



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DENISE TURINI GONZALES MARIOTO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs
NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Paracoccidioides brasiliensis***

DENISE TURINI GONZALES MARIOTO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs
NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M342e Marioto, Denise Turini Gonzales.

Estudo da expressão diferencial de microRNAs no tecido pulmonar de camundongos submetidos a infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis* / Denise Turini Gonzales Marioto. – Londrina, 2014.
64 f. : il.

Orientador: Emerson José Venâncio.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose – Teses. 2. Fungos patogênicos – Teses. 3. Pulmões – Infecção – Teses. 4. Pulmões – Histologia – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. I. Venâncio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

DENISE TURINI GONZALES MARIOTO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs NO
TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Paracoccidioides brasilienses***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Silvana Petrofeza da Silva
Universidade Federal de Goiás - UFG

Londrina, 16 de Dezembro de 2014

Dedico este trabalho às pessoas
mais importantes da minha vida:
Meu esposo Edson e meu filho Ícaro,
Meus Pais Euclides e Fátima,
Minha avó Maria.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e paciência concedida.

À minha família pelo estímulo e apoio nesses últimos anos. Em especial aos meus pais, pelo auxílio nos cuidados direcionados ao nosso pequenino Ícaro; ao meu esposo, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo ao longo desses anos e ao meu filho por cada sorriso, abraço e ternura.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Emerson José Venancio pela orientação neste trabalho, pela paciência e também pela oportunidade concedida de desenvolver esta pesquisa.

Agradeço às professoras Dra. Eiko Nakagawa Itano, Dra. Solange de Paula Ramos e Dra. Silvana Petrofeza da Silva, componentes das bancas examinadoras de qualificação e de defesa, pelas valiosas dicas e sugestões que serviram para lapidação desta dissertação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao professor Dr. Fábio Goulart de Andrade pela contribuição e apoio na análise histológica e principalmente por ser um amigo tão querido.

Às técnicas do laboratório de histotécnica Andreia Carla Eugênio Pupim e Renata Baldo Rodrigues de Carvalho pela amizade, auxílio e dicas nas rotinas histológicas.

A professora Dra. Eiko Nakagawa Itano, a mestrande Franciele S. Chiyoda Rodini, às Doutorandas Paula Leonello Álvares e Silva, Angélica Ishikawa e ao técnico de laboratório Nilson de Jesus Carlos pela colaboração na parte experimental do trabalho.

A professora Dra. Ivete Conchon Costa por ceder aparelhos e o espaço de seu laboratório para a realização de etapas dos processos moleculares.

A professora Dra. Silvana Petrofeza da Silva e a doutoranda Marília Barros Oliveira, pelo auxílio na realização das análises moleculares, interpretação dos dados experimentais e pelo apoio e assistência durante minha estadia em Goiânia - GO.

Aos amigos de longa data, é impossível descrever a importância da amizade e carinho que demonstraram por mim. Aos amigos recentes, que assim como os demais, vêm agraciando a minha vida nesses últimos anos.

As amigas e companheiras de pós-graduação: Angélica Ishikawa, Aline Santana e Ana Paula Cheirubim, hoje eu digo sem sombra de dúvidas que os momentos que passamos juntas estão entre os melhores que vivenciei durante a pós-graduação.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia IV, pelo auxílio, amizade, atenção e apoio. Em especial as amigas Ana Carolina Navarro dos Santos Ferraro, Ana Paula Cheirubim, Amanda de Fáveri Pitz, Michele Pagliari Oliveira Montini, Mayara Almeida e Miriele Caroline da Silva que além da amizade, me auxiliaram em etapas experimentais e rotinas do laboratório e ao amigo Eduardo Vignoto Fernandes pelas dicas e instruções na interpretação de dados.

Enfim, a todos, muito obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.”

Cora Coralina

MARIOTO, Denise Turini Gonzales. **Estudo da expressão diferencial de micrornas no tecido pulmonar de camundongos submetidos a infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis***. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

No Brasil, a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) é uma das principais causas de mortalidade em pacientes acometidos por micoses sistêmicas e um dos mais importantes modelos de estudo sobre micoses profundas. O processo inflamatório associado à presença do fungo no tecido pulmonar é o resultado de uma complexa interação entre os diferentes tipos de linfócitos e moléculas, relacionados aos diferentes padrões de resposta imune celular. Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não-codificantes e possuem de 19 a 25 nucleotídeos de comprimento. Recentemente descobertos, o papel desses pequenos RNAs não codificantes tem sido muito estudado, e está relacionado com a regulação pós-transcricional de diversos RNAs mensageiros (mRNAs). Neste estudo investigou-se a expressão diferencial de miRNAs do tecido pulmonar de camundongos e a sua relação com a progressão da infecção por *P. brasiliensis*. Para isso 12 camundongos BALB/c foram infectados com *P. brasiliensis*, espécie críptica S1, cepa Pb18, por via intravenosa caudal lateral ($2,7 \times 10^7$ células/mL) e 8 camundongos, sem estimulação, foram usados de controle. Após 28 e 56 dias, foram realizadas eutanásias e coleta dos pulmões para o estudo. Considerando que a infecção pulmonar é o principal sítio de infecção humana, este estudo investigou a expressão de miRNAs e a sua relação com aspectos imunológicos e histopatológicos no pulmão. A análise histológica foi realizada para detecção da presença de leveduras e do aspecto do parênquima pulmonar durante a infecção. As análises moleculares, avaliaram mudanças na expressão de mRNA das principais citocinas e dos principais fatores de transcrição relacionados aos perfis de células T em relação ao grupo controle, sendo: TBET para Th1, GATA-3 para Th2, ROR- γ T para Th17 e FOXP3 para T regulatórias; e a regulação gênica pós-transcricional durante o processo inflamatório por meio de análise molecular de um painel com 84 miRNAs relacionados com a resposta inflamatória em camundongo. No 28º dia, foram observadas lesões infiltrativas por todo o parênquima pulmonar, com predomínio de leveduras e presença de macrófagos, linfócitos T e B indicando que houve uma progressão da inflamação nesse primeiro momento. Com 56º dias, o tecido apresentou um quadro controlado de infecção, com poucas leveduras e um aspecto histológico resolutivo. Foram identificados setenta e quatro miRNAs expressos diferencialmente, sendo que os miRNAs 126a-5p, 340-5p, 30b-5p, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-3p e 301a-3p, 466k foram regulados positivamente no 28º dia e os miRNAs let-7f-5p, let-7a-5p, 26b-5p, let-7e-5p e 369-3p foram regulados positivamente no 56º dia. De um modo geral esses miRNA estão envolvidos com os seguintes processos fisiológicos: resposta imune, proteção tecidual, regulação de proliferação celular e controle de apoptose. Os resultados deste estudo sugerem, pela primeira vez, uma possível relação dos miRNAs na regulação de processos celulares inflamatórios que ocorrem durante a resposta imune celular contra infecção de *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Infecção fúngica. Histologia pulmonar. microRNAs. Regulação pós-transcricional.

MARIOTO, Denise Turini Gonzales. **Study of differential expression of micrnas lung tissue of mice submitted to experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis***. 2014. 64p. Dissertation (Masters in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

In Brazil, the infection by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) is a major cause of mortality in patients suffering from systemic mycoses and one of the most important models of study on deep mycoses. The inflammatory process associated with the presence of the fungus in lung tissue is the result of a complex interaction between different types of cells and molecules related to different cellular immune response patterns. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs, have 19 to 25 nucleotides in length. Recently discovered, the role of these small non-coding RNAs has been extensively studied, and is related to the post-transcriptional regulation of different messenger RNAs (mRNAs). In this study we investigated the differential expression of the miRNAs lung tissue of mice and its relationship with the progression of infection by *P. brasiliensis*. To this 12 BALB/c mice were infected with *P. brasiliensis* cryptic species S1, Pb18 strain, intravenously lateral tail (2.7×10^7 cells/ml) and 8 mice, no stimulation, were used for control. After 28 and 56 days, they were carried out euthanasia and collection from the lungs to the study. Considering that pulmonary infection is the major site of human infection, this study investigated the expression of miRNAs and their relationship with immunological aspects and histopathological lung. Histological analysis was performed to detect the presence of yeast and appearance of the pulmonary parenchyma during infection. Molecular analysis evaluated changes in the regulation range (fold change) of mRNA of the main cytokines and key transcription factors related to T cell profiles in the control group, as follows: Tbet to Th1, Th2 to GATA-3, ROR- γ T to Th17 and regulatory T for FOXP3; and post-transcriptional gene regulation during the inflammatory process through molecular analysis of a panel of 84 miRNAs associated with the inflammatory response in mice. After 28 days, infiltrative lesions were observed throughout the lung parenchyma, predominantly yeast and presence of macrophages, T and B lymphocytes indicating that there was a progression of inflammation that first time. With 56 days, the tissue showed a controlled framework of infection, with little yeast and a terminating histological appearance. Seventy-four differentially expressed miRNAs were identified, and the miRNAs 126a-5p, 340-5p, 5p-30b, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-301a-3p and 3p, 466k were upregulated in 28 day and miRNAs let-7f-5p, let-7a-5p, 26b-5p, let-7e-5p and 369-3p were upregulated after 56 days. Generally these miRNA are involved in physiological processes the following: immune response, tissue protection, the regulation of cell proliferation and apoptosis control. The results suggest for the first time a possible relationship of miRNAs in regulating inflammatory cellular processes that occur during cellular immune response against *P. brasiliensis* infection.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Fungal infection. Pulmonary histology. microRNAs. Post-transcriptional regulation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos mRNAs alvos. Genes dos fatores de transcrição: Foxp3 (Forkhead box P3), T-bet (T-box transcription factor 21), ROR- γ t (RAR-related orphan receptor gamma), Gata-3 (trans-acting T-cell-specific transcription factor 3) e citocinas: IL-2 (Interleucina 2), IL-4 (Interleucina 4), IL-6 (Interleucina 6), IL-10 (Interleucina 10), IL-17A (Interleucina 17A), TGF β 1 (Transforming Growth Factor- β 1), IFN γ (interferon-gama).....55
- Tabela 2** – Análise da expressão relativa dos mRNAs dos principais fatores de transcrição das células T. Valores de expressão relativa expressos em $-2^{\Delta CT}$ 56
- Tabela 3** – Análise da expressão relativa dos mRNAs das citocinas relacionadas com os padrões de resposta das células T. Valores de expressão relativa expressos em $-2^{\Delta CT}$ 56
- Tabela 4** – Relação do Fold Change de todos os microRNAs avaliados e dos genes de expressão constitutivas (controles), análise feita tendo o tempo de 56 d.p.i. avaliado em relação ao tempo de 28 d.p.i. (controle)57
- Tabela 5** – Relação dos miRNAs com expressão diferencial entre o 28^o e 56^o d.p.i. Valores de expressão relativa expressos em $-2^{\Delta CT}$. Análise de expressão de um tempo em relação ao outro (controle)59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Biogênese dos microRNAs.....20

Lista de ilustrações do Artigo

Figura 1 – Aspecto histopatológico do tecido pulmonar de camundongos BALB/c no 28° dia e no 56° dia do experimento60

Figura 2 – Padrão histopatológico do tecido pulmonar no 28° d.p.i.61

Figura 3 – Mapa da placa de análise RT-PCR real time, contendo os fold chances de todos os genes avaliados.....62

Figura 4 – Heat mapa da análise de miRNAs interpretando os fold chances obtidos para cada amostra por intensidade de cor.....62

Figura 5 – Clustergrama dos microRNAs regulados positivamente com maior expressão relativa nos tempos avaliados. Análise de expressão de um tempo em relação ao outro (controle)63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
AGO 1-4	<i>Argonaute 1-4</i>
C/EBP β	<i>CCAAT Enhancer-Binding Protein beta</i>
CD28	<i>Cluster de Diferenciação 28</i>
CD62L	Ligante de CD62
cDNA	DNA complementar
c-Myc	proto-onco-gene c-Myc
Cox-2	Ciclo-oxigenase-2
DGCR8	Componente <i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
DLEU2	<i>Deleted in Lymphocytic Leukemia 2</i>
GAX	<i>Growth Arrest-Specific Homeo Box</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
HOXA5	<i>Homeobox protein 5</i>
i.p.	intra peritonal
i.v.	intra venosa
IL-10	Interleucina 10
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolisacarídeo
miRNA, miR	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
NKRF	NF-kappa-B-repressing factor
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PMN	Polimorfonucleares
pré-miRNA	Precursor de microRNA

pri-miRNA	Transcrito primário de microRNA
RAS-RAF-MAPK	Canal de comunicação celular da via da MAPK
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i>
s.c.	subcutânea
T CD4+	Linfócito T auxiliar
T CD8+	Linfócito T citotóxico
TGFβ1	<i>Transforming Growth Factor-β1</i>
Th1	Perfil de produção de citocinas do padrão T helper 1
Th17	Perfil de produção de citocinas do padrão T helper 17
Th2	Perfil de produção de citocinas do padrão T helper 2
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Treg	Perfil de produção de citocinas do padrão T regulatório
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
v.c.l.	veia caudal lateral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	14
2.2	<i>Paracoccidioidomicose</i>	15
2.3	<i>Paracoccidioidomicose e a resposta imune</i>	16
2.4	<i>Biogênese e atuação dos microRNAs</i>	19
2.5	<i>Referências</i>	26
3	OBJETIVOS	32
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	32
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	32
4	ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MIRNAS NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	34
4.1	<i>RESUMO</i>	35
4.2	<i>ABSTRACT</i>	36
4.3	<i>INTRODUÇÃO</i>	37
4.4	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	39
4.4.1	<i>Animais</i>	39
4.4.2	<i>Microrganismos</i>	39
4.4.3	<i>Ensaio in vivo</i>	40
4.4.4	<i>Análise histopatológica</i>	41
4.4.5	<i>Análise da expressão de genes da resposta imune</i>	41
4.4.6	<i>Análise da expressão de microRNAs</i>	42
4.5	<i>RESULTADOS</i>	43
4.5.1	<i>Análise histopatológica</i>	43
4.5.2	<i>Análise da expressão dos mRNAs</i>	44
4.5.3	<i>Análise da expressão dos miRNAs</i>	44
4.6	<i>DISCUSSÃO</i>	45

4.7	<i>REFERÊNCIAS</i>	51
4.8.	<i>TABELAS E FIGURAS</i>	55
5	CONCLUSÃO GERAL	64

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose humana sistêmica que afeta principalmente a população rural das Américas Latinas. No Brasil, a doença é endêmica e causa aproximadamente 200 mortes por ano, sendo considerado o maior centro endêmico desta micose, pois 80% dos casos da doença descritos na literatura foram diagnosticados no país. A real prevalência e incidência não podem ser calculadas, pois a PCM não é uma doença notificável e o local e as condições exatas em que o fungo ocorre na natureza ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, a quantidade de doentes que necessitam de assistência médica de longo prazo nas regiões de maior incidência torna a moléstia, um importante problema de saúde pública brasileira (SANTOS, 2011; WANKE, 2009).

Doenças infecciosas apresentam uma relação íntima entre o patógeno e o seu hospedeiro e o conhecimento desta complexa interação são essenciais para se avançar no conhecimento dos mecanismos de estabelecimento das infecções no organismo. A PCM crônica afeta principalmente os pulmões e é caracterizada por uma reação inflamatória granulomatosa crônica, consequência do tipo de resposta imune do hospedeiro contra o fungo. Porém, ainda há muito para ser esclarecido sobre a resposta imune contra o *P. brasiliensis*, principalmente em relação aos aspectos moleculares envolvidos na resposta inflamatória associada a lesão (TRISTÃO, 2013).

Recentemente foram descobertos pequenos reguladores gênicos pós-transcricionais, chamados de microRNAs (miRNAs). Eles são pequenas sequências de ácidos ribonucléicos (RNAs) não-codificantes que controlam a expressão gênica em muitos processos fisiológicos, tais como: a proliferação de células, diferenciação

dos tecidos, manutenção do tipo de celular, apoptose, transdução de sinais e outros. Nos últimos anos tem sido identificado um número crescente destes pequenos RNAs com função específica no sistema imune de mamíferos, porém, há poucos estudos sobre o papel desses reguladores gênicos em quadro de resposta imune contra fungos, principalmente em relação ao *P. brasiliensis* (EL-ASSAAD, 2011; LINDSAY, 2008).

Frente a isto, a proposta deste estudo foi analisar a expressão de um grupo de miRNAs murinos relacionados com a resposta inflamatória em um modelo experimental de infecção com o fungo *P. brasiliensis*. Para isso foi realizada uma análise histopatológica, a avaliação de microRNAs relacionados com a resposta inflamatória e a avaliação de mRNAs dos perfis de células Th1, Th2, Th17, T regulatórias e das principais citocinas de cada perfil . Essas análises permitiram a determinação das alterações histológicas e na expressão de miRNAs causadas pelo fungo no pulmão dos animais. Dessa forma, pela comparação da expressão de miRNAs com a resposta inflamatória e o processo histopatológico observado, foi possível delinear prováveis genes envolvidos na resposta imune contra *P. brasiliensis* no modelo estudado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

Com base em estudos de filogenia molecular, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é classificado como um micro-organismo pertencente ao Reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides* e espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (ASSUNÇÃO, 2013; SANTOS, 2011).

Esse fungo termo-dimórfico é o agente causal da PCM, uma micose sistêmica autóctone da América Latina. Nas áreas endêmicas, a infecção primária geralmente ocorre na fase juvenil, compreende 3-5% dos casos, envolvendo o sistema reticulo-endotelial. A forma crônica ocorre no adulto e corresponde a cerca de 90% dos casos. A sua disseminação é multifocal, envolvendo primariamente os pulmões, podendo assim se disseminar e causar lesões secundárias em linfonodos, pele e mucosas. Ainda hoje, a PCM representa um grande problema de saúde pública devido ao seu potencial incapacitante (SANTOS, 2011; WANKE, 2009).

O micro habitat do fungo *P. brasiliensis* permanece desconhecido, porém estudos sugerem que o fungo viva saprofiticamente em solo úmido e rico em proteínas, próximos a ambientes úmidos como lagos, rios e pântanos, onde as variações de temperatura são mínimas (ALEGRE, 2014; COUTINHO, 2002).

Provavelmente a infecção por *P. brasiliensis* tenha início com a inalação de hifas ou outras formas de propágulos. Estudos mostram que a infecção depende da transformação dimórfica da forma de micélio saprofítico para a forma de levedura.

Baseado em experimentos *in vitro*, o dimorfismo de micélio para levedura é iniciado por uma mudança na temperatura próxima a 22°C para 37°C, sendo a mudança de levedura para micélio desencadeada pela redução de 37°C para temperaturas em torno de 22°C (TRISTÃO, 2013; ARRAES, 2005; ARISTIZABAL, 1998).

O complexo *Paracoccidioides brasiliensis* é composto por 4 espécies crípticas, atualmente conhecidas como: S1, PS2, PS3 e *P. lutzii*, sendo a última caracterizada por uma maior distância filogenética com as demais. A cepa Pb18 é o principal representante do grupo filogenético S1 e tem sido amplamente utilizada na literatura, devido à sua comprovada virulência em camundongos, quando inoculados por diferentes vias (MACHADO, G. C., 2011; CALICH, V.L., 2008).

2.2 Paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose sistêmica que possui uma distribuição geográfica restrita às Américas do Sul e Central, sendo observada desde o México (23°N) até à Argentina (34°S) (SHANKAR, 2011). O Brasil é o país com o maior número de casos da doença, tendo uma incidência estimada entre 10 a 30 casos por milhão de habitantes e uma taxa de mortalidade de 1,4 morte/milhão de habitantes (SANTO, 2008; BITTENCOURT, 2005). No Brasil, ela é endêmico nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste. Os cinco estados que apresentam as maiores taxas de mortalidade por esta doença são Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (COUTINHO, 2002). Outros países com número significativos de casos são Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (MARQUES, 2013; NUCCI, 2009).

A maior parte dos casos de PCM ocorre em indivíduos do sexo masculino, predominando a faixa etária de 40 anos, e profissão vinculada à

agricultura (VERLI, 2005; GODOY, 2003; BICALHO, 2001). A proporção de casos de PCM observada em homens e mulheres é variada, alguns estudos mostram proporções próximas de 10:1 enquanto outros mostram proporções em torno de 20:1 (BELLISSIMO-RODRIGUES, 2011; PANIAGO, 2003). Esta diferença na incidência da doença entre os sexos pode ser explicada pelas diferenças nos níveis de hormônios sexuais (SHANKAR, 2011). Existem evidências de que os hormônios femininos são protetores contra a infecção por *P. brasiliensis*. Estudos indicam que o estradiol inibe a transição morfológica alterando os perfis de síntese de proteínas de micélio e levedura (SHANKAR, 2011; BORGES-WALMSLEY, 2002).

A PCM apresenta duas principais formas clínicas, a aguda e a crônica. A forma aguda representa 3-5% de todos os casos, e é caracterizada por um curso rápido (semanas para meses) com envolvimento de órgãos linfoides (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A forma crônica ocorre em mais de 90% dos pacientes, na maioria dos casos afetando os homens, preferencialmente os trabalhadores rurais (BRUMMER, 1993). A progressão da doença é lenta e pode levar meses ou vários anos para apresentar sintomas e sinais clínicos. A PCM crônica, primariamente afeta os pulmões e pode se disseminar para outros órgãos e sistemas, sendo que lesões secundárias aparecem freqüentemente em membranas mucosas, linfonodos, pele e glândula adrenal (TRISTÃO, 2013).

2.3 Paracoccidioidomicose e a resposta imune

A defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis* é mediada por uma complexa interação entre a resposta imune inata e a resposta imune celular. Experimentos mostram, tanto em humanos quanto em camundongos, que a

resistência ao *P. brasiliensis* está ligada à resposta imune do perfil Th1, com elevada secreção de interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) (FORTES, 2011; BERNARD, 2008; CALICH, 2008).

A suscetibilidade está associada com níveis muito baixos de citocinas do padrão Th1 e perfil de resposta imune Th2, com aumento dos níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, ativação de células B e produção de anticorpos. Embora níveis elevados de anticorpos sejam frequentemente associados com PCM na sua forma mais grave, não está claro se eles contribuem para a suscetibilidade ou apenas compõem o quadro de infecção (TRISTÃO, 2013; BORGES-WALMSLEY, 2002).

As células Th17 parecem participar da resposta imune frente a PCM pulmonar produzindo citocinas pró-inflamatórias associadas à resistência contra o fungo (VOO, 2009). Por outro lado, as células T regulatórias parecem participar dos mecanismos imunorregulatórios associados com a resistência ou a susceptibilidade à infecção por mecanismos dependentes da participação das moléculas *toll like receptor 4* (TLR4) e *cluster of differentiation* (CD 28) (FELONATO, 2010; LOURES, 2010).

Na maioria das micoses, os monócitos/macrófagos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Eles estão envolvidos na resistência inata cujo mecanismo contra fungos é a sua capacidade fungicida e síntese de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), exercendo um efeito benéfico na prevenção de infecções fúngicas. Os macrófagos são a principal fonte tanto de TNF- α quanto de interleucina-1 (IL-1), as citocinas que medeiam ambas as respostas inflamatórias locais e sistêmicas (TRACEY, 1994).

Durante o processo inflamatório os macrófagos exercem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação. Os

macrófagos inflamatórios têm maior capacidade de fagocitose e habilidade para gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio, produzir citocinas diversas e fatores de crescimento celular (ROMERA, 2012). As citocinas produzidas pelos macrófagos dependem do tipo de polarização que estas células adquirem, que podem ser M1 ou M2, a função distinta dessas populações de macrófagos é definida pelos fatores que dominam o cenário inflamatório.

Os macrófagos M1 são ativados pela via clássica, geralmente produzem altos níveis de IL-12 e baixos níveis de IL-10, atuando como indutores e efetores de resposta imune Th1. Outras diferentes formas de ativação levam ao perfil de macrófagos M2; geralmente as células M2 secretam moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e induzem resposta Th2. Os macrófagos são capazes de conter a infecção por *P. brasiliensis*, mas geralmente não conseguem eliminar as leveduras, há casos em que elas permanecem viáveis no organismo por muitos anos, sendo capazes de promover novos quadros da doença no decorrer da vida do hospedeiro (ROMERA, 2012).

Diversos fatores podem afetar a resposta imune ao fungo incluindo a susceptibilidade ou resistência genética do animal, a quantidade de fungo infectante, a cepa e a liberação de moléculas imunomoduladoras pelo fungo (CAVASSANI, 2011; PAVANELLI, 2007; FERREIRA, 2003). A via pela qual o agente patogênico atinge o seu hospedeiro também provoca profundas diferenças na resposta imune. A inoculação pela veia caudal lateral (v.c.l.) é capaz de causar infecção pulmonar com padrão fúngico difuso (DA SILVA, 2009). A via subcutânea (s.c.) induz forte imunidade celular e processos infecciosos menos graves do que outras vias, levando apenas a infecção local. As vias de inoculação nasal, intraperitoneal (i.p.) ou

intravenosa (i.v.) estimulam infecção sistêmica causando uma doença disseminada (ARRUDA, 2007).

2.4 Biogênese e atuação dos *microRNAs*

Os MicroRNAs (miRNA) fazem parte de uma classe de reguladores gênicos pós-transcricionais compostos de pequenas sequências de RNA não codificantes que variam de 18 a 25 nucleotídeos. Os genes que codificam os miRNAs compreendem aproximadamente 1% do genoma humano, sendo encontrados, na maioria das vezes, em regiões intergênicas ou em sentido anti-senso de certos genes. No entanto, cerca de 40% encontram-se nos íntrons de genes codificadores e não codificadores de proteínas ou ainda de forma mais rara em éxons (EL-ASSAAD, 2011; LINDSAY, 2008).

Os genes de miRNA são semelhantes aos genes responsáveis pela codificação de proteínas. A regulação é desempenhada pela mesma marca epigenética, ou seja, a forma como esses genes são ativados ou desativados, os promotores relacionados e a transcrição são fatores análogos. As regiões gênicas que codificam miRNAs são transcritas pela RNA polimerase do tipo II, produzindo longas transcrições primárias chamadas de pri-miRNA. Esses, ainda no núcleo, são delimitados, poliadenilados e processados por uma endonuclease do tipo III, chamada Drosha e uma proteína não-catalítica chamada DGCR8 (*Component DiGeorge Syndrome Critical Region 8*), formando os precursores de miRNAs chamados de pré-miRNAs, estruturados em forma de grampo, contendo em média 70 nucleotídeos (PODSHIVALOVA, 2013; LI-FAN LU, 2009).

Os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma pela Exportina 5, receptor de membrana dependente de GTP que realiza o transporte do núcleo para o citoplasma com gasto de energia. No citoplasma, um segundo tipo de ribonuclease III, chamada Dicer, cliva o pré-miRNA formando um duplex contendo uma seqüência curta de 18 a 24 pares de bases, o miRNA maduro. Uma fita deste miRNA maduro, chamado de fio guia, é carregado pela proteína da família Argonauta (Ago 1-4) e incorporado ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC) (OCHS, 2014; PODSHIVALOVA, 2013; LI-FAN LU, 2009).

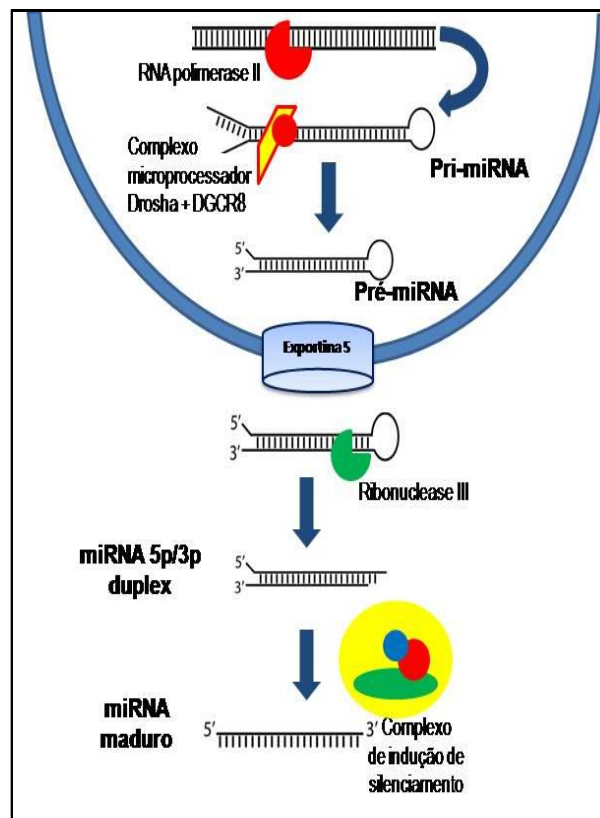


Figura 1 - Biogênese dos microRNAs.
Fonte: O próprio autor.

Cada miRNA pode regular centenas de diferentes genes codificadores de proteínas pela ligação a seqüências complementares na região 3' UTR de RNA mensageiro (mRNA), resultando na inibição de tradução ou degradação do mRNA (EL-ASSAAD, 2011; SULLIVAN, 2009). Embora a interação entre a seqüência de

nucleotídeos de miRNA e mRNA alvo seja imprescindível, não é necessário que haja uma complementaridade perfeita. Essa complementaridade limitada entre um miRNA e seu alvo era vista como um ponto fraco, no entanto, descobriu-se que esta propriedade detém vantagens intrínsecas para a regulação da expressão gênica. A afinidade moderada de um miRNA com seu alvo determinado permite que um único miRNA possa inibir simultaneamente a expressão de centenas de mRNAs distintos (TÉTREAUULT, 2013; EL-ASSAAD, 2011).

Assim, na maioria das vezes, o efeito biológico de um miRNA sobre o fenótipo reflete uma sinergia de todos os seus alvos inibidos. Mesmo sendo observada inibição forte de um único alvo, o mecanismo principal pelo qual os miRNAs desempenham sua função é uma inibição moderada de vários mRNAs, resultando no fenômeno biológico observado (TÉTREAUULT, 2013).

Desde sua descoberta, mais de 1000 miRNA foram identificados em células de mamíferos (LI, 2011; LINDSAY, 2008). A primeira demonstração do importante papel regulatório desempenhado pelos miRNA veio de estudo piloto com miRNA-let-7 e miRNA-lin-4, realizados em *Caenorhabditis elegans*, em 1993, observando interferência em genes que regulam o desenvolvimento do verme (RUVKUN, 2008; WIGHTMAN, 1993). Em humanos, a ausência destes miRNA resultou em células malignas, devido a proliferação contínua em tecidos adultos, a perda de diferenciação e morte celular reduzida (THIAN-SZE, 2011).

Atualmente, alguns aspectos da biologia dos miRNA ainda permanecem desconhecidos, mas é conhecida a atuação na regulação de grande parte da sinalização molecular envolvida no controle da proliferação celular, apoptose, resposta ao estresse, migração e diferenciação, exercendo um papel fundamental em todos os aspectos das doenças humanas (DI LEVA, 2013). Estudos mostram o

envolvimento deles na regulação do desenvolvimento de uma série de processos fisiológicos, incluindo diferenciação celular, hematopoiese e metabolismo do colesterol (DAVIDSON- MONCADA, 2010; LINDSAY, 2008; WILLIAMS, 2007).

Trabalhos recentes revelam que os miRNA desempenham um papel muito importante na regulação da resposta imune. A identificação de múltiplos miRNA em células hematopoiéticas, foi um grande passo para o entendimento dessa regulação, muitas dos quais eram expressos especificamente em células e tecidos de interesse imunológico. As células do sistema hematopoiético podem ser seletivamente identificadas em diferentes tecidos, por seu perfil de expressão de miRNA. Elas expressam cinco miRNA altamente específicos: miRNA-142, miRNA-144, miRNA-150, miRNA-155 e miRNA-223 (DAVIDSON-MONCADA, 2010; LANDGRAF, 2007).

No timo e na medula óssea foi observado o envolvimento dos miRNAs 181 e 223 na diferenciação de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes em células sanguíneas, incluindo várias linhagens de células B e T. Além disso, os miRNAs 17, 92, 150 e 181 estão diretamente envolvidos na diferenciação de células T e B (LI-FAN LU, 2009; COBB, 2006).

Os miRNAs 146, let-7b, 124a, 155, 125b, 220, 199b e 301a atuam regulando negativamente a expressão de diferentes proteínas envolvidas na via de NF-kB em células do sistema imunológico, interferindo assim na produção de mediadores inflamatórios, tais como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o TNF- α . Especificamente o miRNA-301 foi caracterizado por regular negativamente o seu gene alvo, o fator de repressão NKRF, dessa forma atuando na indução de NF-kB (HUANG, 2013).

O miRNA-126, em camundongos, atua na polarização de células Th2, liga-se a *pou2f3* um ativador do fator de transcrição PU.1 que é responsável pela inibição da ativação de DNA ligase ao GATA3 dessa maneira ele promove o padrão Th2 através da regulação negativa do fator de inibição de GATA3 (MATTESS, 2009).

O miRNA-340 apresenta efeitos pleiotrópicos. Pesquisas em células de melanoma humanas mostram que miRNA-340 regula os fatores RAS-RAF-MAPK (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma – Rat Sarcoma Vírus - Mitogen Activated Protein Kinase*) através de modulação da sinalização de expressão de vários componentes desta via. Em pesquisas com modelo de osteosarcoma a super expressão de miRNA340 resultou na inibição de proliferação celular, migração, invasão celular (*in vitro*) e bloqueio de crescimento tumoral (*in vivo*) (STRONG, 2014; ZHOU, 2013).

Os miRNAs 19 e 20a, atuam regulando diferentes fatores, porém influenciam os mesmos pontos do ciclo celular. O miRNA19b atua regulando NOTCH1, fator que promove regulação positiva de promotores das fases G1/S do ciclo celular de células T, levando a uma pausa nas divisões celulares (TOSELLO & FERRANDO, 2013). Sabe-se que em humanos, o miRNA 20a é superexpresso em células tumorais e atua inibindo proliferação celular, invasão e metástase. Sua ação está relacionada com a supressão de E2F1, um fator de transcrição promotor das fases G1/S do ciclo celular de células B. Porém, há indícios de atuação em funções distintas, dependendo do tipo de célula investigada (JIAN-YI LI, 2012).

Os miRNAs let-7a-5p, let-7b-5p, let-7e-5p e let-7f-5p fazem parte da família let-7. Os miRNAs desta família estão relacionados com regulação de proliferação celular. Vários estudos, em humanos, têm observado que a ausência de miR let 7 em células malignas, relaciona-se a proliferação contínua de tecidos, perda de diferenciação e morte celular reduzida (DI LEVA, 2013). Estudo de Jun Lu e

colaboradores (2005) sugere que, na ausência de miRNA- let-7, as células epiteliais específicas sofrem divisões adicionais. Thian-Sze e colaboradores (2011), analisando células humanas, observaram expressão aumentada de miRNA-let-7a/b/d/e/g/i em células normais quando comparado as células carcinogênicas e mostraram que a atuação de let-7 na regulação negativa do oncogene *c-myc*, resulta em diminuição de proliferação celular.

Alguns estudos analisaram o papel da família let-7 na regulação de células T de memória central. Guenin-Macé e colaboradores (2011) observaram que o aumento da expressão do miRNA-let-7b promove, de forma indireta, a expressão de CD62L (L- selectina) em células T CD4+ de memória e T CD8+ de camundongos e em linfócitos do sangue periférico de humanos. Ao contrário disso, estudo realizado *in vitro* observou regulação negativa de miRNAs let-7a/b/c/d/g em células efetoras e de memória central de camundongos ativadas por estímulo antigênico em meio suprido com IL-2 ou IL-15 (ALMANZA, 2010). Embora existam estudos abordando o papel do let-7 na regulação de células T, ainda há muito para ser esclarecido.

O miRNA-26b, em humanos, pode ser considerado como um supressor de tumor. Atualmente, têm sido observada uma relação deste com a inibição de proliferação celular e indução de apoptose em diferentes linhagens de células (OCHS, 2014). A expressão do miRNA-26b é inversamente proporcional à expressão de *cox-2* em carcinoma de células epiteliais nasofaríngeas tratadas com desferrioxamina; demonstrando um *feedback* negativo na expressão de *cox-2* por influência do nível de miRNA-26b (JI, 2010). Recentemente, Li e colaboradores (2013) evidenciaram uma relação entre a superexpressão de miR-26b e inibição de

crescimento de células de câncer de mama pela regulação de COX-2 em células cancerosas humanas.

O miRNA-369-3p foi descoberto por Vasudevan e colaboradores (2007) atuando como modulador de ativação da tradução de TNF- α . Estudos em psoríase humana mostram que o miRNA-369 atua na elevação de níveis de transcrição de TNF- α e outras citocinas mediadas por sequências de mRNA contendo elementos funcionais ricos em adeninas (BAK, 2010).

Thayanithy e colaboradores (2012), mostraram que o miRNA-369-3p assim como outros miRNAs codificados pelo cromossomo 14q32 são regulados negativamente em pesquisa de osteosarcoma humano. Além disso, ao ser restaurada a expressão do miRNA-369, ocorre a diminuição dos níveis de c-Myc e indução de apoptose, sugerindo que este miRNA, assim como o miRNA-26b, é um regulador negativo de *c-myc*, levando a diminuição da proliferação celular.

Chen e Gorski (2008) observaram que o miRNA-130a é um modulador negativo da expressão dos genes GAX (atua na angiogênese de células endoteliais vasculares) e HOXA5 (inibidor de crescimento celular). Estudo recente de Yang e colaboradores (2013) observou um aumento dos níveis basais de miRNA-130a em células jovens de humanos, sugerindo que a sua atuação sobre HOXA5 resulta em proliferação celular.

A relação de miRNAs com a resposta imune a bactérias e vírus em hospedeiros mamíferos tem sido relatada pela literatura, porém, pouco se conhece sobre a sua participação em infecções fúngicas. Recentemente, Das Gupta e equipe (2014) investigaram o possível papel dos miRNAs 132 e 155 em monócitos e células dendríticas de humanos estimulados com *Aspergillus fumigatus* ou com LPS. Ambos miRNAs foram diferencialmente expressos e observou-se indução de miRNA-132

por *Aspergillus fumigatus* mas não por LPS em ambas as células.

Oliveira e cols. (2014) avaliaram a resposta imune inata em macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10) à infecção murina pela cepa Pb18. Os níveis de expressão dos miRNAs 125b, 132, 146a, 155 e 455 dos macrófagos estimulados ou não por células de leveduras foram determinados. Verificou-se um aumento no acúmulo de transcritos para todos os miRNAs analisados, em ambas as linhagens de camundongos testados e uma possível relação com os padrões alterados de expressão de citocinas dos macrófagos.

Neste estudo foi possível verificar miRNA com expressão diferencial durante as diferentes fases do processo infeccioso e investigar a relação destes miRNAs com o quadro histológico do tecido pulmonar e o padrão de células T e citocinas em dois tempos distintos, 28 dias pós infecção (inflamação aguda) e 56 dias pós infecção (inflamação crônica) contribuindo para o melhor entendimento da fisiopatologia da paracoccidiodomicose.

2.5 Referências

ALEGRE, A. C. P. et al. Recombinant Paracoccin Reproduces the Biological Properties of the Native Protein and Induces Protective Th1 Immunity against Paracoccidioides brasiliensis Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p.2788-2794, 2014.

ALMANZA, G. et al. Selected MicroRNAs Define Cell Fate Determination of Murine Central Memory CD8 T Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n.6, p. 112-114, 2010.

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

ARRAES, F.B. et al. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p.290-308, 2005.

ARRUDA, C. et. al. A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 308-316, 2007.

ASSUNÇÃO, L. P. et. al. Análise metalômica do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* durante a infecção. In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX, 2013, Goiânia - Goiás. **Anais do Congresso de Pesquisa, ensino e Extensão – CONPEEX**. Goiânia – Goiás: UFG, 2013. p. 2819-2838. Disponível em: <<http://eventos.ufg.br/SIEC/portalproec/sites/site7201/site/>>.

BAK, R. O.; MIKKELSEN, J. G. Regulation of cytokines by small RNAs during skin Inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n.53, 2010. Disponível em: <<http://www.jbiomedsci.com/content/17/1/53>>. Acesso em 11 de agosto de 2014.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A.A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1.000 cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, n.3, p. 546-550, 2011.

BENARD G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.209-21, 2008.

BICALHO, R.N. et. al. Oral Paracoccidioidomycosis: A retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Diseases**, v.7, n.1, p.56-60, 2001.

BITTENCOURT, J. I.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Parana, Brazil, 1980/1998. *Caderno Saude Publica* 21:1856–1864. (In Portuguese.) Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiology**, v.10, n.2, p. 80-87, 2005.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiology**, v.10, n.2, p.80-87, 2002.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

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

CAVASSANI; K. A. et. al. Cell-Free Antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* Drive IL-4 Production and Increase the Severity of Paracoccidioidomycosis. **Plos One**, v.6, p.1-10, 2011.

CHEN Y.; GORSKI D.H. Regulation of angiogenesis through microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. **Blood**, v.111, p.1217–1226, 2008.

COBB, B.S. et. al. A role for Dicer in immunoregulation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n.11, p. 2519-2527, 2006.

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

DAS GUPTA, M. et. al. Aspergillus fumigatus induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 192-196, 2014.

DA SILVA, F. C. et. al. Morphologic Organization of Pulmonary Granulomas in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.5, p. 798–804, 2009.

DAVIDSON-MONCADA, J.; PAPAVALIIOU, F. N.; TAM, W. MiRNAs of the Immune System: Roles in Inflammation and Cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1183, p. 183–194, 2010.

DI LEVA, G.; CROCE, C. M. Editorial. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 840–841, 2013.

EL-ASSAAD, F. et. al. Differential microRNA expression in experimental cerebral and noncerebral malaria. **Infection Immunology**, v. 79, n.6, p. 2379-2384, 2011.

FELONATO, M. et. al. CD28 exerts protective and detrimental effects in a pulmonary model of paracoccidioidomycosis. **Infection Immunity**, v.78, n.11, p.4922-4935, 2010.

FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, n.3, p.290-297, 2003.

FORTES, M.R. et. al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n.3, p.516-524, 2011.

GODOY, H.; REICHART, P.A. Oral manifestations of Paracoccidioidomycosis. Report of 21 cases from Argentina. **Mycoses**, v.46, n.9-10, p.412-417, 2003.

GUENIN-MACÉ, L. Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression. **Immunology**, v. 108, n.31, p.12833–12838, 2011.

HUANG, L. et. al. Down-regulation of miR-301a suppresses pro-inflammatory cytokines in Toll-like receptor-triggered macrophages. **Immunology**, v. 140, p. 314–322, 2013.

JI, Y. et. al. MiRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells. **FEBS Letters**, v. 584, p. 961–967, 2010.

JIAN-YI LI et. al. Differential Distribution of miR-20a and miR-20b may Underly Metastatic Heterogeneity of Breast Cancers. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 38, 2012.

JUN LU et.al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v.435, p. 833-838, 2005.

LANDGRAF P, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell.**; v.129, p.1401–1414, 2007.

LINDSAY, M.A. microRNAs and the immune response. **Trends Immunology**, v. 29, n.7, p. 343-351, 2008.

LI-FAN LU; LISTON, A. microRNA in the immune system, microRNA as an immune system. **Immunology**, v. 127, n.3, p. 291-298, 2009.

LI, J. et. al. MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. **Cancer Cell International**, v.13, n.7, 2013. Disponível em:<<http://www.cancerci.com/content/13/1/7>>. Acesso em 18 de agosto de 2014.

LI, Z.; WU, F.; BRANT, S.R.; KNOW, J.H. IL-23 Receptor Regulation by Let-7f in Human CD4+ Memory T Cells. **Journal Immunology**, v. 186; p. 6182-6190, 2011.

LINDSAY, M.A. microRNAs and the immune response. **Trends Immunology**, v. 29(7), p. 343-351, 2008.

LOURES, F.V. et. al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infection Immunity**, v.78, n.3, p.1078-1088, 2010.

MACHADO, G. C. **Espécies crípticas em *Paracoccidioides brasiliensis*: diferenciação antigênica e de resposta a fatores estressantes**. 2011. 70 folhas. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/92448>>. Acesso em 15 de setembro de 2014.

MARQUES, A. P. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection by gp 43 Intradermal Test in Rural Settlements in Central-West Brazil. **Mycopathologia**, v.176, p.41–47, 2013.

MATTES, J. et. al. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v.106, p.18704–18709, 2009.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p.15–20, 2009.

OCHS, M. J.; STEINHILBER, D.; SUESS, B. MicroRNAs – Novel Therapeutic Targets of Eicosanoid Signalling. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.114, p.92–96, 2014.

OLIVEIRA, M. A. et. al. Increase in the levels of regulatory microRNAs from murine macrophages in response to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. In: International meeting on Paracoccidioidomycosis, 12., 2014, Brasília - DF. **Anais do International meeting on Paracoccidioidomycosis**. Brasília – DF :UCB, 2014. p. 84-90. Disponível em: < <http://page.ucb.br/BC/producao.lista?tip=TeT&id1=100&id2=5>>. Acesso em 16 de setembro de 2014.

PANIAGO, A.M. et. al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.4, p.455-459, 2003.

PAVANELLI, W.R. et. al. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.163, n.3, p.117-128, 2007.

PODSHIVALOVA, K.; SALOMON, D. R. MicroRNA Regulation of T-Lymphocyte Immunity: Modulation of Molecular Networks Responsible for T-Cell Activation, Differentiation, and Development. **Immunology**, v. 33, n.5, p.435–476, 2013.

ROMERA, L. M. D. **Análise de interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e macrófagos através de receptores do tipo Notch**. Dissertações de Mestrado em Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2012.

RUVKUN, G. The perfect storm of tiny RNAs. **Nature Medicine**, v.14, n.10, p.1041-1045, 2008.

SANTO, A. H. Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of Sao Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 23, p. 313–324, 2008.

SANTOS, R. S. et. al. The human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: a medical and molecular approach. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9,n. 2, p. 281-295, 2011.

SHANKAR, J. et. al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology**,v.24, p.296-313, 2011.

STRONG, A. M. P. et al. microRNA-340 as a modulator of RAS–RAF–MAPK signaling in melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, p.118-124, 2014.

SULLIVAN, C.S. et. al. Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. **Virology**, v. 25, p.157-167, 2009.

TÉTREAULT, N.; DE GUIRE, V. miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 842–845, 2013.

THAYANITHY, V. et. al. Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. **Bone**, v. 50, p. 171–181, 2012.

TOSELLO, V.; FERRANDO, A. A. The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 4, p.199-210, 2013.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **The Annual Review of Medicine**, v.45, p.491–503,1994.

TRISTÃO, F. S. M. et.al. B Cell-Deficient Mice Display Enhanced Susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Mycopathologia**, v. 176, p.1–10, 2013.

THIAN-SZE, W. et. al. MicroRNA let-7 suppresses nasopharyngeal carcinoma cells proliferation through downregulating c-Myc expression. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**,v.137, p.415–422, 2011.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, v. 318, p.1931-1934, 2007.

VERLI, F.D. et. al. Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of São Lucas Hospital, Pontificia Universidade Católica of Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.3, p.234-237, 2005.

VOO, K. S. et. al. Identification of IL-17-producing FOXP3 regulatory T cells in humans. **Immunology**, v. 106, n.12, p. 4793–4798, 2009.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Paracoccidioidomicose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. 12, 2009.

WIGHTMAN, B.; T LLHO, HA; RUVKUN, G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *W-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. **Cell**, v.75, n.5, p.855-862, 1993.

WILLIAMS, A.E. et. al. Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. **Developmental Dynamics**, v.236, n.2, p.572-580, 2007.

YANG, F.; MIAO, L.; MEI, I.; WU, M. Retinoic acid-induced HOXA5 expression is co-regulated by HuR and miR-130a. **Cellular Signalling**, v.25, p. 1476–1485, 2013.

ZHOU, X. et al. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, p. 653–658, 2013.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

- Investigar a expressão de miRNAs relacionados com a resposta inflamatória do tecido pulmonar de camundongos BALB/c durante as fases aguda e crônica da Paracoccidiodomicose experimental.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Avaliar as alterações histopatológicas no tecido pulmonar de camundongos infectados por *P. brasiliensis*;
- Avaliar a expressão dos genes dos fatores de transcrição Gata-3, T-bet, RoRgama T, Foxp3 no tecido pulmonar de camundongos infectados por *P. brasiliensis*;
- Avaliar a expressão dos genes das citocinas IL-17A, INF- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β no tecido pulmonar de camundongos infectados por *P. brasiliensis*;
- Avaliar a expressão de miRNAs relacionados com a resposta inflamatória no tecido pulmonar de camundongos infectados por *P. brasiliensis*.

ARTIGO

4 ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE miRNAs NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Paracoccidioides brasiliensis*

Expressão diferencial de miRNAs durante a infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*

Denise Turini Gonzales Marioto¹, Ana Carolina Navarro dos Santos Ferraro¹, Ana Paula Cheirubim², Fábio Goulart de Andrade³, Marília Barros Oliveira⁴, Eiko Nakagawa Itano¹, Silvana Petrofeza⁴, Emerson José Venancio^{1*}

1 Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas – Universidade Estadual de Londrina

2 Londribio Biotecnologia Indústria e Comércio LTDA.

3 Departamento de Histologia – Universidade Estadual de Londrina

4 Programa de Pós-Graduação em Biologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, – ICB – Universidade Federal de Goiás

*Autor correspondente: Emerson José Venancio

+55 043 3371-5766, emersonjvst@gmail.com

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina, PR

Palavras chave: paracoccidioidomicose, pulmão, doença inflamatória, infecção, sistema imune.

4.1 RESUMO

Recentemente descobertos, os miRNAs, são pequenas sequências de RNA de cadeia simples envolvidos com a regulação pós-transcricional de diferentes processos biológicos e fisiológicos. A regulação desses processos é devido a ação dos miRNAs na estabilidade dos mRNAs. De especial interesse é a ação dos miRNAs no desenvolvimento de linfócitos e na regulação da resposta imune. A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção causada pelo fungo *P. brasiliensis* e é uma das principais causas de mortalidade por micoses sistêmicas. Além disso, a PCM é um dos mais importantes modelos de estudo sobre micoses profundas, sendo de especial interesse a infecção pulmonar. Há poucos relatos sobre o papel dos miRNAs na resposta imune contra fungos, e em especial na PCM. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão diferencial de miRNAs relacionados com a resposta inflamatória na busca de uma relação com os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do processo inflamatório contra *P. brasiliensis*. Foram utilizados 20 animais, sendo 12 camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, por via intravenosa caudal lateral ($2,7 \times 10^7$ células/mL) e 8 camundongos não infectados. Após 28 e 56 dias, os animais foram sacrificados e os pulmões foram coletados. O parênquima pulmonar apresentou muitas leveduras, granulomas e edema no tempo de 28 dias e um quadro de resolução da inflamação com 56 dias. Os mRNAs dos fatores de transcrição gata-3, ror- γ t, foxp3 e da citocina IL-6 foram regulados positivamente no tempo de 56 dias; o mRNA de tgf β -1 foi regulado positivamente nos dois tempos analisados. A expressão diferencial de miRNAs do tecido pulmonar de camundongos mostrou que os miRNAs 126a-5p, 340-5p, 30b-5p, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-3p e 301a-3p, 466k foram os que apresentaram maior aumento de expressão dentre os regulados positivamente no tempo de 28 dias, e os miRNAs let-7f-5p, let-7a-5p, 26b-5p, let-7e-5p e 369-3p apresentaram maior aumento de expressão dentre os regulados positivamente no tempo de 56 dias. Os resultados deste estudo sugerem pela primeira vez, uma possível influência dos miRNAs na regulação de processos celulares inflamatórios que ocorrem durante a resposta imune celular contra infecção de *P. brasiliensis*.

4.2 ABSTRACT

Recently discovered, miRNAs are single stranded small sequences of RNA involved in post-transcriptional regulation of different biological and physiological processes. The regulation of these processes is due to the action of miRNAs in the stability of mRNAs. Of particular interest is the action of miRNAs in lymphocyte development and regulation of immune response. Paracoccidioidomycosis (PCM) is an infection caused by the fungus *P. brasiliensis* and is a major cause of mortality systemic mycoses. Furthermore, the PCM is one of the most important models for study of deep mycosis, being of particular interest pulmonary infection. There are few reports on the role of miRNAs in the immune response against fungi, in particular in PCM. The objective of this study was to evaluate the differential expression of miRNAs associated with the inflammatory response in seeking a relationship with the molecular mechanisms involved in the regulation of the inflammatory process against *P. brasiliensis*. 20 animals were used, 12 BALB/c mice infected with *P. brasiliensis*, intravenously lateral flow (2.7×10^7 cells/mL) and 8 mice not infected. After 28 and 56 days, animals were sacrificed and lungs were collected. The lung parenchyma showed many yeasts, edema, granulomas and time 28 days and resolution of inflammation frame 56 days. The mRNAs of the transcription factors GATA-3, ror-Yt, FoxP3 and IL-6 cytokines were upregulated in time of 56 days; the TGFb-1 mRNA was upregulated in both assessed times. The miRNAs differentially expressed in lung tissue of mice showed that miRNAs 126a-5p, 340-5p, 5p-30b, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-301a-3p and 3p, that were 466k had a greater increase expression from the upregulated in time of 28 days and miRNAs let-7f-5p, 5p-let-7a, 26b-5p, 5p-let-7e and 369-3p had a greater increase expression from the upregulated in time of 56 days. The results suggest for the first time a possible role of miRNAs in regulating inflammatory cellular processes that occur during cellular immune response against *P. brasiliensis* infection.

4.3 INTRODUÇÃO

Há duas décadas foi identificado o primeiro microRNA (miRNA). Os miRNA fazem parte de uma classe de reguladores gênicos pós-transcricionais compostos de pequenas sequências de RNA não codificantes que variam entre 18 a 25 nucleotídeos (EL-ASSAAD, 2011; LINDSAY, 2008). Os miRNAs foram identificados em várias espécies de animais e de plantas, sabe-se, que a maioria deles mantêm sua sequência conservada ao longo da evolução (DE GUIRÉ, 2013). Atualmente já são conhecidos mais de 1000 miRNAs, só em humanos.

Os miRNAs são reconhecidos como grandes reguladores pós-transcricionais, de quase todos os processos biológicos. Cada miRNA é capaz de regular centenas de diferentes genes, de maneira direta ou indireta, pela ligação a sequências complementares na região 3'UTR de mRNAs, resultando na inibição de tradução ou degradação do mRNA alvo (EL-ASSAAD, 2011; SULLIVAN, 2009).

Trabalhos recentes revelam que os miRNAs influenciam diferentes processos biológicos como: a proliferação celular, a apoptose, a diferenciação celular e a resposta imune, tanto inata quanto a adaptativa. A importância do papel dos miRNAs na regulação gênica, resultou em inúmeros estudos e consequente aumento de publicações nos últimos anos. Contudo, o papel de miRNA na infecção fúngica ainda é um tema pouco estudado (DE GUIRÉ, 2013; DAVIDSON-MONCADA, 2010; LANDGRAF, 2007).

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose grave, e ainda hoje é um problema de saúde pública para América Latina. O Brasil é o país com o maior número de casos da doença, tendo uma incidência estimada entre 10 a 30 milhão/casos por habitantes e uma taxa de mortalidade de 1.4 morte/milhão de

habitantes (HERNANDEZ, 2010; SANTO, 2008; BITTENCOURT, 2005). No Brasil, esta micose é endêmica nas regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste (COUTINHO, 2002). Outros países com número significativos de casos são Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (MARQUES, 2013; NUCCI, 2009).

A PCM é adquirida após a inalação de conídios do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Uma vez nos pulmões, os propágulos se convertem na forma de levedura e se instalam no tecido. Em seguida, as células de levedura induzem uma reação inflamatória crônica, que culmina com a formação de granulomas disseminados pelo tecido – podendo se espalhar em vários órgãos através dos sistemas linfático e circulatório, resultando em lesões disseminadas em todo o corpo do hospedeiro (TRISTÃO, 2013; ARRAES, 2005; ARISTIZABAL, 1998).

A defesa do hospedeiro contra PCM é regulada por uma complexa interação entre as células imunes e as citocinas. Estudos indicam que a imunidade mediada por células é a principal defesa do hospedeiro durante a infecção. Além disso, vários estudos têm mostrado que as diferentes formas da doença podem ser resultado da resposta imune, com a predominância de uma resposta *T helper 1* (Th1) ou *T helper 2* (Th2). A resistência a *P. brasiliensis* tem sido associada à produção preferencial das citocinas do tipo Th1 (FORTES, 2011; BERNARD, 2008; BORGES-WALMSLEY, 2002).

Apesar dos avanços no entendimento da resposta imune do hospedeiro frente ao *P. brasiliensis*, pouco é conhecido sobre o papel dos miRNA na regulação da resposta imune contra esse fungo. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da atuação regulatória dos miRNAs na resposta imune celular durante a resposta inflamatória crônica desencadeada pelo fungo *P. brasiliensis* no tecido pulmonar de camundongos. Para isso, foi analisada a expressão de um painel de

miRNAs atuantes no processo inflamatório de camundongos; foi feita a caracterização histológica do parênquima pulmonar, bem como uma avaliação de mRNAs de células T e das principais citocinas dos padrões Th1, Th2, Th17 e T regulatórias presentes no tecido pulmonar, em um modelo experimental de infecção por *P. brasiliensis*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos, BALB/c, machos, com 55 dias de vida e peso de aproximadamente 30 gramas obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), UNICAMP. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Patológicas, com sistema de controle de luz e temperatura, recebendo água e ração à vontade.

A utilização dos animais foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, sob o protocolo de nº 27112.

4.4.2 Microrganismos

Foram utilizadas leveduras do fungo *P. brasiliensis*, cepa Pb18 (ATCC 32069). Antes do inóculo, as formas de leveduras foram cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia), por 7 dias, a 37°C. As leveduras foram coletadas do cultivo, lavadas por duas vezes com

solução salina tamponada com fosfato (PBS, p.H 7.2) estéril e centrifugadas a 280 g, durante 5 minutos. Após a segunda lavagem o precipitado foi coletado e a concentração de células viáveis foi ajustada para $2,7 \times 10^7$ células/mL (OARADA, 2009; CANO, 1995).

4.4.3 *Ensaio in vivo*

Os camundongos foram divididos em dois grupos, o grupo controle (GC) composto por 8 animais e o grupo experimental (GE) composto por 12 animais. Os camundongos do GC não receberam estímulo e o GE foi sedado por inalação de éter etílico e submetido à inoculação endovenosa de *P. brasiliensis*. Para a infecção, cada animal do grupo experimental foi inoculado com $1,4 \times 10^7$ células viáveis de levedura de *P. brasiliensis* em 50 µl de PBS, pH 7,4, conforme descrito por Cano e equipe (1995).

A eutanásia dos animais foi feita por deslocamento cervical após sedação por inalação de éter etílico, no 28º e 56º dia pós-infecção (d.p.i.). Em cada período foram sacrificados 4 animais do GC (sem infecção) e 6 animais do GE (infectados). Logo após a morte, a cavidade torácica dos animais foi aberta e a aurícula direita rompida; 5 mL de PBS foram então injetados diretamente no coração, a fim de insuflar os pulmões e retirar qualquer sangue restante (COCK, 2000).

Os pulmões de todos os animais foram removidos e processados. O pulmão esquerdo foi destinado para análise de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). O pulmão direito foi dividido conforme as suas subunidades para diferentes análises: a extremidade superior (lobo cranial) foi destinada à análise histológica, a porção intermediária (lobo médio) para extração e quantificação de miRNAs e a porção inferior (lobo caudal) para extração e quantificação de RNA total.

4.4.4 *Análise histopatológica*

Os lóbulos craniais do pulmão direito de todos os camundongos foram fixados em solução de Bouin aquosa por 24 horas, incluídos em paraplast e destinados à microtomia (BEÇAK e PAULETE, 1970). Foram realizados cortes de 5 ou 7 μm de espessura em micrótomo.

Para análise do padrão inflamatório dos tecidos, os cortes foram corados com hematoxilina/eosina (H&E) e para a detecção específica das estruturas fúngicas presentes no tecido, os cortes foram corados com Ácido periódico-Schiff (PAS) e contracorados com hematoxilina. A análise histológica foi realizada em microscópio óptico Axion Vision Rel. 4.7 e a documentação fotográfica em sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado ao microscópio óptico. Para a avaliação do padrão inflamatório, foram considerados aspectos histológicos, como edema, presença de macrófagos, células gigantes, linfócitos, plasmócitos e a presença de leveduras e de granulomas.

A análise histopatológica foi realizada de forma qualitativa por análise descritiva da observação de 10 campos aleatórios, com aumento de 200x, para cada animal. As imagens foram analisadas em programa Motic Image Plus 2.0 (Motic, Xiamen, China).

4.4.5 *Análise da expressão de genes da resposta imune*

Para análise da expressão genes da resposta imune, o lobo caudal do pulmão direito foi processado para a extração de RNA total pelo método do TRIZOL[®] seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A expressão dos genes *gata-3*, *t-bet*, *ror-γ*, *foxp3*, *il-17a*, *inf-γ*, *il-2*, *il-4*, *il-10* e *tgf-β* foi avaliada por RT-qPCR usando o sistema SYBR® Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com primers sintetizados a partir de dados da literatura (Tabela 1). Inicialmente 1 µg de RNA total tratado com DNase I (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) foi transcrito reversamente usando oligo(dT)₁₂₋₁₈, e submetido a Real-time PCR. As amplificações foram feitas no sistema StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) em reações de 12 µL contendo 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 6 µL de SYBR Green PCR Master mix (2x) e 0,2 µL de cDNA. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram feitas por 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min.

Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram avaliados usando o método de comparação relativa $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e teve o gene murino *gapdh* como gene controle de expressão constitutiva.

4.4.6 Análise da expressão de microRNAs

A expressão de miRNA foi avaliada nos tempos 28 e 56 d.p.i. O lobo médio do pulmão direito foi processado para a extração de miRNA utilizando o miRNeasy Mini Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o miScript II RT Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA). Essas primeiras fitas de cDNA sintetizadas foram utilizadas como molde para a reação de amplificação de qPCR. As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços no sistema StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), onde cada poço contém as

primeiras fitas de cDNA correspondente aos 84 miRNAs relacionados com autoimunidade e resposta inflamatória de camundongos, pré determinados pelo miScript miRNA PCR Array e os genes *snord61*, *snord68*, *snord72*, *snord95A* e *rnub2*, usados como controles constitutivos (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA).

Os níveis de expressão dos microRNAs analisados foram calculados usando o Método $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), tendo como controle de expressão constitutiva a média de expressão dos genes murinos controles, acima descritos. Foram considerados diferencialmente expressos aqueles miRNAs que se encontraram induzidos em um dos dois tempos analisados.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Análise histopatológica

Em todos os animais do grupo controle 28^o e 56^o d.p.i dias foi observada estrutura microscópica pulmonar com aspecto de normalidade (Figuras 1a e 1c). Por outro lado, nos animais do grupo experimental foram observadas estruturas fúngicas e infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares e linfócitos. A análise microscópica demonstrou características distintas nos diferentes tempos analisados (Figuras 1b e 1d). No 28^o d.p.i, foi observada a presença de granulomas compactos e frouxos, regiões com células inflamatórias, grande número de leveduras e células em apoptose (Figura 2a – d). No 56^o d.p.i foram observadas regiões com edema, presença de células mononucleares, porém, foram raros os campos onde houve a presença de leveduras. Por outro lado, a presença de alvéolos com a estrutura parcialmente preservada, pôde ser verificada, observando luz alveolar e paredes interalveolares (Figura 1d).

O padrão da análise tecidual sugere regressão do quadro inflamatório entre o 28º e o 56º dia (Figura 1b e 1d).

4.5.2 *Análise da expressão dos mRNAs*

Os mRNAs dos fatores de transcrição GATA-3, Ror-YT e FoxP3 foram regulados positivamente no tempo de 56 d.p.i., quando comparado como tempo de 28 d.p.i. (Tabela 2). Os mRNAs das citocinas IL-6 e *tgf*β1 apresentaram-se regulados positivamente, sendo a citocina IL-6 apenas no tempo de 56 d.p.i e TGFβ1 nos dois tempos analisados (Tabela 3). O mRNA do fator de transcrição T-bet e os mRNAs das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A e INF-γ apresentaram níveis basais de expressão de mRNAs nos tempos de 28º e 56º d.p.i.

4.5.3 *Análise da expressão dos miRNAs*

A análise avaliou 84 miRNAs relacionados com a resposta inflamatória de camundongos nos tempos de 28º e 56º d.p.i. Nos dois tempos os miRNAs 20b-5p e 743b-3p, apresentaram nível basal de expressão (Tabela 4; Figuras 3 e 4).

Analisando o tecido dos animais infectados no 28º d.p.i, tendo o tecido dos animais infectados no 56º d.p.i como referência, setenta e quatro miRNAs tiveram a sua expressão regulada positivamente. Dentre eles, os miRNAs com maior aumento de expressão (valores de $2^{\Delta Ct}$ acima de 50,0), foram: 126a-5p, 340-5p, 30b-5p, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-3p e 301a-3p, 466k. Apenas oito tiveram a sua expressão regulada negativamente. Dentre esses, os miRNAs com maior redução da expressão (valores de $2^{\Delta Ct}$ abaixo de 0,05) foram let-7f-5p, let-7a-5p, 26b-5p, let-7e-5p e 369-3p (Tabela 5; Figura 5).

Ao analisar o tecido dos animais no tempo de 56^o d.p.i, tendo o tecido dos animais infectados no 28^o d.p.i. como controle, dez miRNAs tiveram a sua expressão regulada positivamente, dentre eles, os miRNAs let-7f-5p, let-7a-5p, 26b-5p, let-7e-5p e 369-3p apresentaram maior aumento de expressão (valores de $2^{\Delta Ct}$ acima de 50,0). Além disso, 72 miRNAs tiveram a sua expressão regulada negativamente, sendo que os que apresentaram maior redução de expressão (valores de $2^{\Delta Ct}$ abaixo de 0,05), foram: 126a-5p, 340-5p, 30b-5p, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-3p e 301a-3p, 466k (Tabela 5).

4.6 DISCUSSÃO

A evolução do processo infeccioso nos pulmões causado pelo fungo *P. brasiliensis* envolve a formação de infiltrado inflamatório e granulomas. Normalmente a inflamação granulomatosa é mais intensa no início do processo infeccioso, pois no primeiro contato com o fungo há uma resposta imune do animal seguida de uma diminuição no número de granulomas após a segunda semana de infecção. No entanto, nas semanas que seguem, ocorre nova proliferação do patógeno que estimula uma nova frente de resposta imune resultando em um novo aumento do número de granulomas (DA SILVA, 2009; ANDRÉ, 2004).

Os nossos resultados mostram que no 28^o dia pós-infecção há um padrão histológico característico de reação inflamatória granulomatosa. Os granulomas observados apresentaram infiltrados de células gigantes, contornando as células fúngicas e presença de células fagocíticas. Os granulomas foram caracterizados como compactos, e em alguns casos, o tecido apresentou uma estrutura sem fronteiras definidas, aspecto típico de granulomas frouxos, esses resultados estão

de acordo com dados descritos na literatura (ARAÚJO, 2013; COCK, 2000 MARIANO, 1995). Também foram observados no tecido pulmonar, plasmócitos localizados na periferia dos granulomas, essa é uma característica típica de granulomas maduros causados pelo *P. brasilienses*, segundo Brito et. al. (1994).

Analisando o quadro inflamatório no 56 d.p.i foi observado um número pequeno de leveduras no tecido pulmonar – quadro histológico característico de resolução da inflamação. Da Silva et. al. (2009) em um experimento com camundongos Swiss infectados com *P. brasiliensis* observaram uma progressão da infecção e de fibrose pulmonar, após quatro semanas, seguido de maior organização tecidual na oitava semana, indicando um processo inflamatório resolutivo. Nossos resultados são semelhantes ao descrito neste estudo.

Estudos sobre o papel dos miRNAs no quadro de infecção fúngica ainda são escassos. Porém, investigações recentes em modelos murinos, avaliaram a relação do papel de miRNAs na resposta inflamatório em diferentes processos associados a lesão pulmonar. Cai e colaboradores (2012) promoveram indução de lesão pulmonar por estímulo com LPS, e mostraram que o aumento da expressão de miRNA-16, pode regular negativamente o nível de expressão de IL-6 e TNF- α , no tecido, de forma direta. Guo et. al. (2013) mimetizaram uma regulação negativa do miRNA-155 em um quadro de lesão pulmonar aguda (LPA), por meio de um tratamento com o oligonucleotídeo antisenso do miRNA-155. Os resultados mostram que sem a interferência do miRNA-155, a proteína C/EBP β atua como indutora da secreção de IL-10, no desenvolvimento do fenótipo M2 de macrófagos e na indução da expansão de células T regulatórias, dessa forma, a regulação negativa de miRNA 155 pode aumentar a recuperação da LPA pela regulação positiva da C/EBP β . TAN e colaboradores (2014) investigaram um quadro de miRNAs diferencialmente

expressos durante o processo de regeneração do tecido pulmonar lesionado, em modelo de infecção viral e observaram uma regulação negativa da expressão relativa de vários miRNAs cujos genes alvos estão envolvidos nos processos de regeneração tecidual.

Um estudo em tecido pulmonar de camundongos mostrou que a família Let-7 compreende 64% dos miRNAs totais expressos no pulmão, e que após indução de processo inflamatório no animal, houve uma proteção contra invasão do tecido pulmonar (FOSTER, 2013). Nossos resultados mostram que o processo inflamatório induzido pelo *P. brasiliensis* leva a um aumento dos miRNAs Let-7, com destaque para let-7a, let-7e e let-7f, após 56 dias de infecção, neste momento o tecido pulmonar apresenta poucas leveduras e um infiltrado inflamatório menos intenso do que o observado no 28 d.p.i., infere-se que esse aspecto tecidual esteja relacionado com o aumento de expressão dos miRNAs da família let-7, concordando com o papel protetor no tecido pulmonar observado no trabalho citado acima.

Segundo Li e colaboradores (2011), a IL-23 é uma citocina essencial para a sobrevivência e manutenção das células Th17 tanto murinas quanto humanas. Eles observaram que as células T de memória expressam menos Let-7f do que as células T virgens, e sugerem que o miRNA Let-7f apresenta uma correlação inversa com a expressão de IL17, ou seja, o aumento de expressão de Let-7f gera uma regulação negativa da expressão do receptor de IL-23 (IL-23R), que por sua vez regula negativamente a expressão de IL-17 nas células, interferindo no perfil das células Th17. Em nosso estudo, essa relação entre a expressão Let-7f, IL-17A e células Th17 não foi observada, porém no 56 d.p.i houve regulação positiva de expressão do miRNA Let-7f juntamente com aumento da expressão do fator de transcrição ror-Yt, sugerindo que o miRNA Let-7f pode estar relacionado com a

regulação da população de células Th17 nos animais avaliados, porém não podemos inferir a forma como ocorre essa regulação.

O miRNA-26b-5p é conhecido por seu papel na inibição de proliferação celular, inclusive em estudo de tecido pulmonar lesionado (GUO, 2008). Estudo de encefalomielite autoimune experimental em camundongos, sugere que o miRNA-26 regule negativamente o mRNA da IL-6 e dessa forma leve a um aumento da população das células T regulatórias. Com 56 d.p.i, houve uma regulação positiva do miRNA-26b, junto a isso, observou-se uma menor expressão de IL-6 e aumento de expressão do fator de transcrição Foxp3, principal fator de transcrição das células Tregs, comparado com o tempo de 28 d.p.i, sugerindo um possível papel regulatório exercido pelo miRNA-26 (ZHANG, et. al. 2015).

Em humanos, observou-se que o miRNA-369-3p, regula positivamente a secreção citocinas pró-inflamatórias, principalmente de TNF α em diferentes situações, como, por exemplo, em células não mitóticas (VASUDEVAN, 2007), em quadro de psoríase (BAK, 2010) e em processos de cicatrização pulmonar (JIANG, 2010). Nossos dados divergem desses relatos, pois o aumento de expressão deste miRNA no tempo de 56 dias coincide com menor grau de lesão tecidual, comparado com o tempo de 28 d.p.i., o significado biológico desse achado deve ser melhor investigado.

O miRNA 126a-5p, apresentou um aumento da expressão no tempo de 28 dias. Esse miRNA tem sido relacionado com inúmeras funções, dentre elas: inibição de invasão de tumor, regulação da sinalização angiogênica e integridade vascular (GUO, 2008) e atuação em vias de sinalização induzidas por TNF- α (FOSTER, 2013). Em camundongos, Mattes e cols. (2009) e Foster e cols. (2013) mostraram que a regulação positiva da expressão do fator de transcrição GATA3 é

uma consequência da inibição realizada pelo miRNA-126 a fatores reguladores prévios desta via. O miRNA-126 também pode agir em vários mRNAs alvos que regulam ativação e processos de recrutamento celular inibindo sequelas inflamatórias. A expressão aumentada do miRNA 126 no tempo de 28 d.p.i. pode ser responsável pela regulação positiva da expressão relativa de gata-3 observada nesse mesmo tempo. Também pode estar relacionado com a capacidade de proteção contra sequelas inflamatórias nos animais - uma vez que seu aumento de expressão coincide com o período em que o animal apresentou reação inflamatória defensiva contra o fungo e os animais analisados após o processo inflamatório crônico não apresentaram indícios de cicatrizes profundas nos pulmões (FOSTER, 2013).

A maioria dos miRNAs com expressão aumentada no tempo de 28 dias, não puderam ser relacionados com aspectos imunes ou teciduais visualizados, devido a falta de informações sobre o modo de ação na infecção do tecido pulmonar. Novos estudos são necessários para investigar o papel de cada um deles no modelo de infecção por *P.brasiliensis*. Por outro lado, a participação desses miRNAs em processos biológicos tem sido relatada em vários estudos. Brown e Yin (2012) investigaram o miRNA-221-3p e observaram que ele pode estar relacionado com a regulação de resposta imune mediada por ativação dos receptores TLR-4. Estudo em macrófagos sugerem que o miRNA-301a-3p atue na regulação da atividade do fator NF- κ B (HUANG, 2013). O miRNA-130a-3p está envolvido na modulação negativa de fatores anti-angiogênicos, promovendo a angiogênese (OSBOURNE, 2014). Os miRNAs 15a (DI LEVA, 2013; KLEIN, 2010), 19b (TOSSELO E FERRANDO, 2013), 340 (STRONG, 2014; ZHOU, 2013) e 30-b (CHEN, 2014) atuam no controle da proliferação celular através da regulação negativa da divisão

celular, por diferentes vias. Os miRNAs 466k (DRUZ, 2011) e 20a (MATSUBARA, 2007) estão relacionados com a inibição de genes anti-apoptóticos e indução de apoptose.

A citocina TGF β 1 é uma citocina anti-inflamatória que modula a resposta inflamatória, exercendo funções reparadora e reguladora das lesões teciduais. Nos dois períodos de análise do nosso estudo, os níveis de mRNA de *tgfb* 1 estavam regulados positivamente, caracterizando um aumento desta citocina durante o processo inflamatório, sugerindo que houve sua contribuição no reparo tecidual resultando em menor intensidade da seqüela tecidual, porém, não encontramos uma relação entre esse aumento de *tgfb*1 com a expressão dos miRNAs avaliados (COCK, 2000).

Alterações significativas na expressão de miRNAs ocorrem durante um quadro inflamatório, concomitante a ativação e diferenciação dos subconjuntos de células T, porém, não há um padrão estabelecido de miRNAs nos tipos de células T, um quadro exato, um perfil de expressão característico de miRNAs individuais em linfócitos. Infere-se que os níveis de expressão sofrem alterações constantes durante a imunidade ativa, sendo difícil estabelecer um padrão de expressão dos miRNAs em subconjuntos de linfócitos T, até mesmo quando a célula se encontra em condição homeostática (JEKER et. al., 2013; LI et. al, 2011).

Portanto, os resultados deste estudo nos levam a concluir que as mudanças histológicas observadas no parênquima pulmonar nos tempos de 28 d.p.i. e 56 d.p.i são resultados da dinâmica regulação pós-transcricional realizada pelos miRNAs durante o processo inflamatório induzido, sendo necessária a realização de estudos específicos, para o esclarecimento das vias que estão sendo reguladas

pelos miRNAs e de que forma está ocorrendo a regulação no tecido pulmonar de camundongos neste modelo experimental.

4.7 REFERÊNCIAS

ANDRÉ, D. C. et. al. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 549–558, 2004.

ARAÚJO, V.C. et. al. Neutrophils in Oral Paracoccidioidomycosis and the Involvement of Nrf2. **PLoS ONE**, v.8, n.10, p. 769-776, 2013.

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

ARRAES, F.B. et. al. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p.290-308, 2005.

BAK, R. O.; MIKKELSEN, J. G. Regulation of cytokines by small RNAs during skin Inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n.53, 2010. Disponível em: <<http://www.jbiomedsci.com/content/17/1/53>>. Acesso em 11 de agosto de 2014.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Nobel, 1970.

BENARD G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.209-21, 2008.

BITTENCOURT, J. I.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Parana, Brazil, 1980/1998. *Caderno Saude Publica* 21:1856–1864. (In Portuguese.) Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiology**, v.10, n.2, p. 80-87, 2005.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiology**, v.10, n.2, p.80-87, 2002.

BRITO, T. & FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n.2, p. 185-192, 1994.

BROWN, P.N. & YIN, H. PNA-based microRNA inhibitors elicit anti-inflammatory effects in microglia cells. **Chemical Communications**, v.49, p. 4415-4417, 2013.

CAI, ZHI-GANG et.al. MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.90, n.1, p. 37-43, 2012.

CANO, L. E. et. al. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in Resistant and Susceptible Mice: Relationship among Progression of Infection, Bronchoalveolar Cell Activation, Cellular Immune Response, and Specific Isotype Patterns. **Infection and immunity**, v.63, p. 1777–1783, 2005.

CHEN, L. et al. Special role of Foxp3 for the specifically altered microRNAs in Regulatory T cells of HCC patients. **BMC Cancer**, v. 14, p. 489-499, 2014.

COCK, A.M. et. al. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, p.59–66, 2000.

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

DA SILVA, F. C. et. al. Morphologic Organization of Pulmonary Granulomas in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.5, p. 798–804, 2009.

DAVIDSON-MONCADA, J.; PAPAVALIIOU, F. N.; TAM, W. MiRNAs of the Immune System: Roles in Inflammation and Cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1183, p. 183–194, 2010.

DE GUIRE, V. & TÉTREAULT, N. miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 842–845, 2013.

DI LEVA, G.; CROCE, C. M. Editorial. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 840–841, 2013.

DRUZ, A. A Novel MicroRNA mmu-miR-466h Affects Apoptosis Regulation in Mammalian Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, n.7, p. 1651-1662, 2011.

EL-ASSAAD, F. et. al. Differential microRNA expression in experimental cerebral and noncerebral malaria. **Infection Immunology**, v. 79, n.6, p. 2379-2384, 2011.

FORTES, M.R. et. al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Revista do Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n.3, p.516-24, 2011.

FOSTER, P. S. et. al. The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. **Immunological Reviews**, v. 253, p.198–215, 2013.

GUO, C. et al. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 47, p. 939–946, 2008.

- GUO, Z. et. al. Antisense Oligonucleotide Treatment Regulatory T Cells Macrophage-Induced Expansion of CD4 + through IL-10 Secreting M2-like Enhances the Recovery of Acute Lung Injury. **Journal Immunology**, v 190, p.4337-4348, 2013.
- HERNÁNDEZ, O. et. al. . A 32-Kilodalton Hydrolase Plays an Important Role in *Paracoccidioides brasiliensis* Adherence to Host Cells and Influences Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 5280–5286, 2010.
- HUANG, L. et. al. Down-regulation of miR-301a suppresses pro inflammatory cytokines in Toll-like receptor-triggered macrophages. **Immunology**, v.140, p.314-322, 2013.
- JEKER, L. T.; BLUESTONE, J. A. MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. **Immunological Reviews**, v. 253, p. 65-81, 2013.
- JIANG, X et. al. microRNAs and the regulation of fibrosis. **Journal Federation of European Biochemical Societies**, v. 277, n.9, p. 2015–2021, 2010.
- KLEIN,U. et. al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer Cell**, v.17, p. 28–40, 2010.
- LANDGRAF P, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell.**; v.129, p.1401–1414, 2007.
- LINDSAY, M.A. microRNAs and the immune response. **Trends Immunology**,v.29, n.7, p. 343-351, 2008.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT). **Methodology Methods**, v.25, p.402–408, 2001.
- LI, Z.; WU, F.; BRANT, S.R.; KNOW, J.H. IL-23 Receptor Regulation by Let-7f in Human CD4+ Memory T Cells. **Journal Immunology**, v. 186; p. 6182-6190, 2011.
- MARIANO, M. The experimental granulomas a hipotesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n.2, p. 161-176, 1995.
- MARQUES, A. P. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection by gp 43 Intradermal Test in Rural Settlements in Central-West Brazil. **Mycopathologia**, v.176, p.41–47, 2013.
- MATSUBARA, H. et. al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressingmiR-17-92. **Oncogene**, v. 26, p. 6099–6105, 2007.
- MATTES, J. et. al. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, p. 18704–18709, 2009.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p.15–20, 2009.

OARADA, M. et. al. Beneficial effects of a low-protein diet on host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Nutrition**, v. 25, p.954–963, 2009.

OSBOURNE, A. et. al. Downregulation of connexin43 by microRNA-130a in cardiomyocytes results in cardiac arrhythmias. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.74, p. 53–63, 2014.

SANTO, A. H. Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of Sao Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 23, p. 313–324, 2008.

STRONG, A. M. P. et. al. microRNA-340 as a modulator of RAS–RAF–MAPK signaling in melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.563, p. 118–124, 2014.

SULLIVAN, C.S. et. al. Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. **Virology**, v. 25, p.157-167, 2009.

TAN, K.S. et.al. Micro-RNAs in regenerating lungs: an integrative systems biology analysis of murine influenza pneumonia. **BMC Genomics**, v.15, p. 587- 600, 2014.

TOSELLO, V.; FERRANDO, A. A. The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 4, n.3, p. 199–210, 2013.

TRISTÃO, F. S. M. et.al. B Cell-Deficient Mice Display Enhanced Susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Mycopathologia**, v. 176, p.1–10, 2013.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, v. 318, p.1931-1934, 2007.

ZHANG, et. al. MicroRNA-21 regulates intestinal epithelial tight junction permeability. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, p. 235-240, 2015.

ZHOU, X. et. al. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, p. 653–658, 2013.

4.8. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos mRNAs alvos. Genes dos fatores de transcrição: Foxp3 (Forkhead box P3), T-bet (T-box transcription factor 21), ROR- γ t (RAR-related orphan receptor gamma), Gata-3 (trans-acting T-cell-specific transcription factor 3) e citocinas: IL-2 (Interleucina 2), IL-4 (Interleucina 4), IL-6 (Interleucina 6), IL-10 (Interleucina 10), IL-17A (Interleucina 17A), TGF β 1 (Transforming Growth Factor- β 1), IFN γ (interferon-gama).

Oligonucleotídeos:	Sequências:	Referências:
Mouse T-bet	FW primer, 5' GCCAGGGAACCGCTTATA-3' RV primer, 5'-CCTTGTTGTTGGTGAGCTTTA-3'	Shin et al., 2013
Mouse Gata-3	FW primer, 5'-CTGGATGGCGGCAAAGC-3' RV primer, 5'-GTGGGCGGGAAGGTGAA-3'	
Mouse FoxP3	FW primer, 5'-GAAAGCGGATACCAAATGA-3' RV primer, 5'-CTGTGAGGACTACCGAGCC-3'	
Mouse IL-17 ^a	FW primer, 5'-GCTCCAGAAGGCCCTCAGA-3' RV primer, 5'-AGCTTTCCCTCCGCATTGA-3'	
Mouse Tgf-b1	FW primer, 5'-CACCGGAGAGCCCTGGATA-3' RV primer, 5'-GCCGCACACAGCAGTTCTT-3'	
Mouse IL-6	FW primer, 5'-CACTTCACAAGTCGGAGGCTT3' RV primer, 5'-TCAGAATTGCCATTGCACAAC-3'	Hurayama et. al., 2013
Mouse IL-10	FW primer, 5'-AGAGCAAGGCAGTGGAGCAG-3' RV primer, 5'-TGGCCTTGTAGACACCTTGGTC-3'	
Mouse IFN- γ	FW primer, 5'-GCAACAGCAAGGCCGAAAAAG-3' RV primer, 5'-CTCATTGAATGCTTGGCGCT-3'	
Mouse Foxp3	FW primer, 5'-TGGTCTCTGCAGGTTTAGTGC-3' RV primer, 5'-TCCAAGTCTCGTCTGAAGGC-3'	
Mouse ROR- γ t	FW primer, 5'-CATCGACAAGGCCCTCCTAGC-3' RV primer, 5'-TTCCACATGTTGGCTGCACA-3'	
Mouse IL-2	FW primer, 5'-ACAACACATTTGAGTGCC-3' RV primer, 5'-AGAGAGCCTTATGTGTTG-3'	
Mouse IL-4	FW primer, 5'-CCTCACAGCAACGAAGAACA-3' RV primer, 5'-ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT-3'	Li & Li, 2013
Mouse GAPDH	FW primer, 5'-AGCCTCGTCCCGTAGACAA-3' RV primer, 5'-ATGAAGGGGTCGTTGATGGC-3'	

Fonte: O próprio autor.

Tabela 2: Análise da expressão relativa dos mRNAs dos principais fatores de transcrição das células T. Valores de expressão relativa expressos em $-2^{\Delta CT}$.

Genes:	Tempos:	ΔCt:	$2^{\Delta Ct}$:
<i>ror-γt</i>	28 dias	5,043	0,030
	56 dias	2,077	0,237
<i>Tbet</i>	28 dias	10,69	0,001
	56 dias	9,29	0,002
<i>gata-3</i>	28 dias	3,994	0,063
	56 dias	3,212	0,108
<i>foxp3</i>	28 dias	4,762	0,037
	56 dias	2,643	0,160

Fonte: o próprio autor.

Tabela 3: Análise da expressão relativa dos mRNAs das citocinas relacionadas com os padrões de resposta das células T. Valores de expressão relativa expressos em $-2^{\Delta CT}$.

Genes:	Tempos:	ΔCT:	$2^{\Delta CT}$:
<i>il-2</i>	28 dias	8,551	0,003
	56 dias	6,057	0,015
<i>il-4</i>	28 dias	8,827	0,002
	56 dias	6,971	0,007
<i>il-6</i>	28 dias	4,159	0,056
	56 dias	8,335	0,003
<i>il-10</i>	28 dias	8,282	0,003
	56 dias	7,363	0,006
<i>il-17A</i>	28 dias	6,928	0,008
	56 dias	0,000	0,000
<i>tgfβ1</i>	28 dias	3,092	0,117
	56 dias	2,401	0,189
<i>infγ</i>	28 dias	6,926	0,008
	56 dias	7,346	0,006

Fonte: o próprio autor.

Tabela 4 – Relação do Fold Change de todos os microRNAs avaliados e dos genes de expressão constitutivas (controles), análise feita tendo o tempo de 56 d.p.i. avaliado em relação ao tempo de 28 d.p.i. (controle).

Posição na placa	microRNA analisado	Fold Change (56 dias tendo 28 dias como controle)
A01	mmu-let-7a-5p	4076,6387
A02	mmu-let-7b-5p	6,8231
A03	mmu-let-7c-5p	0,4855
A04	mmu-let-7d-5p	0,2233
A05	mmu-let-7e-5p	123,1184
A06	mmu-let-7f-5p	37576,0381
A07	mmu-let-7g-5p	0,0676
A08	mmu-let-7i-5p	0,1451
A09	mmu-miR-106a-5p	0,0766
A10	mmu-miR-106b-5p	0,0677
A11	mmu-miR-1192	0,16
A12	mmu-miR-126a-5p	0,0009
B01	mmu-miR-128-3p	0,0488
B02	mmu-miR-130a-3p	0,0181
B03	mmu-miR-130b-3p	0,2037
B04	mmu-miR-135a-5p	0,3141
B05	mmu-miR-140-5p	0,0317
B06	mmu-miR-144-3p	0,2966
B07	mmu-miR-155-5p	0,0312
B08	mmu-miR-15a-5p	0,0178
B09	mmu-miR-15b-5p	0,0378
B10	mmu-miR-16-5p	0,0317
B11	mmu-miR-17-5p	0,0647
B12	mmu-miR-181a-5p	0,137
C01	mmu-miR-181b-5p	0,1001
C02	mmu-miR-181c-5p	0,4818
C03	mmu-miR-181d-5p	0,0721
C04	mmu-miR-182-5p	0,0455
C05	mmu-miR-186-5p	0,0414
C06	mmu-miR-195a-5p	0,0834
C07	mmu-miR-19a-3p	0,04
C08	mmu-miR-19b-3p	0,0086
C09	mmu-miR-200c-3p	0,0676
C10	mmu-miR-20a-5p	0,0168
C11	mmu-miR-20b-5p	0,5906
C12	mmu-miR-221-3p	0,0093
D01	mmu-miR-222-3p	0,0591
D02	mmu-miR-23a-3p	0,1128
D03	mmu-miR-23b-3p	0,0471
D04	mmu-miR-26a-5p	0,044
D05	mmu-miR-26b-5p	743,9136
D06	mmu-miR-27a-3p	0,0407
D07	mmu-miR-27b-3p	0,0381
D08	mmu-miR-291a-3p	0,1595
D09	mmu-miR-294-3p	0,0901

D10	mmu-miR-295-3p	0,0357
D11	mmu-miR-29a-3p	0,0696
D12	mmu-miR-29b-3p	0,0368
E01	mmu-miR-29c-3p	0,4376
E02	mmu-miR-301a-3p	0,0195
E03	mmu-miR-301b-3p	0,0204
E04	mmu-miR-302b-3p	0,3247
E05	mmu-miR-302d-3p	0,0935
E06	mmu-miR-30a-5p	0,0726
E07	mmu-miR-30b-5p	0,0085
E08	mmu-miR-30c-5p	0,1733
E09	mmu-miR-30d-5p	0,0519
E10	mmu-miR-30e-5p	0,0485
E11	mmu-miR-322-5p	0,0343
E12	mmu-miR-325-3p	0,1482
F01	mmu-miR-338-5p	0,0844
F02	mmu-miR-340-5p	0,0079
F03	mmu-miR-350-3p	0,032
F04	mmu-miR-369-3p	56,7162
F05	mmu-miR-384-5p	0,0762
F06	mmu-miR-410-3p	0,1224
F07	mmu-miR-429-3p	0,0738
F08	mmu-miR-466d-3p	0,0544
F09	mmu-miR-466k	0,0195
F10	mmu-miR-495-3p	0,0758
F11	mmu-miR-497a-5p	0,0726
F12	mmu-miR-568	0,1808
G01	mmu-miR-590-3p	0,1987
G02	mmu-miR-669h-3p	0,2568
G03	mmu-miR-669k-3p	0,1441
G04	mmu-miR-694	0,1652
G05	mmu-miR-712-5p	0,0328
G06	mmu-miR-721	2,0806
G07	mmu-miR-743a-3p	0,0375
G08	mmu-miR-743b-3p	0,8623
G09	mmu-miR-876-3p	0,1987
G10	mmu-miR-9-5p	0,4463
G11	mmu-miR-93-5p	0,0889
G12	mmu-miR-98-5p	2,3083
H01	cel-miR-39-3p	0,0496
H02	cel-miR-39-3p	0,2443
H03	SNORD61	0,962
H04	SNORD68	3,2867
H05	SNORD72	1,1464
H06	SNORD95	0,6555
H07	SNORD96A	0,666
H08	RNU6-6P	0,6319
H09	miRTC	3,2314
H10	miRTC	1,5998
H11	PPC	0,3336
H12	PPC	0,3928

Fonte: o próprio autor.

Tabela 5 – Relação dos miRNAs com expressão diferencial entre o 28^o e 56^o d.p.i. Valores de expressão relativa expressos em $-2^{\Delta CT}$. Análise de expressão de um tempo em relação ao outro (controle).

miRNAs:	28 dias	56 dias
<i>mmu-miR-369-3p</i>	0,02	56,72
<i>mmu-let-7e-5p</i>	0,01	123,12
<i>mmu-miR-26b-5p</i>	0,00	743,91
<i>mmu-let-7a-5p</i>	0,00	4076,64
<i>mmu-let-7f-5p</i>	0,00	37576,04
<i>mmu-miR-126a-5p</i>	1074,41	0,00
<i>mmu-miR-340-5p</i>	127,26	0,01
<i>mmu-miR-30b-5p</i>	117,82	0,01
<i>mmu-miR-19b-3p</i>	116,48	0,01
<i>mmu-miR-221-3p</i>	108,09	0,01
<i>mmu-miR-20a-5p</i>	59,41	0,02
<i>mmu-miR-15a-5p</i>	56,20	0,02
<i>mmu-miR-130a-3p</i>	55,31	0,02
<i>mmu-miR-301a-3p</i>	51,28	0,02
<i>mmu-miR-466k</i>	51,25	0,02

Fonte: o próprio autor.

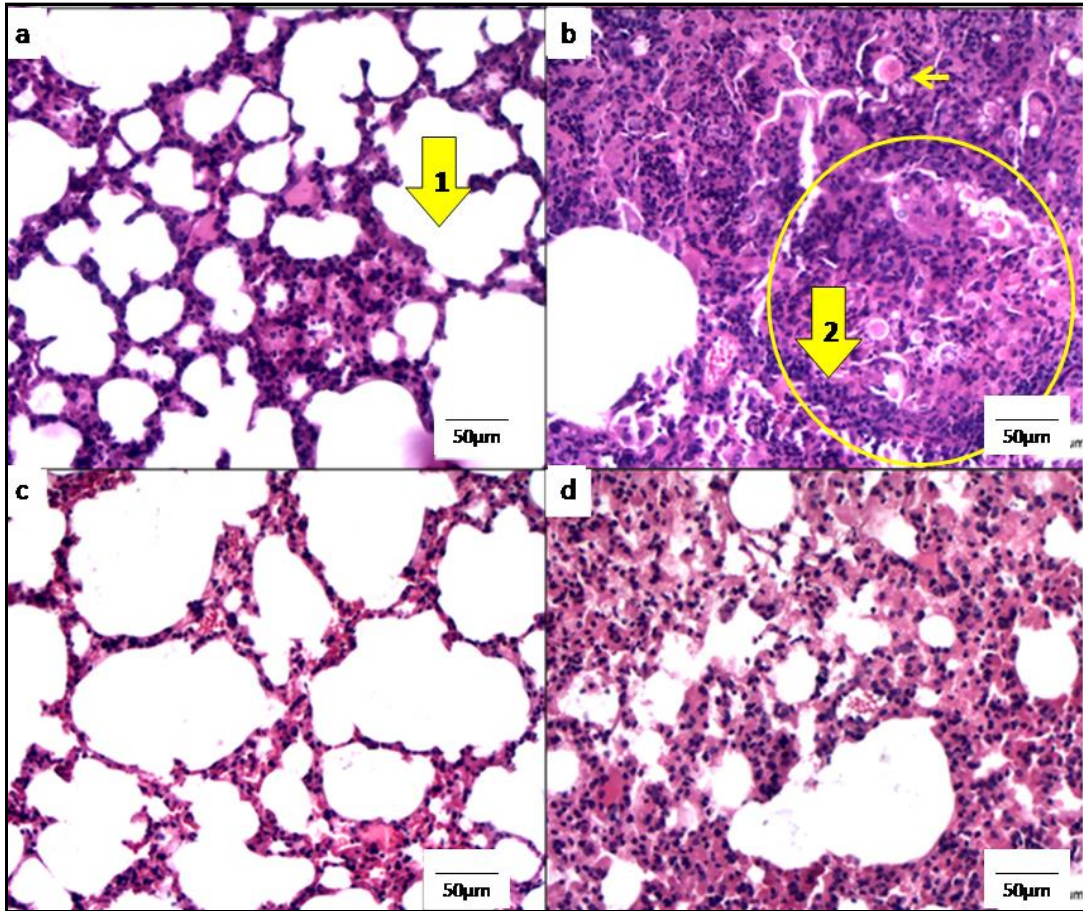


Figura 1 – Aspectos histopatológico do tecido pulmonar de camundongos BALB/c no 28º e no 56º dia do experimento. a) – Animal controle no 28º dia; b) – Animal infectado no 28º dia; c) – Animal controle no 56º dia; d) – Animal infectado no 56º dia. Setas grandes: 1, luz alveolar; 2, aglomerado de linfócitos; seta pequena: leveduras; círculo: granuloma compacto. Coloração com Hematoxilina e Eosina, aumento de 200 x, barra de escala: 50µm. **Fonte:** O próprio autor.

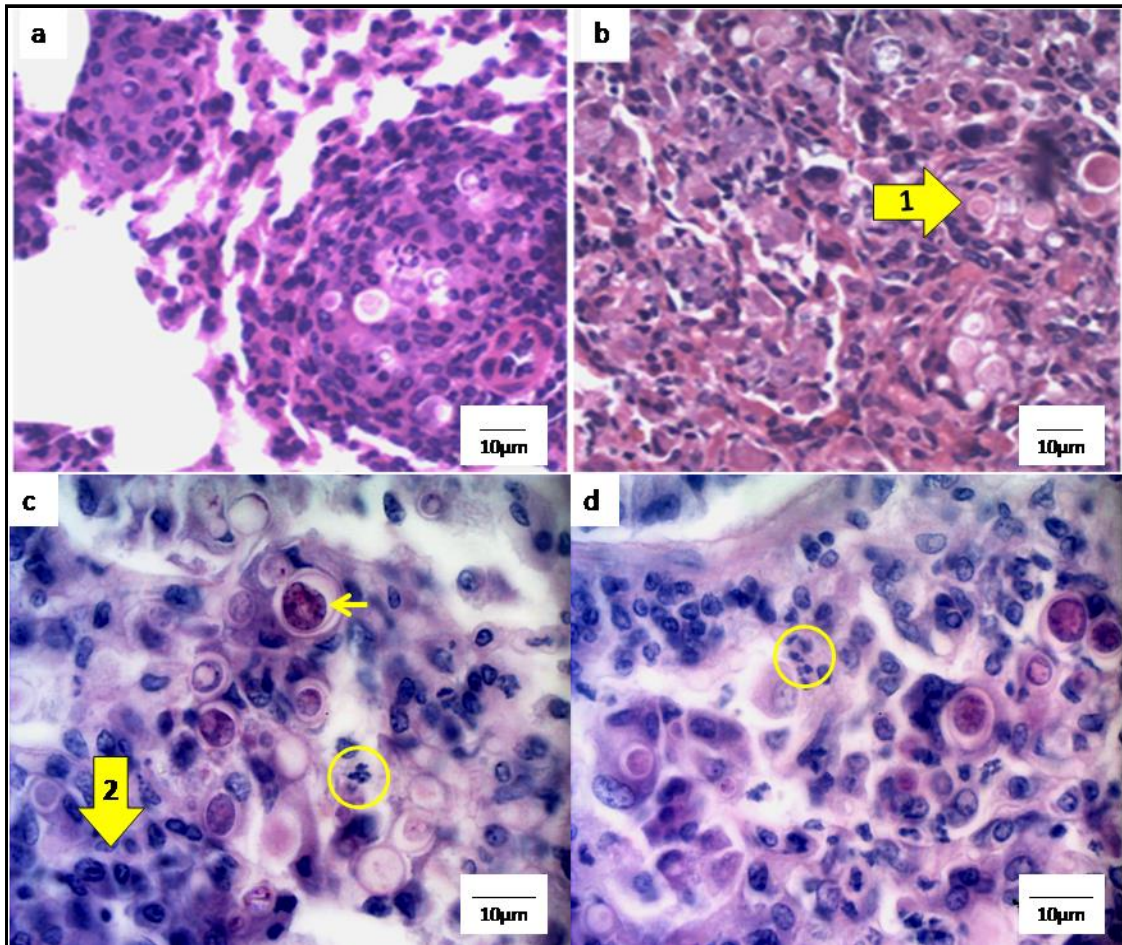


Figura 2 – Padrão histopatológico do tecido pulmonar no 28º d.p.i. a) - Granuloma compacto; b) – Granuloma frouxo; c) Detalhe de corte histológico animal 1 infectado; d) Detalhe de corte histológico do animal 2 infectado. A e B: Coloração com Hematoxilina e Eosina, aumento de 400 x, barra de escala: 10µm. C e D: Coloração com Ácido Periódico de Schiff, aumento de 600 x, barra de escala: 10µm. Setas grandes: 1, leveduras contidas por macrófagos nos granulomas; 2, aglomerado de linfócitos B; setas pequenas: leveduras; círculos: indícios de apoptose; d.p.i.: dias após infecção. **Fonte:** o próprio autor.

Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	mmu-let-7a-5p	mmu-let-7b-5p	mmu-let-7c-5p	mmu-let-7d-5p	mmu-let-7e-5p	mmu-let-7f-5p	mmu-let-7g-5p	mmu-let-7i-5p	mmu-miR-106a-5p	mmu-miR-106b-5p	mmu-miR-1192	mmu-miR-126a-5p
	4076.64	6.82	-2.06	-4.48	123.12	37576.04	-14.79	-6.89	-13.06	-14.77	-6.25	1074.41
	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	A	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
B	mmu-miR-128-3p	mmu-miR-130a-3p	mmu-miR-130b-3p	mmu-miR-135a-5p	mmu-miR-140-5p	mmu-miR-144-3p	mmu-miR-155-5p	mmu-miR-15a-5p	mmu-miR-15b-5p	mmu-miR-16-5p	mmu-miR-17-5p	mmu-miR-181a-5p
	-20.50	-55.31	-4.91	-3.18	-31.56	-3.37	-32.07	-56.20	-26.44	-31.51	-15.45	-7.30
	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
C	mmu-miR-181b-5p	mmu-miR-181c-5p	mmu-miR-181d-5p	mmu-miR-182-5p	mmu-miR-186-5p	mmu-miR-195a-5p	mmu-miR-19a-3p	mmu-miR-19b-3p	mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-20a-5p	mmu-miR-20b-5p	mmu-miR-221-3p
	-9.99	-2.08	-13.87	-21.98	-24.16	-11.99	-25.03	-116.48	-14.79	-59.41	-1.69	-108.09
	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
D	mmu-miR-222-3p	mmu-miR-23a-3p	mmu-miR-23b-3p	mmu-miR-26a-5p	mmu-miR-26b-5p	mmu-miR-27a-3p	mmu-miR-27b-3p	mmu-miR-291a-3p	mmu-miR-294-3p	mmu-miR-295-3p	mmu-miR-29a-3p	mmu-miR-29b-3p
	-16.92	-8.87	-21.24	-22.73	743.91	-24.57	-26.22	-6.27	-11.10	-28.00	-14.37	-27.17
	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
E	mmu-miR-29c-3p	mmu-miR-301a-3p	mmu-miR-301b-3p	mmu-miR-302b-3p	mmu-miR-302d-3p	mmu-miR-30a-5p	mmu-miR-30b-5p	mmu-miR-30c-5p	mmu-miR-30d-5p	mmu-miR-30e-5p	mmu-miR-322-5p	mmu-miR-325-3p
	-2.29	-51.28	-48.96	-3.08	-10.70	-13.77	-117.82	-5.77	-19.27	-20.61	-29.19	-6.75
	OKAY	OKAY	OKAY	B	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B
F	mmu-miR-338-5p	mmu-miR-340-5p	mmu-miR-350-3p	mmu-miR-369-3p	mmu-miR-384-5p	mmu-miR-410-3p	mmu-miR-429-3p	mmu-miR-466d-3p	mmu-miR-466k	mmu-miR-495-3p	mmu-miR-497a-5p	mmu-miR-568
	-11.85	-127.26	-31.29	56.72	-13.12	-8.17	-13.55	-18.38	-51.25	-13.19	-13.77	-5.53
	OKAY	OKAY	OKAY	A	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B
G	mmu-miR-590-3p	mmu-miR-669h-3p	mmu-miR-669k-3p	mmu-miR-694	mmu-miR-712-5p	mmu-miR-721	mmu-miR-743a-3p	mmu-miR-743b-3p	mmu-miR-876-3p	mmu-miR-9-5p	mmu-miR-93-5p	mmu-miR-98-5p
	-5.03	-3.89	-6.94	-6.05	-30.45	2.08	-26.68	-1.16	-5.03	-2.24	-11.25	2.31
	C	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B	OKAY	B	C	OKAY	OKAY	OKAY

Figura 3 – Mapa da placa de análise RT-PCR real time, contendo fold chance de todos os genes avaliados. **Fonte:** O próprio autor.

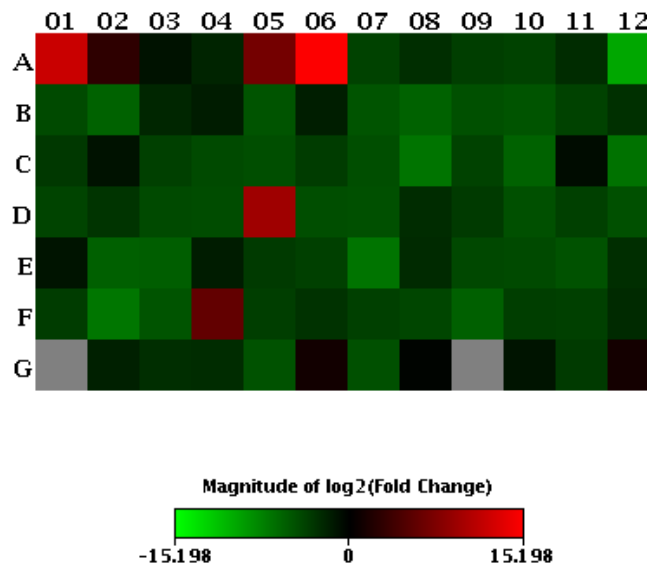


Figura 4 – Heat mapa da análise de miRNAs interpretando os fold chances obtidos para cada amostra por intensidade de cor. **Fonte:** O próprio autor.

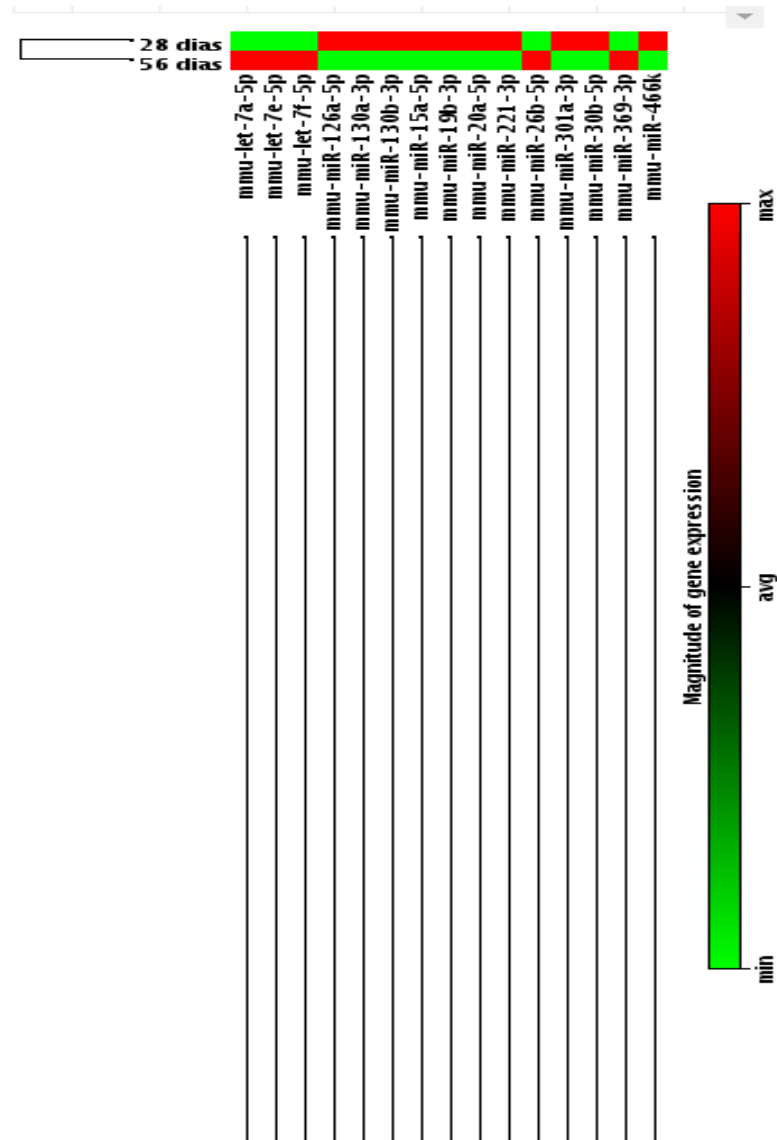


Figura 5 – Clustergrama dos microRNAs regulados positivamente com maior expressão relativa nos tempos avaliados. Análise comparativa de expressão de um tempo em relação ao outro (controle). **Fonte:** o próprio autor.

5 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- O parênquima pulmonar apresenta alterações histopatológicas no 28^o d.p.i. compatível com o desenvolvimento de um processo inflamatório devido a presença do fungo;
- Esse mesmo parênquima apresenta no 56^o d.p.i. um aspecto histopatológico compatível com o controle da infecção por *P. brasiliensis* e a recuperação ativa da estrutura pulmonar;
- Houve alteração significativa da expressão dos genes para os fatores de transcrição Gata-3, RoR γ T e Foxp3 no 56^o d.p.i e das citocinas IL-6 e TGF- β nos 28^o e 56^o d.p.i.;
- No 28^o e 56^o d.p.i. os miRNAs 26a-5p, 340-5p, 30b-5p, 19b-3p, 221-3p, 20a-5p, 130a-3p, 301a-3p, 466k, let-7f-5p, let-7a-5p, 26b-5p, let-7e-5p e 369-3p tem uma alteração significativa da expressão;
- Sugere-se que a regulação dos miRNAs esteja modulando mecanismos de divisão celular, apoptose, transcrição de citocinas pró-inflamatórias, resposta imune celular, preservação e restauração do tecido lesionado pelo processo inflamatório e sinalização através de receptores celulares. Porém há necessidade de mais estudos em modelo experimental para esclarecimento das vias que estão sendo reguladas pelos miRNAs.