

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

Eudislaine Fonseca de Carvalho

Resposta antiviral em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*: comparativo entre infecção por vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e dsRNA.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Computacional e Sistemas

Orientador: Dr. André Nóbrega Pitaluga

RIO DE JANEIRO

2013

i

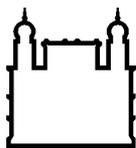
de Carvalho, Eudislaine Fonseca

Resposta antiviral em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*: comparativo entre infecção por vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e dsRNA./ Eudislaine Fonseca de Carvalho. – Rio de Janeiro: 2013.

67 p.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Computacional e Sistemas, 2013.

1 Resposta antiviral 2 *Lutzomyia longipalpis* 3 Vírus da Estomatite Vesicular.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: Eudislaine Fonseca de Carvalho

Resposta antiviral em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*: comparativo entre infecção por vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e dsRNA.

ORIENTADOR: Dr. André Nóbrega Pitaluga

Aprovada em: 12/12/2013

EXAMINADORES:

- Prof. Dr. **Renata Schama** - Presidente
- Prof. Dr. **Ana Cristina Bahia Nascimento**
- Prof. Dr. **Fernando Ariel Genta**
- Prof. Dr. **Antônio Jorge Tempone**
- Prof. Dr. **João Silveira Moledo Gesto**

Rio de Janeiro, 12 de Dezembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pelas oportunidades, pela proteção, pelos dons do espírito santo e por ter colocado vocês, presentes nesses agradecimentos, em minha vida. O que seria de mim sem a fé que tenho Nele.

Gostaria de começar agradecendo ao meu orientador, Dr. André Pitaluga, por ter me aceitado como sua aluna, pela sua dedicação, compreensão, incentivo, pela sua amizade todo esse tempo e principalmente por me acalmar em momentos de conflito com experimentos, seminário discente e até mesmo problemas pessoais. Ele sempre dizia: Di... Vai dar tudo certo! Obrigada André, você é um ótimo professor e orientador!

Dedico este trabalho e agradeço aos meus pais e ao meu irmão, pois não mediram esforços para que eu chegasse a mais esta conquista em minha vida. Por sempre me apoiarem em todas minhas escolhas, sempre com muito amor, conselhos e puxões de orelha. Nossa família tem vários problemas, como todas as outras, mas nosso amor e união supera tudo, amo vocês incondicionalmente.

A minha mãe, aquela que quando tenho que ir embora, com lágrimas nos olhos me abençoa e me fortalece. Pelo o exemplo que me dá todos os dias de que o amor e o perdão são a chave da vida, sua bondade para com os outros ilumina a todos e me faz crer que nada está perdido quando se tem fé. Ao meu pai, meu eterno herói, que independente do que faça ou diga sempre será meu amor maior. Obrigada pelas visitas ao Rio, foram essenciais para me fortalecer. Muito obrigada pai e mãe por todos os ensinamentos, vocês são meus mestres da vida.

Meu querido irmão, te agradeço muito pelo simples fato de estar sempre presente em minha vida, você é meu orgulho e meu exemplo de vida, meu porto seguro em todos os momentos. Sem você não sei se conseguiria chegar até aqui, e digo isso financeiramente também (hehe).

A minha Vozinha, que tanto amo... Sempre querendo que eu volte pra perto dela, mas mesmo assim sempre me apoiando nos estudos. Dedico também este trabalho ao vovô Elson e ao vovô Valdir, vocês foram grandes perdas em minha vida, sinto muito a falta de vocês.

A minha madrinha/prima Sara, que sempre foi um exemplo para mim. Ao meu primo Tiago pela força e momentos de distração. Aos primos Lucas e Regiane por me darem o presente e satisfação de ser madrinha do Guiiii, prometo ser boa nisso! A toda minha família, tias, tios, primos e primas pelos conselhos e momentos de diversão, churrascos e piadas não faltaram nos finais de semana que estive em casa.

Obrigada a Jessica e Daiane por ajudarem minha mãezinha em Minas.

Gostaria de agradecer as amigas de longa data, Loiane, Suellen e Patrícia por estarem sempre presentes em minha vida. A minha amiga/prima Shiara pelos conselhos, pelas diversões, por ouvir meus problemas, meus desabafos... Obrigada pela sua amizade!

Ao meu grande amigo Ronan pelo apoio, carinho e amizade! Jamais esquecerei o que fez por mim para que eu chegasse até aqui.

As minhas amigas e irmãs que conheci na faculdade Ketury e Gabe por me ajudarem em todas minhas dificuldades e por continuarem presentes em minha vida, mesmo com toda essa distância geográfica... Sinto muito a falta de vocês!

Aos amigos que conheci nesses dois anos de pós, Mari, Tati e Maykon... Vocês foram essenciais nessa caminhada. Com vocês tive os melhores momentos ai no Rio, vocês são pessoas excepcionais e espero que nossa amizade ainda perdure por um loooongo tempo, adoro vocês!!!

Agradeço também aos colegas do lab Bruno, Gabriel, Andrea, Andres, Poliana, Dani, Ana Paula, Rute e tantos outros que passaram pelo lab... Muito obrigada pela ajuda e apoio!

Aos amigos de pós Priscila, Paulo e Vivian... Obrigada pelo companheirismo e ajuda nas disciplinas!

Aos pesquisadores Dra. Yara e ao Dr. Antônio Tempone pelos ensinamentos, conversas e apoio neste período.

Ao laboratório de Biologia Celular, Dr. Rubem e Thabata pela colaboração nos experimentos de microscopia.

Ao Dr. João da UFMG por ceder os vírus utilizados nesse trabalho.

A Tati e Dona Mariza pelos cafezinhos de cada dia, pelas conversas e distrações no prédio.

A todos os professores do curso de pós graduação que foram importantes na minha formação e desenvolvimento desse projeto.

A pós graduação em Biologia Computacional e Sistemas.

E por fim a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Há sempre uma luz para quem acredita
E as portas logo se abrem para nós
É acreditar que tudo é possível
É ter a certeza que não lutamos sós.
(Arnaldo Alves de Carvalho)

LISTA DE ABREVIATURAS

Aag2 – Linhagem celular embrionária de *Aedes aegypti*

Ago2 - Argonauta 2

AMPs - Peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides*)

ATG - Proteínas relacionadas à autofagia (*Autophagy-related Protein*)

C6/36 – Linhagem celular de *Aedes albopictus*

cDNA - DNA complementar

CHO - Células de ovário de hamster Chinês

CrPV - Vírus da Paralisia do Grilo

DAP – Ácido diaminopimélico (*Diaminopimelic Acid*)

Dcr2 - Dicer 2

DCV - Vírus C de *Drosophila* (*Drosophila C virus*)

DCV1A - Supressor da via de RNA vírus C de *Drosophila* 1A

DEN-2 - Vírus Dengue do tipo 2 (*Dengue Virus type 2*)

Dif - Fator imune homólogo a Dorsal (*Dorsal Immune Factor*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Dome – Receptor de membrana Domless

dsRNA - RNA dupla-fita (*Double-stranded RNA*)

FHV - Vírus Flock House (*Flock House Virus*)

GFP – Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

hop – Hopscotch

IAPs - Proteínas inibidoras da apoptose (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)

IκB – I Kappa B

IL - Interleucina

Imd - Deficiência imunológica (*Immune Deficiency*)

InVs – Vírus específico de insetos

JAK - Janus quinase

LL5 – Linhagem celular embrionária de *Lutzomyia longipalpis*

Loqs - Loquacious

MDC - Monodansil cadaverina

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MOI - Multiplicidade de infecção (*Multiplicity of Infection*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONNV – Vírus O'nyong-nyong

NFκB - Fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR - PCR quantitativo ou PCR em tempo real

PAMP – Padrão molecular associado a patógenos (*Pathogen-associated Molecular Patterns*)

PGRP - Proteínas de Reconhecedoras de Peptideoglicano (*Peptidoglycan Recognition Proteins*)

PRR - Receptor de Reconhecimento Padrão (*Pattern Recognition Receptors*)

RISC - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (*RNA-induced Silencing Complex*)

RNA - Ácido ribonucléico

RNAi - RNA de interferência

RNA_m - RNA mensageiro

RNAse III – Enzima ribonuclease III

RP49 - Proteína ribossomal 49

siRNA - RNAs de interferência curtos

S2 – Linhagem celular de *Drosophila melanogaster* S2

SF - Febre do Flebotomíneo (*Sandfly Fever*)

SFCV - Vírus Chipre da Febre do Flebotomíneo (*Sandfly Fever Cyprus Virus*)

SFNV - Vírus Nápoles da Febre do Flebotomíneo (*Sandfly Fever Naples Virus*)

SFSV - Vírus Sicília da Febre do Flebotomíneo (*Sandfly Fever Sicilian Virus*)

SFTV - Vírus Turquia da Febre do Flebotomíneo (*Sandfly Fever Turkey Virus*)

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

TLR - Receptor do tipo Toll (*Toll Like Receptors*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alpha (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

TSV - Vírus da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus*)

Upd – Proteína não pareada (*Unpaired Protein*)

Uuk - Uukuniemi

Vir-1 - RNA 1 induzido

VLP – Partículas virais (*Virus-like Particles*)

VSR - Supressor da via de RNAi (*Viral Suppressors of RNAi*)

VSV - Vírus da Estomatite Vesicular (*Vesicular Stomatitis Virus*)

VSV-G - Proteína G do vírus da Estomatite Vesicular

WNV - Vírus do Oeste do Nilo (*West Nile Virus*)

WSSV - Vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos.....	3
Figura 2: Distribuição geográfica de leishmaniose visceral no Velho e Novo mundo.	4
Figura 3: Ciclo de vida do vírus da Dengue.	6
Figura 4: Distribuição dos vírus Toscana, Sicília e Nápoles na União Europeia e nos países vizinhos ao redor do Mar Mediterrâneo.....	8
Figura 5: Distribuição dos vírus da febre do flebotomíneo por sorotipo.....	8
Figura 6: Estrutura do vírus da Estomatite Vesicular (VSV).....	11
Figura 7: Imunohistoquímica demonstrando linhagem celular embrionária de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (LL5) infectadas com o vírus do Oeste do Nilo.....	13
Figura 8: Vias de resposta imune em insetos	16
Figura 9: Patógenos e sinalização imune inata para a indução de autofagia em moscas	19
Figura 10: Silenciamento de RNA contra infecção viral.....	20
Figura 11: Via siRNA demonstrando os supressores virais de RNAi (VSRs) dos vírus FHV, DCV e CrPV	22
Figura 12: Via de imunidade de insetos e sua ligação com a via de RNAi e do gene Vago....	24
Figura 13: Efeito da transfecção de RNA na atividade de luciferase em células C6/36 de <i>Aedes albopictus</i> e LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas com partículas virais do vírus do Oeste do Nilo com gene repórter para luciferase.....	26
Figura 14: Expressão relativa dos genes Argonauta2 e Dicer2 em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transfetadas com duplas fitas de RNA para Ago2 e Dcr2.....	333
Figura 15: Expressão relativa dos genes Vago e Vir-1 em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transfetadas com duplas fitas de RNA para o gene Argonauta2.	344
Figura 16: Detecção do vírus da Estomatite Vesicular (VSV) em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	36
Figura 17: Expressão relativa dos genes Dicer, Vago e Stat em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transfetadas com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C), infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e em células controle não transfetadas (mock)	387
Figura 18: Expressão relativa do gene Defensina 4 em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transfetadas com dsRNA sintética (poly I:C), infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e em células controle não transfetadas (mock)	39
Figura 19: Expressão relativa do gene Atg18 em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transfetadas com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C), infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e em células controle não transfetadas (mock)..	400

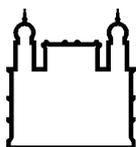
Figura 20: Análise de microscopia de fluorescência de monodansil cadaverina (MDC) em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transfectadas com dupla fita de RNA (poly I:C), infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e somente transfectadas com agente de transfecção (mock).....	411
Figura 21: Análise de microscopia de fluorescência de monodansil cadaverina (MDC) em células LL5 de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	422
Figura 22: Detecção do vírus da Estomatite Vesicular (VSV) em células Aag2 de <i>Aedes aegypti</i>	433
Figura 23: Expressão relativa do gene Stat em células Aag2 de <i>Aedes aegypti</i> transfectadas com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C), infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e em células controle não transfectadas (mock).....	44
Figura 24: Comparação entre as infecções com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) das células Aag2 de <i>A. aegypti</i> e LL5 de <i>L. longipalpis</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição geográfica de <i>Phlebovirus</i> e sua associação com artrópodes.....	11
Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos para <i>Lutzomyia longipalpis</i>	311
Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos para <i>Aedes aegypti</i>	311

ÍNDICE:

AGRADECIMENTOS	iiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xivv
ABSTRACT	xv
1 Introdução	1
1.1 Flebotomíneos	2
1.2 Arbovírus	4
1.3 Flebotomíneos e arbovírus	7
1.4 Resposta imune em artrópodes	15
1.5 Resposta antiviral	17
1.6 Participação das vias clássicas na imunidade contra vírus	24
1.7 Resposta antiviral inespecífica	25
2 Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 Materiais e Métodos	29
3.1 Cultura de células	29
3.2 Transfecção em células LL5 e Aag2	29
3.3 Silenciamento dos genes de interesse em LL5	29
3.4 Transfecção de dsRNA em LL5 e Aag2.....	30
3.5 Infecção viral	30
3.6 PCR em tempo real (RT-PCR).....	300
3.7 Análise de microscopia de fluorescência.....	32
4 Resultados	33
4.1 Silenciamento de genes de interesse.....	33
4.2 Infecções com VSV e transfecção de dsRNA em células LL5	344
4.3 Análise de microscopia de fluorescência nas células LL5	40
4.4 Infecções com VSV e transfecção de dsRNA em células Aag2.....	42
4.5 Comparação entre infecções com VSV em LL5 e Aag2.....	44
5 Discussão	466
6 Conclusão	566
7 Perspectivas	577
Referências	588



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

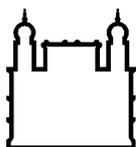
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Resposta antiviral em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*: comparativo entre infecção por vírus da Estomatite Vesicular (VSV) e dsRNA.

RESUMO

Eudislaine Fonseca de Carvalho

As doenças transmitidas por insetos vetores são de grande importância para saúde pública. No Brasil, as principais doenças compreendem a malária, doença de Chagas, leishmaniose, dengue e febre amarela. O inseto vetor flebotômico é o principal transmissor da leishmaniose. Porém, também são vetores de outros agentes patogênicos e hospedeiros de diversos outros microrganismos, tais como bactérias, fungos e arbovírus. Os arbovírus são biologicamente transmitidos entre hospedeiros vertebrados por insetos hematófagos. Sua distribuição ocorre de forma global, porém a maioria é encontrada em áreas tropicais, onde as condições climáticas permitem a transmissão durante todo o ano. Os arbovírus do gênero *Vesiculovirus*, *Orbivirus* e *Phlebovirus* são os mais comuns encontrados em flebotômicos. Além destes gêneros isolados do próprio inseto, os vírus Mayaro e do Oeste do Nilo também são capazes de infectar uma linhagem celular (LL5) da espécie *Lutzomyia longipalpis*. A resposta imune é essencial para os artrópodes sobreviverem aos agentes patogênicos, as principais vias envolvidas na resposta imune de artrópodes incluem a via Imd, Toll e Jak/Stat. Os artrópodes possuem diversos mecanismos contra infecção viral, entre eles a apoptose, a via de RNA de interferência (RNAi) e a autofagia. O mecanismo utilizado pela maioria dos vetores é o silenciamento da expressão gênica dos vírus através da via do RNAi. Esta via é amplamente conservada em diferentes espécies e se baseia na complementariedade do RNA dupla fita (dsRNA) para degradação de mRNA, sendo assim uma resposta sequência específica. A via Jak/Stat também tem sido associada à resposta antiviral. O gene responsivo a vírus, Vago, atua como um interferon like e é responsável pela ativação de Jak/Stat. A única descrição que existe sobre a resposta antiviral em flebotômicos é uma resposta inespecífica, que é ativada por qualquer dsRNA. Como não se tem conhecimento preciso dos mecanismos de defesa antiviral neste inseto, nosso trabalho avalia o papel de diferentes componentes do sistema imune no mecanismo de defesa antiviral em células LL5. Realizamos dois modelos eficientes de infecção com vírus VSV e mimetização da infecção, através de transfecção de poly I:C (dsRNA), em células LL5 e em células Aag2 de *A. aegypti* para o estudo da resposta antiviral. Após a infecção ou transfecção de dsRNA avaliamos o perfil de expressão de alguns genes da resposta antiviral: Dicer 2, Vago, Stat, Defensina e Atg18. LL5 apresentou uma resposta a infecção com VSV diferente das células Aag2, sendo que nestas células a dsRNA é capaz de ativar uma resposta antiviral contra VSV, diferentemente das células LL5. Sugerimos também que a resposta antiviral de LL5 contra infecção com VSV ocorra através do mecanismo de autofagia, pois, outros genes clássicos da via de RNAi e Jak/Stat (Dicer, Vago e Stat) não foram modulados positivamente neste modelo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Antiviral response in LL5 cells of *Lutzomyia longipalpis*: comparative between Vesicular Stomatitis virus (VSV) infection and dsRNA.

ABSTRACT

Eudislaine Fonseca de Carvalho

Insect-borne diseases have a great importance in public health. In Brazil, the main diseases transmitted by insects include malaria, Chagas disease, leishmaniasis, dengue and yellow fever. Sandflies are the main vectors of leishmania parasites, but may also harbor and even transmit other pathogens such as bacteria, fungi and arbovirus. The arboviruses are biologically transmitted between vertebrate hosts by hematophagous insects. Its distribution occurs globally, but mostly in tropical areas, where climatic conditions may allow transmission throughout the year. The arbovirus of the genus *Vesiculovirus*, *Orbivirus* and *Phlebovirus* are commonly found in sandflies. In addition, the Mayaro virus and West Nile virus are also able of infecting *Lutzomyia longipalpis* cell line (LL5). The immune response is essential for arthropods to survive the pathogens infection and the major pathways involved in this immune response are Imd, Toll and Jak/Stat pathways. The arthropods have diverse mechanisms against viral infection, including apoptosis, the RNA interference pathway (RNAi) and autophagy. The mechanism used by most of the vectors is the silencing of gene expression through the RNAi pathway. This pathway is conserved among different species and is based on degradation of mRNA complementary to double-strand RNA (dsRNA), thus being a sequence-specific response. The Jak/Stat pathway has also been associated with antiviral response. The virus responsive gene, Vago, acts as an interferon-like and is responsible for activation of Jak/Stat. The only information regarding the antiviral response in sandflies is a non-specific response, which is activated by any dsRNA. Since there is no precise knowledge of the antiviral defense mechanism in this insect, our study evaluated the role of different components of the immune system in antiviral defense mechanism in LL5 cells. We used two efficient models of infection with VSV virus and mimicking the infection by transfection of poly I:C (dsRNA) in LL5 cells and Aag2 cells of *Aedes aegypti* to study the antiviral response. After infection or transfection of dsRNA we evaluated the expression profile of some genes related to antiviral response: Dicer 2, Vago, Stat and Atg18. LL5 and Aag2 showed different responses to VSV infection, and in Aag2 cells the dsRNA is able to activate and antiviral response against VSV, differently in LL5 cells. We also suggest that the antiviral response of LL5 against VSV infection occurs through the mechanism of autophagy, because other classical genes of the RNAi and Jak/Stat pathways were not positively modulated in this model.

1 Introdução

As doenças transmitidas por insetos vetores são de grande importância para a saúde pública, pois constituem importante causa de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo. No Brasil, as principais doenças transmitidas por vetores são a malária, doença de chagas, leishmaniose, dengue, febre amarela, dentre outras.

A dengue é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* infectados e está presente e aumenta em áreas endêmicas de regiões tropicais e subtropicais a cada ano. Somente no Brasil, no período de Janeiro a Abril de 2012, esta doença foi registrada em mais de 250 mil indivíduos com 74 óbitos (OMS, 2012). A febre amarela também é uma doença transmitida por mosquitos que ocorre em sua maioria na África e América do Sul com cerca de 200 mil casos e 30 mil mortes por ano (OMS, 2013). Os maiores casos de morte por malária ocorrem nos países de extrema pobreza. Em 2010, de acordo com a Organização Mundial da Saúde estima-se que houve cerca de 219 milhões de casos de malária, sendo aproximadamente 660 mil mortes (OMS, 2012). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, em 2011 foram registrados 69 óbitos por malária, sendo que 99,7% dos casos ocorrem na região Amazônica, considerada área endêmica no país.

O aparecimento de novas doenças transmitidas por vetores e o ressurgimento de outras tem aumentado significativamente nas últimas décadas, o que pode estar associado a alterações climáticas que favorecem o aumento da densidade do vetor. Irrigação, construção de barragens, desmatamento e a urbanização são alguns exemplos de fatores que contribuem para o aumento populacional de vetores. Além disso, também existe a disseminação de agentes infecciosos através de viagens para áreas onde determinados agentes eram ausentes (Maroli *et al.*, 2013).

Diante da problemática estabelecida e do elevado número de casos de doenças e mortes que são geradas por doenças transmitidas por insetos é de grande importância a obtenção de informações sobre a biologia desses vetores, desde a sua epidemiologia até a resposta imune que é desencadeada no inseto mediante a infecção de agentes patogênicos para que se possa promover melhores técnicas para o controle de vetores e conseqüentemente combate às doenças transmitidas por eles.

1.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometábolos pertencentes a ordem Diptera, família Psychodidae e são caracterizados por uma grande quantidade de pilosidade em seu corpo e pelo seu pequeno tamanho quando comparados a outros insetos hematófagos. O ciclo de vida dos flebotomíneos passa por uma metamorfose completa que consiste em uma fase de ovo, quatro estágios de larva, pupa e fase adulta (Figura 1).

As fases imaturas necessitam de habitats úmidos e quentes. Os ovos são depositados pelas fêmeas adultas em local rico em matéria orgânica, eles apresentam uma coloração escura (marrom escuro a preto) e forma elipsóide com aproximadamente 300-500 μm de comprimento por 70-150 μm de largura (Figura 1A). As larvas apresentam estágios de L1 a L4, são de aspecto vermiforme, e após a eclosão se alimentam de matéria orgânica, desde cascas dos ovos até dos corpos de adultos em decomposição (Figura 1B). As pupas ficam aderidas em um substrato endurecido, são claras e se tornam escuras ao se aproximarem da eclosão do adulto (Figura 1C).

Na fase adulta, os flebotomíneos apresentam diversas características que levam a distinções sexuais. Uma das principais destas características é a diferença nos hábitos alimentares, já que nestes insetos o macho se alimenta de diversas fontes de açúcar e a fêmea, além de alimentos açucarados, também é hematofágica, pois necessita de sangue para maturação de seus ovos. Desta forma, ela possui estruturas mais adaptadas a este tipo de alimentação, como uma probóscide mais longa. A diferença entre os sexos destes insetos também pode ser observada pela morfologia dos últimos segmentos abdominais, onde estão localizadas as genitálias. Nesta região as fêmeas possuem apêndices menores que confere um aspecto arredondado enquanto que nos machos esses apêndices são mais desenvolvidos e ornamentados (Figura 1D) (Beaty & Marquardt, 1996; Maroli *et al.*, 2013).

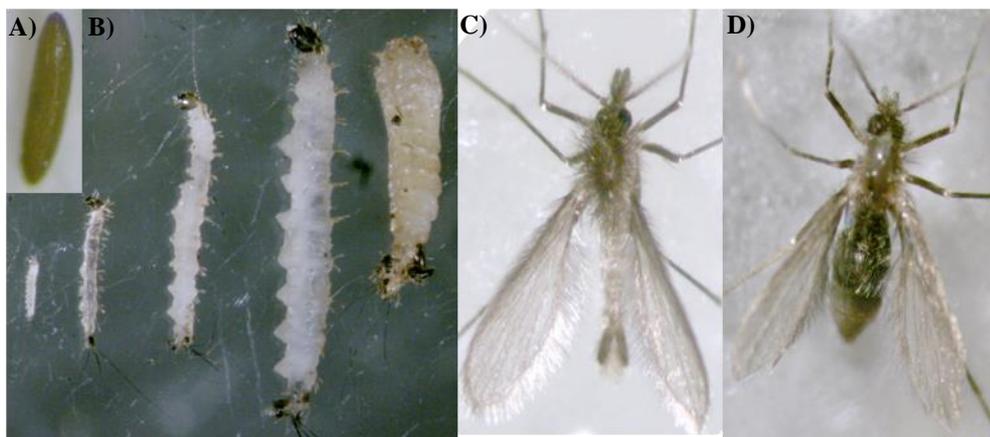


Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos. A) Ovo. B) os quatro estágios larvais e pupa. C) Forma adulta macho. D) Forma adulta fêmea. Espécie *Lutzomyia longipalpis*.
 Fonte: Pitaluga, AN 2009.

O número de espécies de flebotomíneos no mundo chega a aproximadamente 900, sendo que 500 são encontradas na região Neotropical e 229 já foram descritas no Brasil. Existem seis principais gêneros de flebotomíneos no mundo: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileyia* que são encontrados no novo mundo e os gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, encontrados no velho mundo (Galati, 2003; Shimabukuro *et al.* 2011, Ready, 2013). No Brasil já foram descritos diversas espécies vetores de *Lutzomyia* em todo território brasileiro, como *Lutzomyia longipalpis*, *L. intermédia*, *L. whitmani*, *L. neivai*, *L. umbratilis*, *L. flaviscutellata*, *L. migonei* dentre outras (Rangel & Lainson, 2009). O estudo da distribuição dos flebotomíneos em todo mundo é de grande interesse médico, pois estes insetos são importantes transmissores de doenças, principalmente da leishmaniose. Do número de espécies de flebotomíneos existentes, apenas 98 espécies do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* têm sido comprovadamente implicados na transmissão desta doença (Maroli *et al.*, 2012; Ready, 2013). A espécie *L. longipalpis* tem sido considerada o principal transmissor da leishmaniose visceral no Brasil, sendo encontrada em quase todo território nacional.

A leishmaniose é uma doença presente em cerca de 88 países do Novo e Velho Mundo (Figura 2). A população global estimada com risco de contrair esta doença é de 350 milhões de indivíduos, distribuídos nas áreas tropicais e subtropicais. Este parasita infecta cerca de 14 milhões de pessoas, sendo 2 milhões de novos casos por ano e aproximadamente 500 mil mortes por ano (Depaquit *et al.*, 2010; WHO, 2010).



Figura 2: Distribuição geográfica de leishmaniose visceral no Velho e Novo mundo.
Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2010.

Este protozoário causa uma variedade de doenças clínicas, dependendo da espécie a infectar o homem e do estado imunológico do hospedeiro. Os quadros clínicos vão de leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea até a forma visceral, a mais grave. A leishmaniose se desenvolve provavelmente devido a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca dos seres humanos e os hábitos alimentares dos vetores (Wirth, 1996).

Os flebotomíneos, além de serem transmissores da leishmaniose, também são vetores de outros agentes patogênicos e hospedeiros de diversos outros microrganismos. Dentre estes se destacam bactérias (*Bartonella* spp.), alguns arbovírus como Chandipura, Naples (*Phlebovirus*) e o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), fungos e até mesmo outros tripanosomatídeos (Depaquit *et al.*, 2010).

1.2 Arbovírus

Os arbovírus são biologicamente transmitidos entre vertebrados por insetos hematófagos, ou seja, devem se replicar no hospedeiro invertebrado antes da transmissão (Weaver *et al.*,

1997). Os principais gêneros incluem os *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Orbivirus*, *Vesiculovirus*, *Thogotovirus* e os *Asfarvirus*. Dentre estes praticamente todos são constituídos de RNA, com exceção dos *Asfarvirus* que possuem DNA como material genético (Karabatsos, 1985).

A transmissão dos arbovírus entre os insetos pode ocorrer de forma vertical ou horizontal. A vertical envolve a passagem dos vírus a partir de uma fêmea infectada para sua prole feminina ou masculina, já o modo de transmissão horizontal ocorre a partir de um macho infectado diretamente para um vetor do sexo feminino, ou então, por via oral de um vetor do sexo feminino para um hospedeiro vertebrado através da saliva durante a alimentação de sangue. Este último é o modo de transmissão mais comum entre os arbovírus (Weaver & Reisen, 2009).

A distribuição dos arbovírus ocorre de forma global, porém a maioria é encontrada em áreas tropicais, onde as condições climáticas podem permitir a proliferação dos vetores e, assim, a transmissão durante todo o ano. Os fatores limitantes para a distribuição dos arbovírus incluem temperatura, regime de chuvas e umidade, padrões de vegetação e outros parâmetros ecológicos que também determinam a distribuição geográfica dos artrópodes vetores e hospedeiros vertebrados (Gubler, 2002).

Dentre os arbovírus ocorrentes nas Américas estão os vírus da Febre Amarela, o vírus Dengue, Oropouche, Mayaro, vírus do Oeste do Nilo e diversos agentes responsáveis por encefalites. Cerca de 545 espécies de arbovírus são suspeitas de causar doenças em humanos em todo o mundo, embora até o momento somente 150 tenham sido comprovadas (Cleton *et al.*, 2012). No Brasil, os arbovírus são amplamente distribuídos, predominando nas áreas tropicais, principalmente na Floresta Amazônica. Trinta e quatro dos 200 tipos diferentes de arbovírus além de outros vírus de vertebrados identificados na Amazônia brasileira são comprovadamente patogênicos ao homem (Travassos da Rosa *et al.*, 1989). A maior parte dos arbovírus causa zoonoses, porém, devido à alta taxa de mutação, estes vírus podem se adaptar a novos hospedeiros causando grandes epidemias (Weaver & Reisen, 2009).

A forma de manutenção dos arbovírus ocorre através de um ciclo de transmissão que compreende vetores artrópodes e reservatórios animais vertebrados como hospedeiros de amplificação. Quando os humanos são infectados por alguns arbovírus, eles podem, em sua maioria, não apresentar alta viremia e então não serem capazes de infectar outros artrópodes,

sendo considerados hospedeiros “beco sem saída”. Somente alguns vírus, como o vírus da febre amarela, chikungunya e o vírus da dengue, são capazes de expandir sua gama de hospedeiros e incluir os humanos como hospedeiros de amplificação, causando doenças, sem a necessidade de um reservatório animal (Cleton *et al.*, 2012). Baseado na ocorrência dos arbovírus, eles podem se comportar como endêmicos (presença estável em um reservatório), esporádicos (infecções isoladas), ou epidêmicos (ocorrência durante estações com aumento da atividade da doença ou surtos).

O ciclo de vida dos arbovírus pode ocorrer de duas formas: ciclo silvestre e ciclo urbano. Como exemplo, o vírus da Dengue em seu ciclo silvestre, que ocorre entre artrópodes e hospedeiros mamíferos, envolve primatas e mosquitos. Além disso, para alguns arbovírus os humanos, neste ciclo silvestre, podem se tornar hospedeiros becos sem saída, onde a viremia é baixa e por isso, não ocorre novas infecções. O ciclo humano envolve *Aedes peridomiciliar* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) que podem ser encontrados em uma variedade de ambientes ao longo dos trópicos e subtropicais. Neste ciclo os humanos são hospedeiros reservatórios ou de amplificação, que é um padrão usado entre os vírus transmitidos por artrópodes (Figura 3) (Whitehead *et al.*, 2007; Vasilakis *et al.*, 2011).

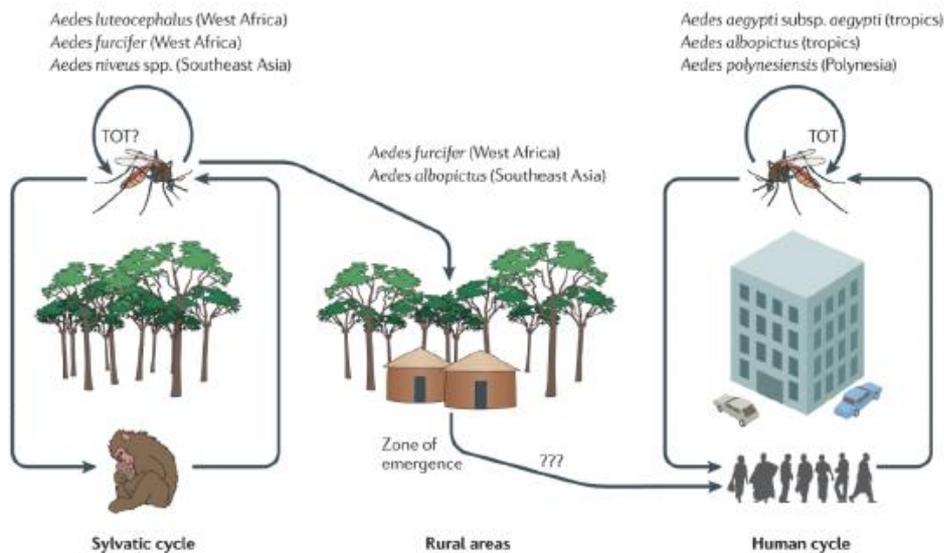


Figura 3: Ciclo de vida do vírus da Dengue.
Fonte: Vasilakis *et al.*, 2011.

A amplificação progressiva dos arbovírus para níveis epidêmicos ocorrem devido a existência de vetores competentes e populações de hospedeiros vertebrados susceptíveis que habitam um mesmo ambiente. Alterações na genética dos vírus, dos vetores e dos hospedeiros pode também interferir para a modulação da propagação viral. Essas mudanças genéticas virais também podem levar a introdução de novas cepas que aumentam seus níveis de virulência, aumentando assim o número de hospedeiros e seu potencial de amplificação e transmissão (Gubler, 2002; Weaver & Reisen, 2009; Maroli *et al.*, 2012).

1.3 Flebotomíneos e arbovírus

Os arbovírus do gênero *Vesiculovirus* (família Rhabdoviridae), *Orbivirus* (família Reoviridae) e *Phlebovirus* (família Bunyaviridae) são os mais comuns presentes em flebotomíneos (Travassos da Rosa *et al.*, 1989).

Os *Phlebovirus* já foram caracterizados em flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no velho mundo e do gênero *Lutzomyia* no novo mundo (Tesh, 1983). *Phlebovirus* são vírus de RNA encapsulados e possuem um genoma em três partes, os segmentos S, M e L que codificam uma RNA polimerase dependente de RNA, glicoproteína do envelope viral, proteína do nucleocapsídeo e uma proteína não estrutural (Alkan *et al.*, 2013). Este gênero compreende mais de 60 sorotipos de vírus e se divide em dois principais grupos: o grupo da febre do flebotomíneo (SF - Sandfly fever) e o grupo Uukuniemi (Uuk). Entre os vírus do grupo SF, o sorocomplexo Nápoles e Sicília são os mais associados a doenças em humanos (Tufan & Tasyaran, 2013). Juntamente com os vírus Toscana, estes vírus são endêmicos na região do Mediterrâneo e podem se espalhar para áreas mais temperadas da Europa, onde os seus vetores são abundantes. A distribuição destes vírus de casos humanos e alguns isolados de flebotomíneos foram reportados em alguns países como Argélia, Egito, Portugal, Israel e Jordânia (Figura 4).



Figura 4: Distribuição dos vírus Toscana (A), Sicília (B) e Nápoles (C) na União Europeia e nos países vizinhos ao redor do Mar Mediterrâneo. Países com casos confirmados estão em cinza e os limites de distribuição estimados são representados com linha cinza escuro.
 Fonte: Depaquit *et al.*, 2010.

O sorogrupo SF Nápoles (SFNV) compreende os vírus Karimabad, Arabia, Punique, Tehran, vírus Toscana e os vírus Nápoles não classificados como SF. O vírus Granada também tem sido descrito como sendo um SFNV. Já os vírus Chipre (SFCV) e Turquia (SFTV) são variantes do sorogrupo SF Sicília (SFSV) (Tufan & Tasyaran, 2013). A distribuição destes vírus da febre do flebotômíneo por sorotipo pode ser visualizada na figura 5.

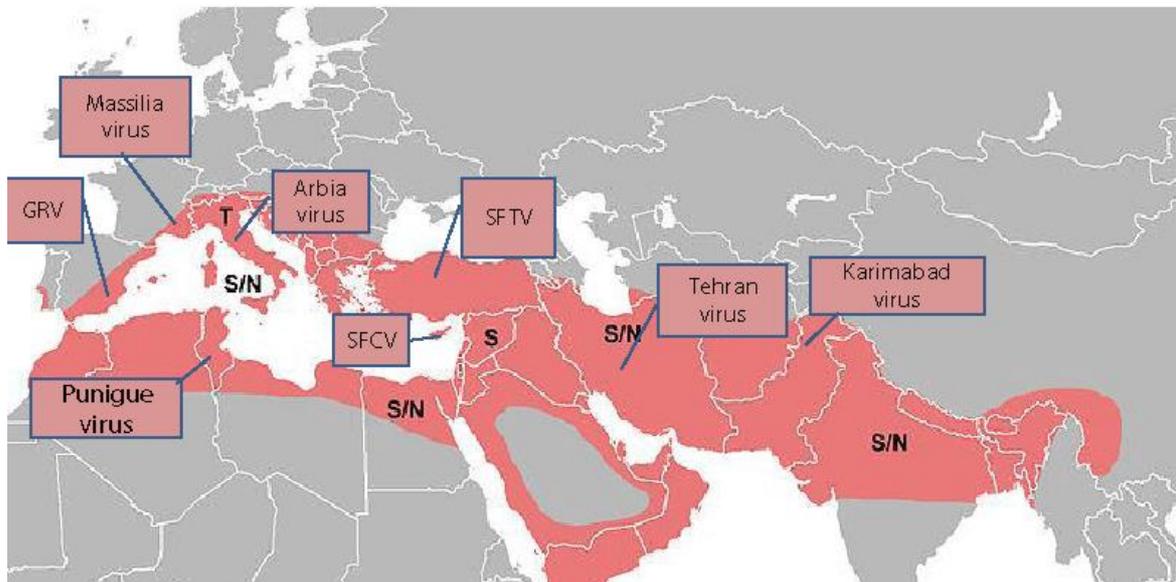


Figura 5: Distribuição dos vírus da febre do flebotômíneo por sorotipo.
 Fonte: Tufan & Tasyaran, 2013.

Os pacientes infectados com vírus da febre do flebotomíneo apresentam sintomas da gripe como febre, dor retro-orbital, mialgias e mal-estar e, na maioria das vezes, se recuperam dentro de uma semana.

Já com o vírus Toscana muitas infecções são assintomáticas, porém, os casos clínicos reportados apresentam sintomas de gripe, e em alguns casos podem iniciar forte neurotropismo, encefalites, meningites e meningoencefalites. Este vírus é endêmico na Itália com pico no número de pacientes infectados na estação quente, entre Maio e Outubro. Muitos casos de incidência do vírus Toscana na França ocorreram pela introdução dos vírus oriundos da Itália através de pacientes que estiveram de viagem pelo país (Defuentes *et al.*, 2005; Epelboin *et al.*, 2008).

Novos vírus e complexos antigênicos infectantes para flebotomíneos vem sendo descobertos, como o novo *Phlebovirus* denominado Massilia descoberto no mediterrâneo em *Phlebotomus perniciosus* e classificado como pertencente ao complexo do vírus da febre do flebotomíneo Napolitano (Nápoles) (Charrel *et al.*, 2009). Recentemente, também em *P. perniciosus*, duas novas linhagens putativas de *Phlebovirus*, Olbia e Provença, foram descritas (Peyrefitte *et al.*, 2013). Estas descobertas enfatizam ainda mais a necessidade de constantes estudos na identificação de arbovírus potencialmente prejudiciais a saúde pública.

Dentro do gênero *Vesiculovirus* existem cerca de 28 agentes virais que são capazes de infectar vertebrados e invertebrados. Os que infectam animais domésticos e humanos e possuem os flebotomíneos como possível vetor compreendem os vírus Chalchiqui, Chandipura, Cocal, Isfahan e o vírus da Estomatite Vesicular (Maroli *et al.*, 2013).

O vírus Chandipura já foi isolado de espécies de *Phlebotomus* e *Sergentomyia* (Geevarghese *et al.* 2005). Este vírus é endêmico na Índia e foi descrito como sendo o principal causador de surtos de encefalites em crianças, caracterizado por uma alta taxa de letalidade com um rápido início de febre e problemas no sistema nervoso central, alguns casos também apresentaram diarreia e vômito (Rao *et al.*, 2004; Tandale *et al.*, 2008; Gurav *et al.*, 2010). A presença desse vírus na Europa ainda não foi evidenciada, porém, não pode excluir a possibilidade de sua introdução por indivíduos infectados.

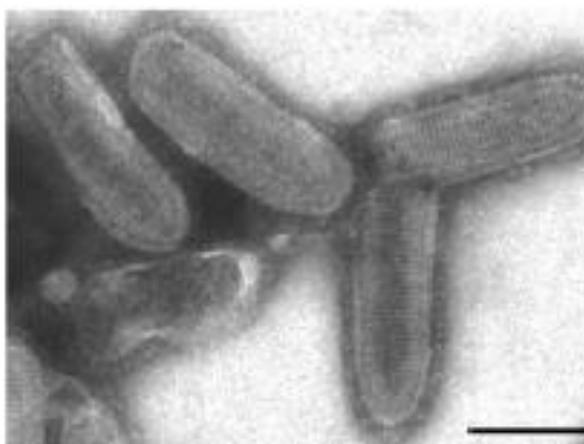
O vírus da estomatite vesicular (VSV) também é um *Vesiculovirus*, porém endêmico do Novo Mundo. Infecções de VSV em humanos vêm sendo descritas no México, América

Central, norte da América do Sul, leste do Brasil e em algumas áreas limitadas dos Estados Unidos. Em pacientes com manifestações clínicas o sintoma inicial é febre alta com sintomas posteriores semelhantes a gripe que incluem mal-estar, dores de cabeça, mialgia, dor retroesternal, dores oculares e náusea. A formação de vesículas na mucosa oral, nariz e lábios também é possível (Maroli *et al.*, 2013).

Os únicos vetores biológicos confirmados para o VSV são os flebotomíneos, sendo os outros insetos hematófagos somente vetores mecânicos. Isto porque já foram encontrados flebotomíneos infectados na ausência de casos clínicos em seres humanos ou animais domésticos e em outros insetos só foram encontrados VSV durante epidemias. Três espécies de *Lutzomyia* têm sido associadas com a transmissão de VSV: *L. trapidoi*, *L. ylephiletor* e *L. shannoni* (Maroli *et al.*, 2013).

O vírus VSV carrega uma fita simples de RNA com polaridade negativa e genoma que codifica cinco genes: a nucleoproteína N, fosfoproteína P, proteína de matriz M, glicoproteína G e uma proteína L polimerase. Cada uma dessas proteínas contribui para funções essenciais na geração de novas partículas virais viáveis. A proteína N possui a função de encapsular a fita negativa de RNA e no processo de transcrição faz o mesmo com a fita de RNA de polaridade positiva que é produzida. A proteína P também desempenha função de encapsulamento, bem como participa no processo de transcrição e replicação do vírus. A proteína G é uma proteína de ligação que interage com receptores na superfície das células susceptíveis a infecções. Após esta ligação, o vírus é captado por endocitose, sua membrana se funde com a membrana do endossomo e o nucleocapsídeo é então liberado no citoplasma da célula hospedeira. A proteína M faz parte da membrana viral, entre o envelope e o nucleocapsídeo do vírus, e está envolvida na montagem de nucleocapsídeos, onde é responsável por mantê-los firmemente ligados à membrana interna do envelope lipoproteico, também desempenha um papel fundamental na inibição da síntese de RNA para que se inicie o processo de associação das proteínas do capsídeo durante a replicação viral. (Novella *et al.*, 2007; Hensel *et al.*, 2009) (Figura 6).

A)



B)

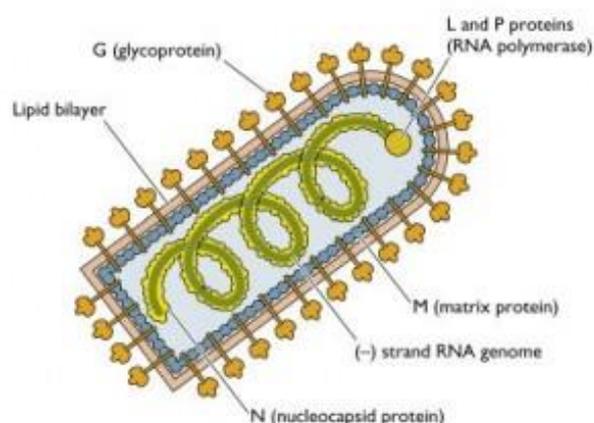


Figura 6: Estrutura do vírus da Estomatite Vesicular (VSV). Microscopia eletrônica (A) e esquema da estrutura do vírus da Estomatite Vesicular (B). Barra 0,1µm.

Fonte: A) Johnson *et al.*, 2012. B) www.virology.ws.

No novo mundo os arbovírus transmitidos por flebotomíneos também são abundantes. O vírus Aguacate, do gênero *Phlebovirus*, foi identificado em *Lutzomyia* spp. na América Central e na América do Sul (Palacios *et al.*, 2011). No Brasil já foram identificados diversas famílias de vírus em flebotomíneos na Amazônia como Bunyaviridae e Reoviridae (Travassos da Rosa *et al.*, 1984). Diversos vírus também já foram caracterizados, através de relações sorológicas e filogenéticas, como pertencentes a um complexo antigênico denominado Carandiru, os quais são distribuídos no Norte do Brasil, principalmente no estado do Pará (Palacios *et al.*, 2011). A tabela 1 resume os *Phlebovirus* no Mundo e sua associação com os artrópodes.

Tabela 1. Distribuição geográfica de *Phlebovirus* e sua associação com artrópodes.

<i>Nome</i>	<i>Distribuição geográfica</i>	<i>Associação com artrópodes</i>
Aguacate	Panamá	<i>Lutzomyia</i> spp.
Alenquer	Brasil	—
Anhanga	Brasil	—
Arbia	Itália	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. peifiliewi</i> .
Arboledas	Colômbia	<i>Lutzomyia</i> spp.
Arumowot	África	<i>Culex antenatus</i> , <i>C. rubinotus</i> , <i>Mansonia uniformis</i> .
Buenaventura	Colômbia	<i>Lutzomyia</i> spp.
Bujaru	Brasil	—

Cacao	Panamá	<i>Lutzomyia trapidoi</i>
Caimito	Panamá	<i>Lutzomyia ylephiletor</i>
Candiru	Brasil	—
Chagres	Panamá e Colômbia	<i>Lutzomyia trapidoi</i> e <i>Lutzomyia ylephiletor</i>
Chilibre	Panamá	<i>Lutzomyia</i> spp.
Corfou	Grécia	<i>Phlebotomus major</i>
Frijoles	Panamá	<i>Lutzomyia</i> spp.
Gabek Forest	África	—
Gordil	República Centro-Africano	—
Icoaraci	Brasil	<i>Anopheles cruz</i> , <i>Aedes</i> spp., <i>Sabethes</i> spp., <i>Culex</i> spp., <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> .
Itaituba	Brasil	—
Itaporanga	Trinidad, Guiana Francesa e Brasil	<i>Culex</i> spp. e <i>Coquillettidia venezuelensis</i>
Joa	Brasil	<i>Lutzomyia</i> spp.
Karimabad	Irã	<i>Phlebotomus</i> spp.
Mariquita	Colômbia	<i>Lutzomyia</i> spp.
Munguba	Brasil	<i>Lutzomyia umbratilis</i>
Nique	Panamá	<i>Lutzomyia panamensis</i>
Oriximina	Brasil	<i>Lutzomyia</i> spp.
Pacui	Brasil	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
Punta Toro	Panamá	<i>Lutzomyia trapidoi</i> e <i>Lutzomyia ylephiletor</i>
Rio Grande	USA (Texas)	—
Saint Floris	República Centro-Africano	—
Salehabad	Irã	<i>Phlebotomus</i> spp.
Naples	Norte da África, Sul da Europa, Ásia Central	<i>Phlebotomus papatasi</i> e <i>P. peifiliawi</i> .
Sicília	Norte da África, Sul da Europa, Ásia Central	<i>Phlebotomus papatasi</i> .
Tehran	Irã	<i>Phlebotomus papatasi</i> .
Toscana	Itália e Portugal	<i>Phlebotomus perniciosus</i>
Turuna	Brasil	<i>Lutzomyia</i> spp.
Urucuri	Brasil	—

Fonte: Tesh, 1988.

Além destes gêneros isolados de flebotomíneos encontrados naturalmente infectados na natureza, diferentes vírus como o Mayaro (*Alphavirus*) e o vírus do Oeste do Nilo (*Flavivirus*) são capazes de infectar, *in vitro*, uma linhagem celular de *L. longipalpis* (LL5) (Figura 7) (Tesh & Modi, 1983; Pitaluga *et al.*, 2008), sugerindo que estes insetos sejam vetores em potencial para estes vírus.

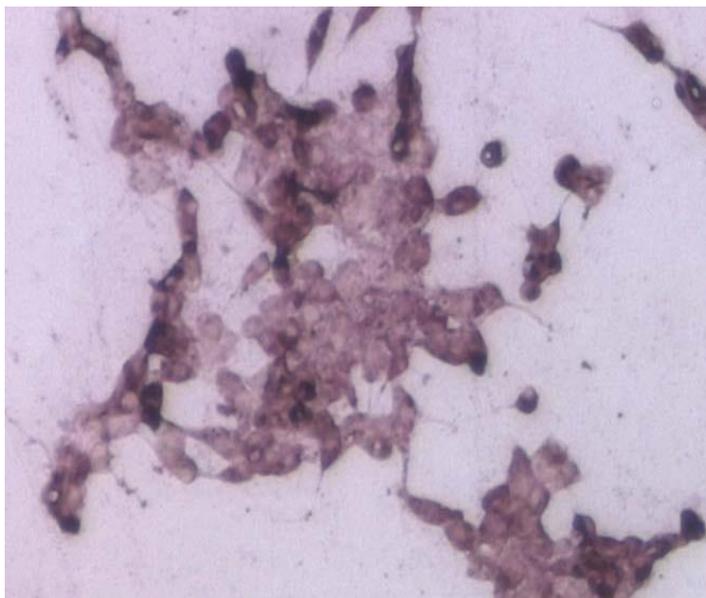


Figura 7: Imunohistoquímica demonstrando linhagem celular embrionária de *Lutzomyia longipalpis* (LL5) infectadas com o vírus do Oeste do Nilo.
Fonte: Pitaluga, 2008.

A prevenção para infecções com arbovírus, em sua maioria, consiste no controle da proliferação dos vetores, o uso de repelentes e inseticidas. Para o controle de vetores é importante considerar que alguns vírus são endêmicos em certas áreas, entretanto, diversos outros podem ser introduzidos de outras áreas, através de viagens de pacientes viremicos, enfatizando, desta forma, a necessidade de um rigoroso sistema de vigilância epidemiológica (Depaquit *et al.*, 2010).

O combate aos insetos pela utilização de inseticidas para o controle de doenças pode ser eficaz, porém, é insustentável e ambientalmente indesejável, além de ao longo do tempo ocasionar resistência nos insetos por esse tipo de produto.

Uma abordagem de controle biológico para redução da transmissão de arbovírus pode ser fornecida pela infecção de insetos vetores com uma bactéria endossimbionte denominada *Wolbachia*. Esta bactéria é encontrada nos ovários de alguns insetos e é capaz de infectar cerca de 76% das espécies estimadas. Esta elevada taxa de infectados ocorre, pois esta bactéria induz uma série de distorções reprodutivas nos hospedeiros que levam ao aumento reprodutivo das fêmeas infectadas, aumentando assim a transmissão vertical de *Wolbachia* (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011).

Essas distorções reprodutivas incluem transformação genotípica de machos em fenótipo de fêmeas, alterando o esperma masculino para que as fêmeas não possam produzir descendentes. No entanto, *Wolbachia* também pode fornecer benefícios diretos para seus hospedeiros afetando a nutrição e desenvolvimento, influenciando a fecundidade e oferecendo resistência a patógenos (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011). *Wolbachia* induz resistência a agentes patogênicos que incluem vírus, bactérias, nematoides e *Plasmodium* (Zelé *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013). Esta bactéria tem conferido resistência de mosquitos a infecção com o vírus da Dengue, e acredita-se que o mecanismo envolvido neste processo esteja ligado a espécies reativas de oxigênio e produção de peptídeos antimicrobianos como Defensina e Cecropina (Pan *et al.*, 2012). A transfecção de uma cepa de *Wolbachia* em *A. aegypti* infectados com o vírus Chikungunya ou com o vírus da Febre Amarela também foi capaz de diminuir as taxas virais neste mosquito (van den Hurk *et al.*, 2012).

Outro aspecto relacionado à coinfeções consiste na descoberta de alguns vírus que são específicos de insetos, denominados insect-virus (InVs), ou seja, não se replicam em hospedeiros vertebrados e são mantidos na natureza através de transmissão vertical. A presença desses vírus específicos em insetos pode alterar a replicação de outros vírus que estejam coinfectando a mesma célula. Em *Culex pipiens* foi detectada a presença natural de um vírus específico, CxFV, que foi capaz de suprimir a replicação de WNV em uma superinfecção (Bolling *et al.*, 2012). Um novo InVs foi descrito, recentemente, em mosquitos do gênero *Coquillettidia* spp. isolados da Austrália, denominado vírus Palm Creek (PCV). Coinfecção de células C6/36 PCV com WNV e vírus Murray Valley encephalitis demonstrou que estas células se apresentam menos permissíveis a infecção quando comparado ao controle sem PCV (Hobson-Peters *et al.*, 2013).

Seis vírus específicos foram descritos no Brasil, Peru, Estados Unidos, Costa do Marfim, Israel e Indonésia de mosquitos e flebotomíneos, tais como *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*

e *Lutzomyia*. Os vírus descobertos compreendem o vírus Negev, Ngewotan, Piura, Loreto, Dezidougou e Santana. Estes vírus formam juntos, baseado na organização do seu genoma e relações filogenéticas, um novo táxon denominado Negevirus (Vasilakis *et al.*, 2013). Porém, ainda não se tem conhecimento da influência destes InVs sobre a replicação viral de outros vírus nestes insetos.

O impacto de arbovírus na saúde humana, na economia, a propagação e o surgimento de novas doenças em todo o mundo, devido as mudanças climáticas e os hábitos de viagem deixam claro a importância de encontrar novas estratégias para limitar a transmissão dos arbovírus. Para isso, é preciso se conhecer melhor sobre as interações patógeno-hospedeiro, tanto no vertebrado quando no inseto vetor, bem como compreender os mecanismos moleculares da imunidade dos patógenos, podendo revelar potenciais candidatos para intervenções e combate do patógeno ainda no vetor (Waldock *et al.*, 2012; Vodovar & Saleh, 2012).

1.4 Resposta imune em artrópodes

A resposta imune é essencial para os artrópodes sobreviverem aos agentes patogênicos. Os insetos possuem vários tipos de barreiras de superfície, sejam elas físicas ou químicas, que agem como primeira linha de defesa contra invasão por organismos patogênicos. Estas barreiras incluem a cutícula do exoesqueleto, revestimento da traqueia, a membrana peritrófica e o epitélio intestinal do inseto. A segunda linha de defesa ocorre em níveis celulares e moleculares ativados na hemolinfa e nos tecidos relacionados a imunidade. Contudo, diversos patógenos tem desenvolvido uma variedade de mecanismos para suprimir ou modular os processos de resposta imune dos insetos vetores.

Existem três diferentes vias de sinalização celulares que têm sido implicadas na defesa imunológica de artrópodes: Imd e Toll, as quais respondem a infecções por bactérias e fungos, e a via Jak/Stat. Na via Imd, o peptídeoglicano diaminopimélico de bactérias Gram-negativas é detectado extra e intracelularmente por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos (PGRP-LC e LE). Esses receptores recrutam a molécula adaptadora Imd e ativam a cascata de sinalização intracelular que leva a ativação de um fator de transcrição como NF- κ B, Relish, que após a clivagem do seu domínio

I κ B é translocado para o núcleo e induz a produção de efetores e compostos antimicrobianos como Cecropina e Diptericina. Esta via envolve o regulador negativo Caspar. A via Toll é ativada através de PRRs e PGRPs SA e SD que levam a uma cascata de eventos que resultam na clivagem do ligante Spätzle, degradação do regulador negativo Cactus, translocação de fatores de transcrição Dif e um aumento de componentes antimicrobianos como Drosomicina e Defensina (Figura 8) (Xi *et al.*, 2008; Vodovar & Saleh, 2012; Merklings & van Rij, 2013; Kingsolver *et al.*, 2013). A via Imd e Toll induzem fatores que participam da morte de micróbios por fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e cascatas de melanização que são essenciais na defesa dos insetos contra patógenos.

A via Jak/Stat é constituída, em *Drosophila*, por citocinas, um transdutor de sinal e ativador de transcrição Stat, receptor transmembrana Domeless (dome), uma quinase Janus codificada por hopscotch (hop) (Figura 8). A ligação de uma proteína não pareada (Upd) induz a dimerização do receptor dome, permitindo a transfosforilação de hop, seguido de recrutamento e transfosforilação do resíduo de tirosina conservado nos fatores de transcrição Stat, estes então dimerizam e são transportados para o núcleo para regular a expressão das moléculas efetoras. Esta via está envolvida em numerosos processos de desenvolvimento, injúrias sépticas, resposta imune antimicrobiana e tem sido associada à resposta antiviral (Xi *et al.*, 2008; Merklings & van Rij, 2013; Kingsolver *et al.*, 2013) .

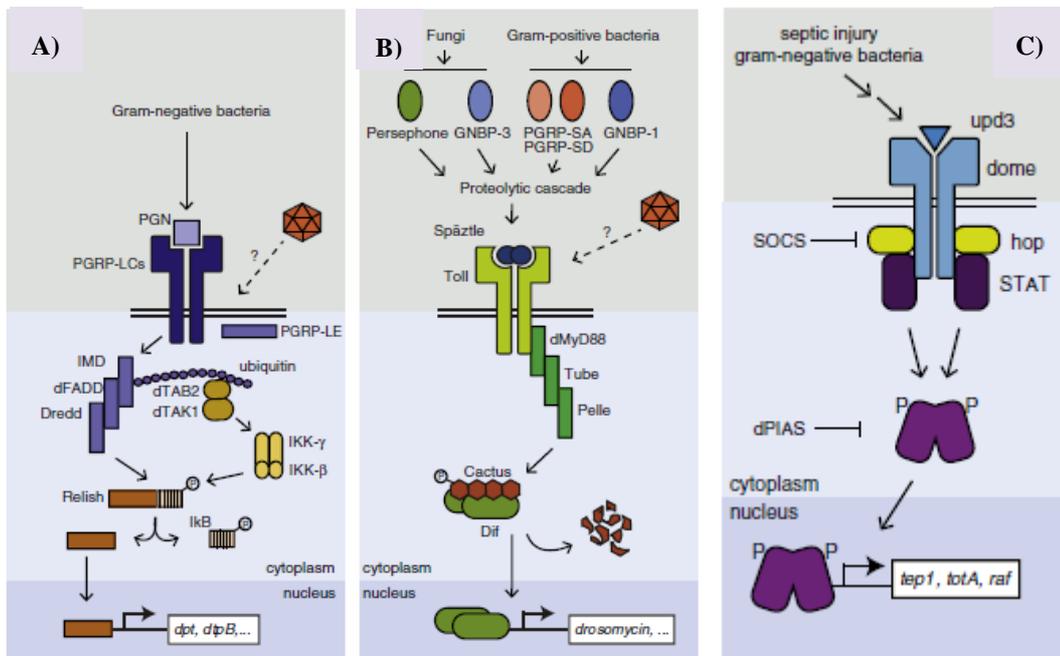


Figura 8: Vias de resposta imune em insetos. Via Imd (A), via Toll (B) e Via Jak/Stat (C).
Fonte: Adaptado de Kingsolver *et al.*, 2013.

1.5 Resposta antiviral

Os artrópodes possuem diversos mecanismos para combater a infecção viral, entre eles a apoptose, a via de RNA de interferência e a autofagia.

Em células de lepidópteros infectadas com Baculovírus, a primeira linha de defesa antiviral que ocorre é o desligamento da síntese proteica global e apoptose. A interação que ocorre entre as células e a infecção com Baculovírus depende do tipo celular que ele irá invadir. Quando a infecção não é produtiva, ocorre um processo denominado infecção abortiva, onde a infecção é bloqueada em uma determinada etapa do ciclo. Isto pode ocorrer antes da expressão dos genes virais, da replicação do DNA viral ou para a síntese de proteínas virais. Esta infecção abortiva pode resultar de incompatibilidade entre fatores virais e celulares envolvidos na replicação do vírus (Ikeda *et al.*, 2013). A inibição das vias relacionadas a ativação da apoptose em insetos é fundamental para o sucesso da infecção de vários vírus e o mecanismo de modulação imune pelo vírus envolve a indução e expressão de vários micro RNAs. Outras proteínas envolvidas na modulação da atividade apoptótica das células do inseto vetor pelos Baculovírus incluem as IAPs (Proteínas inibidoras da apoptose), P49 e P35. Na ausência de P35, por exemplo, o baculovírus AcMNPV (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) não consegue replicar e induz apoptose (Clem *et al.*, 1991). Interessantemente, o próprio vírus utiliza proteínas centrais da indução da apoptose (caspases) para a clivagem e ativação de proteínas virais anti-apoptose (ex. P35) (Bump *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998).

Alguns patógenos possuem a capacidade de invadir as células hospedeiras e crescer dentro da célula, por isso, além dos receptores extracelulares das vias Jak/Stat, Toll e Imd, existem outros receptores que auxiliam no reconhecimento de patógenos dentro da célula hospedeira. Em mamíferos, esses receptores são denominados receptores tipo NOD - domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeos (NLRs) - e são capazes de reconhecer fragmentos de peptidoglicanos de bactérias. Em insetos, somente um receptor intracelular tem sido descrito, a proteína reconhecadora de peptidoglicano LE (PGRP-LE), que reconhece peptidoglicano do tipo DAP (ácido diaminopimérico) de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas. Todos estes receptores intracelulares ativam várias moléculas sinalizadoras que ativam outros mecanismos de resposta imune e não necessitam de fatores da via Toll ou Imd (Yano & Kurata, 2011).

Um desses mecanismos ativados por receptores intracelulares é a autofagia, que é um sistema não seletivo de degradação de organelas e proteínas. Este processo se inicia com proteínas e organelas indesejáveis ou recicláveis sequestradas em uma membrana de isolamento, que se alonga para formar o autofagossomo, uma estrutura que é diferente do fagossomo pela presença de uma membrana dupla. Os autofagossomos após a fusão com lisossomos se tornam maduros e são conhecidos como autolisossomos, onde as substâncias são então capturadas e degradadas. Todo este processo é mediado por fatores bem conservados conhecidos como proteínas relacionadas à autofagia (ATGs).

Foi demonstrado que autofagia tem um papel importante na imunidade de insetos, atuando contra parasitas, bactérias ou vírus presentes no citoplasma (Wu *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012). Em *Drosophila* a autofagia pode atuar no controle de populações de *Wolbachia* como também na resposta antiviral (Vonorin *et al.*, 2012). Porém, o envolvimento dos receptores de reconhecimento padrão para os vírus na indução da autofagia ainda não é claro. A via fosfoinositida 3-quinase (PI3)-Akt é responsável pela sinalização para autofagia e sua ativação promove o aumento dos níveis de Tor, um regulador negativo de autofagia, que então inibe este processo (Stephan & Herman, 2006). No caso de infecção pelo vírus da estomatite vesicular (VSV), em células de *Drosophila*, ocorre uma ativação do processo de autofagia através da glicoproteína de superfície G do vírus (VSV-G), agindo como um padrão molecular associado a patógeno (PAMP), e não pelo reconhecimento de RNA do genoma viral. A ativação da autofagia foi capaz de diminuir a replicação viral e sua repressão aumenta a replicação viral (Shelly *et al.*, 2009) (Figura 9).

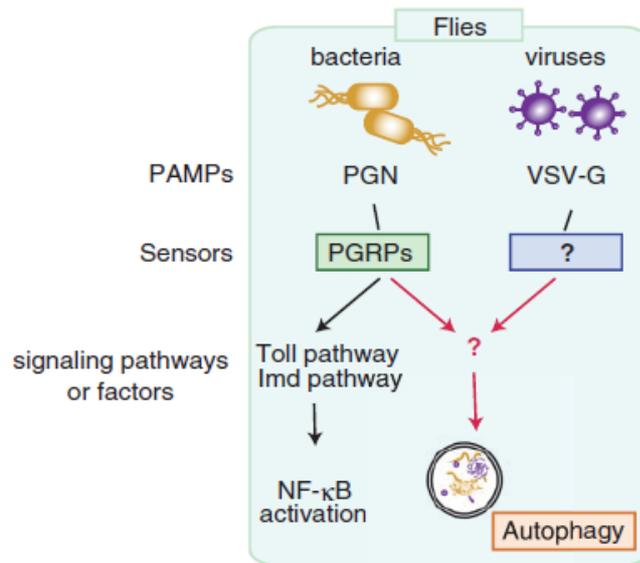


Figura 9: Patógenos e sinalização imune inata para a indução de autofagia em moscas.
 Fonte: Yano & Kurata, 2011.

Um dos principais mecanismos antivirais nos insetos se baseia no silenciamento da expressão gênica através da degradação sequência específica de RNAs mensageiros, mecanismo este conhecido como RNA de interferência (RNAi) (Keene *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2006). Esta via regula vários processos dentro da célula como expressão gênica, modificações epigenéticas e defesa contra patógenos. É bem conservada e tem sido descrita em fungos, plantas e animais, porém, com papéis diferentes.

O funcionamento da via de RNAi envolve a degradação de RNAs dupla-fitas (RNA double strand - dsRNA) por um complexo enzimático chamado Dicer, este complexo possui um domínio helicase DExH-box, dois domínios RNase-III que são responsáveis por cortar as dsRNA e um domínio de ligação a dsRNA. RNase-III gera pequenos fragmentos de dupla fita conhecidos por siRNA (small interfering RNAs) com aproximadamente 21 pares de base de comprimento. Posteriormente, Dicer fornece siRNAs, com a ajuda de R2D2 e Loqs, a um outro complexo proteico denominado RISC (RNA-Inducing Silencing Complex). Em *Drosophila*, a proteína Loqs é necessária para processamento de dsRNA, enquanto R2D2 é essencial para o encaminhamento subsequente de siRNA para o complexo RISC (Marques *et al.*, 2009). Este complexo possui membros da família de proteínas Argonata (Ago), as quais possuem uma atividade RNase, que utilizam a fita anti-senso como guia para degradação do

mRNA complementar, resultando no silenciamento do gene correspondente (Ghildiyal & Zamore, 2009).

Em alguns organismos infectados com vírus existe a produção de dsRNA, de origem do próprio genoma viral, estruturas secundárias ou do produto de sua replicação, que são reconhecidas pelo mecanismo de RNAi, levando ao silenciamento dessas dsRNA viral com conseqüente diminuição da replicação viral, através da redução da quantidade de molde disponível para a produção de novos genomas ou RNA que codificam proteínas virais (Vodovar & Saleh, 2012) (Figura 10).

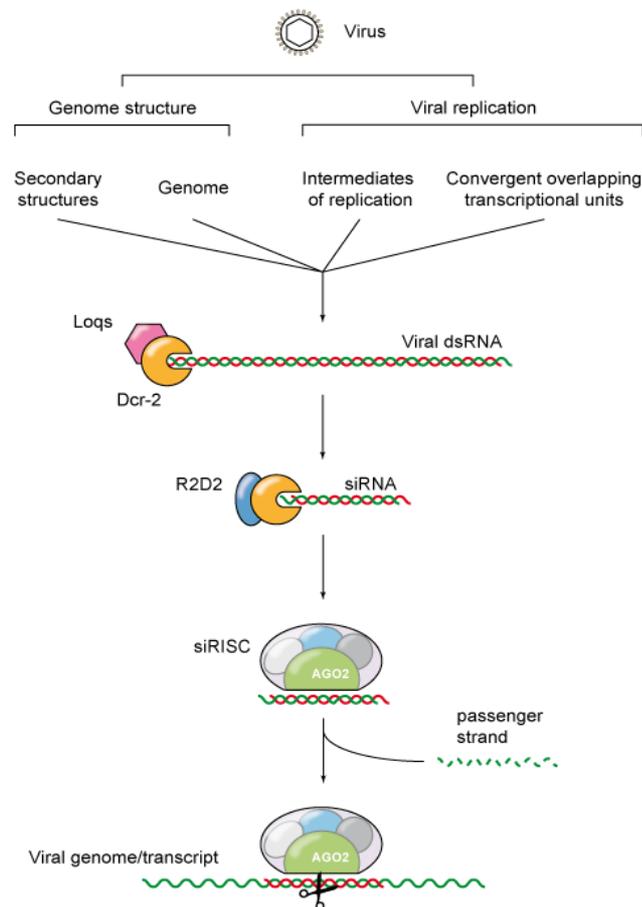


Figura 10: Silenciamento de RNA contra infecção viral.
 Fonte: www.salehlab.eu.

Nos insetos o silenciamento de RNA, ativado por essas moléculas de dsRNA, é considerado um mecanismo de proteção e vigilância celular promovendo a defesa do genoma contra vírus (van Rij *et al.*, 2006). Esse processo foi caracterizado por Adelman *et al.* (2002)

na produção de arbovírus em *A. aegypti* expressando um RNA dupla fita para o vírus da dengue e também em células de mosquito em cultura transfectadas ou com um dsRNA, siRNA, ou ainda um plasmídeo produzindo um RNA em grampo de arbovírus. O envolvimento de RNAi como uma resposta antiviral foi visto em *Anopheles gambiae* infectados com vírus o O'nyong-nyong (ONNV) (Keene *et al.*, 2004; Waldoock *et al.*, 2012).

A via de RNAi também foi descrita como um mecanismo de proteção antiviral em *Drosophila* (Wang *et al.*, 2006). Moscas deficientes para genes chave da via de RNAi, como Ago2, demonstraram hipersensibilidade à infecção viral com vírus C de *Drosophila* (DCV), vírus da Paralisia do Grilo (CrPC) (van Rij *et al.*, 2006) e vírus Sindbis (Saleh *et al.*, 2009). Outros estudos mostraram que Dicer-2 é um importante gene na determinação de suscetibilidade a infecções virais neste inseto (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006).

Os vírus têm desenvolvido mecanismos para minimizar ou suprimir os efeitos da resposta imune baseada na via do RNAi dos hospedeiros. Uma das estratégias desenvolvidas pelos vírus para escapar dessa resposta é a produção de proteínas que são denominadas supressores virais da via de RNAi (Viral suppressors of RNAi - VSRs). Apesar de todos os VSRs compartilharem a mesma função, eles interferem no mecanismo de RNAi em diferentes passos através de diferentes mecanismos. Muitos vírus produzem essas proteínas, tais como DCV, vírus da Paralisia do Grilo (CrPV) e vírus Flock House (FHV). O VSR DCV1A liga-se ao longo de dsRNA intermediárias da replicação, protegendo-as de serem clivadas por Dicer-2, já a CrPV1A interage diretamente com Ago2 e compromete sua atividade. A maioria dos VSRs são ligantes de dsRNA, já que esta é a molécula mais importante para o reconhecimento e ativação da via de RNAi (van Rij *et al.*, 2006; Vodovar & Saleh, 2012) (Figura 11).

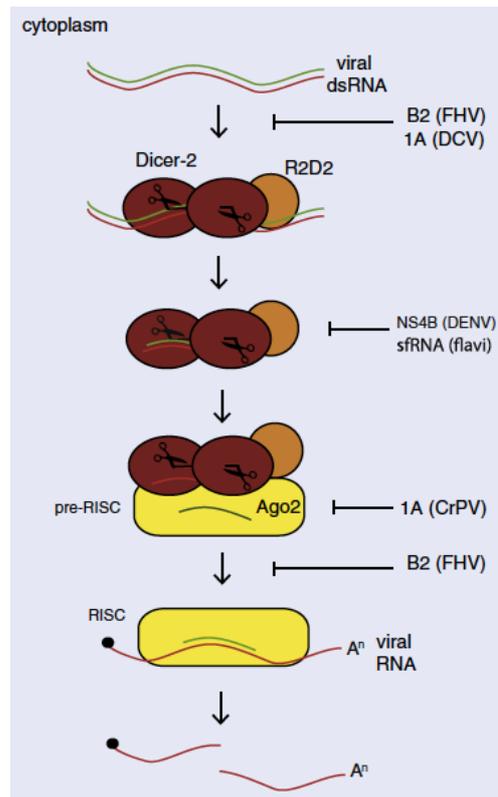


Figura 11: Via siRNA demonstrando os supressores virais de RNAi (VSRs) dos vírus FHV, DCV e CrPV. Fonte: Kingsolver *et al.*, 2013.

Os trabalhos sobre evolução dos genes da via de RNAi demonstraram que alguns genes (Dicer-2, R2D2 e Ago2) possuem uma alta taxa evolutiva comparados aos genes não imunes, e uma rápida evolução quando comparados a outros genes de imunidade inata. Esse processo se caracteriza por uma coevolução entre os hospedeiros e o patógeno, este exercendo estratégias supressivas sobre os genes do hospedeiro, forçando, desta forma, a adaptação da via (Obbard *et al.*, 2006, Vodovar & Saleh, 2012).

Existe uma série de genes que foram relacionados com a infecção por vírus, mas não estão ligados diretamente a via de RNAi em *Drosophila* (Deddouche *et al.*, 2008). Dois destes, Vago e Vir-1, possuem uma expressão aumentada quando este inseto está infectado com o vírus DCV.

O RNA 1 induzido por vírus (virus-induced RNA1 - Vir-1) foi encontrado em células S2 de *Drosophila* infectadas com o DCV, como um dos mais expressos em 24 e 48 horas após infecção. Foi demonstrado também que Vir-1 está sobre regulação do elemento promotor no sítio de ligação Stat, e que a indução de Vir-1 é diminuída em moscas deficientes

para hopscotch, o qual codifica uma quinase Jak em *Drosophila*. Entretanto, super expressão ou nocaute de Vir-1 não possui efeito na resistência para o DCV, estando sua função ainda desconhecida (Doseret *et al.*, 2005).

O gene Vago apresenta interesse especial, pois está relacionado com um dos principais componentes da via de RNAi (Dicer-2) embora não participe da via propriamente dita. A regulação de Vago é dependente do domínio helicase DExD/H-box de Dicer-2, sendo que o aumento da sua expressão não ocorre somente pela presença e processamento de dsRNA, mas requer replicação viral, sugerindo um mecanismo mais complexo de regulação. Esses resultados demonstram que Dicer-2 é capaz de processar dsRNA como sinal de infecção viral e de iniciar ambas respostas dependente e independente de RNAi (Deddouche *et al.*, 2008; Vodovar & Saleh, 2012).

Moscas mutantes para o gene Vago apresentam um aumento de carga viral para o vírus DCV e Sindbis. Porém, a expressão de Vago não foi induzida em infecções com Flock House Virus (FHV), o que pode ser devido a presença de supressores da via de RNAi, com consequente disfunção de Dicer-2, codificadas por estes vírus (Deddouche *et al.*, 2008). Vago também foi descrito recentemente em *Culex* como sendo altamente expresso quando células ou insetos são infectados com vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus - WNV) e que a sua produção e secreção ativa a via Jak/Stat promovendo a diminuição da replicação viral (Paradkar *et al.*, 2012). Interessantemente, Paradkar *et al.* (2012) também relataram que Vago não se liga ao receptor Domless, porém o mecanismo pelo qual Vago ativa a via Jak/Stat ainda não é claro. Como Vago é dependente de Dicer, isso sugere que ocorra uma ligação entre a via de RNAi e a via Jak/Stat (Figura 12) (Kingsolver *et al.*, 2013).

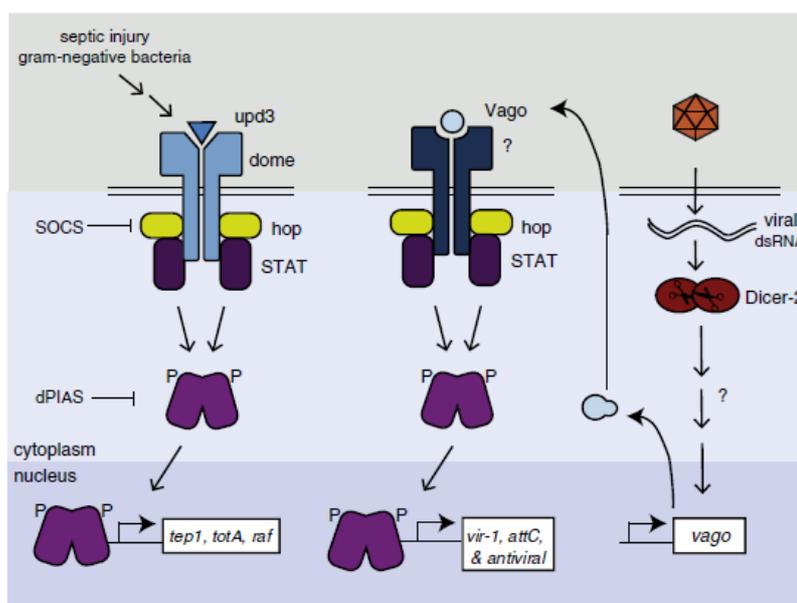


Figura 12: Via de imunidade de insetos e sua ligação com a via de RNAi e do gene Vago. (Fonte: Kingsolver *et al.*, 2013).

1.6 Participação das vias clássicas na imunidade contra vírus

A via de sinalização Jak-Stat foi relacionada com a resposta antiviral de *Drosophila* infectada com o vírus DCV, onde este vírus foi capaz de induzir um perfil de genes que, em sua maioria, apresentam um sítio de ligação para o fator de transcrição Stat. Por outro lado, infecção com DCV não induziu a um aumento na expressão de genes da via de RNAi (Dostert *et al.*, 2005). A via Jak/Stat também foi descrita em *A. aegypti* como sendo ativada mediante infecção com o vírus Dengue, onde o silenciamento de genes que ativam a via, Domeless e Janus Kinase, promove um aumento da susceptibilidade a infecção e quando o regulador negativo da via, Pias, é silenciado ocorre uma diminuição da carga viral (Souza-Neto *et al.*, 2009). Neste mesmo trabalho também foi demonstrado que depleção de Pias causa uma diminuição da expressão de quatro Cecropinas e uma Defensina e um aumento do gene ligante do receptor da via Toll, Spätzle, o que sugere uma ligação entre ativação e inibição de genes da via Toll pela ativação da via Jak-STAT (Kingsolver *et al.*, 2013).

Foi demonstrado também que *A. aegypti* infectado com o sorotipo 2 do vírus da Dengue (DEN-2) apresenta um perfil de expressão de genes relacionados a via Toll e Jak/Stat. Quando a via Toll foi ativada pelo silenciamento de seu regulador negativo (Cactus), ocorreu uma diminuição da carga viral, demonstrando a importância dessa via na resposta antiviral. O

mesmo não foi observado na ativação da via Imd, pois o silenciamento de seu repressor não apresentou efeito sobre a carga viral (Xi *et al.*, 2008). Entretanto, em *Anopheles gambiae* infectados com ONNV foi demonstrado que as vias Jak/Stat e Toll não apresentam papel significativo na regulação da infecção (Waldock *et al.*, 2012). Já para infecção de *Drosophila* com o vírus Sindbis e o vírus CrPV a via Imd foi descrita como sendo importante para o controle da infecção, através de moscas mutantes para a via pode-se verificar um aumento da carga viral (Avadhanula *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009).

Esses estudos demonstram que as vias de imunidade Imd, Toll e Jak/Stat, implicadas na resposta antimicrobiana, também contribuem para a resposta antiviral contra algumas infecções em mosquitos e *Drosophila*. Contudo, devido a contradições em alguns casos, como citado acima, ainda não está claro se as diferenças observadas ocorrem devido a abordagens experimentais diferentes ou as propriedades que cada vírus e hospedeiro possui (Merkling & van Rij, 2013).

1.7 Resposta antiviral inespecífica

Nosso grupo apresentou a primeira evidência da presença de resposta antiviral inespecífica em *L. longipalpis* utilizando linhagem de células (LL5). Utilizando diversos dsRNA não relacionados às partículas do tipo vírus (VLPs) do vírus do Oeste do Nilo (WNV-VLP), foi possível reduzir a replicação viral. Estas VLPs não possuem os genes estruturais e, em função disto, não são capazes de reinfectar novas células (Scholle *et al.*, 2004). Quando dsRNA para luciferase foi introduzida nestas células, produziram a redução esperada da luciferase codificada pelas VLPs, sugerindo o silenciamento específico do gene da luciferase. Surpreendentemente, foi observado que outras dsRNA, que incluíam vários genes específicos de *L. longipalpis*, e mesmo uma beta-galactosidase de *Escherichia coli*, diminuíram a replicação do genoma codificado pelas VLPs. Esta evidencia sugere a presença de uma resposta antiviral inespecífica, ativada por qualquer dupla-fita de RNA (Pitaluga *et al.*, 2008) (Figura 13).

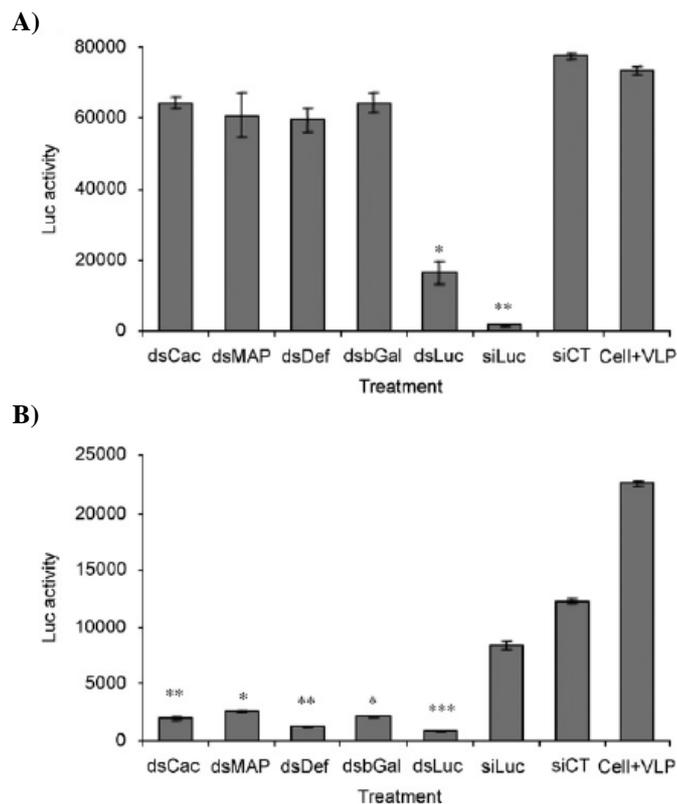


Figura 13: Efeito da transfecção de RNA na atividade de luciferase (luc) em células C6/36 de *Aedes albopictus* (A) e LL5 de *Lutzomyia Longipalpis* (B) infectadas com partículas virais do vírus do Oeste do Nilo com gene repórter para luciferase. Dupla-fita de RNA para Cactus (dsCac), dupla-fita de RNA para MAP-Kinase (dsMAP), dupla-fita de RNA para Defensina (dsDef), dupla-fita de RNA para β -Galactosidase (dsbGal), dupla-fita de RNA para Luciferase (dsLuc), dupla-fita de RNA curtos para luciferase (siLuc), dupla-fita de RNA controle (siCT).

Fonte: Pitaluga, 2008.

Em mamíferos, embora também presente, o mecanismo de RNAi não é utilizado na defesa antiviral, onde a resposta imune inata à infecções virais é também induzida por dsRNA (Jacobs & Langland, 1996). Em vertebrados, a principal resposta antiviral é através da produção de interferon (Levy & Garcia-Sastre, 2001) que pode ser fortemente induzida por dsRNA. Este tipo de resposta ocorre de maneira sistêmica e também local e é ativada de maneira inespecífica, ou seja, o mecanismo é ativado independente da sequência viral, e qualquer dsRNA acima de 30 nucleotídeos já é suficiente para ativar a via (Gantier & Williams, 2007). Por conta disso, em vertebrados, o silenciamento de genes pela via de RNAi requer o uso de siRNA para prevenir as respostas inespecíficas obtidas com as dsRNA.

Pelo fato de não se ter conhecimento preciso dos mecanismos de defesa antiviral em flebotomíneos pode se levantar duas questões importantes: 1) *L. longipalpis* possui uma resposta a dsRNA parecida com o que ocorre em mamíferos ou há outro tipo de resposta ainda desconhecida? 2) *L. longipalpis* utiliza ou não a via de RNAi como resposta antiviral como ocorre em outros insetos estudados até o momento?

Em função disto, uma melhor compreensão da resposta imune aos vírus e dsRNA em flebotomíneos se faz necessária. Para tal, infectamos uma linhagem celular de *L. longipalpis* (LL5) com VSV e poly I:C, que é uma dsRNA sintética, e observamos a modulação na expressão de genes relacionados com vários aspectos da imunidade de insetos (Dicer-2, Vago, Stat, Defensina 4 e Atg18). Assim, esperamos compreender melhor sobre a resposta antiviral neste inseto. As observações geradas neste trabalho poderão ser utilizadas futuramente no desenvolvimento de novas estratégias de controle da transmissão de arbovírus.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar o papel de diferentes componentes do sistema imune no mecanismo de defesa antiviral de *L. longipalpis*.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o perfil de expressão dos genes Vago e Vir-1 nas células silenciadas para os genes da via de RNAi (Argonata-2 e Dicer-2);
- Infectar as células LL5 e Aag2 com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV), bem como simular a infecção viral através da transfecção de dupla fita de RNA longa sintética (poly I:C);
- Caracterizar o perfil de expressão por PCR em tempo real dos genes ligados a resposta antiviral, Dicer-2, Vago, Stat, Atg18 e Defensina 4 durante a infecção das células LL5 e Aag2 com VSV e durante a transfecção com poly I:C;
- Verificar o mecanismo de autofagia através de microscopia de fluorescência de células LL5 marcadas com monodansil cadaverina (MDC) após a infecção com VSV e transfecção com poly I:C.

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultura de células

As células utilizadas neste estudo foram uma linhagem celular embrionária denominada LL5 proveniente de *L. longipalpis* (Tesh & Modi, 1983) e uma linhagem celular embrionária de *A. aegypti* denominada Aag2 (Peleg, 1968).

Estas células foram mantidas em garrafa de cultura com 75 e 150 cm³. As culturas de células LL5 foram colocadas para crescimento em meio L-15 (SIGMA - Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 10% de triptose e 1% de penicilina/streptomicina (100U/mL/100mg/mL). Já as células Aag2 foram mantidas em meio Schneider (Sigma) com as mesmas suplementações do L-15, ambas as células foram acondicionadas a uma temperatura de 30°C. O repique foi realizado após a confluência das culturas (4 - 5 dias). Para realização dos experimentos estas células foram plaqueadas em uma placa de cultura de 6 poços.

3.2 Transfecção em células LL5 e Aag2

Utilizamos a técnica de transfecção com o reagente lipídico Lipofectina (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as dupla-fitas de RNA e o agente transfectante foram incubados, separadamente por 15 min no mesmo meio de cultura das células só que sem soro e antibiótico. Passado este período, as dupla-fitas e o agente transfectante foram misturados e incubados por 45 min. Posteriormente estes foram adicionados à cultura de células, que foram incubadas a 30°C.

3.3 Silenciamento dos genes de interesse em LL5

O silenciamento de genes centrais na via do RNAi (Argonata-2 e Dicer-2) em células LL5 foi realizado através da transfecção de duplas fitas de RNA de aproximadamente 21-23 nucleotídeos, denominadas de siRNA (30 nM), que continham uma sequência específica para

cada gene de interesse (Tabela 2). Utilizamos siRNA randômico como controle, a fim de garantir que o fenótipo observado seja exclusivamente do silenciamento dos genes. Os siRNAs foram desenhados baseados nos algoritmos desenvolvidos pela Ambion/Applied Biosystems. A eficiência do silenciamento foi validada pela expressão relativa dos genes por PCR em tempo real.

3.4 Transfecção de dsRNA em LL5 e Aag2

As dupla-fita de RNA utilizada neste experimento foi uma fita sintética composta por sequências de inosina e citidina, denominada poly I:C. Após 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas da transfecção com poly I:C, o RNA dessas células foi extraído para produção de cDNA e posterior análise da expressão de genes.

3.5 Infecção viral

A infecção viral foi realizada através da adição do vírus da Estomatite Vesicular (VSV – Stomatitis Vesicular Virus) a cultura de células LL5 e Aag2. Estas células foram infectadas com 10 MOI (multiplicidade de infecção) do vírus. Após aproximadamente 16 horas do plaqueamento das células, o vírus foi adicionado a cultura passando por um processo de adsorção de 1 ou 2 horas. Após este período, as células foram lavadas com meio e incubadas a 30°C. A eficiência da infecção foi validada por PCR em tempo real com oligonucleotídeos específicos para VSV.

3.6 PCR em tempo real (RT-PCR)

A coleta das amostras foi feita através da adição de 1 mL do reagente TRIzol (Ambion) a cada poço de cultura de células LL5 após 3, 6, 24, 48, 72, e 96 horas da transfecção ou infecção. O RNA dessas amostras foi, então, extraído, de acordo com o fabricante, quantificado e tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para eliminação de DNA contaminante. Após a confirmação de que as amostras não estavam contaminadas, através de PCR com o RNA como template, foi realizada a síntese de cDNA através de ação

da transcriptase reversa “SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen).

Foram utilizados pares de oligonucleotídeos específicos com sequências diferentes dos siRNAs e preferencialmente localizado entre dois exons. A mesma estratégia foi utilizada no desenho do par de oligonucleotídeos do gene controle (constitutivo) RP49 (Gentile *et al.*, 2007). As reações de RT-PCR foram preparadas utilizando o kit iQTM SYBR Green Supermix (Applied Biosystems), como recomendado pelo fabricante, e a análise foi feita através da Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System. As medidas de expressão em tempo real foram normalizadas contra a expressão do gene de referência RP49. Os níveis relativos de RNA foram calculados utilizando o método $\Delta\Delta CT$ (quantificação relativa) (Livak & Schmittgen, 2001). A tabela 2 contém todas as sequências de oligonucleotídeos utilizados para expressão dos genes de interesse para *L. longipalpis* e a tabela 3 contém as sequências dos genes para *A. aegypti*.

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos para *Lutzomyia longipalpis*.

Gene	Sequência Reverse	Sequência Forward
VSV	TGCAAATAACCGGAATGTCT	TCTGCAACTTCTCGTTCAA
RP49	GGGGAGCATGTGGCGTGTCTT	GACCGATATGCCAAGCTAAAGCA
Vago	ACATCCCGAAGCAGTGTAGG	TATCCGGGTCATTGTTGGTT
Argonauta-2	GACGCACCCGAGTCCAGAT	CCCGTATAGCGGAACCCA
Dicer-2	TCCACCTGCATGTCTCCCGT	AGGATGGTGGGAAGCGCAGT
Stat	AAATGTGGGTCGGGAAGTGA	GGTGGGCGATGGAAATGAT
Defensina 4	GCCTTTGAGTCGCAGTATCC	ATCCATCCTTTATGCAACCG
Atg18	ATCTGTACCTCGCCAGCAGT	CCAGGACATGAAGGTGGTGC

Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos para *Aedes aegypti*.

Gene	Sequência Reverse	Sequência Forward
RP49	GGGGAGCATGTGGCGTGTCTT	GACCGATATGCCAAGCTAAAGCA
Vago	TGTGACAACACTCCGGGTAA	AAATCCATTCCTGGTGTCTG
Stat	CACACAAAAGGACGAAGCA	TCCAGTCCCCTAAAGCTCA

3.7 Análise de microscopia de fluorescência

Para verificar a ocorrência de autofagia nas células LL5 e Aag2 infectadas ou transfectadas com dsRNA (poly I:C), em cada ponto de amostra 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção ou transfecção as células foram incubadas por 1 hora com 100µM do marcador monodansil cadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich), que é um composto lisossomotrópico fluorescente capaz de se acumular nos vacúolos autofágicos. Após este período de incubação as células foram então lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 4% por 40 minutos a temperatura ambiente. Posterior a isso, realizamos a montagem das lâminas com PBS e análise da presença do marcador através de microscopia de fluorescência em microscópio Zeiss Axio Observer M1.

4 Resultados

4.1 Silenciamento de genes de interesse

Para o silenciamento das moléculas presentes na via de RNA de interferência, Argonauta 2 e Dicer 2, realizamos a transfecção de siAgo2 e siDcr2, respectivamente, em células LL5 de *L. longipalpis*. Avaliamos a eficiência do silenciamento em 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a transfecção e os resultados obtidos são demonstrados na figura 14.

Podemos verificar, em comparação com as células controle transfectadas com siRNA randômico (siCT), que houve uma diminuição significativa de aproximadamente 80% e 70% do gene Argonauta 2 nos pontos de 24 e 48 horas, respectivamente, com um retorno da sua expressão até 120 horas, comprovando que o siAgo2 utilizado foi capaz de silenciar este gene nas células LL5. O mesmo não pode ser comprovado para o gene Dicer2, pois, o siRNA utilizado não diminuiu sua expressão, pelo contrário, apresentou um aumento significativo, duas vezes maior, da sua expressão em 24 horas após a transfecção.

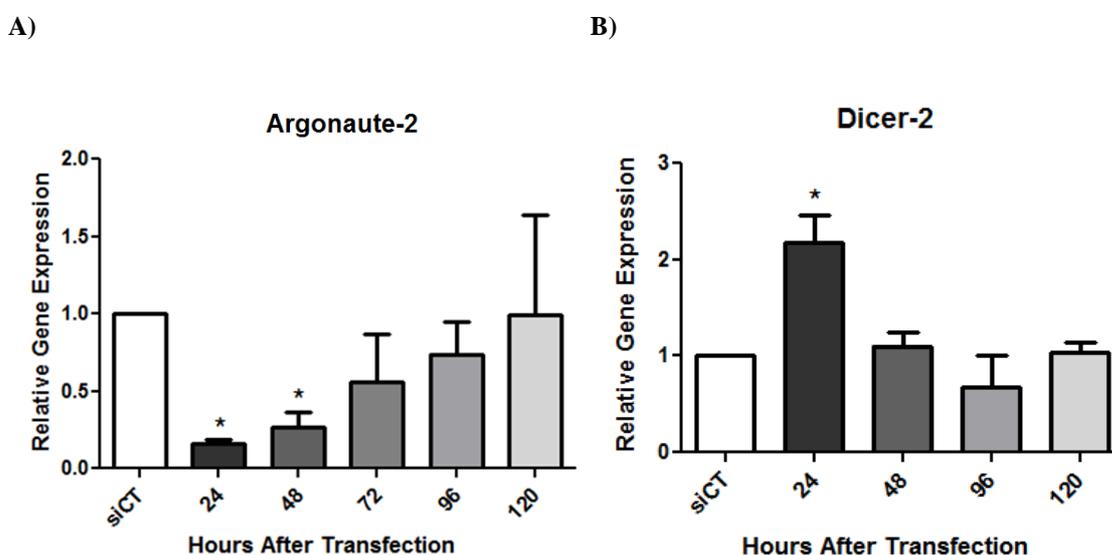


Figura 14: Expressão relativa dos genes Argonauta2 (Ago2) (A) e Dicer2 (Dcr2) (B) em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* transfectadas com duplas fitas de RNA (siRNA) para Ago2 e Dcr2. Análise de expressão das células realizada 24, 48, 72, 96 e 120 após a transfecção comparadas com o controle siRNA randômico. A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo RP49. O gráfico A é baseado na média de 2 amostras biológicas e o gráfico B em 1 amostra biológica. Diferença significativa do grupo controle: * $p < 0,05$. (ANOVA, complementado por teste Bonfferoni).

Nas amostras que obtiveram um silenciamento eficiente (Argonauta 2) foram feitas análises de expressão para os genes Vago e Vir-1, com o objetivo de verificar se estes eram modulados por Ago2 através da interrupção da via de RNAi. Os resultados demonstraram que apenas Vir-1 tem a expressão significativamente modulada positivamente após 72 horas da transfecção com siAgo2 (Figura 15).

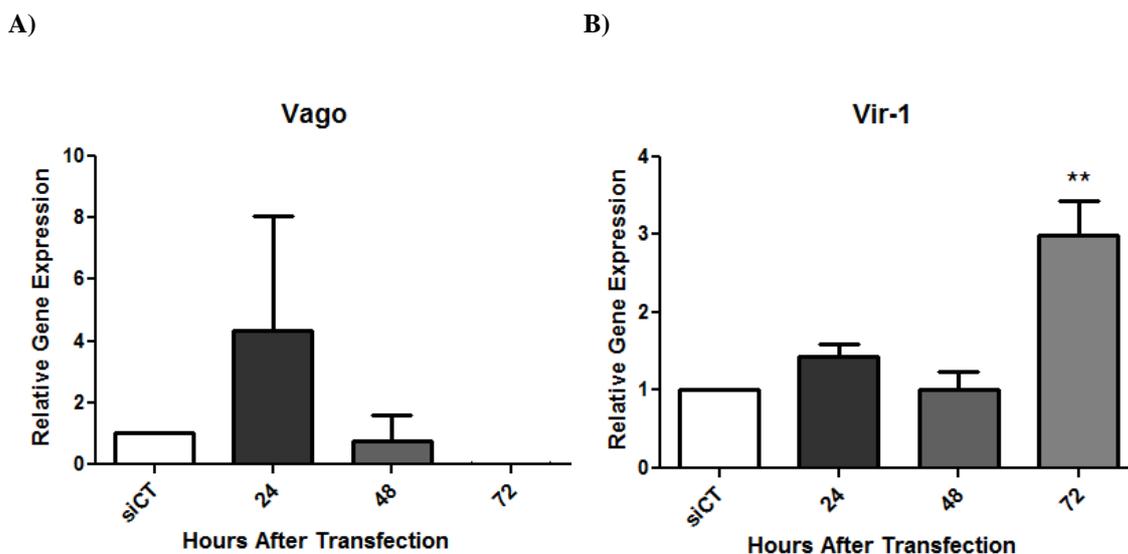


Figura 15: Expressão relativa dos genes Vago (A) e Vir-1 (B) em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* transfectadas com duplas fitas de RNA (siRNA) para o gene Argonauta2. Análise de expressão dos genes nas células realizada 24, 48 e 72 horas após a transfecção comparadas com a expressão do controle (siRNA randômico). A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo RP49. Os gráficos representam a média de 2 amostras biológicas. Diferença significativa do grupo controle, **p<0,01. (ANOVA, complementado por teste Bonfferoni).

4.2 Infecções com VSV e transfecção de dsRNA em células LL5

Foram realizadas infecções com o vírus VSV cedidos gentilmente pelo Dr. João Marques (UFMG) com o intuito de verificar quais genes estavam sendo modulados e, desta forma, tentar verificar possíveis vias que estão atuando sobre a infecção causada por este vírus.

A infecção do vírus VSV em células LL5 de *L. longipalpis* se mostrou bem eficaz no modelo experimental. O gráfico da figura 16 demonstra que o vírus VSV foi capaz de infectar e se replicar em células LL5, pois quando comparados ao ponto controle há um aumento significativo da expressão viral de até aproximadamente 80 vezes nos pontos de 24, 72 e 96

horas após a infecção. Devido a resposta antiviral em células LL5 ocorrer de maneira sequência-inespecífica, mimetizamos as infecções virais através de transfecções de uma dsRNA sintética, denominada poly I:C. De forma a verificar se os genes em estudo também são responsivos a transfecção com dsRNA e comparar os resultados obtidos com os resultados da infecção com VSV.

As infecções com VSV e transfecções com dsRNA (poly I:C) seguidas de infecção com VSV são experimentos de três amostras biológicas diferentes. A expressão relativa do gene viral foi baseada no primeiro ponto de amostra, 3 horas após a infecção. Desta forma, a expressão do vírus é relativa a este ponto e normalizada pelo controle endógeno RP49, um gene ribossomal de *L. longipalpis* (Gentile *et al.*, 2007).

Para verificar se as dsRNA em células LL5 poderiam gerar algum estado antiviral prévio que pudesse interferir na replicação de VSV assim como observado em infecções por WNV-VLP (Pitaluga *et al.*, 2009), transfectamos as células LL5 com dsRNA e após, aproximadamente, 16 horas, infectamos com o VSV. Assim, podemos verificar, de acordo com a figura 16, que não houve diferença significativa na replicação viral quando estas células são pré transfectadas com dsRNA.

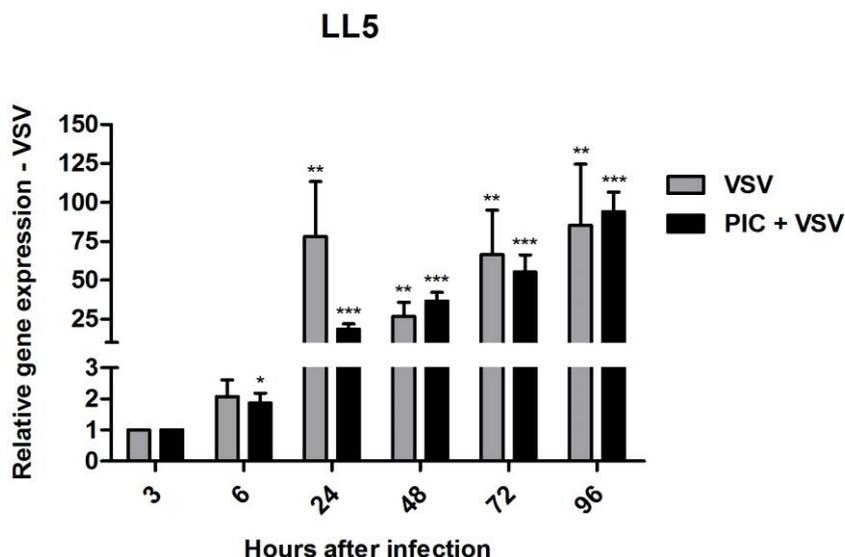


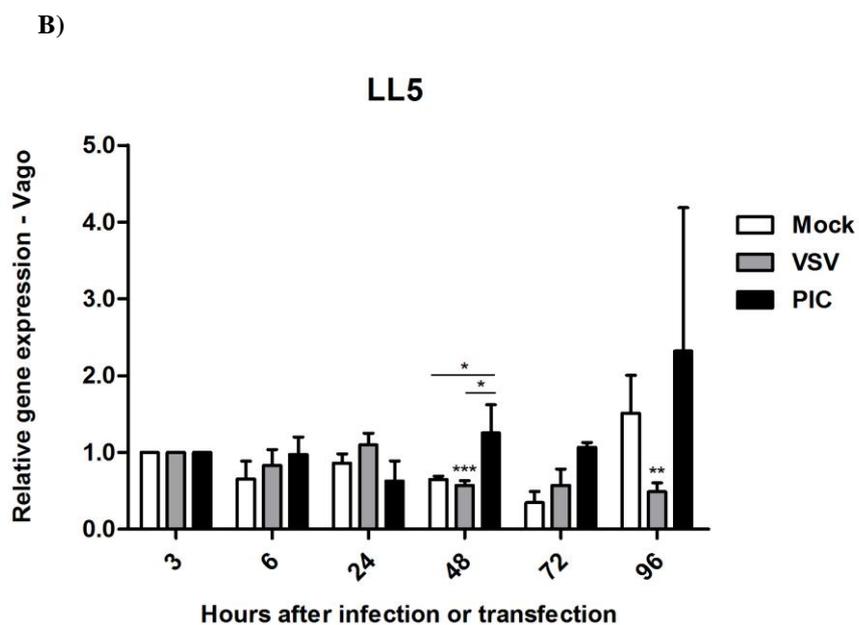
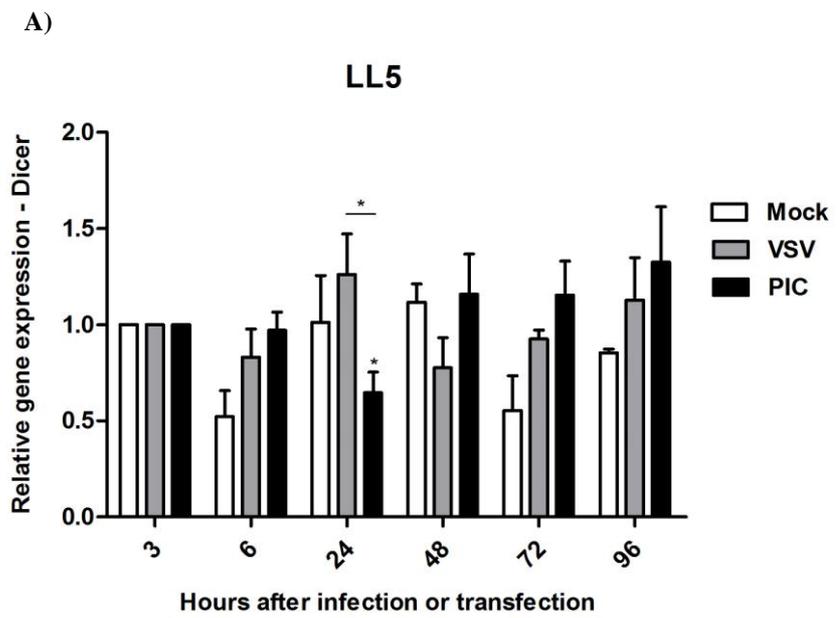
Figura 16: Detecção do vírus da Estomatite Vesicular (VSV) em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* após 6, 24, 48, 72 e 96 horas da transfecção com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C) seguida de infecção com VSV, barras pretas, e somente da infecção com VSV, barras cinzas, relativo a 3 horas após a infecção (controle). O gráfico representa a média de 3 amostras biológicas. Diferença significativa do grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (Teste t, complementado por teste Unpaired).

Nas células LL5 infectadas com VSV ou somente transfectadas com poly I:C verificamos a expressão relativa de alguns genes que são relacionados a defesa antiviral ou descritos como responsivos a vírus, Dicer-2, Vago, Stat, Atg18 e Defensina 4. Desta forma, podemos comparar o tipo de resposta imune que ocorre nessas duas condições. Para o gene Dicer, podemos verificar, de acordo com a figura 17A, que somente após 24 horas da transfecção com dsRNA houve uma modulação significativa, de forma negativa, em sua expressão quando comparado ao ponto controle de 3 horas após a transfecção. Em todos os outros pontos de análise para células transfectadas com dsRNA ou infectadas com VSV não houve modulação de Dicer 2.

De acordo com a figura 17B, a presença do vírus VSV nas células LL5 foi capaz de diminuir significativamente a expressão de Vago após 48 e 96 horas após a infecção. Já na presença de dsRNA as células LL5 responderam de forma a aumentar a expressão de Vago após 48 horas da transfecção, quando comparado ao grupo controle não transfectado (mock) no mesmo tempo analisado.

O gene Stat obteve um aumento significativo de sua expressão, de até 5 vezes, em todos os pontos de análise após a transfecção com dsRNA, quando comparados ao ponto

controle de 3 horas, ao grupo controle (mock) e também quando comparados a expressão das células infectadas. Porém, a infecção com VSV não modulou a expressão de Stat em nenhum dos tempos analisados (Figura 17C).



C)

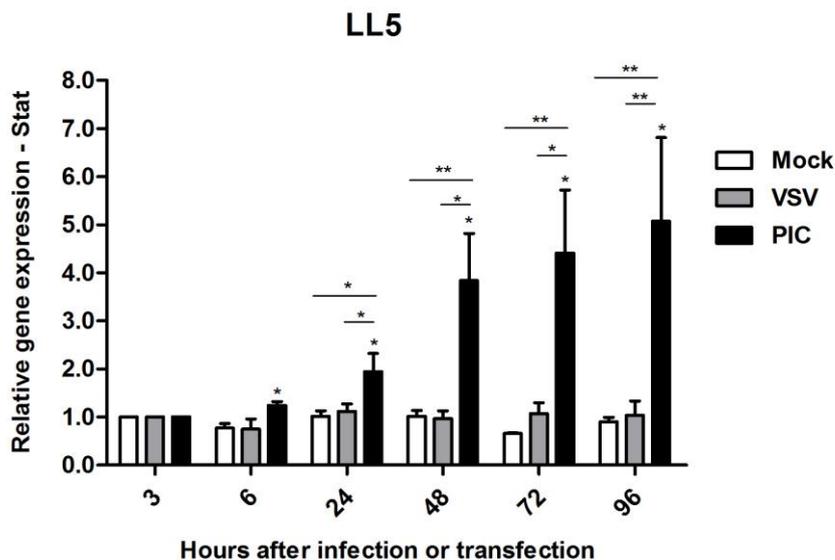


Figura 17: Expressão relativa dos genes Dicer (A), Vago (B) e Stat (C) em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* transfectadas com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C), barras pretas, infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV), barras cinzas, e em células controle não transfectadas (mock), barras brancas. Análise de expressão dos genes nas células realizada 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção ou infecção comparadas com a expressão do ponto controle (ponto de 3 horas). A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo RP49. Os gráficos representam a média de 3 amostras biológicas. Diferença significativa do grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (Teste t, complementado por teste Unpaired).

Nas mesmas amostras também observamos a expressão de um peptídeo antimicrobiano, Defensina 4, e a expressão de um gene relacionado à autofagia, Atg18. Como pode ser observado na figura 18, houve modulação negativa do gene de Defensina 4 para as células LL5 infectadas com VSV em 96 horas após a infecção, quando comparado ao ponto de 3 horas, e um aumento significativo em 72 horas após a infecção quando comparado ao grupo controle (mock) do mesmo horário analisado. Nas células transfectadas com dsRNA o gene de Defensina 4 foi significativamente responsivo em todos os pontos de análise, seja quando comparados ao ponto de controle ou ao grupo controle (mock), onde observamos um aumento de sua expressão em até 5 vezes.

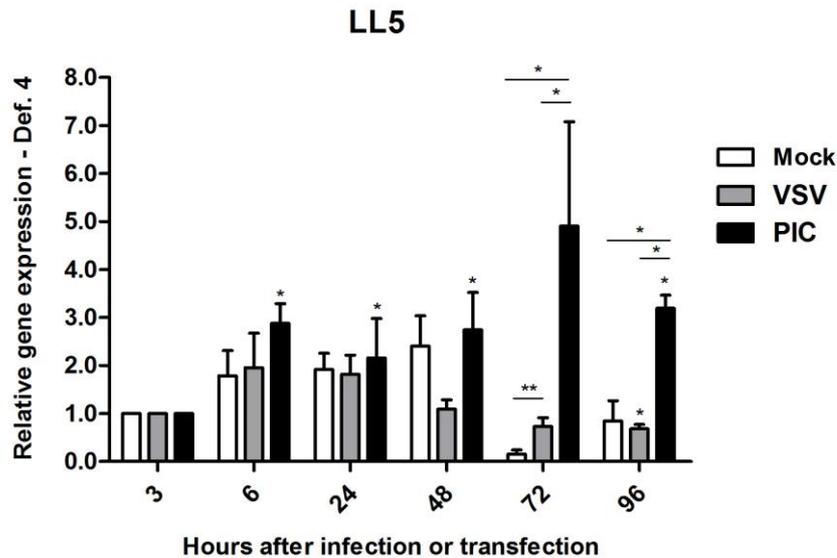


Figura 18: Expressão relativa do gene Defensina 4 em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* transfectadas com dsRNA sintética (poly I:C), barras pretas, infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV), barras cinzas, e em células controle não transfectadas (mock), barras brancas. Análise de expressão do gene nas células realizada 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção ou infecção comparada com a expressão do ponto controle (ponto de 3 horas). A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo RP49. O gráfico representa a média de 3 amostras biológicas. Diferença significativa do grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (Teste t, complementado por teste Unpaired).

Para o gene relacionado a autofagia, Atg18, podemos observar que nas células infectadas com VSV houve um aumento da expressão deste gene, de forma significativa, nos pontos de 72 e 96 horas após a infecção, obtendo um aumento de aproximadamente 30 vezes em sua expressão (Figura 19). Interessantemente, podemos também verificar que para células transfectadas com dsRNA houve uma modulação positiva significativa do gene Atg18 somente em 24 horas após a transfecção, chegando a um aumento de aproximadamente 4 vezes.

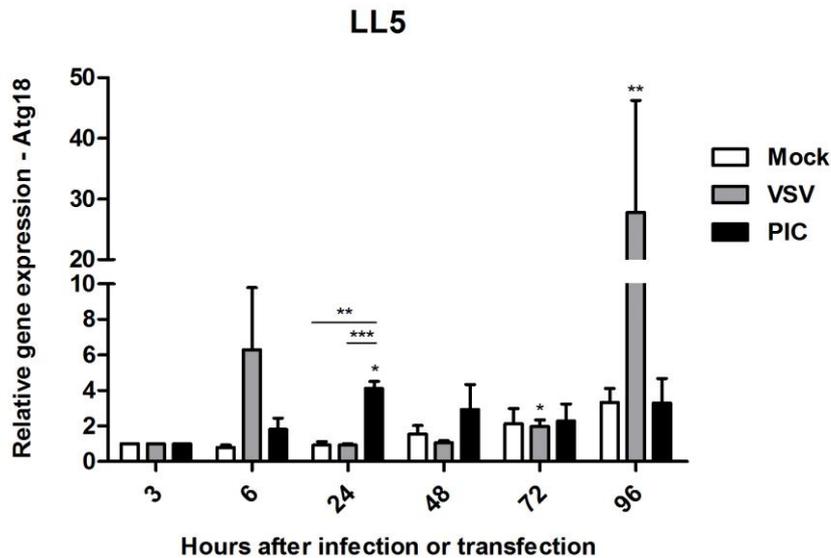
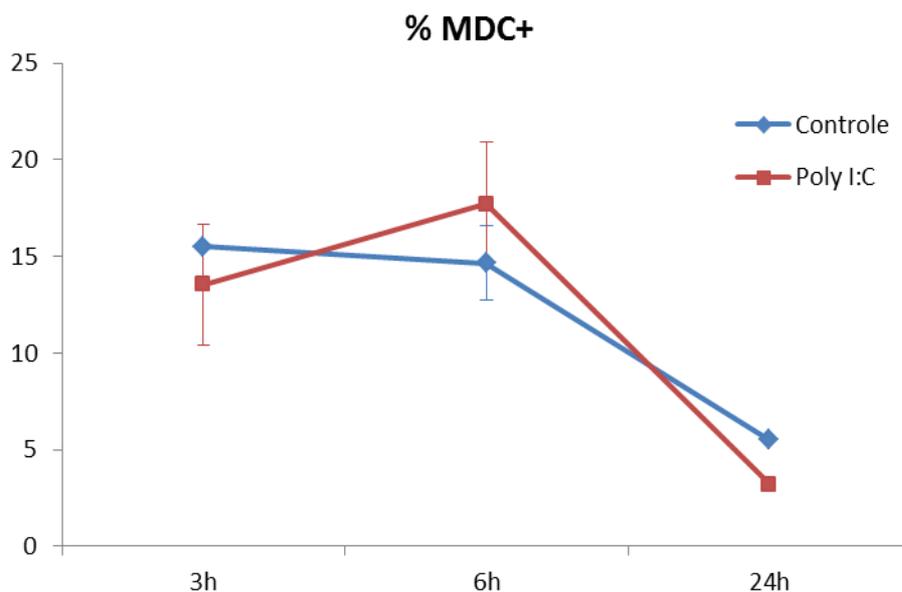


Figura 19: Expressão relativa do gene Atg18 em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* transfectadas com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C), barras pretas, infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV), barras cinzas, e em células controle não transfectadas (mock), barras brancas. Análise de expressão do gene nas células realizada 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção comparada com a expressão do ponto controle (ponto de 3 horas). A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo RP49. O gráfico representa a média de 3 amostras biológicas. Diferença significativa do grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (Teste t, complementado por teste Unpaired).

4.3 Análise de microscopia de fluorescência nas células LL5

Nos pontos de análise de 3, 6 e 24 horas após a transfecção com dsRNA (poly I:C) (Figura 20A) ou infecção com o vírus VSV (Figura 20B) nas células LL5 foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência para o marcador MDC (monodansil cadaverina), que identifica as células que estão em processo de autofagia. De acordo com a figura 20, somente após 6 horas da infecção com o vírus VSV pode se verificar um aumento na marcação de vacúolos autofágicos, representando cerca de 30% das células analisadas.

A)



B)

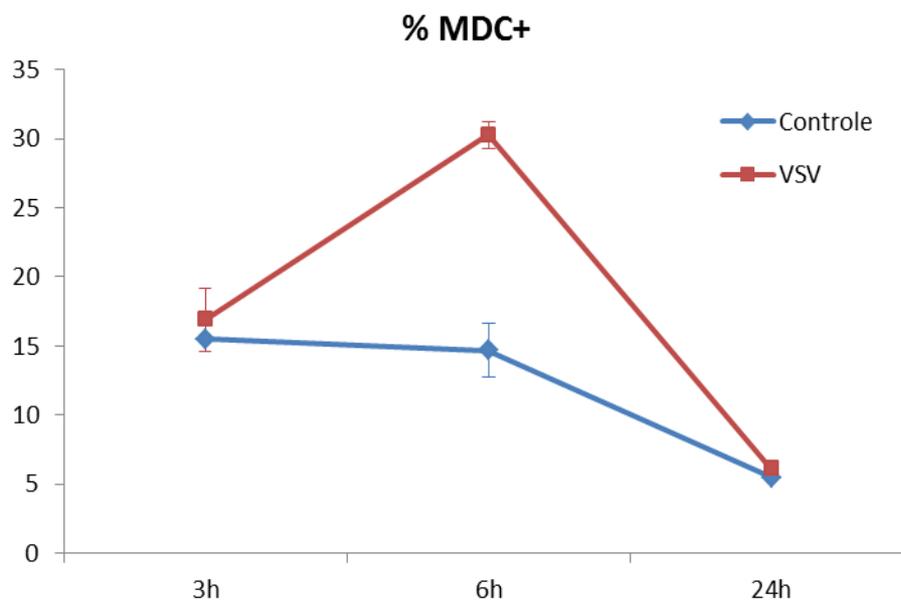


Figura 20: Análise de microscopia de fluorescência de monodansil cadaverina (MDC) em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* transfetadas com dupla fita de RNA (poly I:C) (A), barras vermelhas, infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) (B), barras vermelhas, somente transfetadas com agente de transfecção – controle mock, barras azuis. Análise de microscopia realizada 3, 6 e 24 horas após a infecção ou transfecção. O gráfico representa 2 amostras biológicas.

As fotos das células LL5 marcadas com MDC que apresentaram diferença entre os controles (LL5 não transfetadas e LL5 mock, somente com o agente transfetante) e as células infectadas com VSV e transfetadas com poly I:C podem ser visualizadas na figura 21. Realizamos uma contagem de aproximadamente 300 células em cada amostra analisada,

sendo que as células que apresentaram uma marcação de um pontinho azul mais brilhante foram consideradas MDC positivas.

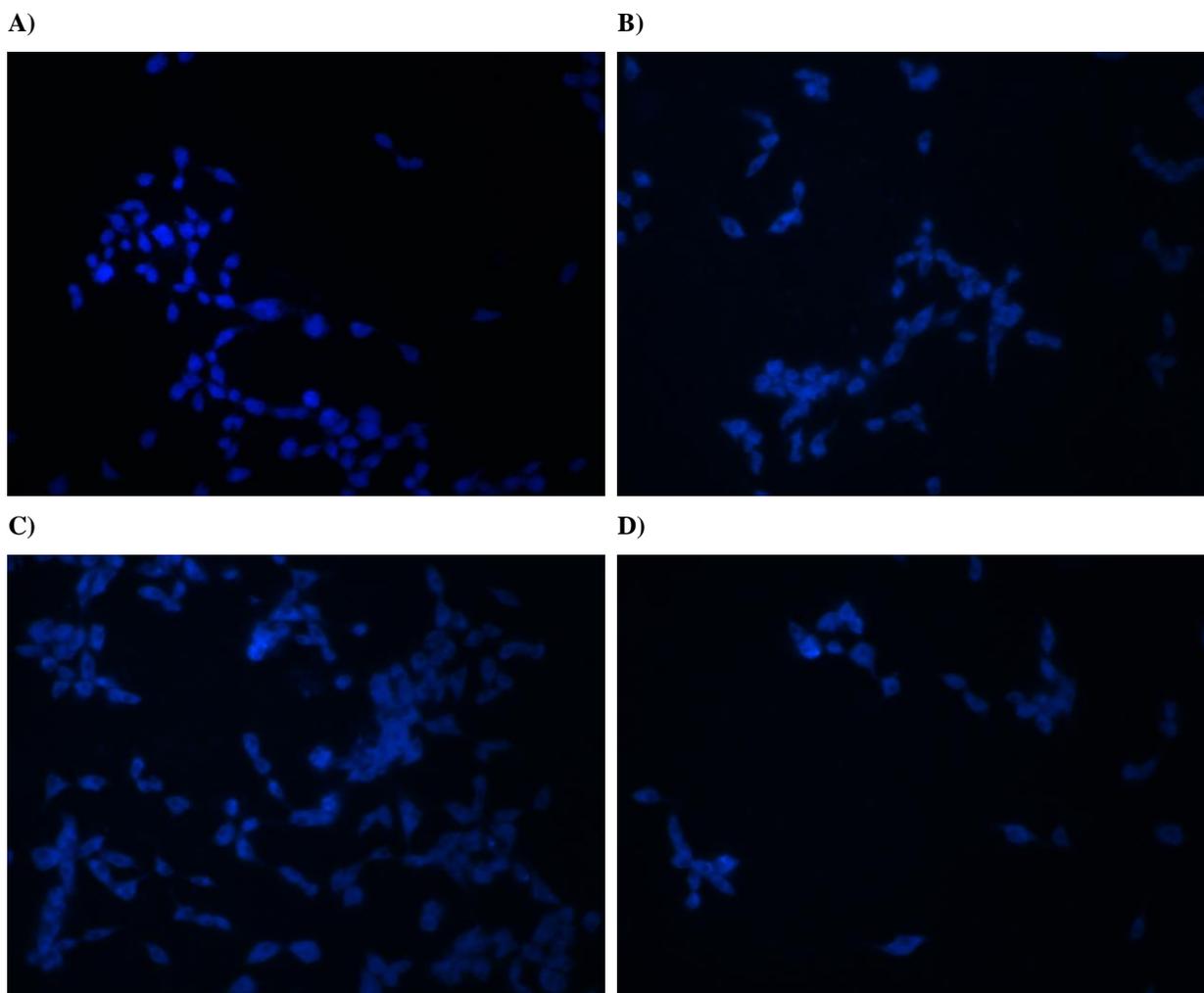


Figura 21: Análise de microscopia de fluorescência de monodansil cadaverina (MDC) em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*. Análise realizada em células sem tratamento (A), somente transfectadas com agente de transfecção – controle mock, (B), transfectadas com dupla fita de RNA (poly I:C) (C) e infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (D). As figuras representam a análise de microscopia realizada 6 horas após a infecção ou transfecção.

4.4 Infecções com VSV e transfecção de dsRNA em células Aag2

Foram realizadas infecções com o vírus VSV e transfecções com o dsRNA (poly I:C) em células de *A. aegypti* (Aag2) com o intuito de verificar se a resposta à infecção viral em células Aag2 ocorrem da mesma forma que observado em LL5. De acordo com a figura 22, podemos verificar que o vírus também foi capaz de se replicar em células Aag2 obtendo um

pico de replicação viral em 24 após a infecção. Diferentemente de LL5 a transfecção com dsRNA antes da infecção foi capaz diminuir a replicação viral, significativamente, em todos os pontos de análise.

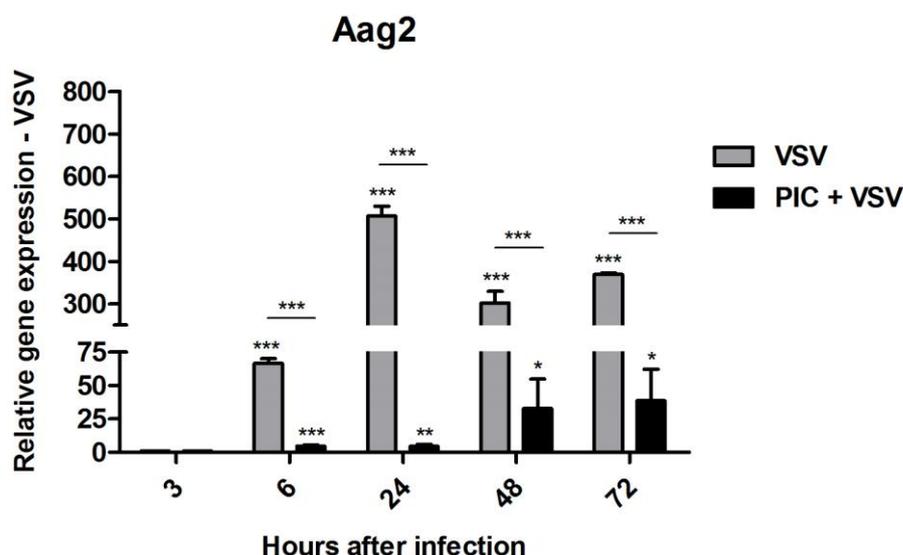


Figura 22: Detecção do vírus da Estomatite Vesicular (VSV) em células Aag2 de *Aedes aegypti* após 6, 24, 48, 72 e 96 horas da transfecção com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C) seguida de infecção com VSV, barras pretas, e somente da infecção com VSV, barras cinzas, relativo a 3 horas após a infecção (controle). O gráfico representa 1 amostra biológica. Diferença significativa do grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (Teste t, complementado por teste Unpaired).

A expressão do gene Stat foi analisada nas células Aag2 infectadas com o vírus VSV e podemos verificar, de acordo com a figura 23, que houve uma tendência ao aumento deste gene 24 horas após a infecção com o vírus e 24 e 72 horas após a transfecção com dsRNA.

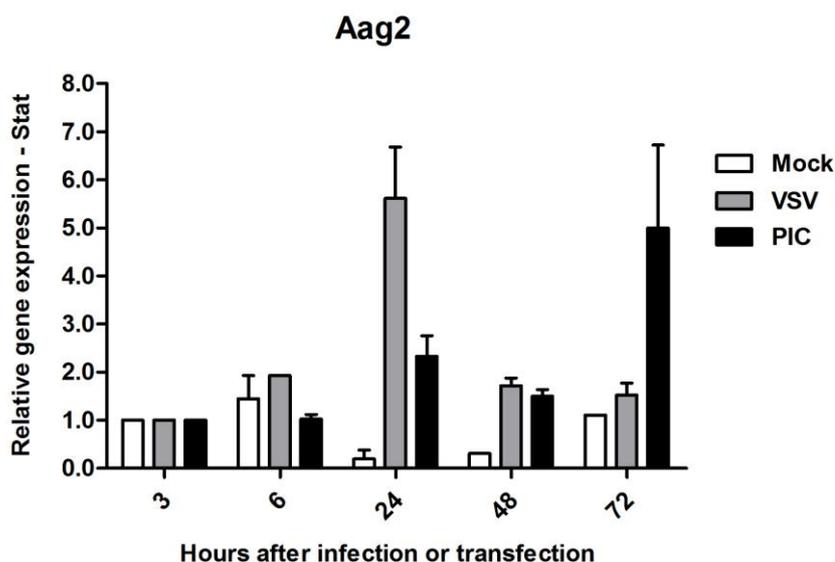


Figura 23: Expressão relativa do gene Stat em células Aag2 de *Aedes aegypti* transfectadas com duplas fitas de RNA sintética (poly I:C), barras pretas, infectadas com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV), barras cinzas, e em células controle não transfectadas (mock), barras brancas. Análise de expressão do gene nas células realizada 3, 6, 24, 48 e 72 horas após a infecção comparada com a expressão do ponto controle (ponto de 3 horas). A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo RP49. O gráfico representa a média de 1 amostra biológica.

4.5 Comparação entre infecções com VSV em LL5 e Aag2

Análise de comparação entre a infecção das células LL5 e Aag2, de acordo com a figura 24, nos demonstra que a célula Aag2 apresentou um aumento significativo da expressão do vírus VSV, em todos os pontos de análise, em comparação pontual a infecção das células LL5. Este resultado sugere que nas células Aag2 a infecção com o vírus VSV ocorreu de forma mais eficiente.

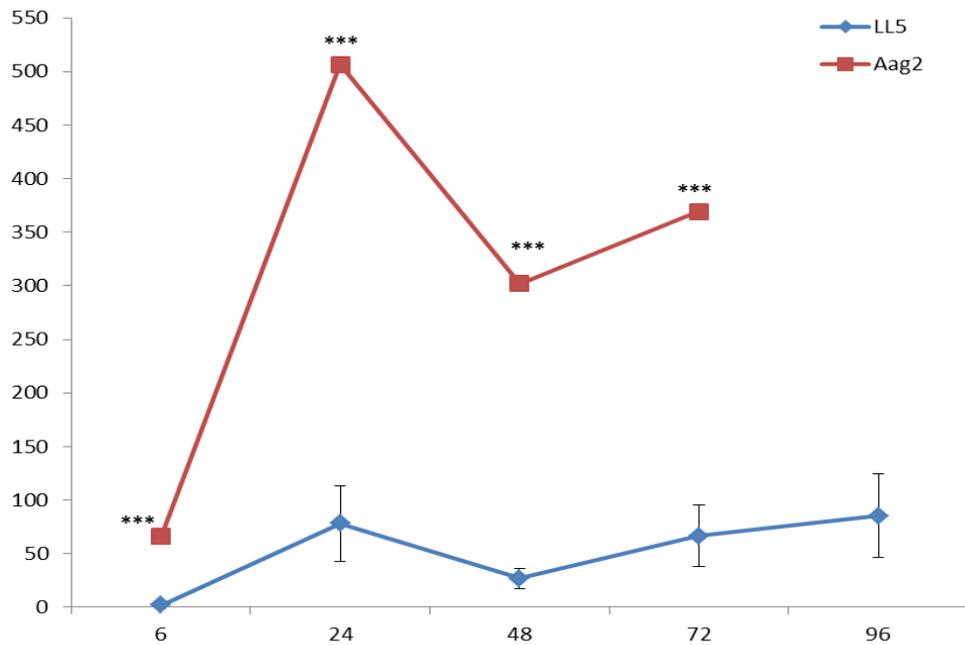


Figura 24: Comparação entre as infecções com o vírus da Estomatite Vesicular (VSV) das células Aag2 de *Aedes aegypti* e LL5 de *Lutzomyia longipalpis*. Detecção do vírus em Aag2 após 6, 24, 48 e 72 horas, barras vermelhas, e em células LL5 após 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção com VSV, barras azuis, relativos ao ponto controle de 3 hora após a infecção. Diferença significativa do grupo controle, *** $p < 0,001$. (Teste t, complementado por teste Unpaired).

5 Discussão

Os estudos desenvolvidos com interesse na resposta imune de insetos vetores vêm crescendo ao longo do tempo e, através destes, muito se sabe a respeito do mecanismo desenvolvido por diversos vetores de importância médica como *A. aegypti*, *Culex* spp. e *Anopheles* spp. Com o conhecimento de como esses insetos respondem a invasão de patógenos, incluindo os vírus, é possível desenvolver estratégias para o combate à doença, com intervenções no ciclo de vida do patógeno, por exemplo, antes mesmo de ser transmitida para os humanos.

As respostas antivirais nos insetos são moduladas principalmente pela autofagia, RNAi e apoptose, com a participação importante também das vias clássicas e seus genes efetores. Apesar de muitos estudos demonstrarem a resposta antiviral em vários insetos vetores, ainda pouco se sabe a respeito de como os flebotomíneos respondem a infecções virais. Até o momento, apenas se sabe que células de *L. longipalpis* apresentam uma resposta sequencia-inespecífica quando infectadas com vírus WNV, onde qualquer dsRNA (viral ou não) e até mesmo ssRNA, pode desencadear uma resposta antiviral. Devido a isto, este nosso interesse em avaliar a resposta antiviral em células de flebotomíneos analisando o perfil de expressão de vários genes envolvidos nas diferentes vias de resposta imune antiviral.

A via de RNA de interferência é um mecanismo de silenciamento da expressão gênica presente em diversos organismos incluindo os flebotomíneos. Em insetos adultos de *L. longipalpis* já foi identificado, pelo nosso grupo, componentes desta via através do sequenciamento de diversas bibliotecas de cDNA e anotação de base de dados de etiquetas de sequências expressas (ESTs) depositadas no genbank como: Tudor, Piwi, Ago2, Dcr2 (Pitaluga *et al.*, 2009). A funcionalidade da via bem como sua utilização para o silenciamento gênico já foi comprovado em fêmeas de *L. longipalpis* por Sant'Anna *et al.* (2009), que silenciou tripsina I utilizando injeção de dsRNA e por Telleria *et al.* (2012) que utilizou a mesma técnica para o silenciamento do gene Caspar, um repressor da via de imunidade Imd.

Já foi descrito anteriormente a participação da via de RNAi no controle de outros genes não relacionados diretamente com esta via (Deddouche *et al.*, 2008; Paradkar *et al.*, 2012). Assim, com o objetivo de interromper o funcionamento da via de RNAi para poder observar que genes estariam sendo modulados pela mesma, tentamos silenciar os dois principais genes da via: Dicer 2 e Argonauta 2. Não obtivemos sucesso no silenciamento de

Dicer, porém, através da transfecção de siRNA para Argonata 2 pudemos silenciar significativamente este gene e observar a atividade da via de RNAi na linhagem celular LL5 de *L. longipalpis* (Figura 14). Uma possível explicação para a falha no silenciamento de Dicer 2 pode ser devido a uma baixa concentração de siRNA ou um ineficiente silenciamento em função da sequência nucleotídica utilizada neste siRNA em particular.

Os genes Vago e Vir-1 foram caracterizados como sendo regulados positivamente mediante a infecção viral em *Drosophila* e não estão diretamente ligados a via de RNAi (Kemp & Imler, 2009). Estes genes foram identificados, por análise de similaridade por Blast, em base de dados de sequências de *L. longipalpis* (Vectorbase). Avaliamos a expressão de ambos genes nas células LL5 após o silenciamento de Argonata 2 por siRNA. Vago não apresentou um aumento significativo e para o gene Vir-1 houve uma regulação positiva de até 3x em 72 horas após o silenciamento (Figura 15), indicando que este gene está sob aparente regulação de um gene central de imunidade antiviral, apesar destas células não estarem infectadas com vírus. Não se tem estudos que indiquem essa associação, porém, se sabe que outro gene pertencente a via de RNAi, Dicer 2, regula a expressão de outro gene que não pertence a esta via, o gene Vago (Deddouche *et al.*, 2008). Já o gene Vir-1 tem sido descrito como um gene ligado ao fator de transcrição Stat da via Jak/Stat, mas ainda não se tem conhecimento sobre a sua função na resposta imune e/ou algum processo celular.

Apesar de todos os silenciamentos induzidos pela via de RNAi em *L. longipalpis* terem ocorridos através de injeções de dsRNA em insetos adultos, nossos experimentos de silenciamento foram conduzidos pela transfecção de siRNA, devido a resposta inespecífica a dsRNA encontrada nas células LL5 (Pitaluga *et al.*, 2008). Este tipo de resposta inespecífica é parecido com o que ocorre nos mamíferos, onde qualquer molécula de dsRNA detectada, por receptores citoplasmáticos, tais como TLR, receptores do tipo NOD, promove a indução da transcrição de interferon do tipo I e outras citocinas pro inflamatórias como IL-12, IL-6 e TNF- α . O interferon I é responsável pela ativação de várias vias metabólicas que, em última análise, levarão a ativação de diversas proteínas na célula infectada, como RNase L, que degrada mRNA celulares e virais, a proteína PKR, que inativa o fator de alongação da tradução, e proteínas que inibem a síntese proteica. De forma geral, essas citocinas desencadeiam processos celulares que impedirão um meio propício para replicação (Gantier *et al.*, 2007).

Esta resposta antiviral inespecífica foi também observada em outros insetos como abelhas (Flenniken & Andino, 2013), mariposas (Hirai *et al.*, 2004) e no bicho da seda *Bombyx mori* (Liu *et al.*, 2013). Alguns crustáceos também possuem esse tipo de resposta antiviral inespecífica, como visto pela primeira vez em *Litopenaeus vannamei* que apresentaram uma resistência a infecção com o vírus da Síndrome de Taura (TSV) e com o vírus da Síndrome Mancha Branca (WSSV) depois de tratados com dsRNA (Robalino *et al.*, 2004). Com o objetivo de verificar se siRNA poderia fornecer um silenciamento sequência específica nos crustáceos, Westenberg *et al.* (2005) injetaram siRNA do WSSV em *Penaeus monodon* e observaram, após infecção com vírus, um aumento significativo na sobrevivência dos camarões quando comparados ao grupo controle, porém, quando injetados siRNA para a proteína não correlacionada GFP eles também observaram um aumento significativo na sobrevivência destes organismos, constatando que em crustáceos ambos dsRNA e siRNA induzem uma resposta antiviral inespecífica.

A atividade endonuclease de Dicer pode estar associada a esta resposta inespecífica, pois esta enzima atua de forma sequência não específica com a clivagem de duplas fitas de RNA. Desta forma, para experimentos conduzidos em organismos que possuem esta resposta, interferon-like, devem ser utilizado siRNAs afim de evitar o reconhecimento e ativação de resposta inespecífica de Dicer. Os siRNAs são diretamente incorporados ao complexo RISC mediados por Ago2 e R2D2, conduzindo agora uma clivagem sequência-específica de mRNA, promovendo assim uma resposta de silenciamento específica.

Realizamos neste trabalho infecções das células LL5 de *L. longipalpis* com o vírus VSV com o objetivo de analisar possíveis modulações em diferentes genes imunes do vetor e com isso tentar compreender melhor o mecanismo antiviral utilizado por estas células. Nossos resultados de infecção de células LL5 com o vírus VSV indicam que estas células são eficientes na replicação desses vírus com um pico expressão do vírus a partir de 24 horas após a infecção (Figura 16). Outros estudos de infecção desta mesma linhagem celular LL5 com o vírus VSV demonstram um pico no título viral 72 horas após a infecção e em experimento de infecções persistentes estas células sustentam um longo período de infecção viral de até 81 dias (Llewellyn *et al.*, 2002). Em trabalhos anteriores (Pitaluga *et al.* 2008), foi observado um efeito protetor da dsRNA (poly I:C) quando transfectado antes da infecção por WNV-VLP. Para comparar o efeito protetor desta transfecção com dsRNA em outro modelo de vírus, realizamos experimentos semelhantes com o uso de VSV. Observamos que, diferentemente

como descrito por Pitaluga *et al.* (2008), as dsRNA não foram capazes de induzir uma resposta antiviral previa contra o VSV (Figura 16). Isto pode ter ocorrido por características distintas dos diferentes vírus. A principal e mais marcante delas é a ausência de moléculas de dsRNA de origem viral durante a infecção por VSV. Além disso, o VSV apresenta um RNA de fita negativa como seu genoma, enquanto WNV apresenta uma fita de sentido positivo com a produção de dsRNA. Isto pode nos sugerir que o mecanismo de resposta antiviral inespecífica de células LL5 de *L. longipalpis* atue principalmente no reconhecimento e resposta a dsRNA. Sendo assim, em função da ausência deste tipo de molécula em infecções por VSV, em tese a transfecção de poly I:C mesmo ativando a resposta antiviral inespecífica, não traria nenhuma forma direta de proteção contra infecções por VSV.

O vírus VSV possui características interessantes quando se refere à produção de dsRNA. Assim, como alguns outros vírus de RNA fita simples de sentido negativo, não se detecta a produção de dsRNA e a presença viral geralmente é detectada por grupamentos trifosfato na extremidade 5' do RNA viral (Mueller *et al.*, 2010). Devido a isso, é de grande interesse os estudos sobre o funcionamento da resposta antiviral nas infecções produzidas por vírus de RNA de sentido negativo. Em células de *Drosophila* infectadas com o VSV foi demonstrado que apesar deste vírus não produzir dsRNA detectáveis a via de RNAi continua sendo importante defesa do inseto, pois ocorre uma aumento dos títulos virais quando genes da própria via são silenciados (Mueller *et al.*, 2010). Na resposta sequência-inespecífica observada em células LL5 de *L. longipalpis* não foi observado nenhuma produção de moléculas análogas ao interferon, a qual até o momento é desconhecida em insetos. Porém, em 2011, Paradkar *et al.* (2012) descreveram uma resposta a infecção viral, onde a proteína Vago atua como interferon-like, pois, além de estar sob regulação de Dicer 2, esta molécula é secretada para o meio extracelular e é responsável pela ativação da via Jak/Stat.

Em relação a resposta antiviral presente nos artrópodes, a via de RNAi tem sido implicada em diversos organismos como a principal resposta antiviral. Em *Drosophila*, esta via é um potente mecanismo de resposta contra os vírus, baseado em três linhas de evidencia. Primeiro, análise genética indicando que mutantes para via de RNAi apresentam uma hipersensibilidade a infecção viral, comprovado pelo aumento da replicação viral. Segundo, a identificação de supressores de RNAi (VSRs) e por último a presença de siRNA viral em células ou insetos infectados (van Rij *et al.*, 2006; Kemp & Imler, 2009). Em células S2 a via de RNAi possui uma função importante na defesa contra infecção viral, assim como também

foi descrito para a mosca adulta. Células infectadas com o vírus do Oeste do Nilo e silenciadas para o gene Argonauta 2 apresentaram uma maior susceptibilidade a infecção viral comparado ao controle (não silenciado) (van Rij *et al.*, 2006).

Com o propósito de determinar um perfil da resposta antiviral em células LL5 infectadas com o vírus VSV, nós avaliamos o perfil de expressão de alguns genes importantes já descritos na resposta antiviral de outros artrópodes. Dicer-2, uma endonuclease capaz de reconhecer dsRNA viral, não apresentou uma modulação significativa mediante a infecção (Figura 17A), o que parece razoável uma vez que este vírus não produz dsRNA. Dostert *et al.* (2005) em infecção de *Drosophila* com o vírus C de *Drosophila* (DCV) também observou que genes da via de RNAi, incluindo Dicer-2, não eram modulados. Por outro lado a importância de Dicer, e da via do RNAi, na resposta antiviral aos vírus que não produzem dsRNA é bem caracterizada. Mesmo não produzindo dsRNA, moscas deficientes para este gene apresentam um aumento dos títulos virais de VSV (Mueller *et al.*, 2010; Kemp *et al.*, 2013). Além disso, a indução de um gene importante na resposta antiviral, Vago, ocorre de forma dependente de Dicer, o que indica que esta enzima desempenha função dupla nas defesas antivirais, capaz de detectar e processar dsRNA como uma assinatura de infecções virais ativando a via de RNAi e de iniciar uma resposta antiviral independente desta via ativando Vago (Kemp & Imler, 2009; Vodovar e Saleh, 2012).

Outro gene analisado em nosso trabalho foi Vago, o qual é um peptídeo secretado que apresenta uma atuação de maneira semelhante aos interferons de mamíferos, pois regula a infecção ativando a via Jak-Stat, a qual possui um papel regulador sobre a expressão do gene Vir-1. Este gene é responsivo a infecções virais como já descrito para *Drosophila* (Deddouche *et al.*, 2008) e em *Culex* (Paradkar *et al.*, 2012). Em nossos experimentos o gene Vago apresentou uma modulação negativa 48 e 96 horas após a infecção com VSV (Figura 17B). Este resultado pode ser explicado como uma possível estratégia do vírus para escapar da resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, Paradkar *et al.* (2012) que identificaram o gene Vago em *Culex* observaram um aumento de sua expressão em 24 e 48 horas após a infecção com o WNV. Novamente, estas respostas diferentes foram observadas em vetores diferentes com diferentes vírus, dificultando o entendimento funcional de Vago a infecções virais em geral.

Assim como Dicer, o gene Stat, não apresentou modulação mediante infecção com VSV (Figura 17C). O reconhecimento de dsRNA virais por Dicer 2 ativa a produção de Vago,

o qual leva a ativação da via Jak/Stat, e esta por sua vez poderia levar o estado antiviral a células ainda não infectadas. A função de Vago proporciona uma conexão direta entre a via de RNAi e da via Jak/Stat o que implica uma coordenação deliberada dessas respostas (Kingsolver *et al.*, 2013). Já em outro modelo experimental, a via de sinalização Jak/Stat foi implicada na resposta antiviral de *Drosophila* infectada com o vírus DCV, onde este vírus foi capaz de induzir um aumento na expressão de genes que, em sua maioria, apresentam um sítio de ligação para o fator de transcrição Stat. (Dostert *et al.*, 2005). Um estudo recente com infecção por diversos vírus em moscas deficientes para a via de Jak/Stat demonstrou um aumento da susceptibilidade viral em moscas infectadas para o vírus DCV e CrPV, o que indica que uma resposta induzida para o controle da infecções virais dependente de Jak/Stat ocorre de forma vírus específica (Kemp *et al.*, 2013). Interessantemente, um dos vírus analisados que não apresentaram diferença em sua titulação mediante mutações para a via de Jak/Stat é o vírus VSV, sugerindo que a resposta antiviral desencadeada por este vírus em *Drosophila* não ocorra por esta via. Isto nos leva a crer que, devido a não modulação do fator de transcrição de Stat, em células LL5 a resposta antiviral para VSV não é eficiente, ou então exerça um papel menor por esta via.

Alguns vírus possuem supressores da via de RNAi (VSRs) que agem de diferentes formas, atuando em diferentes estágios da via e impedindo a sua ação sobre a expressão de genes virais. Com isso, mesmo com uma infecção presente nas células é possível que os genes da via de RNAi não sejam ativados devido ao efeito dos inibidores de RNAi que geralmente atuam de forma a não permitir o reconhecimento de dsRNA pelo complexo RISC ou inibindo seu funcionamento.

Nossos resultados sobre a expressão dos genes de imunidade antiviral, referentes a via de RNAi e a via Jak/Stat, indicam que não houve modulação de seus genes chaves já descritos como sendo essenciais da resposta antiviral em outros modelos estudados. Com isso, avaliamos o perfil de expressão de outros genes, como o peptídeo antimicrobiano (AMP) Defensina regulado pela via Toll, e um gene que participa no processo de autofagia, Atg18. Nas células LL5 infectadas com VSV, houve um aumento de Defensina 4 após 72 horas da infecção e uma diminuição após 96 horas (Figura 18). No que se refere a modulação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) mediante infecção viral, Souza-Neto *et al.* (2009) verificou a modulação negativa de dois AMPs, Defensina e Cecropina, em *A. aegypti* infectados com o vírus Dengue. Já em resposta a infecção com o vírus Sindbis, apresenta uma

regulação de dois AMPs, Atacina e Diptericina, onde mosca deficiente para estes genes resultou em um aumento da carga viral e em moscas deficientes para os fatores de transcrição Stat e Relish houve uma diminuição destes AMP, sugerindo regulação pelas vias Jak/Stat e Imd, respectivamente (Huang *et al.*, 2013).

Para o gene Atg18, foi observado que houve uma modulação positiva 24 horas após a infecção de até 30 vezes (Figura 19), indicando que a via de autofagia pode estar atuando como resposta antiviral nas células LL5 infectadas com VSV. Com o objetivo de corroborar os resultados observados com o gene Atg18, que é uma proteína central na via autofágica modulada por VSV em outros modelos (Shelly *et al.*, 2009), nós realizamos experimentos de microscopia de fluorescência com uma sonda de monodansil cadaverina (MDC), que é uma molécula autofluorescente a qual marca os autofagolisossomos por acumulo nesses vacúolos. Nossos resultados demonstraram que ocorre um aumento de MDC positivo nas células infectadas com VSV, 6 horas após a infecção, quando comparada aos grupos controle somente célula e mock (Figura 20). Células S2 de *Drosophila*, silenciadas para genes centrais da via de autofagia e posteriormente infectadas com VSV, apresentaram um aumento da replicação viral 24 horas após a infecção (Shelly *et al.*, 2009). A utilização deste marcador foi descrita em células de CHO de mamíferos, onde se verificou que a ativação da expansão dos autofagossomos é regulada pela privatização de aminoácidos (Munafó & Colombo, 2001). Também tem se mostrado eficiente em experimentos conduzidos em células e em *Trypanosoma cruzi* na investigação de autofagia causada por uma droga triazólica (Fernandes *et al.*, 2012).

A fim de melhor compreender o funcionamento da resposta inespecífica de LL5, realizamos transfecções de dsRNA sintéticos (poly I:C) e observamos o perfil de expressão dos mesmos genes analisados quando estas células foram infectadas com VSV. Em mamíferos o reconhecimento viral se dá principalmente pelo estrutura de dupla-fita de RNA, dando início a resposta antiviral baseada na expressão de interferon e genes relacionados. Portanto, em mamíferos não há necessariamente a obrigatoriedade do uso de partículas virais, para tal é comumente utilizado uma dsRNA quimicamente sintetizada, o ácido polyinosinico:polycitidinico ou somente poly (I:C). Este dsRNA consiste de trechos de homopolímeros complementares de inosina e citidina, é utilizado como molécula mimetizante da infecção viral. No entanto, como esta dsRNA é composta por um raro nucleotídeo (inosina) acredita-se que o mesmo não seja um total substituto de dsRNA viral (Gantier *et al.*,

2007). Com isso, ambos poly I:C e infecção viral devem ser abordados para se estudar uma via de imunidade antiviral.

A modulação na expressão dos genes da via de RNAi nas células transfectadas com poly I:C ocorreram de forma contrária as células infectadas com VSV, pois os genes Vago e Stat, apresentaram um aumento da sua expressão em resposta a dsRNA, com um aumento em 48 horas para Vago (Figura 17B) e em todos os pontos analisados após a transfecção para Stat (Figura 17C). Porém, para o gene de Dicer também não houve modulação (Figura 17A). O aumento de Vago em resposta a dsRNA ocorreu de forma contrária ao observado na literatura. Este gene tem sido descrito com expressão modulada positivamente em infecções virais, porém, sua modulação não se dá somente pela presença e processamento de dsRNA, mas também pela a replicação viral, o que sugere um mecanismo de regulação mais complexo (Vodovar & Saleh, 2012).

A presença de dsRNA nas células LL5 também foi capaz de regular positivamente os genes de Defensina 4 (Figura 18) em todos os pontos de análise e Atg18 um aumento de até 4 vezes 24 horas após a transfecção (Figura 19). A diferença entre os resultados de expressão para as células infectadas com VSV ou transfectadas com poly I:C demonstram que pode haver dois mecanismos distintos de reconhecimento e resposta. Apesar de poly I:C apenas mimetizar a infecção viral, a diferença básica entre estes dois modelos esta na presença ou não da dsRNA. Aparentemente, a dsRNA é o principal padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) mas não a única molécula viral a ser reconhecida. Isto pode ser observado durante a infecção por VSV, onde não há produção de dsRNA viral, porém a via de RNAi está funcional e reconhece o vírus levando a formação de siRNA de origem viral (Mueller *et al.*, 2010). O perfil de expressão de genes de imunidade por microarranjo em abelhas, que também já foi descrita como tendo uma resposta antiviral inespecífica, infectadas com o vírus Sindbis e transfectadas com diferentes dsRNA, incluindo poly I:C, demonstrou que poucos genes são modulados igualmente pelo vírus e dsRNA. De um total de 628 genes analisados, 382 são modulados unicamente por dsRNA, 171 pelo vírus Sindbis e somente 75 são genes compartilhados (Flenniken & Andino, 2013). Esta observação corrobora nossa hipótese de haver duas vias distintas de reconhecimento e controle das infecções virais.

A via de autofagia é um componente essencial na defesa dos hospedeiros contra infecção viral. O mecanismo de autofagia é altamente conservado em eucariotos unicelulares a metazoários. De forma geral, suas funções em organismos unicelulares incluem homeostase

energética e proteica e controle de qualidade de organelas. Os papéis antivirais que a autofagia pode exercer sobre os organismos consiste na degradação dos componentes virais intracitoplasmáticos, a ativação da sinalização imune inata pela entrega de ácidos nucleicos virais para receptores do tipo Toll, a ativação da imunidade adaptativa pela apresentação de antígenos virais ao complexo de MHC, a regulação da ativação de espécies reativas de oxigênio e a promoção da sobrevivência celular (Dong & Levine, 2013).

Durante e infecção viral, os potenciais indutores de autofagia incluem o processo de entrada ou replicação viral, componentes virais ou intermediários de montagem e seus derivados, aumento de energia requerida e perturbação da membrana plasmática (Dong & Levine, 2013). O papel da autofagia durante a infecção viral já foi descrito em *Drosophila* infectada com o vírus DCV, VSV e o vírus Sigma. Em *Drosophila* infectadas com o vírus VSV foi demonstrado por Shelly *et al.* (2009) que a proteína G do vírus (VSV-G) é o padrão de reconhecimento que induz o processo de autofagia, e esta via uma vez ativada diminui a replicação viral e sua repressão leva ao aumento dos títulos virais de forma independente da replicação viral. Posteriormente, Nakamoto *et al.* (2012) demonstraram que o receptor Toll-7 é o receptor de reconhecimento padrão responsável pelo reconhecimento da proteína VSV-G das superfícies dos vírus.

Em paralelo aos experimentos de infecção com as células LL5, também realizamos infecções em uma linhagem embrionária derivada de *A. aegypti* (Aag2). Nossos resultados demonstram um perfil de expressão viral diferente do que observamos em células LL5. Em Aag2 a quantidade do vírus foi maior do que observado nas células LL5 (Figura 22) e apresentou uma eficiência maior na infecção quando comparadas as células LL5 utilizadas como controle (Figura 24). Além disso, a transfecção de dsRNA antes da infecção com VSV proporcionou uma diminuição significativa do vírus em relação as células somente infectadas. Isto demonstra que nas células Aag2, dsRNA foi capaz de induzir uma resposta imune que levou o reconhecimento de VSV, o que não acontece para as células LL5. O trabalho com LL5 e WNV-VLP (Pitaluga *et al.*, 2008) também mostrou uma grande diferença na eficiência de infecção quando comparados com outra linhagem de mosquito C6/36. A ausência da ativação da atividade antiviral inespecífica nestas células não foi observada, posteriormente Brackney *et al.*, (2010) demonstrou a ausência do funcionamento da via de RNAi nestas células em função de uma mutação pontual em Dicer2. Assim, a existência de tal resposta inespecífica pode ser observada em células Aag2 que demonstram possuir todas as vias

imunes perfeitamente funcionais (Barletta & Sorgine, 2012). É possível haver uma susceptibilidade menor a infecções virais por parte dos flebotomíneos que pode ser mediada pela ativação de uma atividade antiviral presente nestes insetos. Isto sugere a ocorrência de diferenças na maneira pela qual mosquitos e flebotomíneos reconhecem e respondem ao mesmo vírus. Sendo naturalmente encontrado em flebotomíneos (Maroli *et al.*, 2013), o VSV pode ter co-evoluído com seu vetor no sentido de conseguir evadir suas defesas antivirais. O mesmo não aconteceria em um modelo artificial como Aag2 e VSV, onde aparentemente o VSV tem sua infectividade reduzida quando as células foram previamente transfectadas com dsRNA.

Análise do gene Stat em Aag2 infectadas com VSV demonstrou que, diferentemente de LL5, ocorre um aumento da expressão deste gene após 24 horas da infecção, o que sugere, mais uma vez, uma resposta antiviral diferente entre essas duas células durante a infecção com o vírus VSV. A ativação da via Jak/Stat foi implicada na ativação de resposta antiviral de forma vírus específica, onde mutantes de *Drosophila* para hop somente obteve intervenções sobre a replicação de alguns vírus. Foi demonstrado que infecções com diferentes vírus no mesmo modelo (*Drosophila*) apresentaram um perfil de expressão gênica diferente para cada um, por exemplo, para o gene de Vir-1, ocorre modulação positiva somente em moscas infectadas com DCV CrPV e FHV e não há modulação para os vírus Sindbis, VSV, vírus X de *Drosophila* (DXV) e para o vírus Iridescente de invertebrado tipo 6 (IIV-6) (Kemp *et al.*, 2013).

Desta forma, também deve-se levar em consideração a diferença que existe entre modelos experimentais distintos, pois as células hospedeiras e os tecidos respondem a desafios de forma diferente, principalmente em relação aos diversos tipos de infecções virais, com suas estratégias de replicação e expressão ou sua aquisição de supressores de defesa dos hospedeiros. Nestes casos, a resposta é complexa, e deve-se ter cuidado antes de generalizar os resultados obtidos com somente uma espécie de vírus. Além do que, as condições experimentais tornaram difícil identificar padrões na indução de vias específicas do sistema imune de forma consistente (Kemp *et al.*, 2013; Merkling & van Rij, 2013).

6 Conclusão

Em resumo, nossos dados revelam dois modelos de infecções eficientes com o vírus da Estomatite Vesicular em células LL5 de *L. longipalpis* e em células Aag2 de *A. aegypti* para o estudo da resposta antiviral. Comparação entre infecção com VSV e mimetização da infecção através da transfecção com dsRNA em LL5 demonstrou respostas imunes diferentes. Em LL5 infectadas não houve modulação positiva dos genes de Dicer, Vago ou Stat, enquanto que em transfecções com dsRNA pudemos observar um aumento da expressão de Vago e Stat. Porém, para os genes Defensina 4 e Atg18 obtivemos uma regulação positiva de ambos durante a infecção com VSV e transfecção com dsRNA. Em células LL5 o mecanismo de autofagia parece desempenhar um papel relevante. Para o gene Atg18, em especial, ocorreu um aumento de sua expressão de até 30 vezes durante a infecção com VSV, e, além disso, em experimento com o marcador MDC também observamos um aumento de células marcadas 6 horas após a infecção. Também observamos que em células Aag2 a infecção com VSV foi capaz de modular positivamente a expressão do gene Stat e que estas células apresentam um estado antiviral prévio contra VSV quando transfectadas com dsRNA antes da infecção com VSV, o que não ocorreu nas células LL5.

Podemos concluir com esses resultados que as células LL5 apresentam uma resposta antiviral a infecção com VSV diferente das células Aag2, e que nestas células a dsRNA é capaz de ativar uma resposta antiviral inespecífica contra VSV, diferentemente das células LL5. Também podemos sugerir que a resposta antiviral de LL5 contra infecção com VSV ocorra através do mecanismo de autofagia, pois, outros genes clássicos da via de RNAi e Jak/Stat (Dicer, Vago e Stat) não foram modulados positivamente neste modelo.

7 Perspectivas

Novos experimentos precisam ser realizados para melhor compreender o mecanismo de resposta antiviral em células LL5 infectadas com VSV. Nossas perspectivas para publicação deste trabalho consistem na repetição de experimentos de autofagia, para melhor avaliar este processo na resposta antiviral de LL5, avaliar a infecção das células infectadas com VSV através de marcação com anticorpo para este vírus. Também será necessário analisar a expressão de outros genes de resposta antiviral nas células Aag2 infectas com VSV, para que se possa verificar de forma mais consistente a resposta antiviral destas células.

Referências

Adelman ZN, Travanty EA, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD. Developing arbovirus resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002; 32:1333-1343.

Avadhanula V, Weasner BP, Hardy GG, Kumar JP, Hardy RW. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog.* 2009;5(9).

Barletta AB, Silva MC, Sorgine MH. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasit Vectors.* 2012 Jul 24;5:148.

Beaty BJ, Marquardt, WC. *The biology of disease vectors.* Colorado. Niwot: Colorado, 1996.

Bolling BG, Olea-Popelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology.* 2012; 427(2):90-7.

Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, Mudge J, Wilusz J, Olson KE, Blair CD, Ebel GD. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Oct 26;4(10):e856

Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995; 269: 1885–1888.

Charrel RN et al. Massilia Virus, A Novel Phlebovirus (Bunyaviridae) Isolated from Sandflies in the Mediterranean. *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2009; 9(5).

Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 1991; 254: 1388–1390.

Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol.* 2012 Nov; 55(3):191-203.

- Costa A, Jan E, Sarnow P, Schneider D. The Imd Pathway Is Involved in Antiviral Immune Responses in *Drosophila*. *PLoS One*. 2009; 4(10).
- Deddouche S, Matt N, Budd A, Mueller S, Kemp C, Galiana-Arnoux D, Dostert C, Antoniewski C, Hoffmann JA, Imler JL. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. *Nat Immunol*. 2008; 9(12):1425-32.
- Defuentes G, Rapp C, Imbert P, Durand JP, Debord T. Acute meningitis owing to phlebotomus fever Toscana virus imported to France. *J Travel Med*. 2005 Sep-Oct;12(5):295-6.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill*. 2010 Mar 11;15(10):19507.
- Dong X, Levine B. Autophagy and Viruses: Adversaries or Alliens?. *J Innate Immun*. 2013;5:480-493.
- Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL. Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol*. 2005; 6(9):946-53.
- Epelboin L, Hausfater P, Schuffenecker I, Riou B, Zeller H, Bricaire F, Bossi P. Meningoencephalitis due to Toscana virus in a French traveler returning from central Italy. *J Travel Med*. 2008 Sep-Oct;15(5):361-3.
- Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2012; 139(1):26-36.
- Flenniken ML, Andino R. Non-Specific dsRNA-Mediated Antiviral Response in the Honey Bee. *PLoS One*. 2013 Oct 10;8(10):e77263.
- Fritz JH, Girardin SE, Philpott DJ. Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE*. 2006; 13(339):27.

Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler JL. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat Immunol*. 2006; 7(6):590-597.

Geevarghese G, Arankalle VA, Jadi R, Kanojia PC, Joshi MV, Mishra AC. Detection of chandipura virus from sand flies in the genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh, India. *J Med Entomol*. 2005 May; 42(3):495-6.

Gantier MP, Williams BR. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18(5-6):363-71.

Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(2):94-108.

Gurav YK, Tandale BV, Jadi RS, Gunjekar RS, Tikute SS, Jamgaonkar AV, et al. Chandipura virus encephalitis outbreak among children in Nagpur division, Maharashtra, 2007. *Indian J Med Res*. 2010 Oct;132:395-9.

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002; 33(4):330-42.

Hensel SC, Rawlings JB, Yin J. Stochastic kinetic modeling of vesicular stomatitis virus intracellular growth. *Bull Math Biol*. 2009 Oct;71(7):1671-92.

Hirai M, Terenius O, Li W, Faye I. Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi*. *Insect Mol Biol*. 2004; 13: 399–405.

Hobson-Peters J, Yam AW, Lu JW, Setoh YX, May FJ, Kurucz N, et al. A new insect-specific flavivirus from northern Australia suppresses replication of West Nile virus and Murray Valley encephalitis virus in co-infected mosquito cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e56534.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011; 476(7361):454-7.

Huang Z, Kingsolver MB, Avadhanula V, Hardy RW. An antiviral role of antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication. *J virol*. 2013; 87(8):4272-80.

- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep.*, 2011; 12(6):508-18.
- Ikeda M, Yamada H, Hamajima R, Kobayashi M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology*. 2013; 435(1):1-13.
- Jacobs BL, Langland JO. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*. 1996; 219:339-349.
- Johnson JB, Lyles DS, Alexander-Miller MA, Parks GD. Virion associated complement regulator CD55 is more potent than CD46 in mediating resistance of mumps virus and vesicular stomatitis virus to neutralization. *J Virol*. 2012; 86(18):9929-40.
- Karabatsos N. International catalogue of arboviruses. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* San Antonio, 1985.
- Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; *Togaviridae*) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:17240-17245.
- Kemp C, Imler JL. Antiviral immunity in *Drosophila* *Current Opinion in Immunology*. 2009; 21:3-9.
- Kemp C, Mueller S, Goto A, Barbier V, Paro S, Bonnay F et al. Broad RNA interference-mediated antiviral immunity and virus specific responses in *Drosophila*. *J Immunol*. 2013; 190(2):650-8.
- Kim JJ, Lee H, Shin DM, Kim W, Yuk JM, Jin HS, et al. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell Host Microbe* 2012;11:11.
- Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. *J Mol Biol*. 2013 Oct 9. doi:pii:S0022-2836(13)00632-3.
- Levy DE, Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001; 12:143-156.

- Liu J, Smagghe G, Swevers L. Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori*. *J Insect Physiol.* 2013; 59: 646–654.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
- Llewellyn ZN, Salman MD, Pauszek S, Rodriguez LL. Growth and molecular evolution of vesicular stomatitis serotype New Jersey in cells derived from its natural insect-host: evidence for natural adaptation. *Virus Res.* 2002; 89(1):65-73.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013; 27(2):123-47.
- Marques JT, Kim K, Wu PH, Alleyne TM, Jafari N, Carthew RW. Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Jan;17(1):24-30.
- Merkling SH, van Rij RP. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J Insect Physiol.* 2013; 59(2):159-70.
- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico: situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. 2013. 44:1.
- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde: Núcleo de Comunicação. Número de casos graves de dengue cai no país. 2012.
- Mueller S, Gausson V, Vodovar N, Deddouche S, Troxler L, Perot J et al. RNAi-mediated immunity provides strong protection the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(45):19390-5.
- Munafó DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size amino acid deprivation. *J Cell Sci.* 2001; 114(20):3619-29.
- Nakamoto M, Moy RH, Xu J, Bambina S, Yasunaga A, Shelly SS, Gold B, Cherry S. Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. *Immunity.* 2012; 36(4):658-67.

- Novella IS, Hershey CL, Escarmis C, Domingo E, Holland JJ. Lack of evolutionary stasis during alternating replication of an arbovirus in insect and mammalian cells. *J Mol Biol.* 1999; 287(3):459-65.
- Obbard DJ, Jiggins FM, Halligan DL, Little TJ. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes. *Curr. Biol.* 2006; 16(6):580-5.
- Palacios G, Travassos da Rosa A, Savji N, Wick I, Guzman H, Lipkin I. Aguacate virus, a new antigenic complex of the genus Phlebovirus (family Bunyaviridae). *Journal of General Virology.* 2011; 92:1445–1453.
- Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, Xi Z. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)- dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 3:109(1).
- Paradkar PN, Trindade L, Voysey R, Duchemin JB, Walker P. Secreted Vago restricts virus infection in *Culex* mosquito cells activating the Jak-STAT pathway. *Proc. Natl Acad Sci USA,* 2012;109(46):18915-20.
- Peleg J. Growth of arboviruses in primary tissue culture of *Aedes Aegypti* embryos. *Am J Trop Med Hyg.* 1968 Mar;17(2):219-23.
- Peyrefitte CN, Grandadam M, Bessaud M, Andry PE, Fouque F, Caro V, et al. Diversity of *Phlebotomus perniciosus* in Provence, Southeastern France: Detection of Two Putative New Phlebovirus Sequences. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013 Sep;13(9):630-6.
- Pitaluga AN, Mason PW, Traub-Cseko YM. Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Dev Comp Immunol.* 2008; 32(3):191-7.
- Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Farias JRO, Dávila AMR, Souza AA, Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko YM. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected gut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol. Genet. Genom.* 2009; 282: 307–317.

Rancès E, Johnson TK, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Zakir T, Warr CG, O'Neill SL. The Toll and Imd pathways are not required for Wolbachia mediated dengue virus interference. *J Virol.* 2013; Nov;87(21):11945-9.

Rangel, EF, Lainson, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(7):937-954.

Rao BL, Basu A, Wairagkar NS, Gore MM, Arankalle VA, Thakare JP, et al. A large outbreak of acute encephalitis with high fatality rate in children in Andhra Pradesh, India, in 2003, associated with Chandipura virus. *Lancet.* 2004; 364(9437):869-74.

Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev. Entomol.* 2013;58:227-50.

Robalino J, Browdy CL, Prior S, Metz A, Parnell P, Gross P, Warr G. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology.* 2004; 10442–10448.

Saleh MC, Tassetto M, van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, et al. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature.* 2009; 458(7236):346-50.

Scholle F, Girard YA, Zhao Q, Higgs S, Mason PW. Trans-Packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. 2004. *J Virol.* 78:11605-11614.

Shelly S, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Cherry S. Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity.* 2009; 30(4):588-98.

Shimabukuro PHF, Tolezano JE, Galati EAB. Chave de identificação ilustrada dos *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Pap. Avulsos Zool.* 2011; 51(27):399-441.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009; 106(42):17841-6.

Stephan JS, Herman P. The regulation of autophagy in eukaryotic cells: do all roads pass through Atg1? *Autophagy* 2006; 2:2.

Travassos da Rosa APA, Shope RE, Pineiro FP. Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: Uren, MF, Blok J, Manderson LH. (Ed.). *Proceedings fifth symposium on arbovirus research in Australia*. Brisbane: University of Queensland Medical School 1989; 4-8.

Tandale BV, Tikute SS, Arankalle VA, Sathe PS, Joshi MV, Ranadive SN, et al. Chandipura virus: a major cause of acute encephalitis in children in North Telangana, Andhra Pradesh, India. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):118-24.

Tesh RB, Modi GB. Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses. *J Med Entomol*. 1983; (20):199–202.

Tufan ZK, Tasyaran MA. Sandfly Fever: A Mini Review. *Viol Mycol*. 2013; 2:109.

van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Frentiu FD, McElroy K, Day A, Higgs S, O'Neill SL. Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(11):e1892.

van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Antoniewski C, Andino R. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 2006; 20(21):2985:95.

Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact public health. 2011; 13:9(7):532-41.

Vasilakis N, Forrester NL, Palacios G, Nasar F, Savji N, Rossi SL et al. Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *J Virol*. 2013; 87(5):2475-88.

Vodovar N, Saleh MC. Of Insects and Viruses: The Role of Small RNAs in Insect Defence. *Advances in insect physiology*. 2012; 42.

Voronin D, Cook DA, Steven A, Taylor MJ. Autophagy regulates Wolbachia populations across diverse symbiotic associations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 19;109(25):E1638-46.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008 Jul 4;4(7):e1000098.

Waldock J, Olson KE, Christophides GK. *Anopheles gambiae* antiviral immune response to systemic O'nyong-nyong infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1565.

Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, Carthew R, Atkinson P, Ding SW. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*. 2006; 312:452-454.

Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*. 2009; 85(2):328-45.

Westenberg M, Heinhuis B, Zuidema D, Vlak JM. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Research*. 2005; 114:133–139.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(7):518:28.

World Health Organization. Geographical distribution of visceral leishmaniasis in the Old and New world. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. WHO technical report series. 2010; 949.

World Health Organization. World Malaria Report. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>.

World Health Organization. Media centre: Yellow fever. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>.

Wu J, Randle K, Wu LP. *ird1* is a Vps15 homologue important for antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Cell Microbiol* 2007;9:12.

Yano T, Kurata S. Intracellular recognition of pathogens and autophagy as an innate immune host defence. *J Biochem.* 2011 Aug;150(2):143-9.

Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, et al. Autophagic control of *Listeria* through intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. *Nat Immunol* 2008;9:8.

Ye YH, Woolfit M, Rancès E, O'Neill SL, McGraw EA. Wolbachia-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8).

Zelé F, Nicot A, Duron O, Rivero A. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. *J Evol Biol.* 2012; 25(7):1243-52.

Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ et al. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 1998; 37: 10757–10765.