i>	27
2.2.5. <i>Predição dos genes alvo dos microRNAs</i>	27
2.2.6. <i>Análises Bioinformáticas</i>	28
2.2.7. <i>Análises Estatísticas</i>	28
2.3. Resultados.....	29
2.4. Discussão	33
2.5. Conclusão	36
2.6. ReferênciasBibliográficas.....	37
2.7. Tabelas.....	40
Tabela 1:	40
2.8. Legendas de Figuras	40
Figura 1.....	40
Figura 2:.....	41
Figura 3:.....	41

Figura 4.....	42
Figura 5:.....	42
Figura 6.....	42
2.8. Figuras	43
Figura 1.....	43
Figura 2.....	44
Figura 3.....	45
Figura 4.....	46
Figura 5.....	47
Figura 6.....	48
2.9. Material Suplementar	49
2.9.2. Tabelas.....	49
Tabela S1:	49
Tabela S2:	51
Tabela S3:	51
2.10. Perspectivas:	53
Referências Bibliográficas.....	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Criptococose

Devido a tratamentos de imunossupressão, quimioterapia ou à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pacientes imunocomprometidos tornam-se propensos a contrair doenças oportunistas, as quais geram quadros que variam no grau de severidade e, em alguns casos, pode levar ao óbito. A criptococose é uma importante patologia que acometem pacientes imunocomprometidos. Essa doença pode variar de uma simples infecção cutânea auto-limitante em pacientes saudáveis a uma infecção sistêmica fatal em pacientes com o sistema imune debilitado, sendo fortemente associado a casos de AIDS, sendo a terceira doença oportunista mais prevalente nestes pacientes (Perfect *et al.*, 2010; Lanjewar, 2011).

Os principais agentes etiológicos da criptococose são as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Pacientes imunocomprometidos geralmente desenvolvem a infecção por *C. neoformans*, enquanto infecções por *C. gattii* também podem ocorrer em imunocompetentes (Pappas, 2013). A distribuição geográfica dos casos relatados de criptococose difere entre as espécies, visto que *C. gattii* apresenta caráter endêmico, limitando-se a regiões tropicais e subtropicais, com a exceção do surto na região noroeste dos Estados Unidos e na ilha de Vancouver no Canadá, enquanto *C. neoformans* apresenta distribuição global (Byrnes *et al.*, 2009; Dixit, Carroll e Qureshi, 2009; Byrnes *et al.*, 2010; Kronstad *et al.*, 2011). Com relação à extensão da infecção, em modelo murino *C. gattii* apresenta-se mais restrito ao pulmão, caracterizando um quadro de pneumonia e raramente se disseminando para o sistema nervoso central; ao passo que *C. neoformans* possui tropismo pelo tecido cerebral, causa uma forma mais grave da doença, caracterizada por um quadro de meningoencefalite (Brown *et al.*, 2012).

A introdução de terapia antirretroviral diminuiu consideravelmente a incidência da criptococose em países desenvolvidos (Perfect *et al.*, 2010), contudo, estima-se que um milhão de pessoas sofrem de meningite criptocócica e cerca de 60% têm a doença como causa de óbito pouco tempo após receber diagnóstico. Grande parte dos casos de meningite criptocócica está associada a pacientes imunocomprometidos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV

positivos). Estudos indicam que a criptococose é a causa de cerca de 30% da mortalidade em pacientes portadores de AIDS, em regiões como sudeste asiático e ao sul e leste da África, devido à deficiência na implementação de terapia antirretroviral (Lin e Heitman, 2006; Sabiiti, May e Pursall, 2012).

O tratamento farmacológico da patologia é baseado em uma combinação de fármacos antifúngicos como a anfotericina B, a flucitosina e o fluconazol. Contudo, esses fármacos apresentam alta toxicidade, gerando vários efeitos colaterais no paciente. Além dos efeitos colaterais, a resistência a drogas antifúngicas é um fator que também dificulta o tratamento da doença, principalmente em países como a África, visto que o fármaco fluconazol é utilizado tanto para profilaxia quanto como monoterapia para o tratamento da criptococose (Simm *et al.*, 2011). Essa resistência desenvolve-se através de mutações que ocorrem naturalmente nas células, e desta forma as drogas antifúngicas atuam como agentes seletivos para as células que não possuem a mutação, o que acaba gerando uma população ainda mais resistente. Outro fator que gera resistência aos fármacos utilizados no tratamento da criptococose é o tempo de tratamento. Através de testes de susceptibilidade *in vitro*, observou-se que o uso prolongado de antifúngicos culmina no desenvolvimento de resistência aos componentes. Tais evidências reforçam a necessidade da descoberta de alternativas terapêuticas mais eficazes para a doença.

1.2. *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans é um organismo intracelular facultativo. Esta espécie em especial apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, e em infecção sistêmica, consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica promovendo o desenvolvimento dos quadros mais graves da doença: meningite e meningoencefalite. Seus principais fatores de virulência são: produção de cápsula polissacarídica, produção de melanina, desenvolvimento a 37°C e a produção de enzimas extracelulares como a fosfolipase B e a uréase (Kronstad *et al.*, 2012).

A cápsula polissacarídica é o principal mecanismo de virulência dessa levedura, e trata-se de uma estrutura dinâmica, única entre fungos patogênicos. Composta principalmente pelo polissacarídeo glicuronoxilomanana (GXM), além do polissacarídeo galactoxinomanana (GalXM) e manoproteínas, a cápsula possui

propriedades antifagocíticas e imunomoduladoras que conferem uma vantagem da levedura frente à resposta imune celular (Johnston e May, 2013).

A produção de melanina está relacionada à proteção ao estresse exercido pelo ambiente em que a levedura se encontra, como, por exemplo, em resposta a antifúngicos (Casadevall e Pirofski, 2001). Produzir enzimas extracelulares também confere vantagens para o estabelecimento da infecção fúngica. Enquanto a fosfolipase B garante a integridade da parede celular e contribui para a invasão do tecido pulmonar e disseminação do fungo, a urease catalisa a hidrólise da ureia em amônia, o que parece facilitar a disseminação de *C. neoformans* para o sistema nervoso central, devido ao efeito tóxico da amônia nas células endoteliais dos capilares cerebrais (Singh *et al.*, 2013).

Outra característica de *C. neoformans* é a produção de células “titãs”, as quais são formadas no ambiente pulmonar. Essas células caracterizam-se pelo tamanho, pois com um diâmetro que varia de 50 a 100µm, elas são de cinco a dez vezes maiores que as células normais, segundo observações *in vitro* e *in vivo*. O conteúdo nuclear dessas células também apresenta alteração, visto que o número de cromossomos está aumentado, podendo ser encontradas células tetraploides ou octaploides. A vantagem da presença desse tipo celular para o patógeno em uma infecção é que devido ao seu tamanho aumentado, as células do sistema imune possuem dificuldade em internalizar estas leveduras. Além disso, as células “titãs” apresentam uma maior resistência aos principais mecanismos de defesa exercidos pelas células fagocitárias, pois são mais resistentes às estratégias antimicrobianas envolvendo espécies reativas como o óxido nítrico (NO) e processos oxidativos (Okagaki *et al.*, 2011).

Além dos mecanismos clássicos de virulência, *C. neoformans* também apresenta capacidade de se adaptar a um ambiente desfavorável do ponto de vista nutricional, modulando a expressão de genes envolvidos em diversos processos metabólicos, incluindo a homeostase de metais, como o ferro, fosfato e zinco (Kronstad *et al.*, 2012; Kretschmer *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2012).

1.3. Via de infecção

A levedura *C. neoformans* é capaz de gerar infecções que acometem a pele, os pulmões e o sistema nervoso central, sendo que os dois últimos são responsáveis por quadros mais graves de infecção. O início do processo infeccioso ocorre através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no solo (Fig. 1), fezes de pombos ou em árvores como eucaliptos, locais nos quais é mais frequente o isolamento da levedura (Lazera *et al.*, 2000).

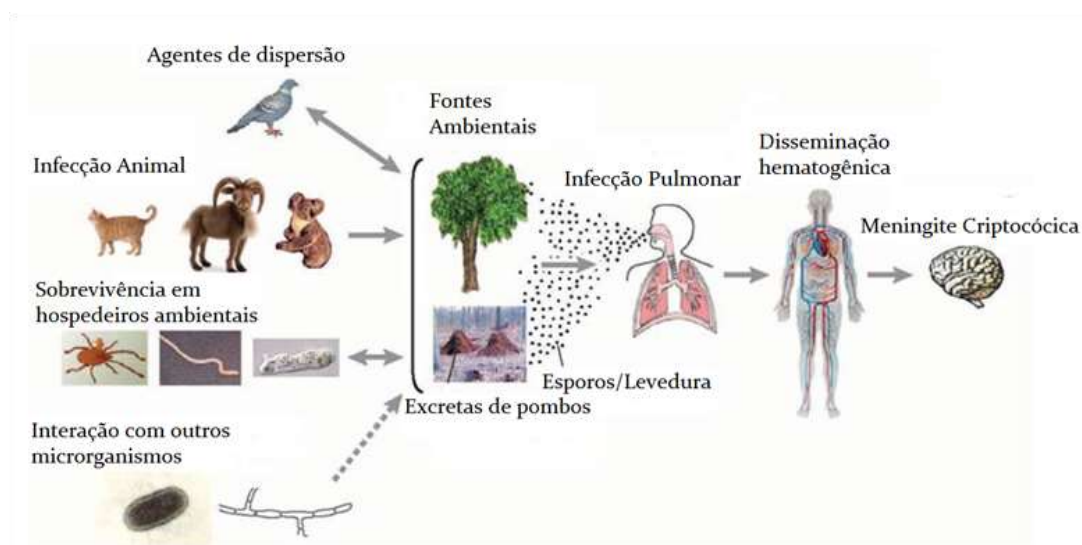


Figura 1: Ciclo infeccioso de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*. A levedura pode ser encontrada no solo ou associada a excretas de pombos e troncos de árvores, podendo infectar hospedeiros de várias espécies distintas, como gatos, cabras e coalas. As células fúngicas podem sobreviver em associação com hospedeiros ambientais como amebas, carrapatos e vermes. Os pombos são considerados a principal forma de dispersão do fungo, e acredita-se que a principal forma de infecção ocorre por inalação de esporos ou levedura dessecadas, que podem estabelecer infecção primária no pulmão e posteriormente sofrer disseminação hematogênica, causando meningite criptocócica. Adaptado de Lin e Heitman, 2006(Lin e Heitman, 2006).

A partir da inalação de células fúngicas, estas se depositam nos alvéolos pulmonares, caracterizando uma infecção pulmonar primária. Esse tipo de infecção pode permanecer latente por longos períodos (Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014), ou pode se manifestar caracterizando uma pneumonia criptocócica em hospedeiros imunocomprometidos. Estes pacientes também apresentam maior propensão à disseminação de células de *C. neoformans* pelo organismo, e essa espécie em especial apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, gerando um quadro de meningite ou meningoencefalite, sendo que o último é a forma invasiva de manifestação clínica mais comum (Velagapudi *et al.*, 2009; Ni, Huang e Cui, 2013).

Contudo, a quantidade de células que entram em contato com o pulmão após inalação, sejam esporos ou leveduras dessecadas, é ínfima, já que a grande maioria é eliminada através de mecanismo do próprio organismo do hospedeiro, como a ação ciliar dos órgãos do sistema respiratório e a turbulência do ar circulante. Os poucos esporos ou leveduras que conseguem atingir o parênquima pulmonar desencadeiam resposta imune, apresentando uma resposta inflamatória caracterizada pela produção de citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), além da presença de células fagocitárias como macrófagos e células dendríticas, neutrófilos e linfócitos (Cheng, Sham e Kronstad, 2009).

O sistema imunológico desempenha papel crucial no controle da infecção por *Cryptococcus sp.*, apresentando ação inicial da imunidade inata com forte atuação das células dendríticas e, principalmente dos macrófagos alveolares; e posterior resposta pela imunidade adaptativa, frente à ação de linfócitos T CD4+. Estudos demonstram que um controle efetivo contra *C. neoformans* dá-se através do balanço entre os tipos Th1 e Th2 de linfócitos T CD4+; as células Th1, devido à produção de citocinas relacionadas com a defesa mediada por fagocitose frente a infecções por agentes intracelulares, e as células Th2 principalmente pela ativação alternativa dos macrófagos através do aumento de outras funções como a síntese de proteínas da matriz extracelular envolvidas no reparo tecidual (Lindell *et al.*, 2006).

A resposta imune desencadeada pode resultar tanto na eliminação das leveduras presente nos alvéolos quando na restrição da infecção, formando um granuloma, neste caso o chamado criptococoma. Esta manifestação geralmente é autolimitada e benigna, sendo os criptococomas formações bem delimitadas, compostos principalmente por células fagocitárias e células gigantes multinucleadas envolvendo as leveduras. As células de *Cryptococcus sp.* apresentam-se intracelular ou extracelularmente em infecções sem a formação de criptococoma, enquanto quando existe tal formação, aparecem no citoplasma das células gigantes ou dos macrófagos (Shibuya *et al.*, 2005). A presença de granulomas não se restringe a pacientes imunocomprometidos, podendo estar presentes em hospedeiros imunocompetentes, e diferentemente dos granulomas formados em infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, os criptococomas são menos inflamatórios e sugerem uma infecção controlada ou latente (Shibuya *et al.*, 2001).

1.4. Macrófagos

Macrófagos são as células do sistema imune especializadas na eliminação de patógenos através de fagocitose; internamente, com o fagolisossomo formado, ocorrem processos de acidificação e degradação enzimática (Kinchen e Ravichandran, 2008; Underhill e Goodridge, 2012). Ainda possuem outras funções, como produção de citocinas e quimiocinas, e apresentação de antígeno (Nicola e Casadevall, 2012). Estas células possuem papel fundamental na imunidade inata, caracterizando a primeira linha de defesa do hospedeiro em vários tipos de infecção, inclusive nas infecções pulmonares (Fan *et al.*, 2005).

Devido à forte ação do sistema imune no tecido pulmonar, as leveduras patogênicas de *Cryptococcus sp.* são fagocitadas por macrófagos alveolares, com a possibilidade de permanecerem em estado de latência por um período extenso de tempo, e caracterizando um quadro de infecção intracelular (Mitchell, 2006; Hagen *et al.*, 2012). As células de *C. neoformans* são capazes de se multiplicar no citoplasma dos macrófagos, podendo causar a ruptura da célula hospedeira e escapando da resposta fungicida. No entanto, existe outra forma de burlar o sistema imune exercida por *C. neoformans*, sem a necessidade de lise da célula hospedeira, dependendo principalmente de condições específicas do fagolisossomo, como por exemplo o pH (Ma *et al.*, 2006; Nicola *et al.*, 2011).

Os macrófagos possuem duas vias de ativação para o desempenho de fagocitose: a via clássica e a via alternativa. Ambas são observadas em modelos experimentais de criptococose, e segundo a literatura, a via de ativação dos macrófagos pode influenciar na sua atividade fungicida (Arora *et al.*, 2011).

A via clássica de ativação dos macrófagos origina-se das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ Th1, as quais reforçam mecanismos de combate a patógenos intracelulares, tais como: geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, produção de proteases e mediadores lipídicos (Laskin *et al.*, 2011). Por exemplo, a geração de espécies reativas como o NO é uma estratégia utilizada para promover a morte de patógenos internalizados, reforçada pela presença de INF- γ (Johnston e May, 2013; Coelho, Bocca e Casadevall, 2014). Esse efeito não é restrito ao modelo em questão, se estendendo para outros patógenos intracelulares como espécies do

protozoário *Leishmania*, evidenciando a importância da ativação de macrófagos pela via clássica (Hölscher *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2013).

Pela via alternativa, a ativação dos macrófagos ocorre através de outras citocinas, como interleucinas IL-4, IL-5, IL-13, produzidas pelos linfócitos T CD4+ Th2. Diferentemente da via clássica, a via alternativa promove ativação pelo aumento de processos celulares relacionados ao reparo tecidual, como o aumento da fibrose e recuperação do tecido lesado. Segundo Flaczyk e colaboradores, IL-33 desempenha importante função na ativação por via alternativa, visto que em modelo murino com deficiência de receptores de IL-33 foi observada que a redução da ativação por essa via gera uma redução na carga fúngica tanto pulmonar quanto no SNC, aumentando a sobrevivência dos animais. Por conseguinte, tais resultados evidenciam que o maior potencial fungicida exercido pelos macrófagos dá-se pela ativação por via clássica, embora seja necessário o equilíbrio entre as duas vias de ativação, visto que uma exerce regulação sobre a outra (Flaczyk *et al.*, 2013).

Alguns fatores de virulência de *Cryptococcus* permitem o escape do estado de ativação dos macrófagos, a fim de garantir a sobrevivência dessas leveduras. A evasão ao sistema imune pode ocorrer através da ação de proteínas do próprio *Cryptococcus* quanto pela utilização de proteínas do hospedeiro. Um exemplo é a produção da enzima lacase, responsável principalmente pela produção de melanina, mas também pela modulação da produção de prostaglandinas (Qiu *et al.*, 2012).

Outra característica importante é a utilização da chamada imunidade nutricional como estratégia dos macrófagos em resposta a patógenos intracelulares. Alguns metais são essenciais para várias funções biológicas desempenhadas tanto pelos macrófagos quanto pelas células de *C. neoformans*, dentre eles já estão bem descritos na literatura principalmente ferro, cobre e zinco (Eide, 2006; Ding *et al.*, 2013). A fim de conter um processo infeccioso, é comum o hospedeiro limitar a disponibilidade de alguns nutrientes como glicose, ou íons metálicos para dificultar o crescimento dos patógenos; ou mesmo reter metais intracelularmente, com o intuito de criar um ambiente tóxico (Cassat e Skaar, 2012; Hood e Skaar, 2012).

Diante disso, as interações patógeno-hospedeiro tornam-se importante objeto de estudo, visto que constituem mecanismos de controle da infecção desenvolvidos pelo hospedeiro para restringir o desenvolvimento fúngico.

1.5. MicroRNA

Alguns RNAs não codificantes (ncRNAs) são importantes reguladores de processos celulares, como defesa do hospedeiro, transcrição, tradução, desenvolvimento, estabilidade e processamento de RNA, entre outros (Carmell *et al.*, 2002; Ding e Voinnet, 2007; Carthew e Sontheimer, 2009; Ghildiyal e Zamore, 2009; Li, Chang e Liu, 2010). Dentre estes ncRNAs, figuram alguns pequenos RNAs (sRNAs), caracterizados por sequências curtas de nucleotídeos (20 – 30 nt), além de estarem envolvidos na regulação da expressão gênica pelo processo de RNA de interferência (RNAi) (Grosshans e Filipowicz, 2008). Em eucariotos, é possível observar-se três variações de pequenos RNAs, conhecidas como: pequenos RNAs de interferência (siRNA); RNAs que interagem com Piwi (piRNA); e os microRNAs (miRNA). As diferentes classificações devem-se a biogênese, processamento, função nas células e padrão de expressão distintos (Grosshans, 2008).

MicroRNAs são mediadores de RNAi e desempenham importante mecanismo de silenciamento de genes. Estes RNAs mostram-se promissores no tratamento de doenças nas quais há expressão exacerbada ou mesmo expressão gênica associada ao seu desenvolvimento. O importante papel desempenhando na regulação da expressão gênica pós-transcricional torna os RNAi objeto de estudo para tratamento de patologias como câncer, doenças genéticas, doenças cardiovasculares, entre outros (Ramachandran e Ignacimuthu, 2013; Uchino, Ochiya e Takeshita, 2013).

Os miRNAs são transcritos a partir de genes miR, cuja localização no genoma é variada, sendo possível encontrar em regiões de íntrons, éxons e regiões intragênicas. A transcrição desses genes gera um RNA precursor de fita simples, o chamado miRNA primário (pri-miRNA). Ainda no núcleo, essa pequena sequência sofre ação do complexo microprocessador, gerando uma estrutura de fita dupla devido a complementariedade entre as bases nitrogenadas constituintes, e sofre clivagem pela enzima Drosha dando origem ao pre-miRNA. O pre-miRNA é por sua vez exportado para o citoplasma com gasto energético, e processado pela enzima Dicer, resultando em um pequeno miRNA dupla fita, sendo uma das fitas direcionada ao complexo silenciador induzido por RNA, o chamado RISC, e a outra fita é degradada. O complexo RISC é composto por várias proteínas, mas sua maior atividade se dá pela proteína Argonata, pois esta carrega o miRNA enquanto é guiada até o RNA

mensageiro (mRNA), permitindo a correta inserção do miRNA ao seu mRNA alvo (Fig. 2) (Faehnle e Joshua-Tor, 2007; Mallory e Vaucheret, 2010).

As células do sistema imune devem passar por uma grande reprogramação da expressão gênica para conter a disseminação do patógeno, e estudos recentes demonstram que a expressão de miRNAs em macrófagos sofre alterações frente a estímulos de patógenos (Chen *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2011; Hardison *et al.*, 2012). Monk e colaboradores avaliaram essa expressão diferencial em um estudo utilizando como patógeno modelo *Candida albicans*, pelo qual foi possível verificar-se um aumento na expressão de certos miRNAs em macrófagos ao longo do tempo observado. Sendo assim, o controle da transcrição via miRNAs pode ser uma forma de controle adicional na ativação da resposta imune de macrófagos (Monk, Hutvagner e Arthur, 2010).

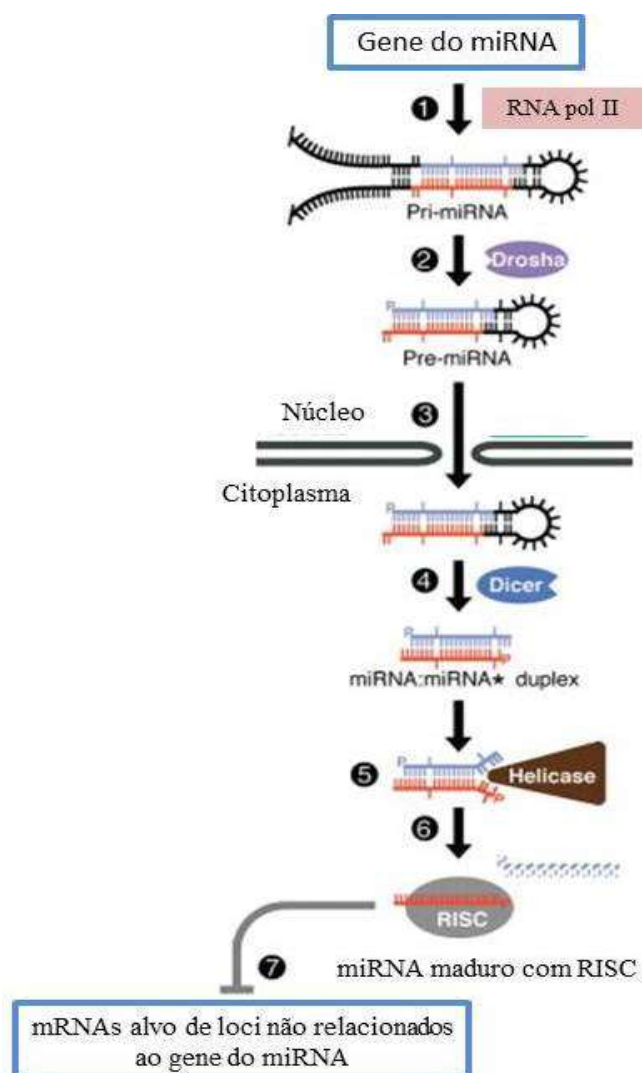


Figura 2: A biogênese do miRNA de animais. A biogênese do miRNA de animais (etapas 1- 6) e o hetero-silenciamento de um loci não relacionado ao gene de origem do miRNA (etapa 7). A etapa 1 caracteriza a transcrição do gene do miRNA pela RNA polimerase II, originando o pri-miRNA, o qual assume conformação secundária pela complementariedade de bases em forma de grampo. Observa-se na etapa 2 a primeira clivagem realizada pela enzima drosha no núcleo, transformando a molécula de pri-miRNA em pre-miRNA; esta então é transportada para o citoplasma com gasto energético (etapa 3), e posteriormente ocorre nova clivagem dessa vez pela enzima dicer, formando uma estrutura curta de RNA dupla fita. As fitas são separadas (etapa 5), sendo uma delas degradada e a outra capturada pelo complexo RISC e carregada pela proteína argonauta até o mRNA alvo (etapa 7). Adaptado de Bartel, 2004.

Visto que uma ligação parcial do miRNA ao seu mRNA alvo já é efetiva, os miRNAs possuem várias sequências alvos, as quais podem estar localizadas em um mesmo gene ou em genes distintos. Vários possuem funções parcialmente sobrepostas, devido à conservação de sequências, possuindo então perfis de alvos similares. Os miRNAs miR-146 e miR-155 encontram-se ativados na resposta antimicrobiana de macrófagos de mamíferos, e estão relacionados a mecanismos da imunidade inata e da resposta inflamatória. Originam-se de distintos loci genômicos, e através de diferentes tipos de processamento, sendo as isoformas a e b do miR146 derivadas respectivamente de um pré-mRNA (miR-146a) e de um íntron de mRNA (miR-146b); e o miR-155 originado de um éxon de um longo RNA não codificador (Schulte, Westermann e Vogel, 2013).

Logo, os miRNAs atuam no citoplasma como importantes reguladores da expressão gênica a nível pós-transcricional, e, normalmente, a ligação do miRNA ao seu mRNA alvo dá-se na região não traduzida (UTR) 3', resultando em uma inibição da tradução, indução da degradação ou desadenilação das sequências alvo (Pillai, Bhattacharyya e Filipowicz, 2007). Frente ao papel imunomodulatório exercido por *C. neoformans* em macrófagos, torna-se necessário avaliar os mecanismos pelo qual se dá esta modulação (Johnston e May, 2013).

Objetivo geral

Analisar a expressão de microRNAs em macrófagos após infecção com o patógeno *Cryptococcus neoformans*, a fim de avaliar possível modulação da resposta imune das células frente à infecção fúngica pelo mecanismo de RNAi.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da indução da expressão dos miRNAs miR146a, miR146b e miR155 em macrófagos por *C. neoformans*;
- Predição de genes alvo comuns aos três miRNAs através de análises de bioinformática;
- Averiguar relação com sistema imune por análises quantitativas baseadas em banco de dados;
- Verificar relações com processos biológicos e as funções dos miRNAs no ambiente intracelular através de análises *in silico*.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Análise de microRNAs diferentemente expressos em macrófagos infectados com *Cryptococcus neoformans*” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *Microbes and Infection*.

Análise de miRNA diferentemente expressos em macrófagos infectados com *Cryptococcus neoformans*.

Analysis of differentially expressed miRNA in macrophages infected by Cryptococcus neoformans.

Ane Wichine Acosta Garcia^a, Alícia Corbellini Piffer^a, Francine Melise dos Santos^{a,c}, Rafael de Oliveira Schneider^{a,c}, Livia Kmetzsch^{a,b,c}, Marilene Henning Vainstein^{a,b,c}, Charley Christian Staats^{a,b,c,*}.

^aCentro de Biotecnologia e ^bDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

(*) Correspondência: Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 220. Caixa Postal 15005.

Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Telefone +55 51 3308 6091; Fax +55 51 3308 7309.

E-mail: staats@cbiot.ufrgs.br

Resumo

A levedura *Cryptococcus neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose, caracterizada por uma infecção pulmonar primária, com a possibilidade de disseminação pelo organismo do hospedeiro, causando meningoencefalite. A fagocitose exercida pelos macrófagos alveolares é a principal linha de defesa pulmonar do hospedeiro contra criptococose. A reprogramação da expressão gênica nessas células é necessária para a contenção da disseminação do patógeno, e pode ser modulada por microRNAs como miR-146 miR-155. Através de qRT-PCR, nós observamos que em condições de infecção com *Cryptococcus neoformans* morto por calor, houve um aumento da expressão dos microRNAs, não observado com patógeno vivo, sugerindo uma modulação exercida pela levedura na reposta imune. Os níveis

de expressão de miR-146a e miR-155 apresentaram diminuição ao longo do tempo, sugerindo uma resposta imediata de aumento da expressão que posteriormente é revertida. A predição de genes alvo para validação dos resultados revelou uma grande diversidade de alvos, sendo observado ainda um enriquecimento dos sítios de reconhecimento em genes associados à resposta imune, sugerindo forte modulação por parte destes miRNAs nesses genes.

Abstract

Cryptococcus neoformans is the main etiological agent of cryptococcosis, a disease characterized by a primary lung infection that may disseminate to the whole organism leading to meningoencephalitis. The alveolar macrophage phagocytosis is the major host pulmonary defense against cryptococcosis. These cells must alter their gene expression in order to limit the dissemination of the pathogen and this can be achieved by the modulation of microRNAs expression, such as miR-146 and miR-155. Here, employing qRT-PCR, we observed an increase in the expression of miR-146 and miR-155 in macrophages exposed to heat-killed *C. neoformans*. The same was not observed when the macrophages were infected with the pathogen alive. These findings imply that the yeast cells promote a modulation of the immune response in the alveolar phagocytes. Also, the expression levels of miR-146 and miR-155 decreased with time, suggesting an immediate response that is subsequently reversed. Moreover, we performed a prediction of target genes in order to evaluate our primary results. It led us to a large plethora of genes. We also verified enrichment for sites of miRNA hybridization in target genes related to the immunity, which suggests a strong modulation of these microRNAs in those sites.

2.1. Introdução

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são conhecidas como causadoras de infecções fúngicas de maneira oportunista, acometendo pacientes imunocomprometidos, e os principais agentes etiológicos são: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Pacientes que são submetidos à terapia imunossupressora devido a transplante de órgãos, quimioterapia ou doença autoimune, e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), são mais propensos à infecção por *C. neoformans*, enquanto infecções por *C. gattii* também podem ocorrer em imunocompetentes [1]. A maior parte dos casos relatados deve-se a infecção por *C. neoformans*, que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, atingindo pessoas de diferentes localizações no mundo inteiro [2-5].

A infecção ocorre via inalação de células fúngicas, geralmente esporos ou leveduras dessecadas, as quais se depositam nos alvéolos pulmonares, caracterizando uma infecção pulmonar primária. Esse tipo de infecção pode permanecer latente por longos períodos de tempo [6], ou pode se manifestar caracterizando uma pneumonia criptocócica em hospedeiros imunocomprometidos. Estes pacientes também apresentam maior propensão à disseminação de células de *C. neoformans* pelo organismo, visto que esta espécie apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, gerando um quadro de meningite ou meningoencefalite [7, 8]. No entanto, a quantidade de células que entram em contato com o pulmão do hospedeiro após inalação, sejam esporos ou leveduras dessecadas, é muito pequena, já que a grande maioria é eliminada através de mecanismos como a ação ciliar dos órgãos do sistema respiratório e a turbulência do ar circulante.

Os raros esporos ou leveduras que conseguem atingir o parênquima pulmonar desencadeiam resposta imune, apresentando uma resposta inflamatória caracterizada pela produção de citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), além da presença de células fagocitárias como macrófagos e células dendríticas, neutrófilos e linfócitos [9]. Esta resposta imune desencadeada pode resultar tanto na eliminação das leveduras presente nos alvéolos quando na restrição da infecção, formando um granuloma, neste caso o chamado criptococoma. Devido à forte ação do sistema imune no tecido pulmonar, as leveduras patogênicas de *Cryptococcus sp.* são fagocitadas por macrófagos alveolares, com a possibilidades de permanecerem em estado de latência por um período extenso de tempo,

caracterizando assim um quadro de infecção intracelular [10, 11]. Nesse aspecto, as interações patógeno-hospedeiro tornam-se importante objeto de estudo, visto que constituem mecanismos de controle da infecção desenvolvidos pelo hospedeiro para restringir o desenvolvimento fúngico. Diante disso, as células do sistema imune devem passar por uma grande reprogramação da expressão gênica para conter a disseminação do patógeno [12-14]. Recentemente, foi descrito que a expressão de microRNAs (miRNAs) em macrófagos também podem sofrer expressão diferencial em resposta a estímulos de patógenos, sugerindo ser uma forma de controle adicional na ativação da resposta imune de macrófagos [15].

MiRNAs são mediadores do RNA de interferência (RNAi), importante mecanismo de silenciamento de genes. O papel essencial desempenhando na regulação da expressão gênica pós-transcricional torna os RNAi objeto de estudo para tratamento de patologias como câncer, doenças genéticas, doenças cardiovasculares, entre outros [16, 17]. Os miRNAs são caracterizados por uma sequência curta de nucleotídeos (20 – 30 nt), e são transcritos a partir de genes de miR, cuja localização no genoma é variada, sendo possível encontrar em regiões de íntrons, éxons e regiões intragênicas. Após processamento inicial, são transportados do núcleo para o citoplasma na forma de pré-miRNA, e então sofrem modificações até tornarem-se moléculas curtas de RNA dupla fita maduras [18, 19].

Os miRNAs atuam no citoplasma, como importantes reguladores da expressão gênica a nível pós-transcricional, pela ligação do miRNA ao seu mRNA alvo na região não traduzida (UTR) 3', resultando em uma inibição da tradução, indução da degradação ou desadenilação das sequências alvo [20]. Frente ao papel imunomodulatório exercido por *C. neoformans* em macrófagos, torna-se necessário avaliar os mecanismos pelos quais dá-se esta modulação [21]. Neste contexto, os miRNAs miR-146 e miR-155 encontram-se ativados na resposta antimicrobiana de macrófagos de mamíferos, e estão relacionados a mecanismos da imunidade inata e da resposta inflamatória [22]. O presente estudo visa analisar a expressão dos miRNAs miR-146, isoformas a e b, e miR-155 em macrófagos após infecção com o patógeno *C. neoformans*, a fim de avaliar possível modulação da resposta imune das células frente à infecção fúngica pelo mecanismo de RNAi.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Linhagens celulares, microrganismos e cultivos

Os experimentos foram realizados utilizando a linhagem celular de macrófagos peritoneais murinos J774.1 em meio DMEM (Invitrogen) acrescido de soro fetal bovino (10%) e complementado com 1% de piruvato de sódio (100 mM), 1% de L-glutamina (200 mM), 1% de tampão HEPES, 1% de MEM (aminoácidos não essenciais), penicilina e estreptomicina 20 µg/mL. O cultivo celular foi mantido incubado a 37°C em ambiente umidificado contendo CO₂ (7,5%).

Para a infecção dos macrófagos, foi utilizada a linhagem H99 de *C. neoformans*, previamente cultivada em meio líquido YPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura) e incubada à temperatura de 30°C em plataforma giratória (200 rpm).

2.2.2. Interação entre macrófagos e *C. neoformans*

A fim de avaliar a expressão de microRNAs dos macrófagos em resposta a infecção por *C. neoformans*, foram realizados ensaios de fagocitose, sendo os co-cultivos incubados por dois períodos distintos: 4 e 24 h. Em placas de 12 poços contendo DMEM, foram cultivados 5×10^7 células de macrófagos J774.1 pelo período de 24 h, no qual essa quantidade é duplicada, resultando em 1×10^6 células. As células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, posteriormente submetidas a centrifugação e lavagem com PBS; após contagem em câmara de Neubauer, as células foram diluídas em DMEM complementado para posterior adição nos poços respectivos a cada condição de estudo. Para a condição de *C. neoformans* morto por calor, as células foram submetidas à temperatura de 50°C por 30 minutos. A fim de manter a proporção de 1:1 entre as células de *C. neoformans* e macrófagos, os experimentos foram realizados utilizando 1×10^6 células de levedura. Os experimentos foram realizados em triplicata e as condições observadas foram as seguintes: controle, composto exclusivamente de células de macrófagos; *C. neoformans*, composta pela interação de células vivas da levedura com as células de macrófagos; e *C. neoformans* morto por calor (*C. neoformans* MC), composta pela interação de células mortas de *C. neoformans* e macrófagos.

2.2.3. Extração e quantificação de RNA

Ao final dos tempos de interação, a monocamada celular foi lavada 3 vezes com PBS e lisada pela adição de TRIzol®(Life Technologies), seguido do protocolo de extração de RNA conforme recomendações do fabricante. A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e a quantificação do RNA foi realizada através do sistema QuBit (Life Technologies), conforme recomendações do fabricante.

2.2.4. qRT-PCR

Com o intuito de avaliar a expressão dos microRNAs miR-146a, miR-146b e miR-155 após a interação entre células de macrófagos e *C. neoformans* nos tempos de 4 horas e 24 horas, foi realizada a síntese de cDNA e posterior PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para cada miRNA de estudo. A síntese de cDNA dos miRNAs foi realizada por *stem-loop RT-PCR*, conforme descrito previamente [15]. Como normalizador, foram utilizados os transcritos relativos ao snRNP U6. Os protocolos utilizados para síntese do cDNA do normalizador U6, para a PCR em tempo real e para a quantificação dos níveis relativos de expressão dos miRNAs de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$ seguiram a metodologia já descrita e estabelecida no laboratório [23].

2.2.5. Predição dos genes alvo dos microRNAs

Com a finalidade de estabelecer uma visão global da influência dos miRNAs de estudo em células do sistema imune, foi realizada uma busca no banco de dados MicroRNA (www.microrna.org) tendo como base a última análise, realizada em agosto de 2010. Em uma busca pelos dados referentes a *Mus musculus* para os miRNAs conservados miR-146a e miR-155 e para o miRNA não conservado miR-146b, obtivemos informações a respeito dos mRNAs reconhecidos por estes miRNAs, as quais foram relacionadas aos dados de anotação funcional de ontologias gênicas (*Gene Ontology*) presentes no banco de dados *Mouse Genome Informatics* (MGI - <http://www.informatics.jax.org>) [24]. Ao refinar a busca para produtos relacionados à resposta imune (GO:0006955), foram listados os produtos gênicos alvo referentes aos miRNAs individualmente, além de se obter genes comumente regulados.

2.2.6. Análises Bioinformáticas

A partir dos dados obtidos pelas análises dos genes regulados pelos miRNAs miR-146a, miR-146b e miR-155, foram realizadas análises pelo servidor GOrilla, o qual serve como ferramenta para a identificação e visualização de termos obtidos pelo *Gene Ontology*, permitindo uma classificação da lista de genes de interesse quanto ao processo envolvido no organismo ou conforme função intracelular desempenhada, utilizando como critério $p < 10^{-3}$ [25].

Para a visualização do número de genes relacionados a cada miRNA de estudo, foi gerado um diagrama de Venn, desenvolvido através do servidor *Venny* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.) [26].

2.2.7. Análises Estatísticas

Através dos experimentos realizados, obtivemos os valores utilizados para análise estatística. Estes foram expressos pela média das replicatas \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por *Student t test* utilizando o software *GraphPadPrism6*, pelo qual também foram gerados os gráficos para visualização dos resultados.

2.3. Resultados

Para avaliar se ocorre modulação da expressão dos miRNAs 146 (isoformas A e B), assim como do miRNA 155 em macrófagos murinos expostos à levedura *C. neoformans*, empregamos qRT-PCR associado à síntese de cDNA por *Steem-loop* [15]. A partir da análise dos dados obtidos, não foi possível observar diferenças significativas nos níveis de expressão dos miRNAs analisados nos macrófagos comparando-se as condições controle e infectados com *C. neoformans* após interação patógeno-hospedeiro pelo período de 4 horas (Fig.1A). Entretanto, observa-se diferença estatística significativa entre as condições de infecção testadas utilizando o patógeno vivo ou morto por calor nos três miRNAs testados, caracterizada pelo aumento da expressão dos miRNAs na condição *C. neoformans* MC. Observou-se também um aumento nos níveis relativos de transcritos da condição *C. neoformans* MC quando comparada à condição controle, composta somente por macrófagos, nos miRNAs miR146b e miR155 (Fig.1A). Tais resultados demonstram que ocorre uma intensa modulação na expressão de miRNAs quando células vivas de *C. neoformans* são incubadas com macrófagos comparativamente a células mortas de *C. neoformans*, sugerindo que moléculas produzidas por células da levedura metabolicamente ativas podem estar modulando a expressão destes miRNAs e, conseqüentemente, a resposta imune.

Frente ao aumento significativo da expressão destes miRNAs quando incubados com células de *C. neoformans* mortas por calor, foram realizados ensaios de fagocitose, utilizando um período maior de incubação, a fim de determinar se o mesmo perfil de expressão era mantido. Não foi possível observar diferenças nos níveis de expressão dos miRNAs nos macrófagos, quando comparadas as condições controle e incubados com *C. neoformans* MC no período de incubação de 24 horas (Fig.1B). Estas análises foram restritas ao estudo da interação *C. neoformans* MC:macrófagos, pois não possível extrair RNA de qualidade de macrófagos após interação de 24 h com células metabolicamente ativas da levedura.

A análise comparativa entre os níveis relativos de transcritos dos diferentes miRNAs presentes nos dois tempos de interação revelou que, conforme o aumento do tempo de incubação de células de macrófagos com células inativadas de *C. neoformans*, os miRNAs miR-146a (Fig.2A) e miR-155 (Fig.2C) sofreram uma redução dos níveis de transcritos. Estes resultados sugerem que ocorre uma adaptação

da expressão dos miRNAs, no qual como resposta imediata é visto um aumento da expressão, seguido de uma diminuição semelhante aos níveis observados no controle. Tal resultado não foi reproduzido no miR-146b (Fig.2B), o qual inclusive apresenta uma tendência a aumento da expressão com o aumento do período de incubação, contudo são necessários maiores estudos para confirmação deste dado.

A fim de obter-se uma visão geral da influência destes microRNAs em células do sistema imune, foram realizadas análises com base no banco de dados MicroRNA, posteriormente relacionando ao modelo murino utilizado no estudo. Partindo dos produtos gênicos que apresentavam a anotação relacionado à resposta imune, foram detectados diversos genes reconhecidos por cada um dos três microRNAs (Tabela 1). Verificou-se que esses miRNAs apresentam número elevado de sítios alvo totais, sendo que o miR-146a e o miR-155 exibem perfil semelhante, com número total de alvos maior aos elucidados pelo miR-146b, refletido também no número de genes associados à resposta imune correspondentes (Tabela 1). Em seguida, os genes referentes à resposta imune encontrados para cada miRNA foram relacionados com a identificação dos respectivos produtos gênicos (Tabelas S1-S3). Observou-se a prevalência de citocinas da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral, quimiocinas e interleucinas, além de outras proteínas relacionadas à sinalização para processos celulares.

Para avaliação quantitativa das relações entre os genes regulados pelos miRNAs, foram construídos dois diagramas de Venn: para genes totais e apenas para genes relacionados à resposta imune. A análise relacionada aos genes alvo totais evidenciou uma sobreposição de regulação entre todos os miRNAs de estudo, sendo que a maior sobreposição é apresentada entre miR-146a e miR-155, totalizando 672 genes em comum. Além disso, os três miRNAs apresentam regulação gênica em comum de 74 genes (Fig.3A). Já para os genes relacionados à imunidade, a sobreposição de regulação é reduzida, inclusive não foi possível a observação de alvos que recebessem regulação tanto por miR-146b quanto por miR-155. Apenas um gene mostrou ser regulado pelos três miRNAs de estudo (Fig.3B). A partir de análise de enriquecimento, chegamos ao gene da ectodisplasina A (Eda), o qual origina uma proteína transmembrana membro da superfamília do fator de necrose tumoral.

Diante disso, analisamos as relações referentes ao número de sítios alvo presentes para cada miRNA e sua respectiva quantidade de genes alvo. A fim de avaliar se existe uma regulação relevante da resposta imune exercida por esses

miRNAs, foram gerados gráficos referentes ao número de sítios e genes alvo totais e restritos à resposta imune. Sabe-se que um mRNA pode sofrer regulação por miRNA de diferentes maneiras, já que a sequência pode conter mais de um sítio de ligação. Considerando essa informação, observa-se uma vasta quantidade de sítios alvo frente ao número de genes alvo totais para os miRNAs de estudo. Os miRNAs miR-146a e miR-155 apresentam proporções semelhantes em ambas medidas analisadas. Embora o número de genes alvo totais do miR-146-b seja menor que dos outros dois miRNAs analisados, é possível verificar elevada quantidade de sítios alvo, evidenciando uma forte regulação gênica pela presença de vários sítios alvo em um mesmo mRNA (Fig.4A). Ao que refere-se à avaliação das relações com a resposta imune, notou-se uma proporção similar mantida entre número de genes e sítios alvo nos três miRNAs analisados, e mais uma vez foi observado o mesmo perfil entre miR-146a e miR-155 (Fig.4B). Ao calcularmos a razão entre o número de sítios e genes alvo, comparamos os dados para quantidades totais e as quantidades encontradas relacionadas à resposta imune (Fig.4C). A respeito dos dados totais, a razão se mantém bastante semelhante entre os três miRNAs; no entanto, mais baixa do que a razão apresentada pelos dados relacionados à imunidade, sugerindo que existe uma forte modulação exercida por estes miRNAs na resposta imune. Dentre os miRNAs, a maior razão foi apresentada pelo miR-146b.

Adicionalmente, foram realizadas análises com base nos genes que são regulados por cada um dos miRNAs, a fim de obter-se uma noção das funções desempenhadas por esses genes no ambiente intracelular, além de relacionar os processos biológicos aos quais fazem parte para ser possível uma melhor compreensão das vias que sofrem regulação por estes miRNAs. Não foi possível realizar as análises para o miR-146b; contudo, o miR-146a apresentou resultados referentes aos processos envolvidos, partindo de processos mais abrangentes como processo celular e processo de organismo único, resultando na regulação específica de processos do ciclo celular (Fig.5A). Para o miR-155, foi possível gerar dois diagramas, um referente aos processos e outro às funções envolvidas. Os resultados apresentados pelo diagrama de funções (Fig.5B) apresenta como base a função molecular, resultando na função específica de ligação a ácidos nucleicos. Já o diagrama de processos (Fig.6), relaciona uma grande variedade de termos, partindo de duas vertentes principais: processo celular e processo metabólico. Relacionado principalmente a processos metabólicos e de biossíntese, é o miRNA que apresentou

maior abrangência em termos de processos, resultando no exclusivo processo metabólico de RNA.

Tais análises sugerem que os miRNAs abordados neste trabalho estão amplamente relacionados a vários aspectos celulares, promovendo regulação por diferentes mecanismos conforme necessidade celular.

2.4. Discussão

No presente estudo, foi possível elucidar pontos da modulação exercida pelos miRNAs miR-146, isoformas a e b, e miR-155, secretados por macrófagos após infecção com o patógeno *C. neoformans*. Estes miRNAs apresentam forte associação à imunomodulação, ligados à imunidade inata e exercendo o controle da resposta inflamatória em diferentes níveis. Através de diversas funções, eles ajustam os limites máximos e mínimos da resposta inflamatória de macrófagos a patógenos [22]. O fator de transcrição NFκB é reportado com importância quando se trata da regulação efetuada pelos miR-146 a e b sobre processos inflamatórios, que pode ser devido a atenuação de sinalização de citocinas via NFκB [27]. Já o miRNA miR-155 afeta fortemente as vias de sinalização pró-inflamatórias, sendo propostos dois mecanismos: por repressão da rota de amplificação da sinalização autócrina/parácrina de TNFα, a qual é parte integrante desse tipo de resposta em macrófagos; ou por reforçar a produção de TNFα através da estabilização do seu mRNA [28, 29].

Os níveis reduzidos de todos os miRNAs na condição de infecção com células de *C. neoformans* vivas, contrários aos apresentados pelas leveduras inativadas por calor infere que as células vivas possuem mecanismos de defesa contra a estimulação do sistema imune induzida por estes miRNAs no período de incubação de 4 horas. As modificações físicas da parede celular e dos receptores de superfície celular após tratamento com calor, associadas à inativação metabólica das leveduras propiciaram um aumento na expressão dos miRNAs em macrófagos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias para estimular ativação de mais células fagocíticas. Na condição de infecção com células vivas, os níveis de miRNAs apresentam redução, sugerindo mais um mecanismo de evasão do sistema imune apresentado por *C. neoformans*. Provavelmente, as células metabolicamente ativas produzem moléculas que interferem a produção ou induzem a degradação dos miRNAs. Já foi descrito em estudos anteriores que a síntese destes três miRNAs é dependente do fator de transcrição pró-inflamatório NFκB [30, 31], portanto, esta via pode ser o alvo da modulação exercida pela levedura; contudo, são necessários mais estudos para melhor compreensão desses mecanismos.

Estudos demonstram que esses miRNAs apresentam alteração de expressão em resposta à infecção de diferentes patógenos. Grande parte dos estudos relaciona imunidade frente a infecções bacterianas, como por *Staphylococcus aureus*, no qual

miR-155, que possui caráter inflamatório, apresentou-se superexpresso nas células imunes do infiltrado pulmonar após exposição por inalação da enterotoxina B bacteriana, resultando em doença inflamatória pulmonar aguda [32]. Tanto miR-155 quanto miR-146a também apresentam envolvimento no que diz respeito aos mecanismos do patógeno para escapar da resposta imune, como ocorre na infecção por *Helicobacter pylori*, no qual estes miRNAs agem como fator de virulência da bactéria, atenuando a resposta inflamatória por diminuição da ativação de NFκB [33].

Vários miRNAs são corregulados durante o mesmo processo fisiológico e co-induzidos em vários tipos celulares em resposta a estímulos. Nesse caso, os miRNAs miR-146a e miR-155 apresentaram comportamento semelhante, sofrendo redução dos níveis de expressão ao longo do tempo; em contrapartida, o miR-146b apresentou uma tendência a aumento ao decorrer do tempo de observação. Pouco se sabe sobre a ação dos miRNAs em fungos, no entanto, estudos com outros modelos de infecção, utilizando diferentes microrganismos, apresentam resultado semelhante, mostrando os miRNAs miR-146a e miR-155 sofrendo o mesmo tipo de modulação. Essa co-indução já foi vista em protozoários como *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo apicomplexa [34], e em vírus como Epstein-Barr (herpesvírus humano do tipo IV) [31]. Além disso, esse dois miRNAs apresentam semelhanças quantitativas totais, e compartilham grande quantidade de genes alvo, corroborando com a ocorrência de co-indução entre eles. Este perfil de expressão mais semelhante entre esses dois miRNAs em comparação ao miR-146b pode ser devido ao fato de que ambos fazem parte dos miRNAs considerados conservados, enquanto o miR-146b é do grupo de miRNAs não conservados.

O gene que codifica para a Ectodisplasina A (Eda), resultante das análises de bioinformática como possivelmente corregulado pelos três miRNAs de estudo, é responsável por codificar uma proteína transmembrana membro da superfamília do fator de necrose tumoral [35]. Normalmente, os membros dessa superfamília estão fortemente relacionados à regulação de mecanismos de defesa do hospedeiro, como imunidade e inflamação; além de apresentar efeito pleiotrópico, atuando em eventos celulares como sobrevivência, diferenciação, proliferação e morte celular [36, 37]. A ectodisplasina, em especial, possui importante função no desenvolvimento típico de órgãos derivados do ectoderma no período fetal, diferenciando-se dos outros membros por modificações estruturais que lhe conferem atividade biológica. Esta modificação é caracterizada pela presença de duas pequenas regiões do tipo colágeno, e sabe-se que

esse gene apresenta *splicing* alternativo. O papel pleiotrópico do gene leva ao recrutamento de diferentes proteínas intracelulares, e inclusive à ativação de vias de sinalização como a via de NFκB [38]. Diante disso, a validação dos resultados pode nos fornecer informações mais precisas da função dos miRNAs de estudo.

MiRNAs são importantes moduladores em processos do desenvolvimento e fisiológicos, incluindo homeostasia energética, metabolismo de lipídeos[39]. No entanto, o papel desses miRNAs também tem sido associado a diversas patologias como câncer, doenças metabólicas, além de apresentarem relação com processos de contenção de infecções. Tanto miR-146a quanto miR-146b estão envolvidos em vários estudos com diferentes tipos de linhagens tumorais, como cânceres de tireóide, pulmão, pâncreas e mama [40]. MiR-155 apresenta-se superexpresso em diferentes tumores, como linfoma difuso de células B e tipos severos de adenocarcinoma [41]. Essa amplitude de processos envolvidos deve-se às diferentes rotas que esses miRNAs podem influenciar. Como mostramos, os processos celulares e metabólicos nos quais os miRNAs desempenham modulação são fundamentais para o bom funcionamento da célula, portanto, é necessária uma rigorosa regulação a fim de garantir que as vias de sinalização e as rotas metabólicas não sofram desvios. Por isso, cada miRNA é responsivo a diferentes mRNAs, e são expressos conforme estímulo.

2.5. Conclusão

Conforme as análises efetuadas no presente estudo, nós observamos que há possibilidade da levedura exercer uma modulação na expressão dos miRNAs de macrófagos miR-146a, miR-146b e miR-155, e, conseqüentemente, na resposta imune. Também foi possível visualizar uma resposta imediata de aumento da expressão dos miR-146a e miR-155, a qual é revertida ao longo do tempo. Estes dados, juntamente às análises de bioinformática efetuadas sugerem uma forte modulação exercida por esses microRNAs na resposta imune, embora estejam envolvidos nos mais diversos processos celulares e metabólicos. Em conclusão, estes miRNAs se apresentaram importantes na indução da imunidade inata e processos pró-inflamatórios, sendo um possível alvo terapêutico para criptococose, a fim de impedir o estabelecimento da fase de infecção intracelular e proliferação da levedura.

2.6. Referências Bibliográficas

- [1] Pappas PG, Lessons learned in the multistate fungal infection outbreak in the United States, *Curr Opin Infect Dis* 26 (2013) 545-550.
- [2] Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J, Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box, *Nat Rev Microbiol* 9 (2011) 193-203.
- [3] Byrnes EJ, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, Carter DA, Chaturvedi V, Bildfell RJ, May RC, Heitman J, Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States, *PLoS Pathog* 6 (2010) e1000850.
- [4] Byrnes EJ, Bildfell RJ, Frank SA, Mitchell TG, Marr KA, Heitman J, Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States, *J Infect Dis* 199 (2009) 1081-1086.
- [5] Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST, *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America, *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009 (2009) 840452.
- [6] Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL, *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen, *Yeast* 31 (2014) 47-60.
- [7] Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J, Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*, *Infect Immun* 77 (2009) 4345-4355.
- [8] Ni W, Huang Q, Cui J, Disseminated cryptococcosis initially presenting as cellulitis in a patient suffering from nephrotic syndrome, *BMC Nephrol* 14 (2013) 20.
- [9] Cheng PY, Sham A, Kronstad JW, *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*, *Infect Immun* 77 (2009) 4284-4294.
- [10] Mitchell AP, Cryptococcal virulence: beyond the usual suspects, *J Clin Invest* 116 (2006) 1481-1483.
- [11] Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, Torres-Rodriguez JM, Cogliati M, Velegraiki A, Burggraaf A, Kamermans A, Sweere JM, Meis JF, Klaassen CH, Boekhout T, Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe, *Emerg Infect Dis* 18 (2012) 1618-1624.
- [12] Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL, Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation, *J Immunol* 189 (2012) 4060-4068.
- [13] Chen F, Ding X, Ding Y, Xiang Z, Li X, Ghosh D, Schurig GG, Sriranganathan N, Boyle SM, He Y, Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain, *Infect Immun* 79 (2011) 2460-2469.
- [14] Jensen KD, Wang Y, Wojno ED, Shastri AJ, Hu K, Cornel L, Boedec E, Ong YC, Chien YH, Hunter CA, Boothroyd JC, Saeij JP, *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation, *Cell Host Microbe* 9 (2011) 472-483.
- [15] Monk CE, Hutvagner G, Arthur JS, Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*, *PLoS One* 5 (2010) e13669.

- [16] Uchino K, Ochiya T, Takeshita F, RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment, *Jpn J Clin Oncol* 43 (2013) 596-607.
- [17] Ramachandran PV, Ignacimuthu S, RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool, *Appl Biochem Biotechnol* 169 (2013) 1774-1789.
- [18] Faehnle CR, Joshua-Tor L, Argonautes confront new small RNAs, *Curr Opin Chem Biol* 11 (2007) 569-577.
- [19] Mallory A, Vaucheret H, Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins, *Plant Cell* 22 (2010) 3879-3889.
- [20] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W, Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?, *Trends Cell Biol* 17 (2007) 118-126.
- [21] Johnston SA, May RC, *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen, *Cell Microbiol* 15 (2013) 403-411.
- [22] Schulte LN, Westermann AJ, Vogel J, Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing, *Nucleic Acids Res* 41 (2013) 542-553.
- [23] Schneider ReO, Fogaça NeS, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC, Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*, *PLoS One* 7 (2012) e43773.
- [24] Blake JA, Bult CJ, Eppig JT, Kadin JA, Richardson JE, Group MGD, The Mouse Genome Database: integration of and access to knowledge about the laboratory mouse, *Nucleic Acids Res* 42 (2014) D810-817.
- [25] Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z, GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists, *BMC Bioinformatics* 10 (2009) 48.
- [26] Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W, BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams, *BMC Genomics* 9 (2008) 488.
- [27] Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Jaworski C, Duncan T, Cameron JE, Flemington EK, Hooks JJ, Redmond TM, Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ , *Mol Vis* 19 (2013) 737-750.
- [28] Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock, *J Immunol* 179 (2007) 5082-5089.
- [29] Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frendewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Supprian M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K, Regulation of the germinal center response by microRNA-155, *Science* 316 (2007) 604-608.
- [30] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D, 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* 103 (2006) 12481-12486.
- [31] Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grässer FA, Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a, *RNA Biol* 4 (2007) 131-137.
- [32] Rao R, Nagarkatti P, Nagarkatti M, *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB) - induced microRNA-155 targets suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) to promote acute inflammatory lung injury, *Infect Immun* (2014).

- [33] Cadamuro AC, Rossi AF, Maniezzo NM, Silva AE, *Helicobacter pylori* infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs, *World J Gastroenterol* 20 (2014) 1424-1437.
- [34] Cannella D, Brenier-Pinchart MP, Braun L, van Rooyen JM, Bougdour A, Bastien O, Behnke MS, Curt RL, Curt A, Saeij JP, Sibley LD, Pelloux H, Hakimi MA, miR-146a and miR-155 delineate a MicroRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain, *Cell Rep* 6 (2014) 928-937.
- [35] Kowalczyk-Quintas C, Schneider P, Ectodysplasin A (EDA) - EDA receptor signalling and its pharmacological modulation, *Cytokine Growth Factor Rev* 25 (2014) 195-203.
- [36] Jarpe MB, Widmann C, Knall C, Schlesinger TK, Gibson S, Yujiri T, Fanger GR, Gelfand EW, Johnson GL, Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death, *Oncogene* 17 (1998) 1475-1482.
- [37] Baker SJ, Reddy EP, Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily, *Oncogene* 17 (1998) 3261-3270.
- [38] Koppinen P, Pispä J, Laurikkala J, Thesleff I, Mikkola ML, Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar, *Exp Cell Res* 269 (2001) 180-192.
- [39] Ahn J, Lee H, Jung CH, Jeon TI, Ha TY, MicroRNA-146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade, *EMBO Mol Med* 5 (2013) 1602-1612.
- [40] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC, Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells, *Oncogene* 27 (2008) 5643-5647.
- [41] Tili E, Croce CM, Michaille JJ, miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer, *Int Rev Immunol* 28 (2009) 264-284.

2.7. Tabelas

Tabela 1:Produtos gênicos reconhecidos pelos microRNAs miR146a, miR146b e miR155 em camundongo.Representação quantitativa dos sítios alvo relacionados a cada miRNA de estudo, com o respectivo número de genes que estão relacionados à resposta imune segundo dados obtidos pelo *Gene Ontology* (GO:0006955).

microRNA	Sítios alvo totais	Genes alvo associados à resposta imune
miR-146a	42.603	34
miR-146b	18.314	8
miR-155	41.515	27

2.8. Legendas de Figuras

Figura 1:Análise dos níveis relativos de transcritos de miRNAs empregando qRT-PCR após 4 horas e 24 horas de interação entre macrófagos J774.1A e *C. neoformans* H99. (A) No tempo de 4 horas observa-se que houve diferença na expressão dos três microRNAs analisados nas condições propostas. Todos apresentaram expressão diferenciada nas condições com a presença de *C. neoformans*, sendo detectados níveis de transcritos mais elevados na condição da infecção com patógeno inativado por calor (*C. neoformans* MC). Os microRNAs miR-146b e miR-155 também apresentaram diferença significativa quando comparadas as condições controle e *C. neoformans* MC, o que sugere que os macrófagos possuem mecanismos de modulação por RNAi diferenciados conforme a condição de infecção fúngica imposta. (B) Os níveis de transcritos não apresentaram diferença estatística significativa entre as condições controle e *C. neoformans* MC, contudo, é possível observar que entre os microRNAs analisados, o miR146b apresentou maior expressão em ambas condições quando comparado aos demais. As barras representam as médias e desvio padrão obtidos a partir de 3 réplicas técnicas de 3 réplicas biológicas. Expressão relativa baseada em $2^{-\Delta Ct}$ a partir de dados do normalizador snRNP U6.A análise estatística foi realizada por *Student t test*: (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.001$.

Figura 2: Avaliação comparativa da expressão do microRNAs nas condições utilizadas no experimento de interação em relação aos tempos observados. (A) miR146a na condição *C. neoformans* MC apresentou redução significativa nos níveis relativos de transcritos quando comparado os níveis observados na interação de 4 horas com os níveis de transcritos na interação de 24 horas. (B) Para o miR146, não houve diferença estatística entre os tempos de interação de 4 horas e 24 horas analisados no presente estudo. (C) É possível observar-se uma redução estatisticamente relevante nos níveis relativos de transcritos do miR155 na condição *C. neoformans* morto por calor (MC) quando comparados os níveis observados na interação de 4 horas com os níveis de transcritos na interação de 24 horas. As barras representam as médias e desvio padrão obtidos a partir de 3 réplicas técnicas de 3 réplicas biológicas. Expressão relativa baseada em $2^{-\Delta Ct}$ a partir de dados do normalizador snRNP U6. A análise estatística foi realizada por *Student t test*: (*) $p < 0.05$.

Figura 3: Análise quantitativa de genes relacionados a cada microRNA exclusivamente, comum entre dois microRNAs ou comum aos três microRNAs. A partir da geração de diagramas de Venn, observa-se o número de genes que recebem regulação pelos miRNAs miR-146a, miR-146b e miR-155, além do número de genes que recebem regulação por dois ou mais desses genes. (A) Relacionado os genes alvo totais, é possível perceber uma sobreposição de modulação em 74 genes, exercida pelos três miRNAs. A maior sobreposição de genes alvo é apresentada entre miR-146a e miR-155. (B) Relação entre genes relacionados à resposta imune. Nota-se apenas um gene regulado pelos três microRNAs, o qual é referente ao gene da ectodisplasina A, escolhido para posterior validação da regulação por estes RNAi. Não foi possível observar alvos relacionados à imunidade que recebessem regulação tanto por miR-146b quanto por miR-155.

Figura 4: Análise da relação quantitativa entre o número de sítios alvo e genes alvo de cada miRNA de forma geral e relacionados à resposta imune. É possível observar diversas possibilidades de ligação dos miRNAs para regulação dos genes alvo, devido a grande quantidade de sítios alvo presentes. (A) Relação entre o número de sítios alvo e de genes alvo totais para cada miRNA de estudo. (B) Relação entre o número de sítios alvo e de genes alvo relacionados à resposta imune para cada miRNA de estudo, notando-se uma proporção mantida pelas quantidades nos três miRNAs analisados. (C) Razão entre o número de sítios e genes alvo, comparando os dados para quantidades totais e relacionadas à resposta imune. Observa-se que referente aos dados totais, a razão se mantém bastante semelhante, contudo mais baixa do que a razão apresentada pelos dados relacionados à imunidade, no qual destaca-se a razão apresentada pelo miR-146b.

Figura 5: Diagramas gerados pelo programa GOrilla classificando os genes de interesse conforme processos envolvidos para miR-146a, e função intracelular para miR-155. (A) Análise dos processos envolvendo o microRNA miR146a, partindo do termo geral de processos biológicos e chegando ao termo específico de processos do ciclo celular. (B) Funções intracelulares desempenhadas pelo microRNA miR146b, culminando na função específica de ligação aos ácidos nucleicos.

Figura 6: Diagrama gerado pelo programa GOrilla classificando os genes de interesse relacionados ao miR155 de acordo com o processo biológico envolvido. Partindo de processos biológicos, observa-se uma vasta variedade de processos envolvendo o microRNA em questão, basicamente divididos em processos celulares e metabólicos, resultando no processo específico de metabolismo de RNA.

2.8. Figuras

Figura 1

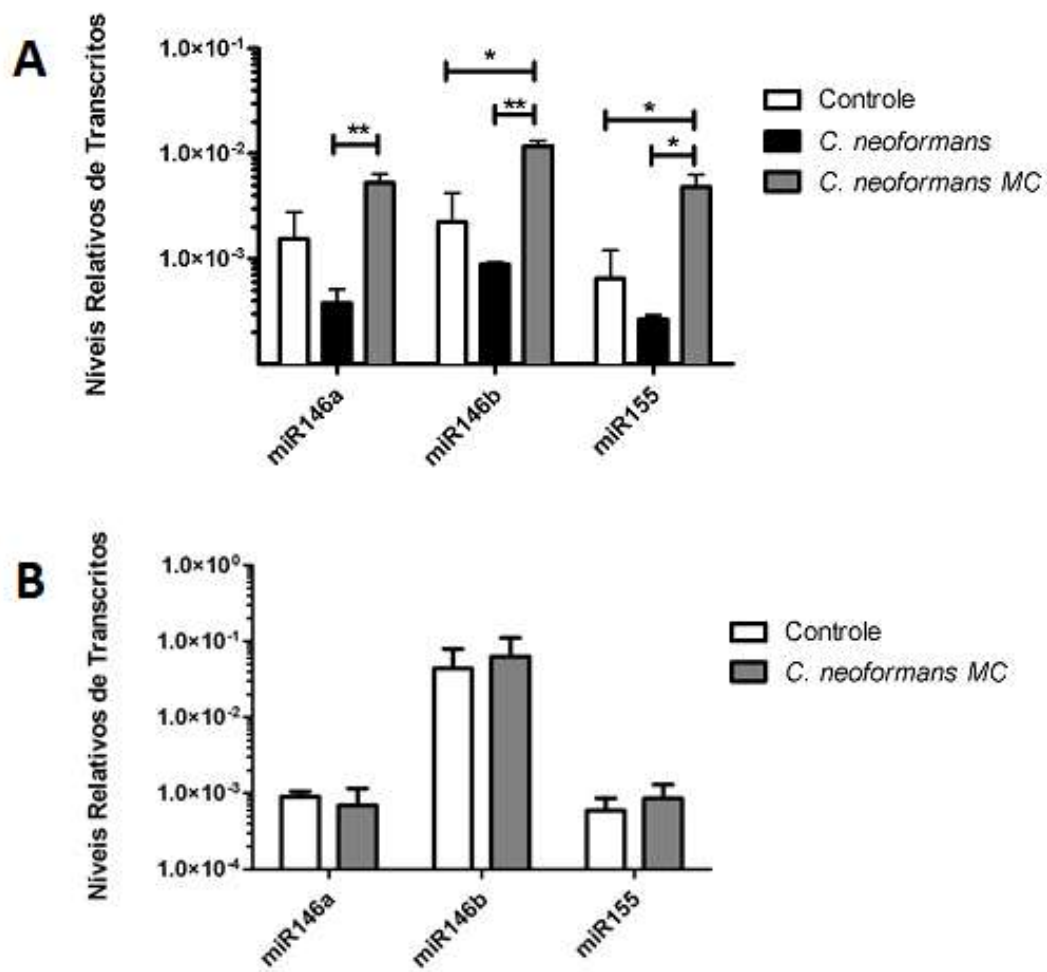


Figura 2

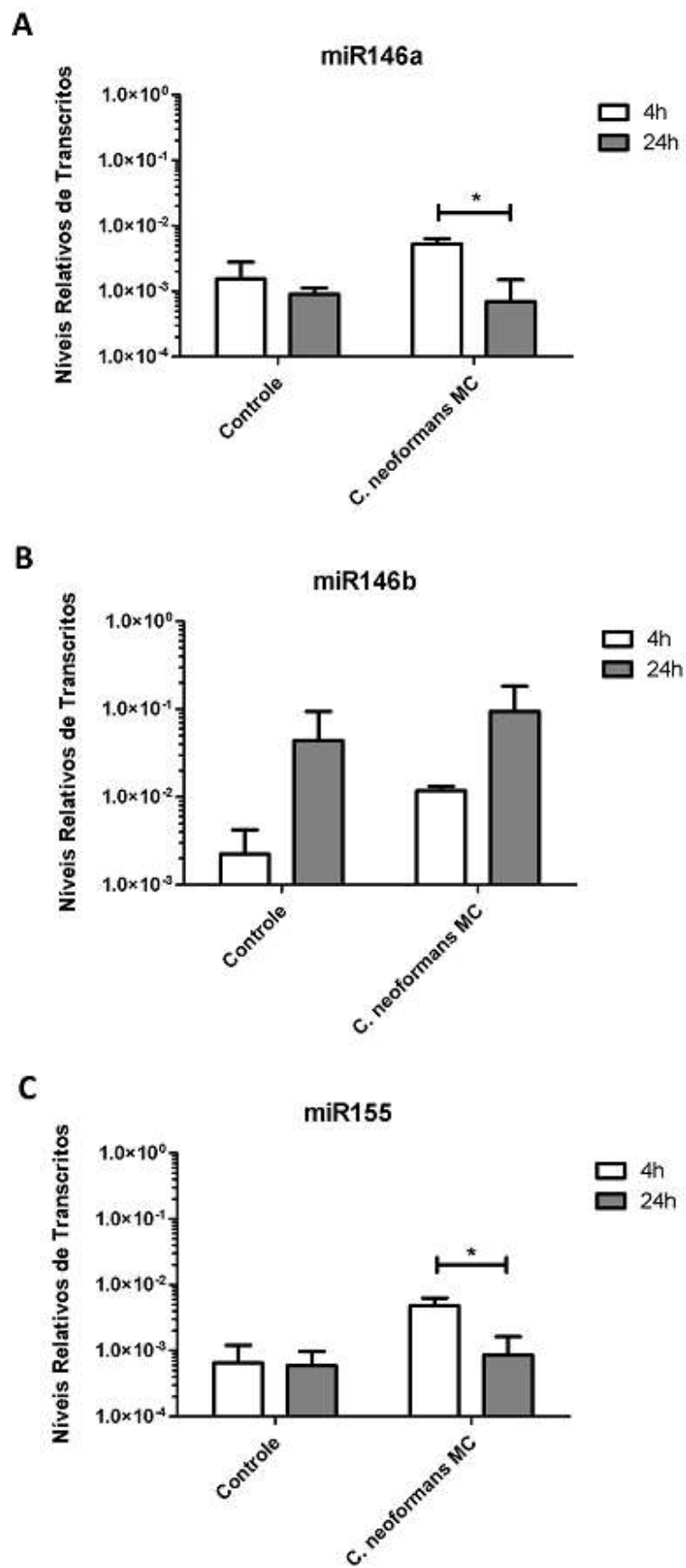


Figura 3

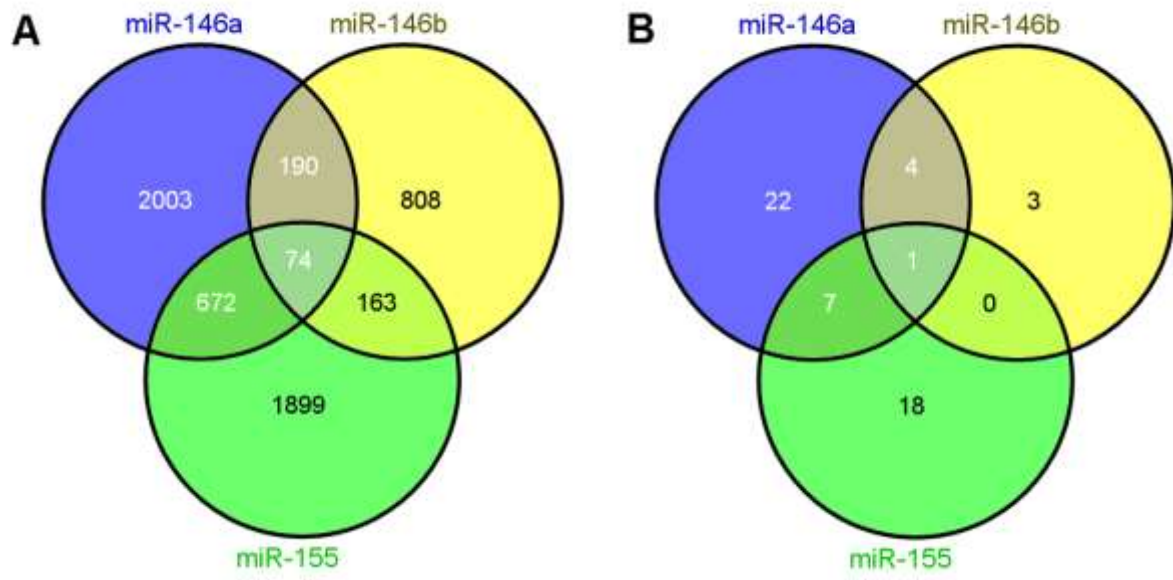


Figura 4

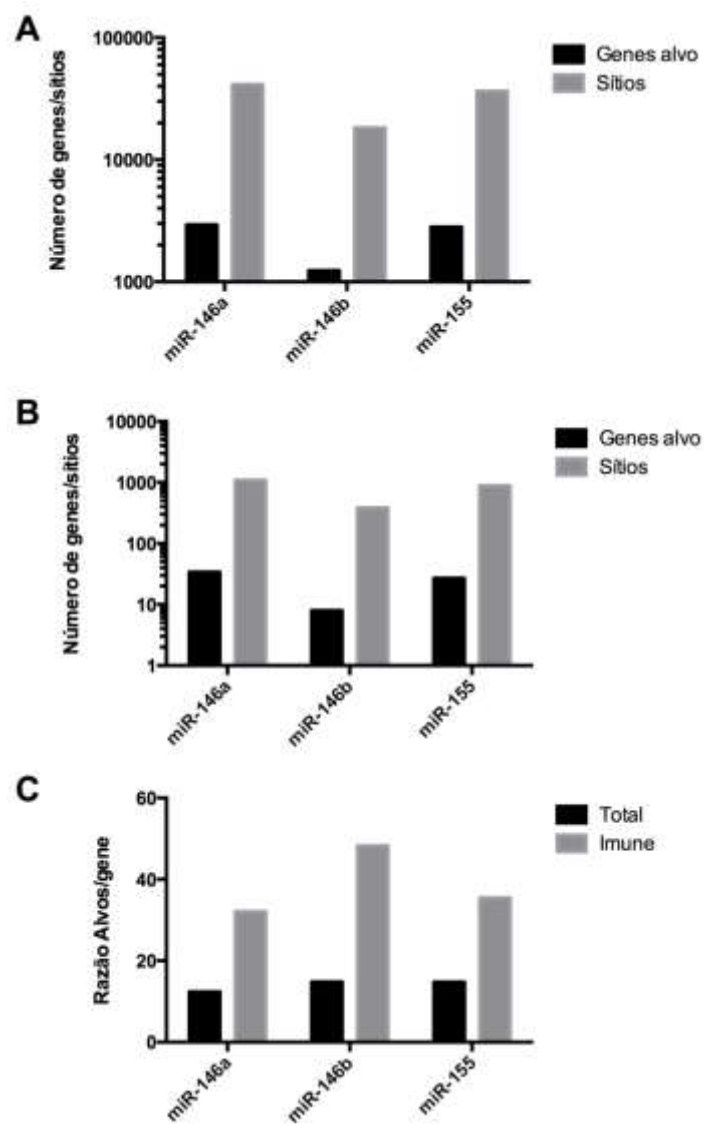


Figura 5

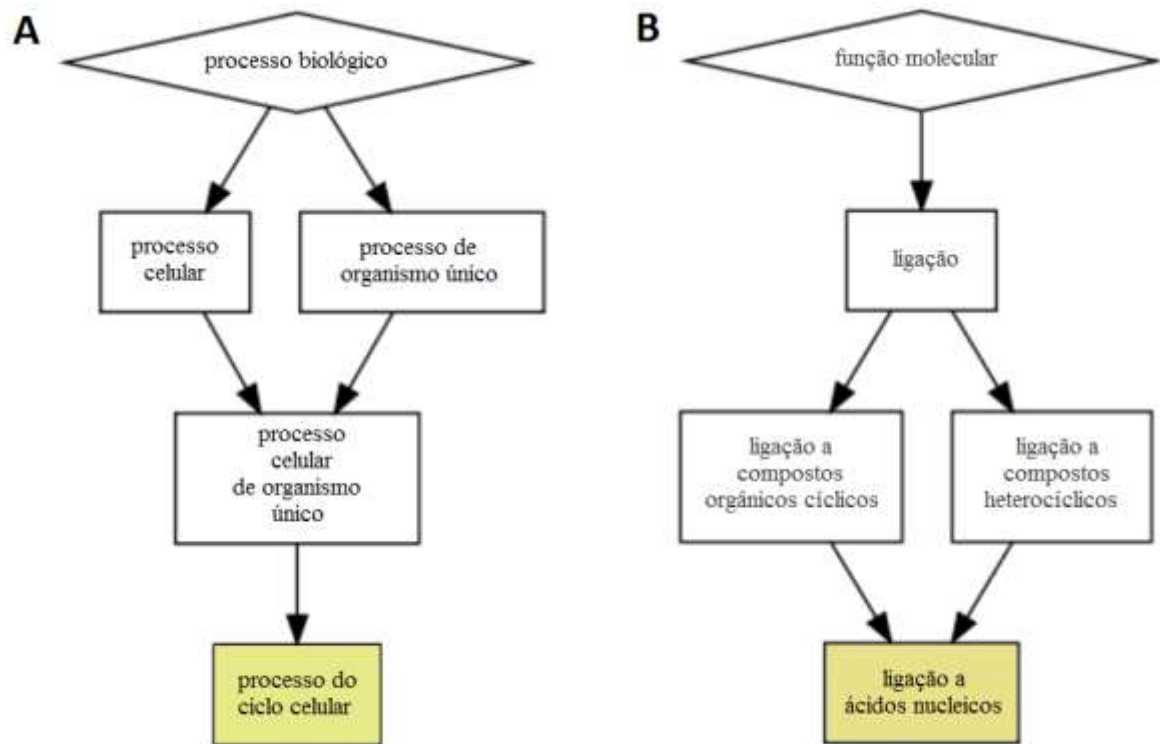
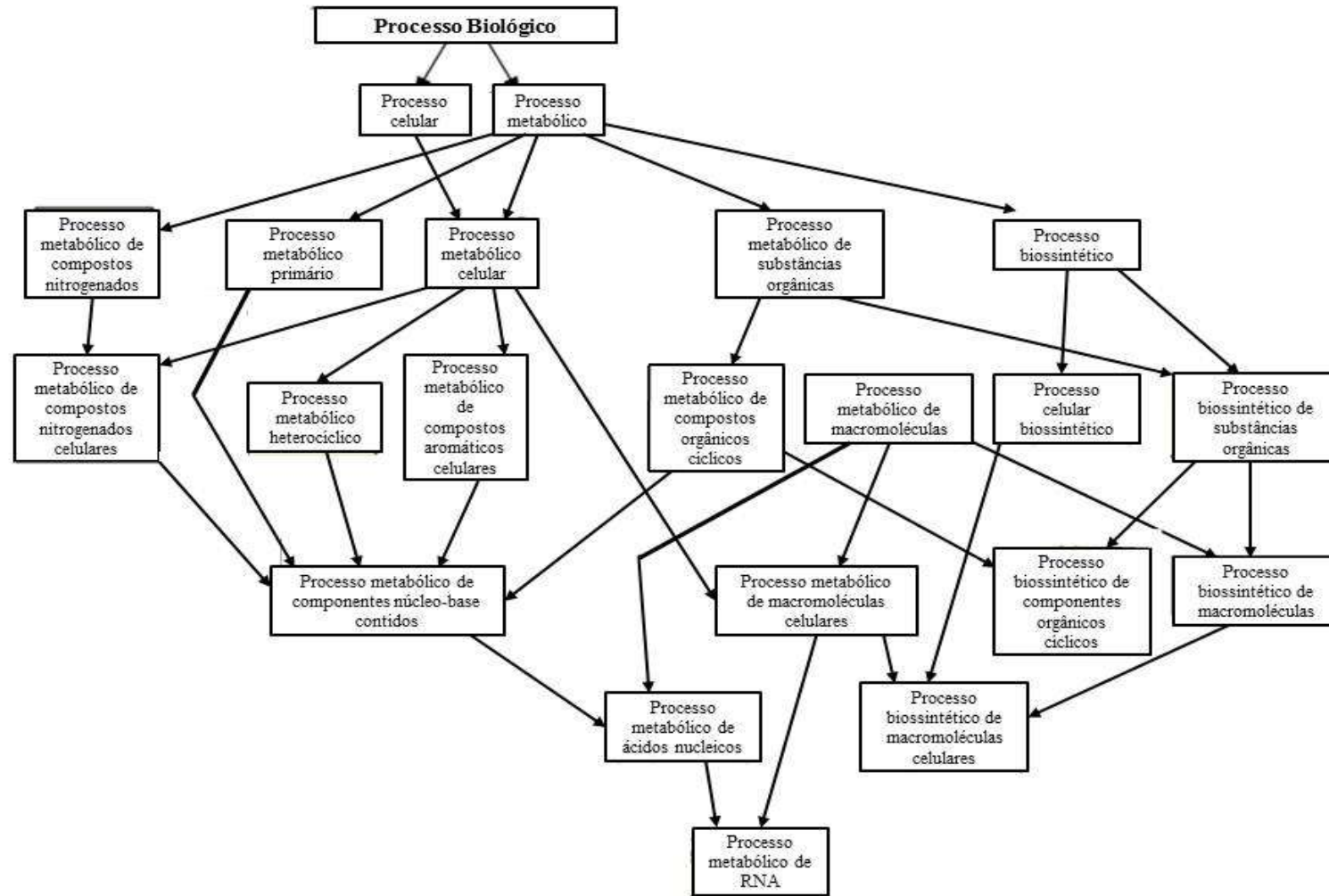


Figura 6



2.9. Material Suplementar

2.9.2. Tabelas

Tabela S1: Identidade dos produtos gênicos reconhecidos pelos microRNAs miR146a em camundongo. Listagem dos 34 genes reconhecidos pelo miR146a relacionados à resposta imune, contendo o código de acesso, o símbolo do gene e descrição do produto gênico.

Código Acesso	Gene	Identificação do produto gênico
20308	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
17127	Smad3	SMAD family member 3
16196	Il7	interleukin 7
13607	Eda	ectodysplasin-A
20307	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8
12981	Csf2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
18605	Enpp1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
22034	Traf6	TNF receptor-associated factor 6
20315	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
21943	Tnfsf11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
20723	Serpinb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9
24099	Tnfsf13b	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
15018	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7
22376	Was	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human)
17874	Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88
226866	Sbspo	somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing
20309	Cxcl15	chemokine (C-X-C motif) ligand 15
14130	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb
15978	Ifng	Interferon gamma
15064	Mr1	major histocompatibility complex, class I-related
12504	Cd4	CD4 antigen

71733	Susd2	Sushi domain containing 2
208650	Cblb	Casitas B-lineage lymphoma b
14972	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region
20311	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
16001	Igf1r	insulin-like growth factor I receptor
12487	Cd28	CD28 antigen
110382	C8b	complemente component 8, beta polypeptide
16153	Il10	interleukin 10
12010	B2m	beta-2 microglobulin
15007	H2-Q10	histocompatibility 2, Q region locus 10
14964	H2-D1	histocompatibility 2, D region locus 1
15061	Ifi44l	interferon-inducedprotein 44 like
209558	Enpp3	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3

Tabela S2: Identidade dos produtos gênicos reconhecidos pelos microRNAs miR146b em camundongo. Listagem dos 8 genes reconhecidos pelo miR146b relacionados à resposta imune, contendo o código de acesso, o símbolo do gene e descrição do produto gênico.

Código Acesso	Gene	Identificação do produto gênico
17127	Smad3	SMAD family member 3
13607	Eda	ectodysplasin-A
19011	Endou	endonuclease, polyU-specific
17874	Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88
22164	Tnfsf4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
14972	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region
20311	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
56221	Ccl24	chemokine (C-C motif) ligand 24

Tabela S3: Identidade dos produtos gênicos reconhecidos pelos microRNAs miR155 em camundongo. Listagem dos 27 genes reconhecidos pelo miR155 relacionados à resposta imune, contendo o código de acesso, o símbolo do gene e descrição do produto gênico.

Código Acesso	Gene	Identificação do produto gênico
13607	Eda	ectodysplasin-A
18605	Enpp1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
60505	Il21	interleukin 21
20723	Serpinb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9
14103	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
20723	Serpinb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9
12479	Cd1d1	CD1d1 antigen
15064	Mr1	major histocompatibility complex, class I-related
12166	Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A
12477	Ctla4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

12611	Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
18606	Enpp2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
20297	Ccl20	chemokine (C-C motif) ligand 20
22034	Traf6	TNF receptor-associatedfactor6
20315	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
330122	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
12774	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5
21950	Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
54448	Il1f6	interleukin 1 family, member 6
55985	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
56838	Ccl28	chemokine (C-C motif) ligand 28
53859	Map3k14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
12772	Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2
16163	Il13	interleukin 13
15061	Ifi44l	interferon-induced protein 44 like
60533	Cd274	CD274 antigen
12487	Cd28	CD28 antigen

2.10. Perspectivas:

- Avaliar o efeito da indução da expressão de microRNAs em macrófagos por estimuladores do sistema imune INF- γ e LPS;
- Avaliar a funcionalidade dos microRNAs com expressão alterada pela quantificação da expressão do gene alvo da ectodisplasina A (Eda);

Referências Bibliográficas

ARORA, S. et al. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 1915-26, May 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383052>>.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, Dec 2012. ISSN 1946-6242. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253612>>.

BYRNES, E. J. et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 1081-6, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220140>>.

BYRNES, E. J. et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942>>.

CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 16, n. 21, p. 2733-42, Nov 2002. ISSN 0890-9369. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414724>>.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-55, Feb 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239886>>.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J Infect Dis**, v. 184, n. 3, p. 337-44, Aug 2001. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443560>>.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 215-35, Mar 2012. ISSN 1863-2300. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048835>>.

CHEN, F. et al. Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2460-9, Jun 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464087>>.

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*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827>>.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014. ISSN 0065-2164. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581388>>.

DING, C. et al. *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 3, p. 265-76, Mar 2013. ISSN 1934-6069. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498952>>.

DING, S. W.; VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 413-26, Aug 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693253>>.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 840452, 2009. ISSN 1687-708X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19503836>>.

EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 7, p. 711-22, Jul 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675045>>.

FAEHNLE, C. R.; JOSHUA-TOR, L. Argonautes confront new small RNAs. **Curr Opin Chem Biol**, v. 11, n. 5, p. 569-77, Oct 2007. ISSN 1367-5931. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928262>>.

FAN, W. et al. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1420-33, Aug 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087747>>.

FLACZYK, A. et al. IL-33 signaling regulates innate and adaptive immunity to *Cryptococcus neoformans*. **J Immunol**, v. 191, n. 5, p. 2503-13, Sep 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894196>>.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 2, p. 94-108, Feb 2009. ISSN 1471-0064. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148191>>.

GROSSHANS, H.; FILIPOWICZ, W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 414-6, Jan 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216846>>.

HAGEN, F. et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 10, p. 1618-24, Oct 2012. ISSN 1080-6059. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017442>>.

HARDISON, S. E. et al. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4060-8, Oct 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984078>>.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 525-37, Aug 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796883>>.

HÖLSCHER, C. et al. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. **J Immunol**, v. 176, n. 2, p. 1115-21, Jan 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16394000>>.

JENSEN, K. D. et al. *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 6, p. 472-83, Jun 2011. ISSN 1934-6069. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669396>>.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. Cryptococcus interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 403-11, Mar 2013. ISSN 1462-5822. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127124>>.

KINCHEN, J. M.; RAVICHANDRAN, K. S. Phagosome maturation: going through the acid test. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 10, p. 781-95, Oct 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813294>>.

KRETSCHMER, M. et al. Defects in phosphate acquisition and storage influence the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, Apr 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24711572>>.

KRONSTAD, J. et al. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 2, p. 109-18, Feb 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140231>>.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274>>.

LANJEWAR, D. N. The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of 236 autopsied cases in mumbai, India. **Patholog Res Int**, v. 2011, p. 547618, 2011. ISSN 2042-003X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660276>>.

LASKIN, D. L. et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 51, p. 267-88, 2011. ISSN 1545-4304. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887196>>.

LAZERA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, v. 38, n. 5, p. 379-83, Oct 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092385>>.

LI, L.; CHANG, S. S.; LIU, Y. RNA interference pathways in filamentous fungi. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 22, p. 3849-63, Nov 2010. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20680389>>.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346>>.

LINDELL, D. M. et al. Diversity of the T-cell response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 74, n. 8, p. 4538-48, Aug 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861640>>.

MA, H. et al. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2156-60, Nov 2006. ISSN 0960-9822. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084701>>.

MALLORY, A.; VAUCHERET, H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. **Plant Cell**, v. 22, n. 12, p. 3879-89, Dec 2010. ISSN 1532-298X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183704>>.

MITCHELL, A. P. Cryptococcal virulence: beyond the usual suspects. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1481-3, Jun 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741574>>.

MONK, C. E.; HUTVAGNER, G.; ARTHUR, J. S. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13669, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060679>>.

MÜLLER, U. et al. Abrogation of IL-4 receptor- α -dependent alternatively activated macrophages is sufficient to confer resistance against pulmonary cryptococcosis despite an ongoing T(h)2 response. **Int Immunol**, v. 25, n. 8, p. 459-70, Aug 2013. ISSN 1460-2377. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532373>>.

NI, W.; HUANG, Q.; CUI, J. Disseminated cryptococcosis initially presenting as cellulitis in a patient suffering from nephrotic syndrome. **BMC Nephrol**, v. 14, p. 20, 2013. ISSN 1471-2369. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336386>>.

NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 844, p. 189-97, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262444>>.

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, 2011. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828219>>.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 10, p. 1306-16, Oct 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821718>>.

PAPPAS, P. G. Lessons learned in the multistate fungal infection outbreak in the United States. **Curr Opin Infect Dis**, v. 26, n. 6, p. 545-50, Dec 2013. ISSN 1473-6527. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152763>>.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480>>.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; FILIPOWICZ, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 3, p. 118-26, Mar 2007. ISSN 1879-3088. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197185>>.

QIU, Y. et al. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47853, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23110112>>.

RAMACHANDRAN, P. V.; IGNACIMUTHU, S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, n. 6, p. 1774-89, Mar 2013. ISSN 1559-0291. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340870>>.

SABITI, W.; MAY, R. C.; PURSALL, E. R. Experimental models of cryptococcosis. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 626745, 2012. ISSN 1687-9198. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007224>>.

SCHNEIDER, R. E. O. et al. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43773, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916306>>.

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 Res**, v. 41, n. 1, p. 542-53, Jan 2013. ISSN 1362-4962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23143100>>.

SHIBUYA, K. et al. Histopathology of cryptococcosis and other fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Int J Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. 78-85, 2001. ISSN 1201-9712. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468102>>.

SHIBUYA, K. et al. Granuloma and cryptococcosis. **J Infect Chemother**, v. 11, n. 3, p. 115-22, Jun 2005. ISSN 1341-321X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990974>>.

SIMM, C. et al. High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25136, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980385>>.

SINGH, A. et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653445>>.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375706>>.

UCHINO, K.; OCHIYA, T.; TAKESHITA, F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. **Jpn J Clin Oncol**, v. 43, n. 6, p. 596-607, Jun 2013. ISSN 1465-3621. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592885>>.

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 7, p. 492-502, Jul 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699831>>.

VELAGAPUDI, R. et al. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4345-55, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620339>>.